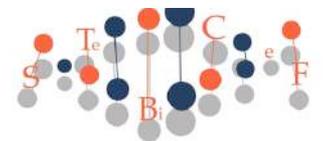




UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Biotechnologies for Human Health and Blue Growth
Cod. C1-1.1-9 CUP B76H18000180005 -
2016 - PICO - 0031



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

RELAZIONE ASSEGNO PER LA COLLABORAZIONE AD ATTIVITÀ DI RICERCA (TIPOLOGIA B)

“Caratterizzazione delle attività biologiche
degli estratti ottenuti dagli scarti ittici”.

PO INTERREG V-A ITALIA MALTA progetto BYTHOS
“Biotechnologies for Human Health and Blue Growth” - cod. C1-1.1-9-
CUP: B76H18000180005

DOTT. MARCO CHIARAMONTE



Negli ultimi anni l'aumento della richiesta di pesce per il consumo umano, ha portato a una crescita esponenziale sia della quantità di allevamenti e imprese ittico-conserviere, sia ad un aumento della quantità di scarti di lavorazione del pesce che ovviamente devono essere smaltiti (Poppe et al., 2002).

È stato stimato che, in alcuni casi, oltre il 60% dei tessuti del pesce, comprese pinne, teste, pelle e visceri, vengono conferiti in discarica, in quanto considerati dalle industrie come "scarti" della lavorazione del pesce e senza alcun valore economico. Questo si traduce, a livello globale, in una produzione di circa 65.2 milioni di tonnellate di scarti che rappresentano un fattore negativo sia per le aziende, poiché hanno un costo di smaltimento non poco indifferente, sia per l'impatto ambientale che generano (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008).

Infatti, un aspetto da non sottovalutare, è legato all'impatto ambientale che i rifiuti ittici potrebbero avere sugli ecosistemi acquatici, poiché il rilascio di una gran massa organica nell'ambiente, potrebbe cambiare significativamente la struttura della comunità e la biodiversità del benthos (Gowen, R. & Bradbury, 1988).

Nonostante il basso valore abitualmente attribuito ai sottoprodotti della pesca, da questa enorme fonte di risorse non utilizzate, vi è ancora un gran margine di manovra per l'estrazione di una notevole pletora di materiali con proprietà bioattive e/o biocompatibili quali enzimi, collagene, gelatine, olii, astaxantine, chitine, bioplastiche con ampie applicazioni in campo farmaceutico, nutraceutico, biomedico e biotecnologico (Arvanitoyannis and Kassaveti, 2008; Caruso G, 2016; Fao, n.d.; Thilagar and Samuthirapandian, 2020). Inoltre, potrebbero anche essere utilizzati come componenti per la produzione di mangimi per le "fish farm", in quanto, tra i possibili composti bioattivi estratti dai sottoprodotti della lavorazione del pesce, vi sono le proteine e gli olii, ricchi di acidi grassi polinsaturi (PUFA), in particolare acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA), che sono particolarmente interessanti per il loro alto valore commerciale (García-Hernández et al., 2013; Ghaly et al., 2013) (Perea et al., 1993)

La maggior parte dei mangimi che sono utilizzati nell'acquacoltura sono costituiti da una miscela di diversi ingredienti formulati appositamente per la specie ittica di interesse ed il suo stadio di accrescimento, anche se, gli ingredienti chiave nella mangimistica per acquacoltura sono le proteine, scelte perché facilmente digeribili, e i grassi sotto forma di olii ed in particolare di acidi grassi poli-insaturi Omega-3 (Ghaly et al., 2013). Nel 2012, circa 15 milioni di tonnellate di pesce pescato/lavorato sono state utilizzate per la produzione di farina e olio di pesce, e circa il 60% della farina di pesce e l'80% dell'olio di pesce, proveniente dalla produzione totale mondiale, sono stati utilizzati per la formulazione di mangimi per l'acquacoltura (Olsen et al., 2014).

DOTT. MARCO CHIARAMONTE

Queste percentuali tenderanno ad aumentare per supportare la crescita dell'acquacoltura nel mondo (Péron et al., 2010). Infatti, si stima che nel 2025, la farina di pesce prodotta da rifiuti di pesce, rappresenterà il 38% della produzione mondiale di mangimi, rispetto al 29% del livello medio dal 2013-2015 (Fonte: *Institute of Aquaculture, University of Sterling and IFFO, July 2016*).

Un altro importante ruolo degli scarti della produzione ittica, come già in precedenza accennato, è quello sostenuto dalla produzione di gelatine.

GELATINE

Le gelatine di origine animale sono prodotte tramite estrazione in soluzione acquosa a caldo dei tessuti connettivi, principalmente di suini e bovini, per idrolisi e costituiscono un ingrediente prezioso in molti settori industriali, alimentare, farmaceutico, cosmetico, biomedico.



Figura 1 Grafico esemplificativo della produzione di gelatina nel mondo

Infatti, la gelatina costituisce un alimento naturale e sano con notevole valore nutrizionale e apporta numerosi benefici al nostro organismo, considerando che possiede ben 9 dei 10 amminoacidi essenziali. Inoltre possiede altre interessanti caratteristiche: è un alimento che non ha alcun potenziale allergizzante; alimento ipocalorico, privo di grassi e di zuccheri; facilmente digeribile; Nell'industria alimentare, è utilizzata come agente addensante, stabilizzante, emulsionante, schiumogeno, legante e chiarificante, e, a differenza di molte altre sostanze che vengono identificate come "additivi alimentari", la gelatina è considerata un vero e proprio ingrediente, non comportando quindi alcuna limitazione.

Le gelatine sono utilizzate anche in altri settori industriali, oltre quello alimentare, basti pensare all'impiego in campo farmaceutico per la formulazione di capsule molli e pastiglie, oppure in

campo biomedico per la produzione di particolari dispositivi medici che facilitano i processi di riparazione tissutale.



Figura 2 Prodotti commerciali a base di gelatina

Altri settori industriali che utilizzano le gelatine per produrre prodotti commerciali, sono l'industria cosmetica, con creme facciali, lozioni per il corpo, shampoo, spray per capelli, creme solari, e l'industria nutraceutica, con integratori a base di gelatina bovina o suina, per il miglioramento del benessere generale.



Figura 3 Prodotti cosmetici a base di gelatina.



Figura 4 Prodotti nutraceutici a base di gelatina

A oggi, seppur ampiamente diffuse nel mondo e utilizzate in diversi settori della produzione, le gelatine, di origine bovina e suina, trovano ancora diversi ostacoli nella diffusione e utilizzo per motivi religiosi. Per esempio nei paesi a maggioranza di fede musulmana o ebraica, in osservanza delle loro credenze, è assolutamente vietato mangiare la carne di suino, e tantomeno i suoi derivati (le gelatine). Così come per gli induisti è severamente vietato il consumo di carne di bovino.

Inoltre, negli anni 80 vi fu una profonda crisi delle gelatine nel settore alimentare, poiché scoppio nel Regno Unito un'epidemia (Encefalopatia Spongiforme Bovina o BSE, meglio conosciuta come "morbo della mucca pazza") che colpì in maniera devastante gli allevamenti di carni bovine fece.

Anche se, il Comitato di Coordinamento Scientifico (SSC) europeo e la Gelatine Manufacture of Europe (GME), associazione che tutela i produttori e i consumatori di quest'alimento, confermarono che il rischio di trasmissione del patogeno attraverso il consumo di gelatine bovine è quasi nullo, in quanto il processo di produzione era sufficiente a garantire l'eliminazione dell'agente eziologico, resta sempre una certa diffidenza in questi prodotti alimentari.

BIOPLASTICHE

Un altro importante settore industriale, nel quale si utilizzano scarti provenienti da diversi settori (es. agro-alimentare), è il mondo della produzione di Bio-plastiche. Quest'ultime rappresentano una piccola parte della grande famiglia delle plastiche e hanno avuto un significativo tasso di crescita negli ultimi anni, soprattutto in prospettiva di sostituire le plastiche inquinanti, presenti oggi sul mercato, con plastiche biodegradabili e compostabili, di origine rinnovabile.



Figura 5: Bioplastiche ottenute da scarti agricoli.

Differenti bioplastiche sono state prodotte tramite incorporazione di polimeri naturali nelle formulazioni convenzionali, attraverso sintesi chimica o per fermentazione microbica (Tsang et al., 2019). La ricerca di plastiche biodegradabili di origine naturale o biologica ha spinto sempre più la comunità scientifica a esplorare le caratteristiche di nuove fonte di materiali di partenza che possano servire a tale scopo.

DOTT. MARCO CHIARAMONTE

Le bioplastiche possono essere suddivise in due gruppi, definiti “Bio-based” e “Bio-degradable” (Jariyasakoolroj et al., 2019).

Le prime sono prodotte a partire da risorse rinnovabili, quali amido, cellulosa, glutine, acido polilattico (PLA), I poli-idrossialcanoati (PHA). In ogni caso, tutte queste tipologie di plastiche non sono necessariamente biodegradabili. Per esempio, il bio-polietilene (Bio-PE), il bio-polipropilene (Bio-PP) e il bio-polietilenteraftalato (Bio-PET), che non sono biodegradabili, prodotti a partire da risorse rinnovabili, quali zucchero di canna, mais e manioca (Jariyasakoolroj et al., 2019).

Al contrario, le bioplastiche prodotte da amido, da cellulosa e acido polilattico sono biodegradabili a seguito di reazioni di ossidazione e fotodegradazione. In ogni caso la velocità di degradazione dipende essenzialmente dalle caratteristiche del materiale che determinano, quindi, anche l’efficienza di compostabilità.

In questa situazione globale, il progetto Bythos, nato dalla cooperazione tra Italia e Malta, ha come scopo principale il recupero e la trasformazione degli scarti delle imprese ittiche conserviere, siciliane e maltese, in prodotti ad alto valore aggiunto, come molecole bioattive, collagene, gelatine, elementi per le formulazioni di mangimi, bio-plastiche, che andrebbero persi per gli elevati costi a cui vanno incontro le aziende.



In particolare, all’interno delle attività progettuali, il materiale di scarto che qualitativamente non è adatto all’estrazione di molecole bioattive, sarà utilizzato per la formulazione di un mangime innovativo che sarà testato su esemplari di spigola e orata nell’allevamento Maltese.

Il mangime sarà formulato tenendo conto dei corretti equilibri nutrizionali e potrà essere arricchito di sostanze immunostimolanti di origine fungine. La formulazione mangimistica che otterrà il migliore indice di accrescimento sarà oggetto di protezione intellettuale.

Durante il primo anno di progetto di ricerca, volto a validare la possibilità di estrarre, dagli scarti di pesce, principi attivi di possibile interesse economico per l’industria farmaceutica, cosmetica,

DOTT. MARCO CHIARAMONTE

nutraceutica, mangimistica e non solo, abbiamo messo a punto un processo iniziale di analisi della qualità dello scarto ittico, proveniente da diverse zone di produzione della Sicilia e di Malta, prima di essere processato per l'estrazione di molecole.

In particolar modo, i primi campioni conferiti all'Università di Palermo, presentavano grosse problematiche; in termini di volume (oltre i 20Kg), con difficoltà nella conservazione e nel processo di lavorazione; nella composizione del campione, di cui solo 10% rappresentava scarti di pesce; nell'identificazione, in quanto, non presentavano alcuna documentazione sull'origine dello scarto, il luogo di raccolta, il metodo di conservazione e di trasporto (Figura 1).



Figura 6: Campionamento errato da parte del personale.

A tal proposito, una volta analizzato i punti critici dell'iniziale campionamento, abbiamo definito una serie di parametri di controllo qualità, nella fase di raccolta, etichettatura, trasporto e stoccaggio, che sono stati trasferiti al personale addetto, per migliorare e ottimizzare tale processo (Figura 2).



Figura 7: Campionamento idoneo.

In seguito, in accordo con le decisioni del partenariato guidate dall'esplorazione del mercato di riferimento, ci siamo concentrati su tre diverse tipologie di scarto ittico (Figura 3); uno scarto eterogeneo/multispecie; uno scarto omogeneo/monospecie di *Engraulis encrasicolus*, la comune acciuga; uno scarto omogeneo/monospecie di *Thunnus thynnus*.

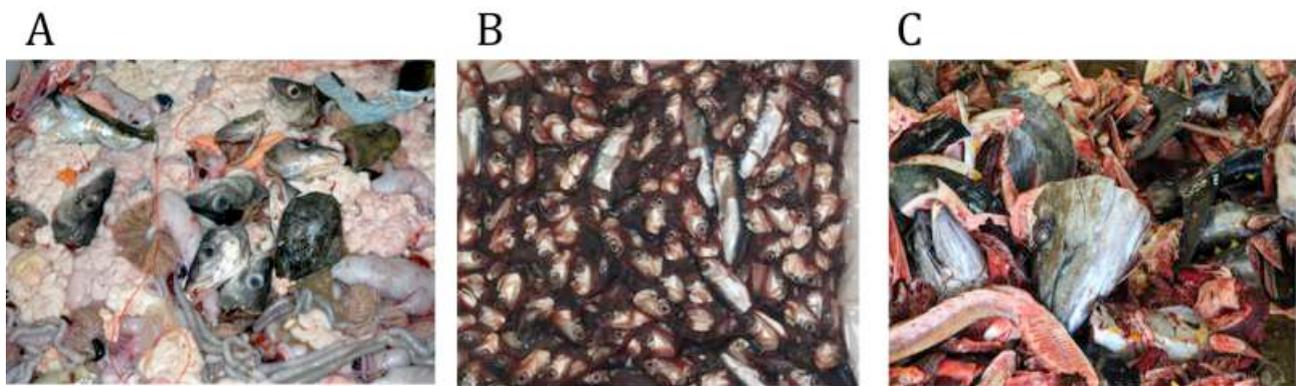
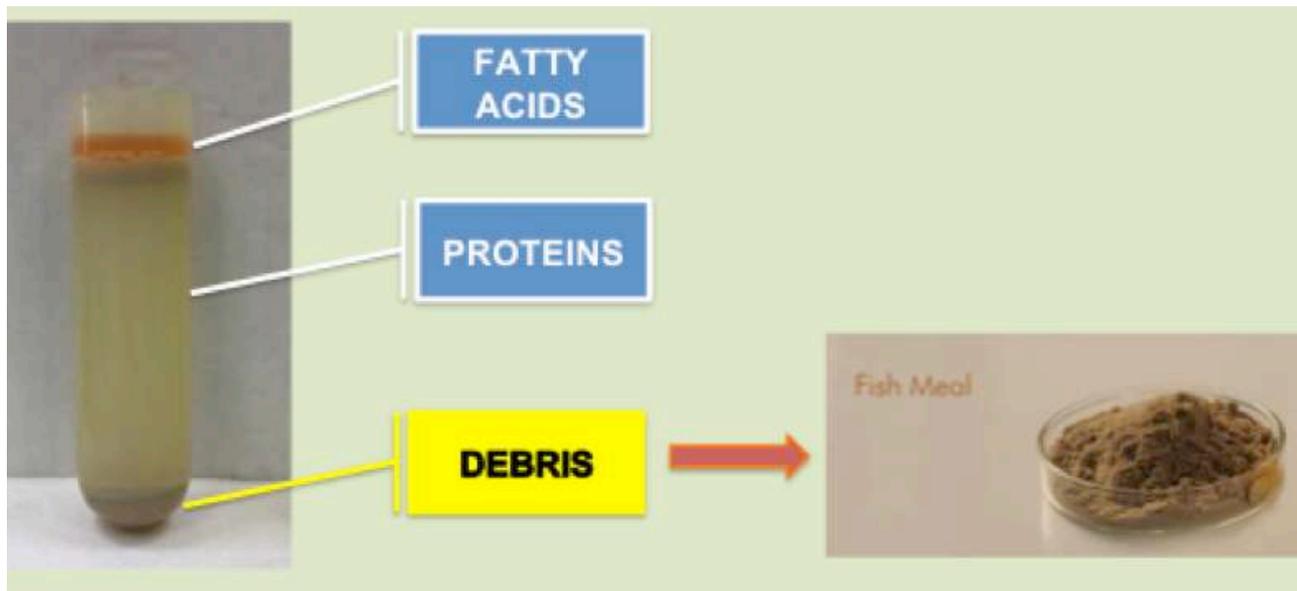


Figura 8: Diverse tipologie di scarto ittico; A: Scarto misto; B: Scarto di acciuga; C: Scarto di tonno.

Dopo aver definito le tipologie di scarto da utilizzare, abbiamo definito il processo di estrazione di molecole bioattive e di produzione della farina di pesce.

Tale processo si articola su due passaggi; nel primo passaggio, necessario e propedeutico alla seconda fase, si omogeneizza il campione, tramite specifico macchinario, lo si porta a ebollizione e lo si fa sedimentare. In seguito a questo trattamento preparatorio, si ottengono tre fasi, una fase liquida idrofoba, costituita da acidi grassi e olii, una fase liquida idrofila, costituita da proteine, e una fase solida, costituita dai detriti.



Nel secondo passaggio, la fase liquida idrofila è stata recuperata e processata per l'estrazione di molecole bioattive antimicrobiche, grazie a protocolli consolidati da tempo nel laboratorio del Prof. Arizza (Schillaci et al., 2014, 2013, 2012; Spinello et al., 2018), mentre la fase liquida idrofoba è stata recuperata e inviata al Dipartimento di Chimica per la caratterizzazione degli acidi grassi presenti. L'ultima fase, quella solida, è stata recuperata e processata per la produzione di farina di pesce. In particolare, è stata trattata termicamente al fine di rimuovere la quasi totalità dell'acqua in esso contenuta, passando da valori del 50-60% a un contenuto idrico del 5-10%.

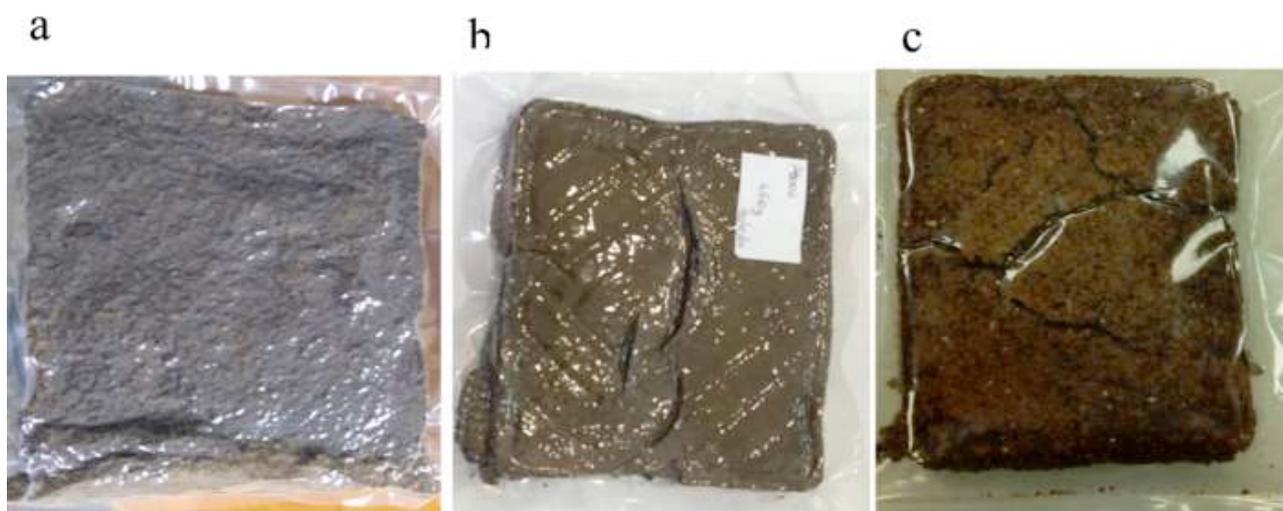


Figura 9 Diverse tipologie di fish meal prodotto; a: da scarto misto; b: da scarto di acciuga; c: da scarto di tonno.

Il successivo passo è stato quello di caratterizzare la composizione amminoacidica (Tabella 1).

Le analisi dei livelli di aminoacidi essenziali sono di fondamentale importanza per la formulazione di un mangime “equilibrato”, capace di sostenere lo sviluppo e l’accrescimento dell’animale da allevare, negli impianti di acquacoltura, in modo controllato e standardizzato.

AmminoAcidi	Media std	Media AA	Rapporto aree
Alanina	6,05E+08	3,33E+09	5,51
Valina		7,39E+08	1,22
Isoleucina		4,69E+08	0,78
Leucina		1,03E+09	1,70
Glicina		4,84E+09	7,99
Prolina		3,11E+09	5,14
Ac. Aspartico		1,47E+09	2,43
Treonina		7,77E+08	1,28
Metionina		7,03E+08	1,16
Ac. Glutammico		6,57E+08	1,09
Serina		6,18E+08	1,02
Lisina		9,82E+08	1,62
Fenilalanina		1,08E+09	1,79
Arginina		3,02E+09	4,99

Tabella 1 Caratterizzazione amminoacidica della farina di pesce dallo scarto eterogeneo.
In rosso gli aminoacidi essenziali. In rosso gli AA essenziali.

Tali dati andranno confermati e ripetuti anche per gli altri lotti di farina di pesce, cercando di massimizzare la qualità di tali prodotti, apportando specifiche variazioni al protocollo di produzione. Questo avverrà con l’ausilio dei partner maltesi che sovrintendono alla fase di formulazione specifica del “fish pellet”, grazie al quale potranno essere avviata la sperimentazione in vasca di acquacoltura, prevista per il successivo anno.

Un altro “deliverable” progettuale, conseguito in laboratorio, è stato realizzato attraverso la separazione della componente proteica dai tessuti osseo-connettivali e la conseguente prototipazione di terreni di coltura cellulari batterici.

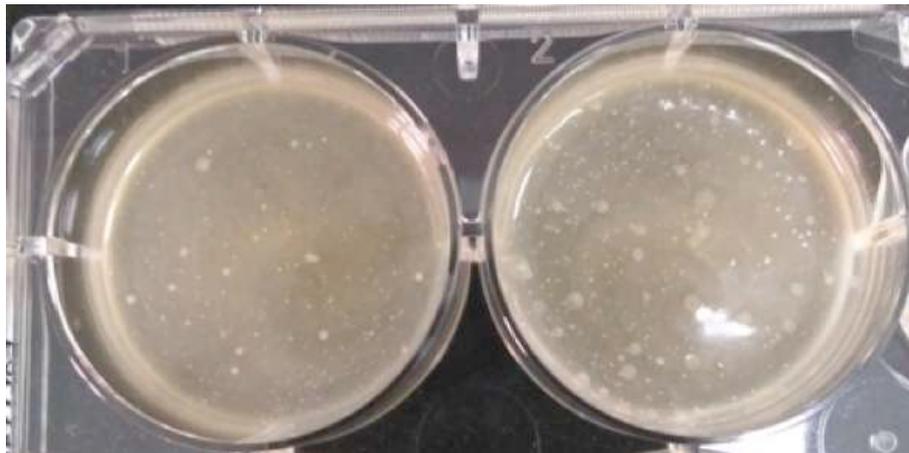


Figura 10: Prototipazione di un terreno di coltura batterica, a partire da scarti ittici.

Inoltre, abbiamo ipotizzato, per tale prodotto, anche un possibile uso come terreno di coltura per cellule staminali totipotenti, quale quello rappresentato in figura 11.



Figura 11: Terreno di coltura per cellule murine, contenente 0,1% di gelatina in acqua sterile.

Le bio-plastiche, che abbiamo precedentemente descritto quali materiali innovativi, biodegradabili, in costante crescita e dal forte interesse economico, sono state oggetto di interesse progettuale.

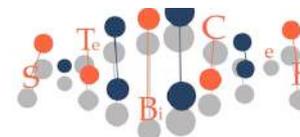
Per tal motivo, siamo riusciti a elaborare un protocollo di produzione di bio-plastiche utilizzando le componenti polipeptidiche degli scarti ittici.

In particolare, abbiamo strutturato due protocolli di produzione di bio-plastiche che si differenziano per la tipologia di proteine estratte dal “fish waste”. Entrambi sono ancora in fase di definizione, anche se i primi risultati sono molto incoraggianti.



Figura 12: Bio-plastica prodotto proteine estratte da Fish Waste

Sono altresì necessarie ulteriori conferme delle attività descritte, l'ottimizzazione dei protocolli, la validazione delle formulazioni mangimistiche, tramite sperimentazione in vivo, per raggiungere l'obiettivo "Zero Waste" prefissato dal progetto BYTHOS.



Bibliografia:

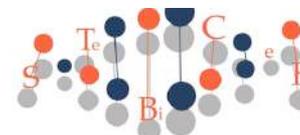
- Arvanitoyannis, I.S., Kassaveti, A., 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 726–745. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x
- Caruso G, 2016. Fishery Wastes and By-products: A Resource to Be Valorised, *Journal of FisheriesSciences.com* Journal abbreviation: *J Fisheriessciences.com*.
- Fao, n.d. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans Trends and prospects.
- García-Hernández, V.M., Gallar, M., Sánchez-Soriano, J., Micol, V., Roche, E., García-García, E., 2013. Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 993–1000. doi:10.3109/09637486.2013.812619
- Ghaly, A., Ramakrishnan VV, Brooks MS, Budge SM, 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Amin. Acids Oils A Crit. Rev. J Microb Biochem Technol* 5, 107–129. doi:10.4172/1948-5948.1000110
- Gowen, R. & Bradbury, N., 1988. The ecological impact of salmonid farming in coastal waters: a review. *Deep Sea Res. Part B. Oceanogr. Lit. Rev.* 35, 572. doi:10.1016/0198-0254(88)92716-1
- Jariyasakoolroj, P., Leelaphiwat, P., Harnkarnsujarit, N., 2019. Advances in research and development of bioplastic for food packaging. *J. Sci. Food Agric.* doi:10.1002/jsfa.9497
- Olsen, R.L., Toppe, J., Karunasagar, I., 2014. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends Food Sci. Technol.* 36, 144–151. doi:10.1016/J.TIFS.2014.01.007
- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I., Serra, J.L., 1993. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 418–23. doi:10.1016/0141-0229(93)90129-p
- Péron, G., François Mittaine, J., Le Gallic, B., 2010. Where do fishmeal and fish oil products come from? An analysis of the conversion ratios in the global fishmeal industry. *Mar. Policy* 34, 815–820. doi:10.1016/J.MARPOL.2010.01.027
- Poppe, T.T., C. Barnes, A., Midtlyng, P.J., 2002. Welfare and Ethics in Fish Farming, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.
- Schillaci, D., Cusimano, M., Cunsolo, V., Saletti, R., Russo, D., Vazzana, M., Vitale, M., Arizza, V., 2013. Immune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. *AMB Express* 3, 35. doi:10.1186/2191-0855-3-35
- Schillaci, D., Cusimano, M.G., Spinello, A., Barone, G., Russo, D., Vitale, M., Parrinello, D., Arizza, V., 2014. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *AMB Express* 4, 78. doi:10.1186/s13568-014-0078-z
- Schillaci, D., Vitale, M., Cusimano, M.G., Arizza, V., 2012. Fragments of beta-thymosin from the sea urchin *Paracentrotus lividus* as potential antimicrobial peptides against staphylococcal biofilms. *Thymosins Heal. Dis.* 1270, 79–85. doi:10.1111/J.1749-6632.2012.06652.X
- Spinello, A., Cusimano, M.G., Schillaci, D., Inguglia, L., Barone, G., Arizza, V., 2018. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of a Recombinant Fragment of β -Thymosin of Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Drugs* 16. doi:10.3390/md16100366
- Thilagar, G., Samuthirapandian, R., 2020. Chitosan from crustacean shell waste and its protective role against lead toxicity in *Oreochromis mossambicus*. *Toxicol. Reports* 7, 296–303. doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.006



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Biotechnologies for Human Health and Blue Growth
Cod. C1-1.1-9 CUP B76H18000180005 -
2016 - PICO - 0031



DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE
BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE (STEBICEF)

Tsang, Y.F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y.S., Song, H., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Jeon, Y.J., 2019. Production of bioplastic through food waste valorization. Environ. Int. 127, 625–644. doi:10.1016/J.ENVINT.2019.03.076

PALERMO

24/02/2020

Marco Chiaramonte

DOTT. MARCO CHIARAMONTE