



## **Manual for omega oil production from locally sourced fish residues**

Extraction procedures for omega oils

 **Interreg  
Italia-Malta**  
**Bythos**

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale  
European Regional Development Fund



### **Abstract**

Bythos has produced a manual for the extraction of oils 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](http://www.BythosEU.com)



@BythosEU



Page: BythosEU



bythoseu

## Manual for collagen extraction from locally sourced fish residues

### *OLIO DI PESCE DAL MARE RIFIUTI DI LAVORAZIONE: USI CORRENTI E PRODOTTI*

#### Farina e olio di pesce come alimenti per animali

L'industria internazionale delle farine e dell'olio di pesce è una delle principali fonti di occupazione in tutto il mondo. Questo settore è di cruciale importanza per la piscicoltura, l'agricoltura, il benessere degli animali, la nutrizione umana e il settore della pesca in generale.

Il cascame di pesce, ricco di proteine, è utilizzato come materia prima nell'alimentazione animale sin dalla fine del XIX secolo. Oggi dagli scarti ittici si ricava la farina di pesce che viene utilizzata nella formulazione di mangimi utilizzati in acquacoltura. Sul mercato mondiale la farina di pesce è commercializzata a prezzi elevati; di conseguenza, sviluppando il know-how per trasformare gli scarti ittici in farina di pesce, le comunità di pesca avrebbero l'occasione di ricavare maggiori entrate rispetto alla semplice vendita della materia prima. Occorre notare, tuttavia, che per competere in un settore altamente concorrenziale, in termini sia di volume che di qualità i nuovi operatori dovranno intraprendere un arduo processo di apprendimento.

La farina di pesce è un composto granulare (più o meno palpabile) ottenuto dalla lavorazione del pesce di piccola taglia o dalle carcasse di grossi pesci.

La materia prima di partenza è costituita da tre frazioni: solidi, olio e acqua. Scopo del processo di produzione è separare queste frazioni nel modo più completo possibile, con la minore spesa energetica, ottenendo al tempo stesso un prodotto di elevata qualità. In linea di principio il processo è semplice ma richiede macchinari specifici e notevole abilità ed esperienza per ottenere un alto rendimento e un'alta qualità del prodotto.

L'olio di pesce si ottiene durante il processo produttivo della farina di pesce a uso zootecnico. Circa il 10% di quest'olio viene invece venduto all'industria dell'Omega-3 per essere ulteriormente trattato fino a divenire olio di pesce Omega-3 purificato e altamente concentrato da utilizzare come integratore e nell'industria alimentare. L'olio al 30% o 18/12 standard è così suddiviso:

1. 30% Grassi Omega-3 o approssimativamente 18% EPA e 12% DHA
2. 30% Grassi saturi
3. 30% Grassi monoinsaturi
4. 10% Altri grassi come l'Omega-6 e il colesterolo

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]

## 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.

## Olio di pesce – protocollo di estrazione

L'olio di pesce è la frazione lipidica estratta dai pesci e dagli scarti. In generale, gli oli di pesce sono più complessi degli oli degli animali terrestri o degli oli vegetali a causa degli acidi grassi insaturi a catena lunga [37]. L'olio di pesce è diverso dagli altri oli principalmente a causa della varietà unica di acidi grassi contenuti incluso l'acido grasso insaturo di alto livello (omega-3FFA e Omega-6FFA) che sono essenziali per il corpo. Questi sono noti come acido icosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA). Gli oli di pesce raffinati, infatti, sono ricchi di grassi polinsaturi come l'omega-3. L'olio di pesce è importante non solo per la sua applicazione nei prodotti alimentari, ma anche per applicazioni industriali, come la concia delle pelli, la produzione di prodotti farmaceutici, cosmetici, vernici, sapone, glicerolo e altri prodotti [37].

Il consumo di acidi grassi omega-3 derivati dall'olio di pesce ha dimostrato di aiutare a mantenere la salute umana, in particolare quello dell'apparato cardiovascolare [38]. I benefici sono evidenti grazie alla diminuzione dei disturbi infiammatori, renali, diabete, cirrosi, cataratta, glaucoma, ulcera gastrica, pancreatite, asma, dislessia, eczema, obesità, debolezza delle ossa, artrite reumatoide, fibrosi cistica, anemia falciforme e per prevenire la perdita di peso causata da alcuni farmaci antitumorali [39]. Ma forse gli effetti più importanti in futuro saranno lo sviluppo neurologico e la salute mentale, compresa la funzione cognitiva [40]. Con l'importante attività di EPA e DHA come componente del cervello e del tessuto nervoso, e in particolare nello sviluppo di questi organi, l'inclusione di acidi grassi omega-3 ha un ruolo importante nell'ultimo trimestre di gravidanza e nell'alimentazione infantile [41–43].

Ciascuno dei metodi di estrazione dell'olio come la pressatura idraulica, l'estrazione con il calore, l'estrazione con solvente e metodi relativamente nuovi, innovativi ed ecologici come l'estrazione con fluidi supercritici, l'estrazione enzimatica, l'estrazione con microonde o ultrasuoni [37,44], presenta vantaggi, variazioni di progettazione, dimensioni operative, implicazioni tecniche, costi, sicurezza del personale e affidabilità. L'olio può essere estratto in diversi modi. Comuni a tutti i metodi di importanza pratica sono le seguenti fasi di elaborazione:

- Il riscaldamento, che coagula le proteine, rompe i depositi di grasso e libera l'olio e l'acqua legata chimicamente;
- Pressatura o centrifugazione, che rimuove una grande frazione dei liquidi dalla massa;
- Separazione dell'estratto in olio e acqua. Questo passaggio può essere omesso se il contenuto di olio del pesce è inferiore al 3%;

Per ottenere l'olio di pesce è stato applicato il seguente protocollo:

I campioni di testa e muscolo di salmone (1 kg ciascuno) sono stati lasciati a scongelare per una notte a 4°C e poi tritati con un tritacarne IKA MF 10 (Figura 1) e successivamente omogenati tramite un omogenizzatore ad alta velocità ultraturrax IKA T25 digital con sonda da dispersione S 25 NK – 19 G (Figura 2).



Figura 1 - Tritacarne IKA MF 10



Figura 2 – Ultraturrax IKA T25 digital

L'omogenato è stato diluito successivamente con acqua distillata ad un rapporto di 1:1. L'estrazione dell'olio è stata eseguita a due temperature 50°C e 90°C per 15, 30, 45, e 60 minuti.

L'omogenato dopo la il trattamento termico è stato filtrato per ottenere la frazione liquida e successivamente centrifugato a 10,000 g a 4°C in un rotore ad angolo variabile in una centrifuga Beckman J6-M (

Figura 3) per separare la componente acquosa da quella oleosa.



Figura 3 – Centrifuga Beckman J6-M

Nella Figura 4 è mostrato il risultato della centrifugazione dell'omogenato dove si distinguono superiormente la fase oleosa, segue, in posizione intermedia, la fase acquosa ed infine, sul fondo della provetta la componente insolubile che è passata dalla filtrazione.

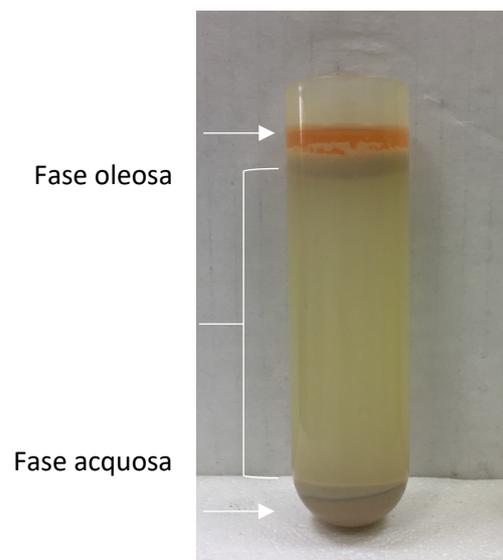


Figura 4 - Separazione delle componenti dell'estratto di testa di salmone

Le analisi eseguite per caratterizzare chimicamente gli estratti sono state eseguite seguendo i protocolli AOAC 2005, AOAC 1995, IUPAC 1987 [45–47].

Riferendoci alla sola fase oleosa, in Figura 9 è mostrato la percentuale di olio alle due temperature e ai diversi tempi presente nel peso secco della fase.

Nelle Figura 5 e Figura 6 sono mostrati, in percentuale il contenuto in ceneri, grassi e proteine nel peso secco delle tre fasi ottenute dopo centrifugazione degli omogenati prodotti a 95°C per 60 minuti di trattamento, rispettivamente, di testa e muscolo di salmone.

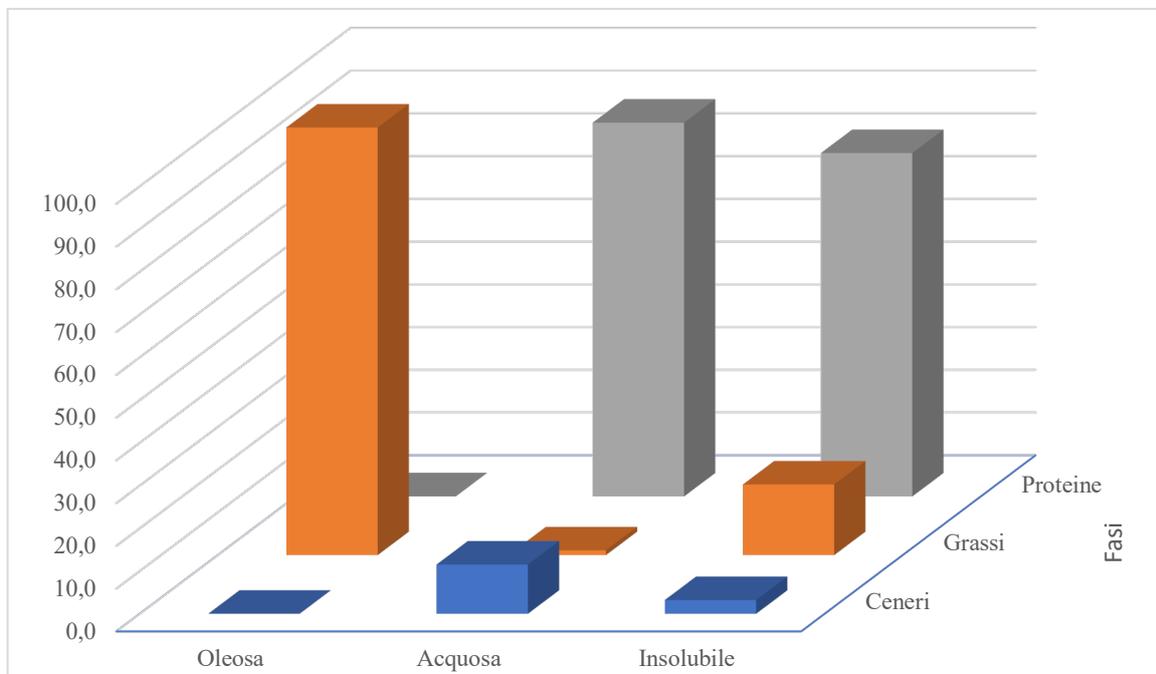


Figura 5 – Composizione chimica delle varie fasi dell'estratto di testa di salmone

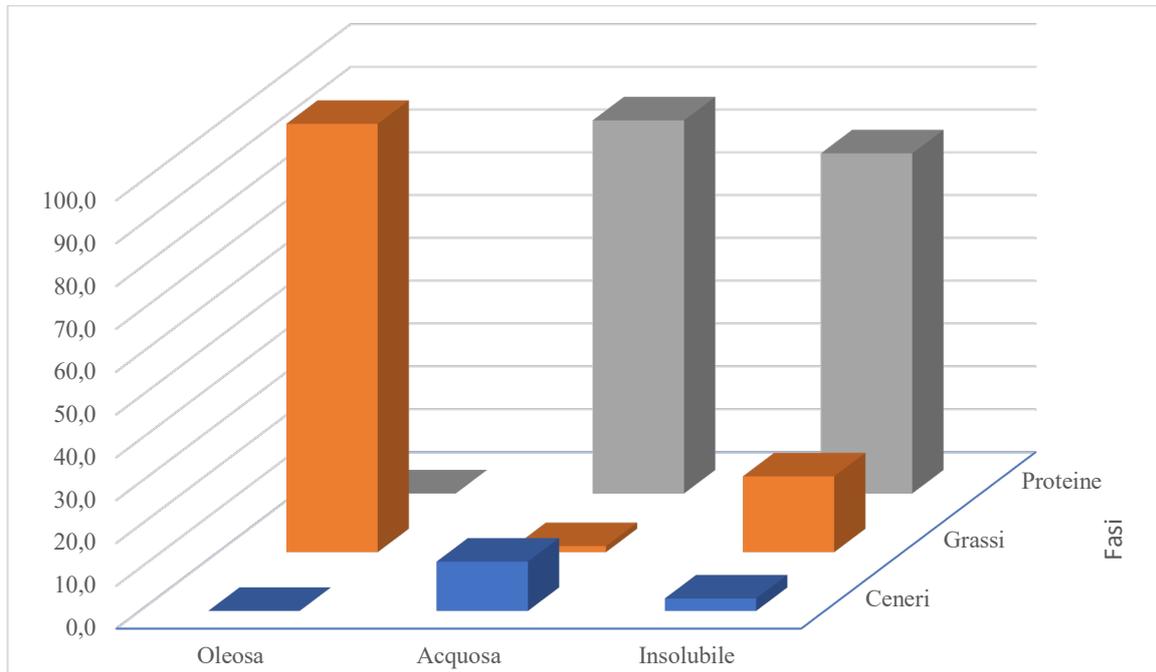


Figura 6 - Composizione chimica delle varie fasi dell'estratto di muscolo di salmone

Come si può notare dalla comparazione dei grafici, la percentuale delle componenti non ha significative differenze.

La fase oleosa isolata si presenta come un olio colorato per via dei carotenoidi presenti in abbondanza nei tessuti del salmone. Quello proveniente dal muscolo (Figura 7) è più colorato rispetto quello che deriva dalla testa (Figura 8).



Figura 7 - Fase oleosa estratta da muscolo di salmone



Figura 8 - Fase oleosa estratta dalla testa intera di salmone

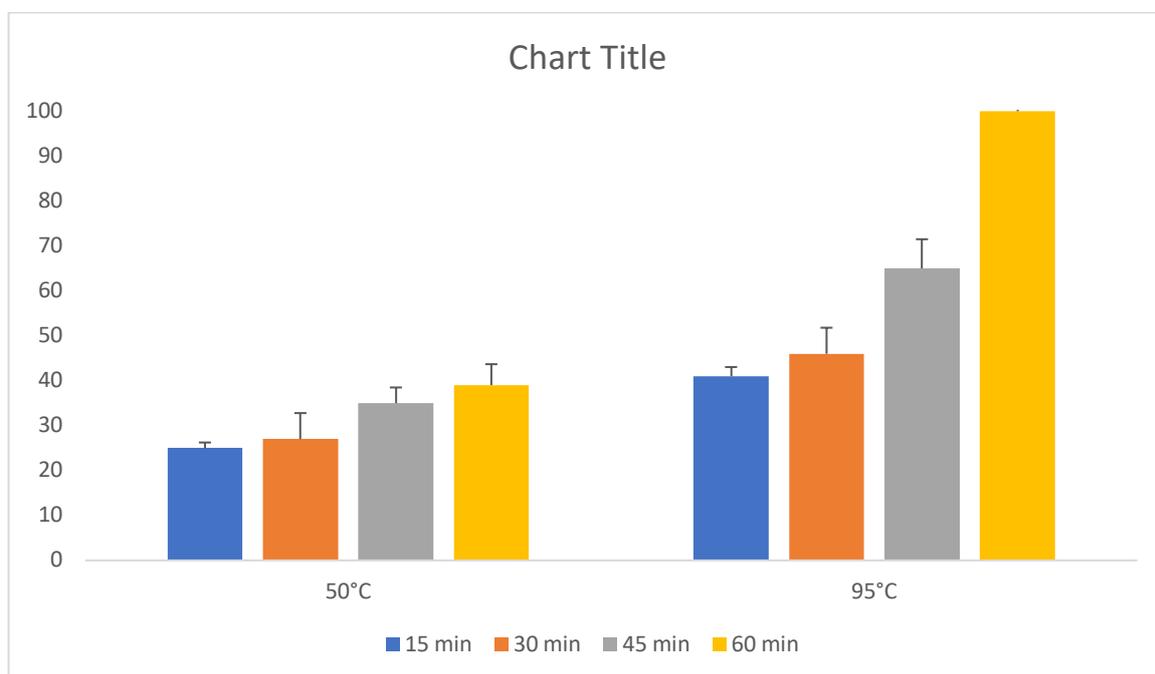


Figura 9 – Olio di pesce nel peso secco della fase oleosa alle due temperature e ai vari tempi di incubazione

Nelle tabelle Tabella 2 e Tabella 3 sono riportati i risultati delle analisi chimiche per caratterizzare la componente in acidi grassi.

Tabella 2 - Composizione degli acidi grassi della fase oleosa nell'estratto di testa di salmone			
Nome IUPAC	Nome commerciale	R.T	% Relativa $\pm$ D.S
C14:0	Acido miristico	9.59	2.56 $\pm$ 0.29
C14:1 $\Delta^9$	Acido miristoleico	9.74	0.03 $\pm$ 0.01
C15:0	Acido pentadecanoico	10.05	0.14 $\pm$ 0.12
C16:0	Acido palmitico	10.33	9.57 $\pm$ 0.38
C16:1 $\Delta^9$	Acido palmitoleico	10.49	1.39 $\pm$ 1.59
C16:2 $\Delta^{9,12}$	Acido 9,12-esadecadienoico	10.65	0.13 $\pm$ 0.06
C17:0	Acido margarico	10.73	0.2 $\pm$ 0.03
C17:1 $\Delta^{10}$	Acido cis-10-eptadecenoico	10.80	0.16 $\pm$ 0.14
C17:1 $\Delta^8$	Metil 8-eptadecanoato	10.85	0.13 $\pm$ 0.04
C18 :0	Acido stearico	10.95	0.54 $\pm$ 0.6
C18:1 $\Delta^9$	Acido oleico	11.05	39.47 $\pm$ 2.57
C18:2 $\Delta^{9,12}$	Acido linoleico	11.25	14.56 $\pm$ 0.19
C18:2 $\Delta^{12,15}$	Acido 12,15-ottadecadienoico	11.38	0.09 $\pm$ 0.01
C18:3 $\Delta^{6,9,12}$	Acido 6,9,12-ottadecadienoico	11.45	2.13 $\pm$ 3.4 9
C18:3 $\Delta^{6,9,12}$	Acido linolenico	11.50	4.46 $\pm$ 3.2
C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	Acido stearidonico	11.62	0.59 $\pm$ 0.5

C20:0	Acido eicosanoico	11.81	2.25±3.36
C20:1 $\Delta^{11}$	Acido gondonico	11.87	4.02±3.45
C20:2 $\Delta^{8,11}$	Acido 8,11-eicosadienoico	12.01	0.58±0.91
C20:2 $\Delta^{11,14}$	Acido cis-11,14-eicosatrienoico	12.06	1.27±0.84
C20:3 $\Delta^{8,11,14}$	Acido 8,11,14-eicosatrienoico	12.16	0.39±0.26
C20:3 $\Delta^{11,14,17}$	Acido 11,14,17-eicosatrienoico	12.28	0.82±0.08
C20:4 $\Delta^{8,11,14,17}$	Metil 8,11,14,17-eicosatetranoato	12.36	1.53±0.80
C20:5 $\Delta^{8,11,14,17}$	Acido timnodonico (EPA)	12.45	1.90±1.42
C22:0	Acido docosanoico	12.63	1.57±2.64
C22:1 $\Delta^{13}$	Acido erucico	12.69	3.33±2.88
C22:2 $\Delta^{13,16}$	Acido cis-13,16-docosadienoico	12.99	0.26±0.12
C22:5 $\Delta^{4,7,10,14,16}$	Metil 4,7,10,14,16 docosapentanoato	13.34	0.45±0.61
C22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$	Acido clupanodonico (DPA)	13.51	2.03±1.17
C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	Acido cervonico (DHA)	13.65	2.78±2.04
C24:0	Acido tetracosanoico	13.75	0.12±0.10
C24:1 $\Delta^{15}$	Acido cis-15-tetracosenoico	13.88	0.29±0.24

Tabella 3 - Composizione degli acidi grassi della fase oleosa nell'estratto di testa di salmone

Nome IUPAC	Nome commerciale	T	% Relativa ± D.S
C14:0	Acido miristico	10.10	2.28±0.04
C16:0	Acido palmitico	10.84	11.44±0.16
C16:16 $\Delta^9$	Acido palmitoleico	10.91	3.24±0.24
C18:0	Acido stearico	11.52	2.34±0.12
C18:16 $\Delta^9$	Acido oleico	11.56	53.58±0.72
C18:26 $\Delta^{9,12}$	Acido linoleico	11.70	15.43±0.37
C18:36 $\Delta^{9,12,15}$	Acido linolenico	11.89	5.91±0.10

C20:1 $\Delta^{11}$	Acido cis-11eicosenoico	12.34	5.75±0.99
---------------------	-------------------------	-------	-----------

Come è possibile notare dalle tabelle Tabella 2 e Tabella 3, nella fase oleosa sono presenti l'acido linoleico, alfa linolenico, l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5,  $\omega$ 3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6,  $\omega$ 3) che compongono la serie dei lipidi essenziali omega 3.

Nella fase proveniente dal muscolo di salmone gli acidi grassi più rappresentati sono l'Acido oleico (**Error! Reference source not found.**) (39.47±2.57), l'Acido linoleico Figura 11 (14.56±0.19), le stesse componenti si ritrovano maggiormente concentrati nella fase oleosa della testa l'Acido oleico (53.58±0.72), l'Acido linoleico (15.43±0.37).

### L'acido Oleico

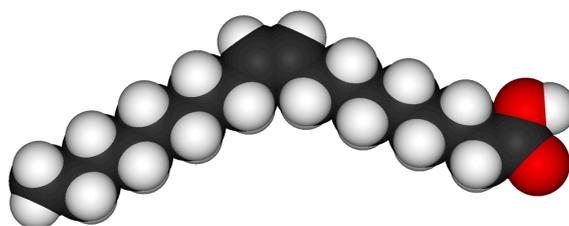


Figura 10 - Acido Oleico

È un acido grasso che si trova naturalmente in vari grassi e oli animali e vegetali. È un olio inodore e incolore, anche se i campioni commerciali possono essere giallastri. In termini chimici, l'acido oleico è classificato come acido grasso omega-9 monoinsaturo, abbreviato con un numero lipidico di 18:1 *cis*-9. Ha la formula  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  [48]. Il nome deriva dalla parola latina oleum, che significa olio ed è l'acido grasso più comune in natura. L'acido oleico è un comune grasso monoinsaturo nella dieta umana. Il consumo di grassi monoinsaturi è stato associato a una riduzione dei livelli di colesterolo, rischio di aterogenesi [49], rigetto al trapianto [50], pressione arteriosa e assunzione giornaliera di farmaci anti ipertensivo [51].

Inoltre è stato dimostrato che l'acido oleico induce effetti benefici anti-infiammatori sulle malattie autoimmuni [52,53], effetto protettivo sul cancro al seno e miglioramento della funzione del sistema immunitario [54–58].

## L'acido Linoleico



Figura 11 - Acido Linoleico

L'acido linoleico (del gruppo  $\omega 6$  o n-6) è un acido grasso insaturo presente in natura nella carne bovina, nei prodotti caseari e negli oli come l'olio di soia. L'acido linoleico è un acido grasso omega-6, il che significa che è insaturo, con un doppio legame che si verifica al sesto atomo di carbonio dall'estremità omega della molecola  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ .

L'acido linoleico è uno dei due acidi grassi essenziali (l'altro è l'acido  $\alpha$ -linolenico (alfa, del gruppo  $\omega 3$  o n-3). Questi acidi grassi vengono considerati "essenziali" perché l'organismo non è in grado di produrli autonomamente. E' infatti essenziale qualunque nutriente che l'organismo deve introdurre dall'ambiente circostante.

Con questi due nutrienti a disposizione, l'organismo è in grado di ricavare altri composti, con funzioni specifiche o metabolicamente diversi.

Com'è facilmente deducibile, i derivati appartengono al gruppo degli  $\omega 3$  se provengono dall'acido alfa linolenico e al gruppo degli  $\omega 6$  se provengono dal gruppo dell'acido linoleico.

Tra i vari derivati  $\omega 3$  originati dal metabolismo dell'acido alfa linolenico, i più attivi e importanti sono l'acido eicosapentaenoico o EPA (20:5) e l'acido docosaesaenoico o DHA (22:6).

Questa trasformazione è mediata da un enzima chiamato  $\Delta$ -6-desaturasi, la cui attività catalitica diminuisce con l'invecchiamento, in caso di alcolismo, dieta ipoproteica, iperglicemia e trattamento con farmaci glucocorticoidi (cortisone).

Per questo motivo, anche se le fonti alimentari di acido alfa-linolenico sono molto importanti, è bene valutare pure il contenuto percentuale di EPA e DHA.

I compiti di queste molecole sono ben diversi; infatti, giocano un ruolo fondamentale in molti tessuti, ad esempio:

Partecipano alla costituzione delle membrane cellulari.

Permettono la sintesi di alcune sostanze dette eicosanoidi bioregolatori (o "superormoni") coinvolti nella modulazione di importanti reazioni cellulari come l'infiammazione.

Soprattutto in condizioni patologiche, favoriscono il ripristino dei parametri metabolici come la pressione sanguigna, la colesterolemia, la trigliceridemia e i danni arrecati dall'iperglicemia ecc.

Di conseguenza, proteggono dall'aterosclerosi, dalle trombosi e dalle embolie che scatenano eventi infastidi di natura vascolare (ischemie cardiache, cerebrali ecc).

Supportano la funzione cognitiva e proteggono dalla degenerazione del sistema nervoso.

Garantiscono il mantenimento della funzione visiva.

Possono agire positivamente sulla depressione \*. Esercitano uno stimolo positivo sullo sviluppo embrionale e sull'accrescimento del bambino.

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.

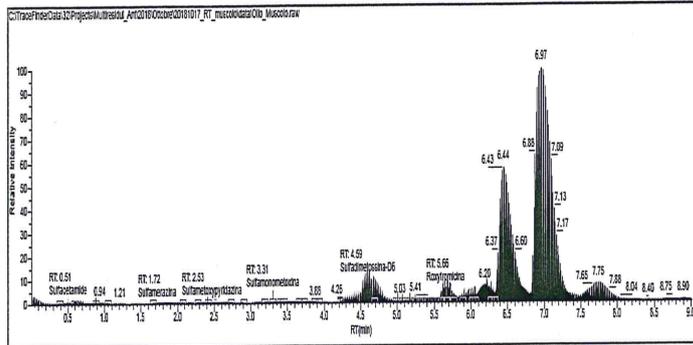
I risultati sono mostrati nelle seguenti immagini

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
Norfloxacin-D5	3.37	281.336 m/z	110	25,000	25,000	
Demeclociclina	3.51	430.100 m/z	184	25,000	25,000	
Sulfadimetossina-D6	4.59	156.000 m/z	69049	25,000	25,000	
Penicillina G-D7	5.88	160.000 m/z	7773	25,000	25,000	
Roxitromicina	5.66	157.842 m/z	36830	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-L&LOQ;I=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  
 Calli File: 20181017\_RT\_muscolo.calli

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	
	Sulfaguandina	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
	Eptitetraciclina	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
	EgyOxytetraciclina	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
	Sulfactropiridazina	N/F 156.078 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
	Norfloxacina	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
	Enrofloxacina	3.59 318.289 mz	186	Linear	0.000	0.166 0.166
	Danofloxacina	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
	Orbitofloxacina	N/F 352.170 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Epicortetetraciclina	N/F 98.100 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Difloxacina	N/F 299.204 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Sarafloxacina	N/F 299.264 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Sulfeterazolo	N/F 158.239 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Clortetetraciclina	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
	Sulfacimetossina	N/F 156.118 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F

Flag Legend: LOD<LLOQ)=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.call

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	
	Oxolinic Acid	4.82 244.230 mz	14155	Linear	0.000	-5.856 -5.856
	Sulfachinossolina	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
	Nalidixic 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
	Piperacillina	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
	Nadifloxacinina	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
	Clarithromycin	N/F 158.220 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Dicloxacillina	N/F 160.000 mz	N/F	Linear	0.000	N/F N/F
	Natillina	5.91 115.000 mz	28768	Linear	0.000	151.037 151.037

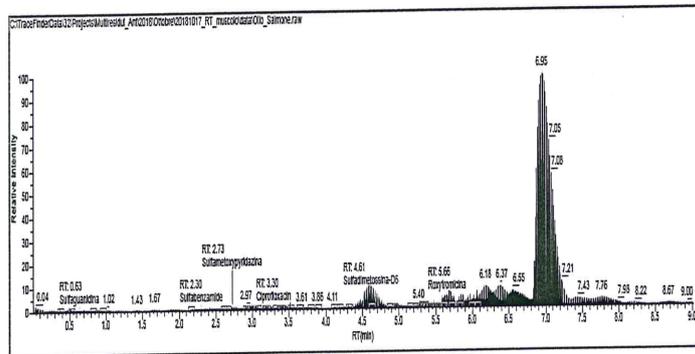
Flag Legend: LOD<math><LLOQ</math>=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated; Bordered cell = Manually integrated.

Figura 12 – 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  
Calli File: 20181017\_RT\_muscolo.calli

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
Norfloracin-D5	NIF	281.336 m/z	NIF	NIF	NIF	
Dermecidocina	3.44	430.100 m/z	158	25.000	25.000	
Sulfadimetossina-D6	4.61	156.000 m/z	32197	25.000	25.000	
Penicilina G-D7	NIF	160.000 m/z	NIF	NIF	NIF	
Roxitromicina	5.66	157.942 m/z	28569	25.000	25.000	

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

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

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: Residii ES  
 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	
	Sulfaguanidina	0.63 156.000 mz	1537	Linear	0.000 6.461	6.461
	Sulfafiazolo	N/F 108.128 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfafiazina	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	N/F 156.078 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	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	N/F 108.088 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Pipemidic Acid	N/F 217.000 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfabenzamide	2.3 108.000 mz	149	Linear	0.000 -1.39	-1.39
	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
	Sulfametyloxypiridazina	2.73 156.000 mz	1741	Linear	0.000 -2.826	-2.826
	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
	Sulfacoropiridazina	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
	Otloxacin	3.09 318.200 mz	1291	Linear	0.000 2.316	2.316
	Oxytetraciclina	N/F 201.200 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfamethovazolo	3.03 155.980 mz	1478	Linear	0.000 -6.962	-6.962
	Norfloxacin	N/F 233.238 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	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	N/F 156.118 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Enrofloxacin	N/F 316.289 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Danofloxacin	N/F 283.252 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Lomefloxacina	3.53 265.100 mz	239	Linear	0.000 1.829	1.829
	Sulfosovazolo	N/F 156.030 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Orbifloxacina	N/F 352.170 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Epioritetraciclina	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 299.264 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Sulfafenazolo	4.28 156.239 mz	4998	Linear	0.000 -2.669	-2.669
	Cioritetraciclina	N/F 275.000 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F
	Cinoxacin	4.18 245.300 mz	1174	Linear	0.000 -10.579	-10.579
	Sulfadimetossina	N/F 156.118 mz	N/F	Linear	0.000 N/F	N/F

Flag Legend: LOD<|<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 Z77  
 User: COMPUTER  
 Batch: 20181017\_RT\_muscolo

Method: 20181017\_RT\_muscolo\_Antibiotici\_Multiresiduo  
 Antibiotici\_Multiresiduo  
 Cali File: 20181017\_RT\_muscolo.cali

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	Sulfachiossalina	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	2491	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	1099	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	Nafcillina	115.000 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; P=Limit Of Reporting; b=Blank; s=Solvent flag; est=Estimated;  
 Bordered cell = Manually integrated.

Figura 13 – 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](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  $\omega$ -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.aejrs.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 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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<sup>+</sup>, (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](http://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  $\beta$ -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](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  $\alpha$ -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. Kołodziejaska, 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.



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO