

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Estrazione enzimatica di prodotti ad alto valore aggiunto dagli scarti di lavorazione del tonno in scatola



Relatori

prof.ssa Tonia Tommasi
dott.ssa Silvia Fraterrigo Garofalo

Candidato

Enrico Marco Arba

A.A. 2020-2021

Sommario

1. Introduzione	3
2. Materiali e Metodi	11
2.1. Prodotti chimici	11
2.2. Preparazione del Campione di Pesce	11
2.3. Saggio Bradford	12
2.4. Attività Enzima	13
2.5. Determinazione dell'azoto totale nel campione di tonno	14
2.6. Design Of Experiments (DOE)	14
2.7. Estrazione Enzimatica	16
2.8. Determinazione dell'olio	17
2.9. Quantificazione del grasso totale presente nel campione di pesce	18
2.10. Determinazione di Omega-3	18
2.11. Indice di Solubilità-TCA	19
2.12. Cinetica e grado di idrolisi	19
2.13. Determinazione attività antiossidante	19
3. Risultati	21
3.1. Analisi Preliminari	21
3.2 Resa dell'Estrazione Enzimatica	22
3.3 Omega-3	27
3.4 Indice di Solubilità-TCA e attività antiossidante	30
3.5 Cinetica	32
4. Conclusioni	36
5. Bibliografia	37
6. Ringraziamenti	39

1. Introduzione

Le società umane stanno affrontando l'enorme sfida di fornire cibo e mezzi di sussistenza ad una popolazione, che entro il 2050 supererà i 9 miliardi di persone, fronteggiando al contempo gli impatti sproporzionati dei cambiamenti climatici e il degrado ambientale delle risorse di base. L'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite e i suoi 17 obiettivi di sviluppo sostenibile (Sustainable Development Goals, SDGs) offrono un approccio unico, trasformativo e integrativo che non lasci indietro nessuno. L'alimentazione e l'agricoltura sono argomenti fondamentali nell'intera serie di SDG, in particolare l'SDG 14 (Conservare e utilizzare in modo sostenibile gli oceani, i mari e le risorse marine per lo sviluppo sostenibile) è direttamente pertinente alla pesca ed all'acquacoltura.

La quantità di pesce presente sul mercato mondiale ha raggiunto, nel 2016, il massimo storico di 171 milioni di tonnellate. Questo è stato possibile sia grazie alla pesca che all'acquacoltura, che rappresenta il 47% delle 171 tonnellate e consiste nell'allevamento di organismi acquatici in ambienti confinati e controllati.¹ L'utilizzo dell'acquacoltura è recentemente cresciuto notevolmente in alcuni paesi dell'UE rappresentando uno sviluppo economico per piccole e medie imprese in aree remote dove l'occupazione lavorativa in altri settori è piuttosto limitata. Questa tendenza è stata rafforzata a causa di un generale calo degli stock di pesce selvatico catturabile e dall'aumento nella domanda pubblica di pesci e crostacei.² Tra il 1961 e il 2016, l'aumento medio annuo di consumo di pesce globale (3.2%) ha superato la crescita della popolazione (1.6%) e ha superato quello della carne (2.8%). Tra le specie più importanti c'è quella dei tonni a causa del loro alto valore economico e il diffuso commercio internazionale, e gestirli in maniera sostenibile è sicuramente una grande sfida. Nel 2015 nei mercati sono arrivate 4.8 milioni di tonnellate delle principali specie di tonno – albacore (*Thunnus alalunga*), obeso (*Thunnus obesus*), pinna blu (*Thunnus thynnus*, *Thunnus maccoyii*, *Thunnus orientalis*), tonnetto striato (*Katsuwonus pelamis*) e pinna gialla (*Thunnus albacares*) – mostrando una tendenza in continua crescita dal 1950, in cui sono state poco meno di un milione.¹ Le principali specie di tonno sono soggette a un commercio internazionale basato sulle conserve e sul sashimi. Continuando così, lo stato degli stock di tonno (e di conseguenza della cattura) potrebbe deteriorarsi ulteriormente, a meno che non si migliori significativamente la loro gestione. Ciò è dovuto alla notevole domanda di tonno ed alla significativa sovraccapacità delle flotte di pesca di tonno.⁴ Le maggiori nazioni che importano i prodotti derivanti dal tonno sono il Giappone, gli Stati Uniti d'America e alcune nazioni dell'Unione Europea. Il commercio include tonno per sashimi, tonno in scatola e materie prime per l'inscatolamento. Il Giappone rappresenta il mercato principale per il tonno per sashimi, mentre l'Unione Europea e gli Stati Uniti d'America sono i maggiori importatori di tonno in scatola, mercato in cui la Thailandia è maggior esportatrice.⁴ L'espansione di questo consumo ha necessariamente condotto non solo all'aumento della produzione, ma soprattutto alla ricerca di soluzioni che portino alla riduzione degli sprechi.¹ Durante il processo di inscatolamento, solo un terzo di tutto il pesce costituisce valore, per cui, anche a causa della concorrenza a livello globale, l'industria del tonno deve puntare a sviluppare nuovi prodotti a partire dagli scarti della lavorazione del tonno. Questi sottoprodotti potrebbero essere processati per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto per le industrie alimentari, dei mangimi e farmaceutiche.⁴ L'utilizzo di questi sottoprodotti si può classificare genericamente in diretto, con cui si intende una conversione in prodotti per il consumo umano, e indiretto, con cui si intende una conversione in mangimi e fertilizzanti utilizzabili nell'allevamento e nell'agricoltura.⁴

Gli utilizzi diretti comprendono la formazione di un idrolizzato dall'acqua di cottura usata nelle industrie che producono tonno in scatola, farina all'aroma di tonno sempre dall'acqua di cottura delle industrie che producono tonno in scatola, produzione di enzimi dall'intestino del tonno utilizzabili nell'industria del formaggio e la produzione di olio di pesce. L'olio di pesce

rappresenta una tra le più ricche fonti di acidi grassi polinsaturi a catena lunga (long-chain polyunsaturated fatty acids, PUFA), ed è molto importante nelle diete umane per diverse funzioni, tra cui accelerare l'assorbimento del glucosio e mantenendone normale il metabolismo.^{1,3}

La composizione dell'olio di pesce è diversa da quella degli altri oli poiché presenta alte concentrazioni di acido Eicosapentaenoico (EPA, C₂₀:5n-3) che contiene cinque doppi legami e acido Docosaesaenoico (DHA, C₂₂:6n-3) che contiene sei doppi legami. Questi sono acidi grassi polinsaturi classificati come acidi grassi omega-3 e si trovano prevalentemente nella frazione grassa di molti animali marini, soprattutto quelli che vivono in acque fredde. Gli omega-3 sono acidi grassi caratterizzati dalla presenza del primo doppio legame della catena situato nella terza posizione rispetto al carbonio terminale che viene chiamato omega (in rosso, Figura 1.1).

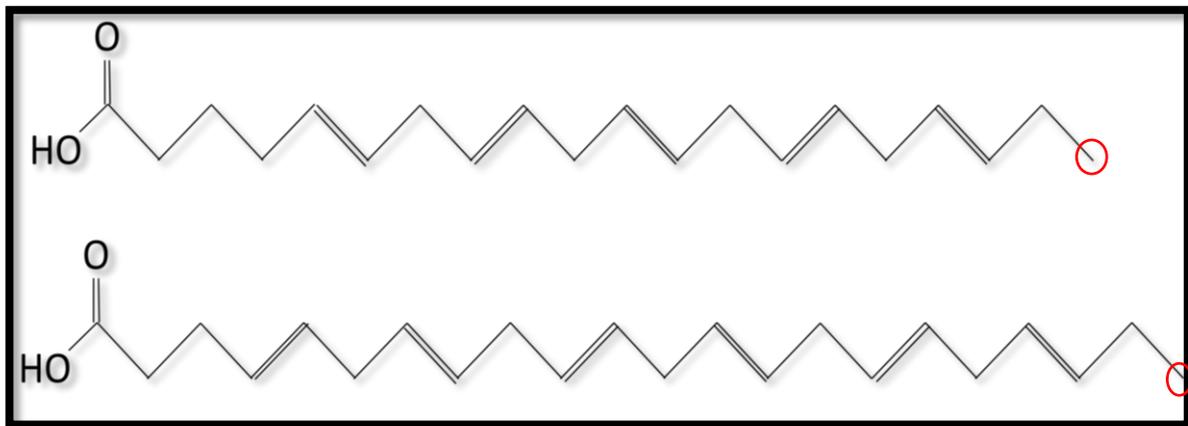


Figura 1.1 Acido Eicosapentaenoico (EPA, C₂₀:5 n-3) in alto e Acido Docosaesaenoico (DHA, C₂₂:6 n-3) in basso. Cerchiato in rosso è il carbonio omega. Vengono chiamati omega-3 poiché il primo doppio legame è sul terzo carbonio rispetto al carbonio omega.

Rispetto ai grassi saturi, gli acidi grassi polinsaturi nell'olio di pesce sono facilmente digeriti e convertiti in energia ed esercitano altre attività benefiche per l'organismo. L'assunzione di olio di pesce sembra avere un ruolo importante nel contrastare e prevenire numerose malattie. La relazione inversa tra la quantità di livelli di acidi grassi omega-3 presenti nel sangue e l'insorgenza di malattia coronarica è la prova più forte del coinvolgimento di questi acidi grassi nella prevenzione di alcune malattie. Molti studi scientifici hanno rivelato che il consumo di pesce aumenta i livelli di EPA e DHA nel sangue, il che a sua volta contribuisce alla riduzione dell'insorgenza di malattie coronariche. Gli effetti antisclerotici e antitrombotici degli acidi grassi omega-3 degradano la crescita delle placche aterosclerotiche dei lipidi e diminuiscono il rischio di trombosi per evitare la formazione di trombi. È stato scoperto che l'olio di pesce esercita anche il suo effetto protettivo contro le malattie cardiache diminuendo i livelli sierici di trigliceridi, migliorando la funzione endoteliale vascolare e abbassando la pressione sanguigna. L'assunzione di olio di pesce esercita effetti benefici anche contro il diabete mellito. EPA e DHA un'azione antinfiammatoria e aumentano il tasso di sopravvivenza per persone con malattie autoimmuni. Inoltre, gli acidi grassi omega-3 dell'olio di pesce sono associati allo sviluppo del cervello e collegati alla loro capacità di prevenire problemi di salute mentale (Tabella 1.1).³

Tabella 1.1 Potenziali benefici degli acidi grassi omega-3.

Benefici
Prevenzione da aterosclerosi
Protezione contro le aritmie
Riduzione pressione sanguigna
Benefici per pazienti con diabete
Riduzione sintomi in pazienti asmatici
Allevia i sintomi della fibrosi cistica
Aumenta la probabilità di sopravvivenza in pazienti con il cancro

Studi scientifici hanno dimostrato che gli scarti del tonno sono una fonte eccellente di olio ricco in PUFA.

Gli utilizzi indiretti dei sottoprodotti del tonno comprendono l'utilizzo della carne scartata dagli impianti che processano il tonno per fare farina di pesce utilizzata per cibo animale, formazione di insilati e la formazione di un idrolizzato proteico da viscere. Gli idrolizzati sono definiti come proteine che sono stati, chimicamente o biologicamente, suddivisi in peptidi di diversa grandezza.⁴

In particolare, i conservifici di tonno producono un volume significativo di sottoprodotti il cui completo riutilizzo porterebbe benefici ambientali ed economici. La Figura 1.2 mostra il processo di produzione del tonno in scatola e la generazione dei rifiuti in vari punti del processo.

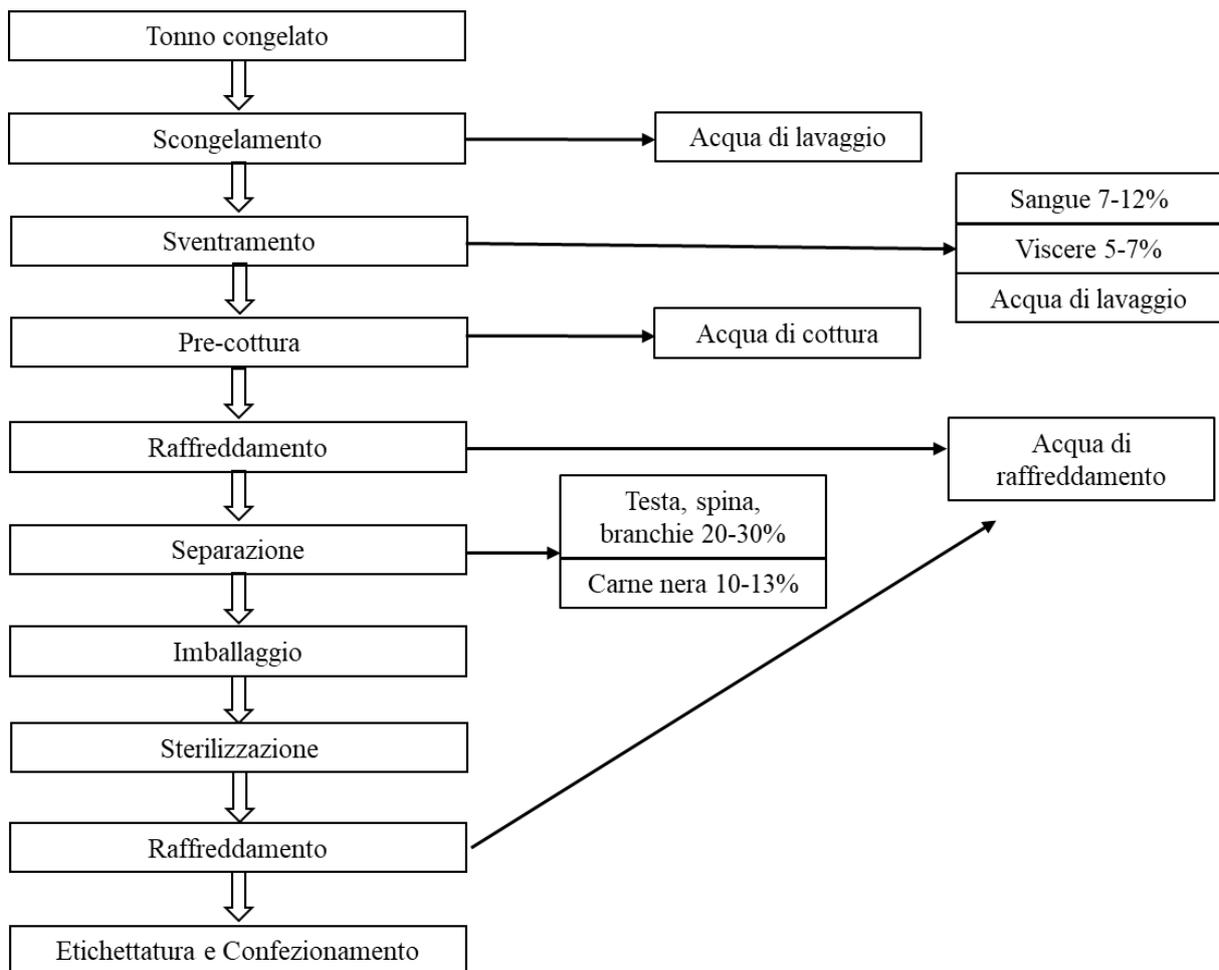


Figura 1.2 Processo di produzione del tonno in scatola e scarti generati in vari punti del processo. Immagine modificata da Gamarro E. G.⁴

Per la produzione inizialmente devono essere esaminate fisicamente le diverse parti del tonno: branchie, occhi, pelle. Dopo l'ispezione i tonni congelati vengono scongelati a temperatura ambiente utilizzando acqua. La durata dipenderà dalla grandezza del tonno. Solitamente ci vogliono 2-3 ore per aumentare la temperatura di 5°C. La temperatura del tonno va tenuta quanto più bassa possibile poiché un'alta temperatura attiverebbe batteri ed enzimi che farebbero deteriorare il pesce. Successivamente il pesce viene sventrato per rimuovere sangue (7-12%) e viscere (5-7%) e lavato con acqua per ridurre la crescita microbica e il deterioramento. Il tonno viene quindi precotto a vapore a temperatura di 95°C ed alla pressione di 1-2 bar per circa 60-90 minuti a seconda della grandezza e della specie di tonno. Questo step può aiutare a rimuovere la pelle e le lische più facilmente. Il tonno precotto viene spruzzato quindi con acqua fredda per diminuire la temperatura ed evitare che venga cotto eccessivamente. Il peso del tonno dopo questo punto sarà diminuito molto a causa del grande quantitativo di acqua che evaporerà. Il tonno raffreddato viene privato di testa e lische (20-30 percento). La carne bianca, destinata al consumo umano e che ha resa del 35%, verrà successivamente inscatolata. La carne nera, che ha una resa del 10-13%, verrà usata per produrre cibo per animali. Il tonno viene inscatolato in diverse misure e vengono aggiunti aromi o altri ingredienti, dettati dall'esigenza del consumatore. Il processo termina con sterilizzazione del tonno in scatola (116°C per 90 minuti) e immediato raffreddamento per evitare l'accumulo di calore che causerebbe cambio di colore e cambio di sapore, oltre a modificare i valori nutrizionali. Non appena la temperatura delle lattine raggiunge quella ambiente vengono etichettate e impacchettate per facilitarne il trasporto.⁴

Gli scarti del processo di produzione del tonno in scatola vengono divisi in due parti: gli scarti solidi e gli scarti liquidi. In Figura 1.3 sono mostrati i passaggi che portano i rifiuti solidi (testa, lische, ossa, viscere, coda, pinne e pelle, ad essere separati prevalentemente dopo la cottura.^{4,5}

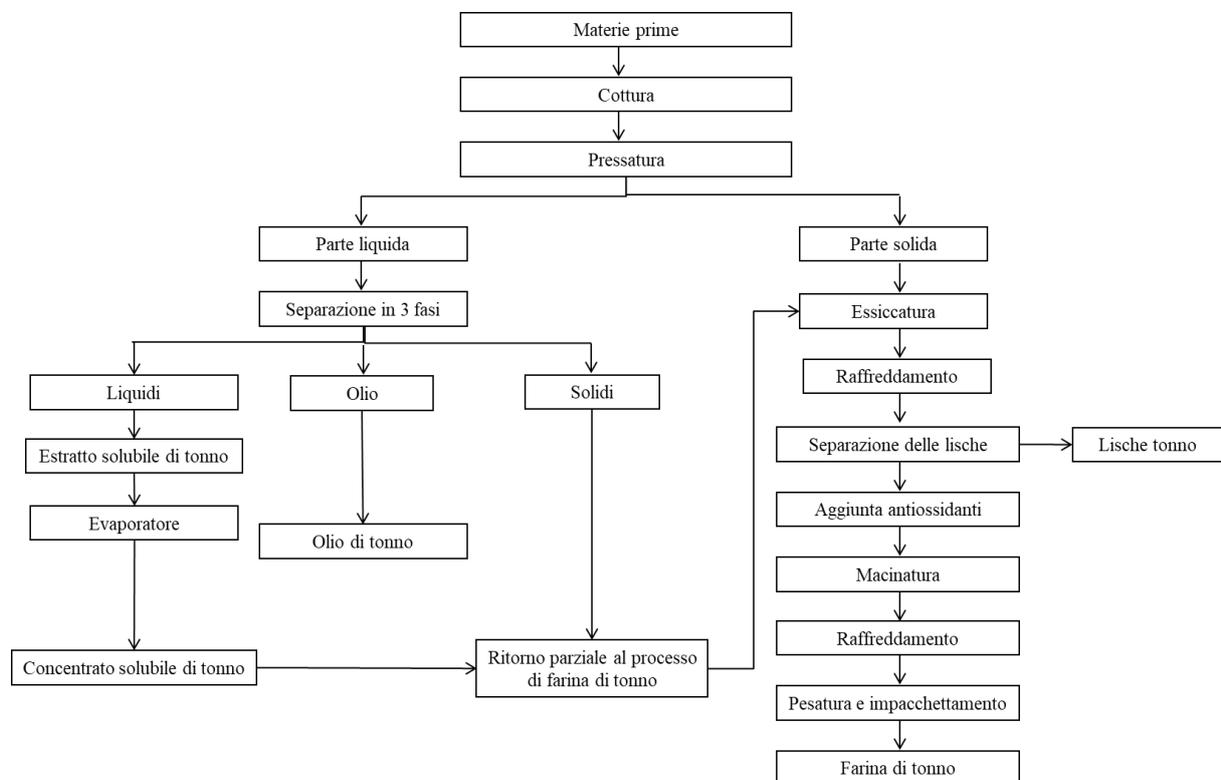


Figura 1.3 Processi dei sottoprodotti del tonno. Immagine modificata da Gamarro E. G.⁴

La cottura, infatti, fa coagulare le proteine del pesce rilasciando in questo modo acqua e olio. La pressatura separa i liquidi dai solidi. Questi ultimi solidi rappresentano circa il 30 percento del peso totale del tonno fresco. I sottoprodotti solidi sono prevalentemente utilizzati per produrre farina di pesce e olio di pesce il cui uso primario è quello di essere usati come ingredienti per mangimi per acquacoltura di pesci e gamberi. La parte liquida è separata in tre fasi attraverso una centrifugazione. La parte liquida del centrifugato viene concentrata grazie ad evaporatori, formando un concentrato solubile di tonno. Questo viene miscelato ai solidi e mandato al processo di produzione di farina di pesce mentre l'olio di tonno prodotto viene stoccato in cisterne. Il processo di estrazione appena illustrato, chiamato anche pressatura a umido (Figura 1.3), viene classificato come processo fisico e viene utilizzato in tutto il mondo dalla maggior parte delle industrie che producono olio di pesce come sottoprodotto del processo di produzione di farina di tonno.^{5,6} Tuttavia, esistono altre due categorie di processi per l'estrazione di olio di pesce: i chimici e i biologici.

L'estrazione con solventi chimici è un processo ben consolidato per estrarre olio di pesce utilizzando solventi organici.⁵ Uno dei migliori metodi per l'estrazione di lipidi polari dai tessuti di pesce è il tradizionale metodo Bligh e Dyer, utilizzato come punto di riferimento per il confronto con altri metodi di estrazione. Il metodo Bligh e Dyer utilizza una miscela di solventi polari e non polari (cloroformio, metanolo e acqua) in rapporti specifici che permettono la totale estrazione dei lipidi dai muscoli come quelli dei pesci. I solventi utilizzati permettono di penetrare nelle cellule adipose ed estrarre i lipidi dalla membrana cellulare e dai muscoli, incluso il materiale fosfolipidico. Gli svantaggi di questo metodo includono la generazione di una grande quantità di solventi da scartare se si utilizzano per applicazione su larga scala, ponendo l'accento sui costi di riciclo e sulla sicurezza nel maneggiare solventi organici. La contaminazione dei prodotti con il solvente organico ha escluso la sua applicazione nei processi alimentari e le regolamentazioni dell'Unione Europea sull'utilizzo di solventi clorurati ne ha aumentato il costo di smaltimento.⁵ Un altro metodo chimico è quello di Soxhlet. Questo si basa sull'estrazione liquido-solido, chiamata anche lisciviazione. Per l'estrazione dei lipidi vengono utilizzati solventi non polari come l'esano o l'etilacetato. L'estrazione avviene attraverso ripetuti lavaggi con solvente fresco a riflusso da un pallone di distillazione. L'efficienza dell'estrazione dipende molto dalle proprietà del solvente. Questo metodo permette un'estrazione completa poiché il campione viene continuamente a contatto con del solvente fresco, non richiede filtrazione dell'estratto poiché la temperatura applicata al pallone di distillazione è mantenuta relativamente alta anche nella cavità di estrazione e permette anche di condurre più estrazioni parallele contemporaneamente, in questo modo viene aumentata la produttività. Gli svantaggi principali includono il tempo necessario per l'estrazione, problemi ambientali ed economici nello smaltimento di rifiuti organici (come per Bligh e Dyer) e la difficile automatizzazione del metodo, che lo rendono appropriato per estrazioni di piccola scala. Utilizzando una base o un acido per digerire le proteine presenti nei muscoli del pesce si riesce a produrre olio di pesce e idrolizzato proteico di pesce. Se il contenuto di olio del residuo di pesce fosse elevato, si produrrebbe anche olio di pesce. Il metodo di digestione acida prevede l'idrolisi del campione di muscolo, in questo modo viene rilasciato materiale grasso che può essere estratto utilizzando solventi appropriati. Lo svantaggio di questo metodo è che estrae anche composti non lipidici, portando ad una sovrastima del grasso totale nel campione alimentare. Inoltre, l'idrolisi acida è considerata molto aggressiva poiché produce estratti chimicamente degradati con uno scarso profilo degli acidi grassi. Il metodo di estrazione con fluidi supercritici è stato usato per estrarre prodotti ad alto valore aggiunto da tessuto animale (come i sottoprodotti del pesce). Il solvente più popolare è la CO₂ poiché è disponibile a basso costo, ha bassa tossicità, non è infiammabile e offre un potenziale uso dei gas serra. Insieme a questo la CO₂ è un gas a temperatura e pressione ambiente, questo rende la separazione solvente-soluto molto semplice ed ha condizioni critiche non estreme (T=303.9 K, P=7.38 MPa)

se confrontato con altri solventi. In generale le maggiori limitazioni dell'estrazioni con fluidi supercritici sono il costo molto elevato delle attrezzature e della loro complessità unite al bisogno di una fornitura costante di CO₂.⁵

I processi biologici producono olio di pesce e concentrati proteici di pesce mediante l'utilizzo di enzimi endogeni o esogeni. Se il processo è portato avanti da enzimi endogeni (enzimi ricavati dalle interiora di pesce) si produce un insilato ed il processo viene chiamato autolisi (Figura 1.4). Se il processo viene sviluppato partendo da enzimi esogeni (enzimi ricavati da altre fonti) si producono olio di pesce ed un idrolizzato proteico ed il processo prende il nome di idrolisi. (Figura 1.5).

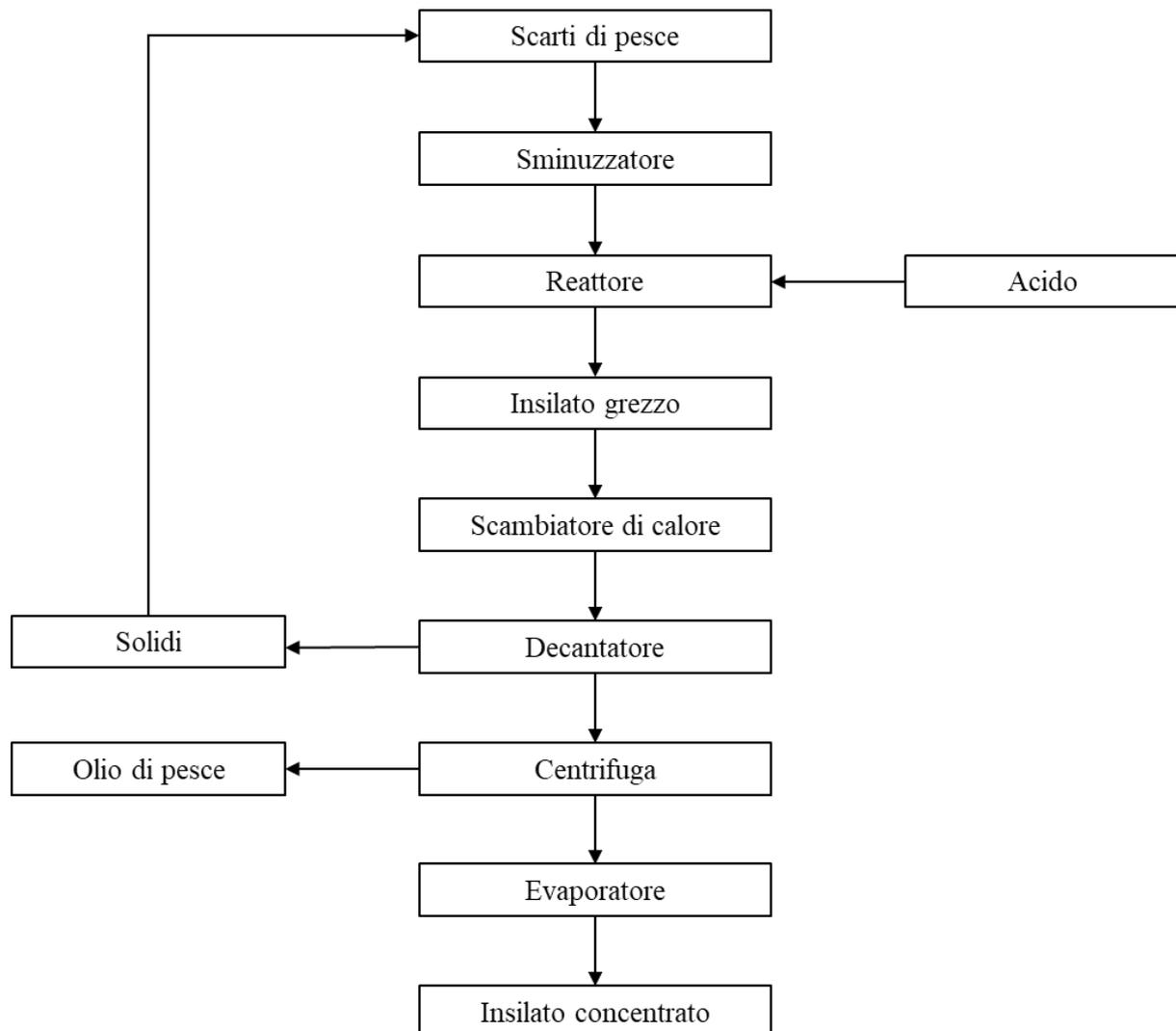


Figura 1.4 Processo di autolisi. Agli scarti sminuzzati viene aggiunto un 3-4% di acido in modo che il pH rimanga acido. L'aggiunta di acido aiuta a prevenire la crescita dei batteri. Modificato da Bimbo AP¹².

L'aggiunta di un acido (acido formico per esempio) inibisce e distrugge i batteri e consentendo agli enzimi interni del pesce di digerire i muscoli del pesce. L'idrolisi può essere portata avanti sono condizioni acide o alcaline. In generale, l'autolisi di muscoli di pesce è solitamente utilizzata per produrre insilati.

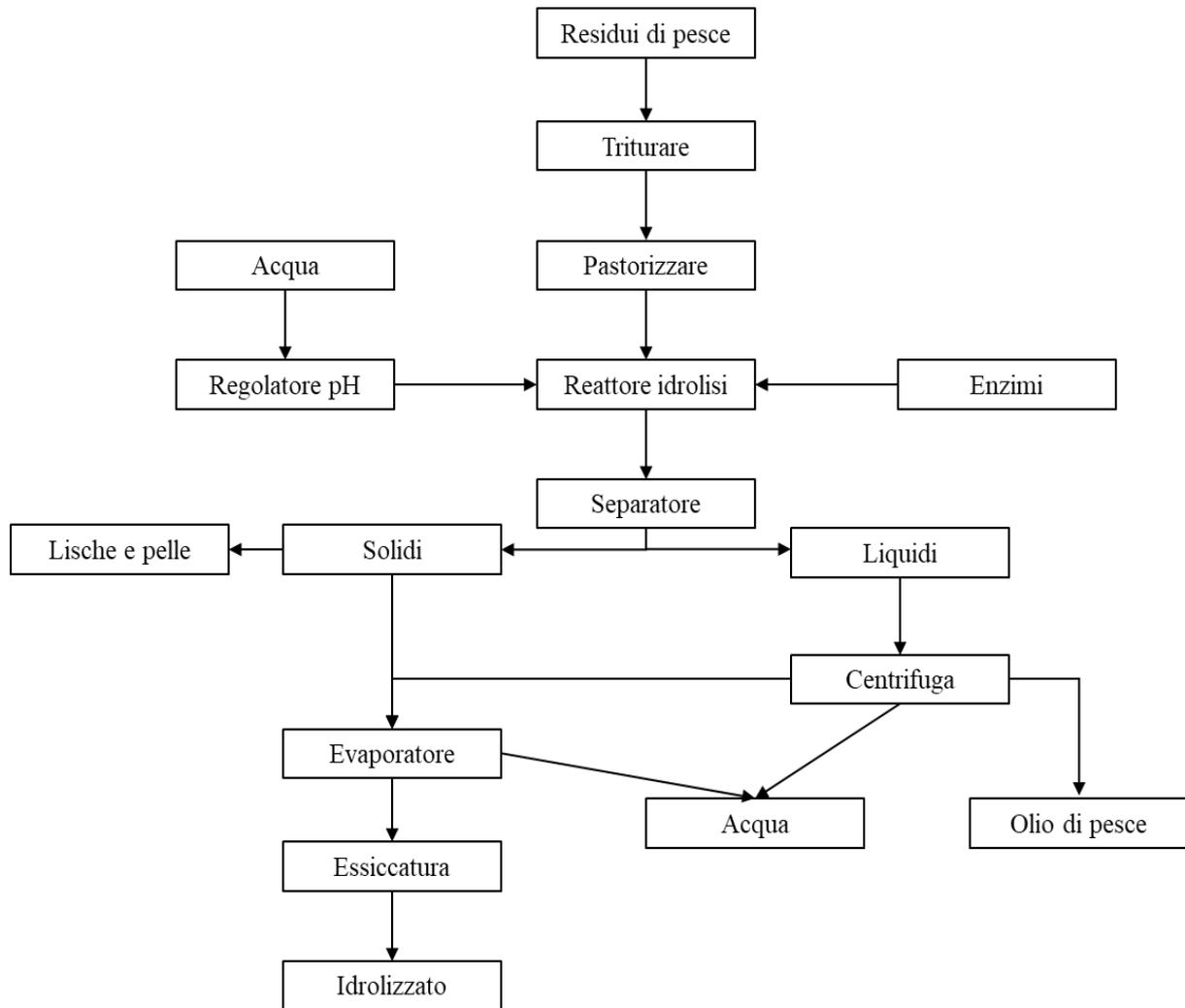


Figura 1.5 Diagramma di flusso per classica idrolisi. Modificato da Bimbo AP ¹²

Il processo forma una soluzione acquosa ricca in piccoli peptidi e aminoacidi, e gli enzimi promuovono il rilascio di olio. Lo svantaggio principale dell'autolisi è la difficoltà nel controllare il processo poiché sono necessari enzimi digestivi interni. L'utilizzo di enzimi esogeni rende il processo di idrolisi altamente controllabile con tempi di estrazione ridotti. Gli enzimi possono essere di origine animale, vegetale o microbica per accelerare la scomposizione delle proteine in unità più piccole (peptidi).⁵ L'idrolisi enzimatica mediante proteasi commerciali a basso costo e di qualità alimentare fornisce un'alternativa interessante poiché il processo viene eseguito in condizioni blande e per un breve periodo di tempo. Proteasi commerciali sono state usate per produrre olio da sottoprodotti di origine marina, con conseguente miglioramento delle rese rispetto a quelle ottenute da processi che prevedevano la cottura.

Gli enzimi ed il pesce utilizzati nel processo devono avere una cosa in comune, devono essere di grado alimentare. Nella maggior parte dei casi, per l'idrolisi si utilizzano proteasi alcaline/neutre perché permettono di ottenere risultati migliori rispetto alle proteasi acide.⁶ La funzione più sorprendente delle proteasi è il loro ruolo nel promuovere proteolisi, che le classifica come "Idrolasi" nel sistema internazionale per la classificazione e la nomenclatura degli enzimi (numero CE), classe 3, e sottoclasse 3.4. - idrolisi dei legami peptidici. Questa funzione idrolitica delle proteasi non viene esercitata in modo casuale e di solito non è coincidente tra diverse proteasi.⁷ A causa della diversa selettività dell'idrolisi, le proteasi sono

classificate come endopeptidasi ed esopeptidasi, una caratteristica che indica la posizione in cui la proteasi esercita la sua funzione nella catena proteica del substrato, ma indica anche le caratteristiche del prodotto finale che può essere estremamente vario a seconda dell'enzima anche utilizzando lo stesso substrato proteico dell'estratto.^{7,8} Usando endoproteasi, per esempio, si possono formare prodotti con peptidi più grandi rispetto a quelli formati utilizzando esoproteasi. Questa differenza tra le azioni delle diverse proteasi può essere vista come un vantaggio poiché si può disporre di un'enorme varietà di "strumenti" da scegliere e ottenere così un'ampia gamma di prodotti finali dalla stessa fonte proteica idrolizzata.⁸ Le proteasi sono riconosciute come enzimi ampiamente applicabili, che si distinguono per i loro usi nell'industria farmaceutica, alimentare e dei detersivi. Più recentemente è stata evidenziata la loro applicazione nel campo dei nutraceutici, trovando ampia applicazione nella liberazione di peptidi bioattivi. Queste bioattività sono state fortemente correlate al tipo di proteina utilizzata come materia prima per l'idrolisi, poiché la sua dimensione (numero di amminoacidi) e gli amminoacidi terminali (ammino e amminoacidi carbossi-terminali) possono determinare la potenziale bioattività dei peptidi prodotti. Le proprietà finali dell'idrolizzato saranno anche determinate dalla specificità e selettività degli enzimi utilizzati.⁸

L'enzima Alcalase è una proteasi alcalina molto utilizzata dal punto di vista industriale, grazie alla sua stabilità e attività a valori di pH alcalini.⁸ Inizialmente l'Alcalase veniva ottenuta da *Bacillus subtilis* e chiamato "Subtilisina Carlsberg". È stato scoperto da Linderstrom-Lang e Ottesen e purificato da Gtintelberg e Ottesen. Altre proteasi sono state prodotte da diversi ceppi di *Bacillus subtilis*. Queste presentavano ampia specificità a pH alcalino. È stato dimostrato che l'Alcalase è uno degli enzimi più efficienti nel rilascio di peptidi bioattivi e di olio da fonti proteiche di vario tipo.⁸ Fu inizialmente applicato ampiamente come componente per i prodotti per la pulizia, essendo stato la prima proteasi sviluppata da Novozymes negli anni 60 del 1900.⁸ In seguito, sono state proposte altre applicazioni per l'Alcalase, come ausiliario nel processo di sgommatura delle fibre di seta⁹ o altri processi tessili come la modifica enzimatica della superficie della poliammide.¹⁰ L'Alcalase è stato trovato aver un ampio campo di applicazione nella produzione e modifica di prodotti dell'industria alimentare. L' "Alcalase[®]" commerciale è un marchio registrato da Novozymes Corp. e consiste di un preparato liquido enzimatico composto come segue: 50% (w/w) glicerolo, 41% (w/w) acqua e 9% (w/w) proteasi estratta da *Bacillus licheniformis*.⁸ La sua attività è espressa in Anson Units (AU) e la più tipica è ≥ 2.4 U/g, che può avere le specifiche di purezza per prodotti alimentari, in base alle condizioni del Comitato Congiunto FAO/OMS di Esperti sugli Additivi Alimentari (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) e del Food Chemical Codex (FCC).

L'Alcalase, a causa della vasta gamma di aminoacidi che può riconoscere, catalizza reazioni di idrolisi che hanno una forte tendenza a formare un idrolizzato con molti peptidi di piccole dimensioni.⁸ Questa sua ampia selettività e specificità permette all'Alcalase di essere utilizzato con una vasta varietà di substrati proteici portando sempre ad ottenere un'alta idrolisi delle proteine, sia applicato individualmente che in combinazione con altre proteasi.

L'Alcalase ha trovato un'importante applicazione nel recupero dei sottoprodotti della lavorazione del pesce marino, tra cui il tonno.¹¹ Infatti, può essere usato per convertire scarti di pesce in prodotti ad alto valore aggiunto come peptidi bioattivi, utilizzabili nelle industrie farmaceutiche e alimentari, in modo da assistere in modo efficiente gli scarti delle industrie ittiche. In questo senso, è stata analizzata con buoni risultati la produzione di peptidi antiossidanti, con attività antimicrobica, antiinfiammatoria e antiossidante, da sottoprodotti di tonno attraverso idrolisi enzimatica con Alcalase.

L'obiettivo di questa tesi è quello di dimostrare come da scarti della lavorazione del tonno in scatola, utilizzando l'enzima Alcalase, si possa estrarre sia la frazione oleosa ricca in omega-3 (in particolare EPA e DHA), sia ottenere un idrolizzato proteico con elevato potere antiossidante.

2. Materiali e Metodi

2.1. Prodotti chimici

I reagenti utilizzati sono tutti provenienti da Sigma-Aldrich (Germania). In particolare, sono stati utilizzati: Acetone, Acido Acetico, Acido Cloridrico, Acido Nitrico, Acido Solforico, Acido Tricloroacetico, Etanolo, Metanolo, Idrossido di Sodio, Idrossido di Potassio, Perossido di Idrogeno, Proteasi Alcalase, Carbonato di Sodio, Ossido di Tungsteno, Fosfato di Potassio, Diclorometano, Cloroformio.

2.2. Preparazione del Campione di Pesce

Gli scarti di lavorazione sono stati ottenuti dalla Ditta Drago Sebastiano (Sicilia, Italia) che opera nella conservazione di prodotti ittici, tra cui il tonno. I campioni (circa 10kg) sono stati surgelati, impacchettati e spediti al Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia, Politecnico di Torino. Dai campioni arrivati, previo scongelamento, grazie all'uso di bisturi usa e getta è stato possibile ricavare organi interni e tessuto molle con successiva omogeneizzazione attraverso un comune mixer. In Figura 2.1 sono mostrati una parte degli scarti ricavati ed utilizzato per gli esperimenti condotti mentre in Figura 2.2 sono mostrati gli stessi scarti omogeneizzati. Il prodotto finale ottenuto è stato separato in pacchetti da 100 g e congelato a -20°C.



Figura 2.1 Scarti di tonno interi, ricavati dagli scarti dei tonni della Ditta Drago Sebastiano.

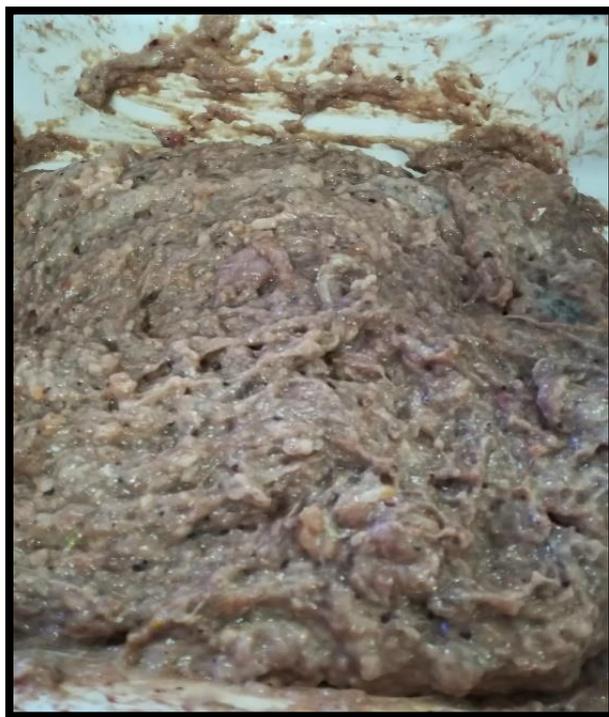


Figura 2.2 Scarti di tonno omogeneizzati.

2.3. Saggio Bradford

Il saggio di Bradford è stato utilizzato per determinare la concentrazione di proteine nella soluzione enzimatica di partenza. Questo è un metodo veloce e affidabile, basato sulla colorazione del campione proteico grazie all'utilizzo del reagente Bradford.

Inizialmente è stata preparata una soluzione di BSA concentrata a 1 mg/mL in un matraccio da 10 mL. Per la curva di calibrazione sono state utilizzate dieci eppendorf da 2 mL in cui è stato aggiunto un volume di BSA crescente da 0 a 1000 μ L. Ad ognuna di queste è stato aggiunto Buffer Fosfato 0.1 M a pH 7 per arrivare ad 1 mL. In dieci nuove eppendorf da 2 mL sono stati aggiunti 100 μ L di ciascun campione precedente e 1000 μ L di reagente Bradford a temperatura ambiente. Per omogeneizzare ed evitare la formazione di schiuma le eppendorf sono state accuratamente rotate. Per il bianco in una eppendorf sono stati aggiunti 100 μ L di Buffer Fosfato e 1000 μ L di reagente Bradford. Dopo aver aspettato 15 minuti, sono state utilizzate cuvette da 1 mL per leggere l'assorbanza a 596 nm grazie allo spettrofotometro Hach Lange DR5000 con Cammino Ottico = 1 cm. Da questi dati è stato estratto un grafico dove in ascissa vi è la concentrazione in mg/mL e in ordinata l'assorbanza.

Per la quantificazione di proteine l'Alcalase è stato diluito 1:2000. L'assorbanza è stata ricavata come prima utilizzando lo stesso bianco e cuvette da 1 mL. La concentrazione è stata ricavata grazie alla formula (2.1), ricavata dalla retta di taratura (Figura 2.3).

$$\text{Concentrazione} = \frac{(A_{595} - 0.0275)}{2.1166} \quad (2.1)$$

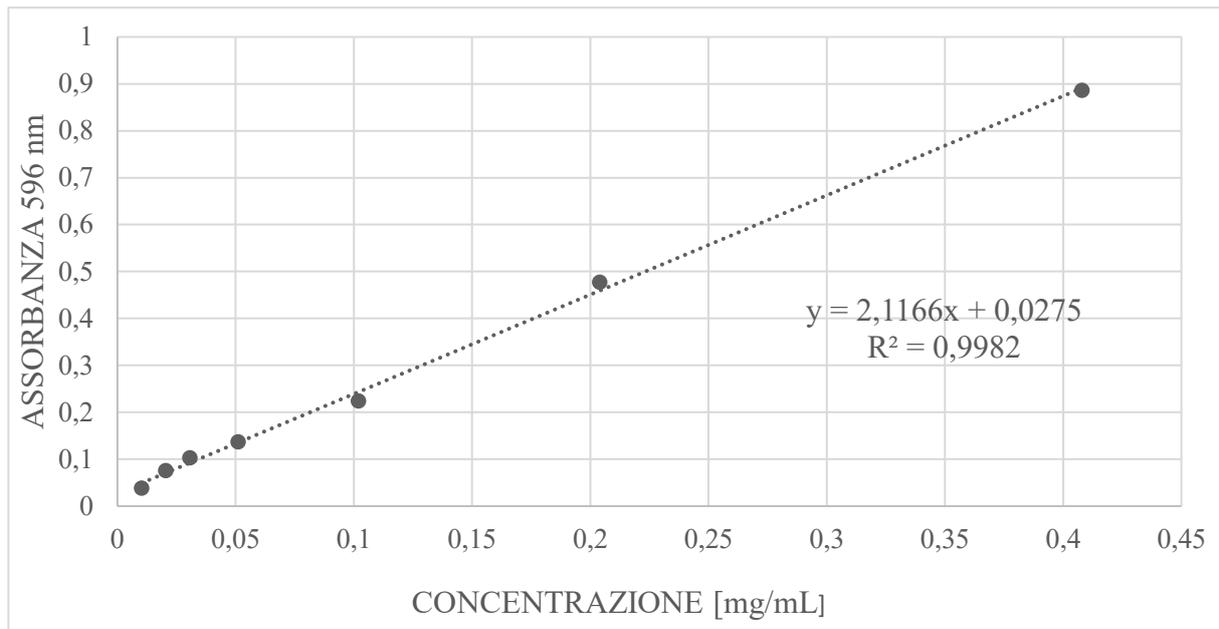


Figura 2.3 Retta di taratura per il saggio Bradford.

2.4. Attività Enzima

La valutazione dell'attività dell'Alcalase® è stata fatta utilizzando la Caseina come substrato. Le condizioni operative sono state $T = 35^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,5$, $A_{660\text{nm}}$ Cammino Ottico = 1 cm in uno spettrofotometro Hach Lange DR5000.¹³

Per poter misurare l'attività dell'enzima sono stati preparati i seguenti reagenti:

- Buffer: 50 Mm Fosfato di Potassio preparato con 11,4 mg/mL di fosfato di potassio dibasico triidrato, in acqua distillata ed aggiustato a pH delle condizioni operative con 1 N HCl.
- Caseina: 0,65%(w/v) soluzione di caseina.
- TCA: 110 mM Acido Tricloroacetico preparato con diluizione 1:55 di acido tricloroacetico, 6,1N, approssimativamente 100% (w/v), SAPN T0699, con acqua distillata.
- FC: 0,5 M Fenolo di Folin & Ciocalteu preparato con diluizione 1:4 di 2 M di Fenolo di Folin & Ciocalteu, SAPN F9252, con acqua distillata.
- Na_2CO_3 : soluzione di Carbonato di Sodio 500 mM preparato con 53 mg/mL in acqua distillata usando Carbonato di Sodio, Anidro, SAPN S2127
- Diluente Enzima: 10 mM di buffer di Acetato di Sodio con 5 mM di Acetato di Calcio preparato con 1,4 mg/mL di Acetato di Sodio, Triidrato, SAPN S8625, e 0,8 mg/mL di Acetato di Calcio, SAPN C1000, in acqua distillata.
- Tirosina: 1,1 mM di L-Tirosina Standard preparata con 0,2 mg/mL di L-Tirosina, SAPN T3754, in acqua distillata.

Per la curva standard (Figura 2.4) è stata eseguita la procedura descritta successivamente utilizzando la Tirosina a 0,05 mL – 0,1 mL – 0,2 mL – 0,5 mL – 0,6 mL.

La diluizione dell'enzima con il diluente è stata di 1:1000 su un campione di 1000 mL. Per il saggio, dopo aver portato la Caseina a 37°C , si sono usate quattro Falcon che costituiscono un bianco e tre prove a diversa concentrazione di enzima diluito. Quindi in ogni Falcon sono stati pipettati 5 mL di Caseina e 1 mL – 0,7 mL – 0,5 mL e 0 mL (bianco) di enzima diluito e messi in incubatore a 37°C per 10 minuti. Successivamente sono stati inseriti contemporaneamente e

rispettivamente 5 mL di TCA e 0 mL – 0.3 mL – 0.5 mL e 1 mL (bianco) di enzima diluito in modo da pareggiare i volumi delle prove e messi in incubatore a 37°C per 30 minuti. Infine, sono stati filtrati 2 mL da ogni Falcon in cui si sono aggiunti in contemporanea 5 mL di Na₂CO₃ e 1 mL di FC e messi in incubatore per 30 minuti a 37°C.¹³

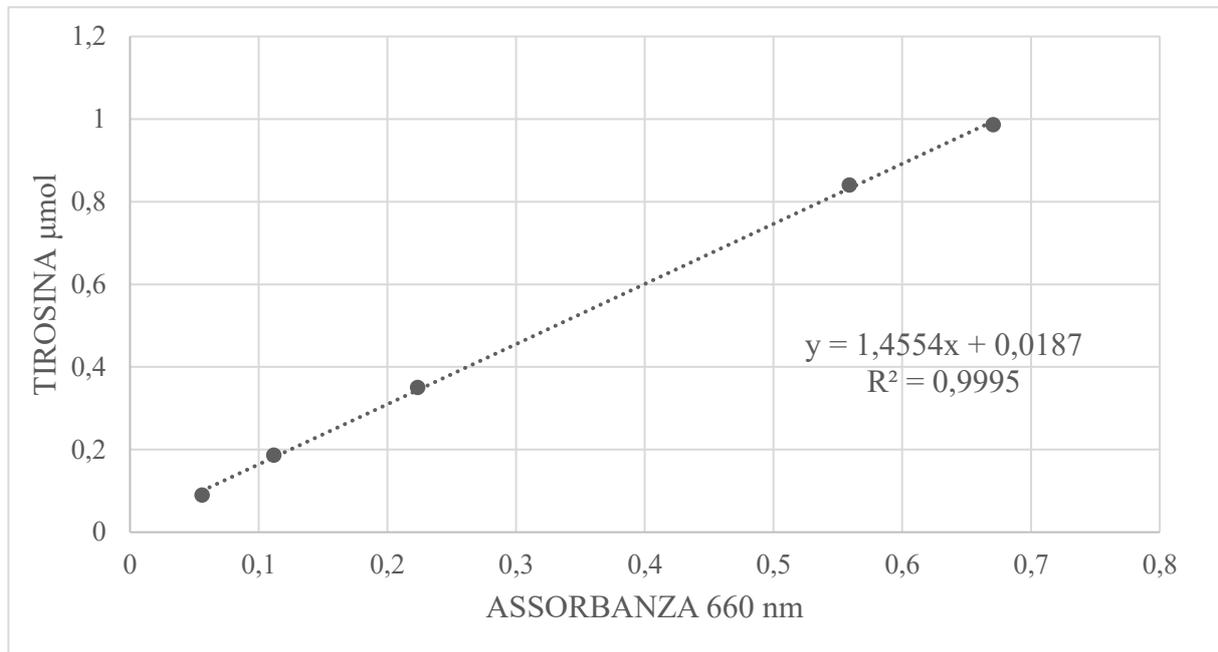


Figura 2.4 Curva standard per il calcolo dell'attività dell'enzima Alcalase.

2.5. Determinazione dell'azoto totale nel campione di tonno

La determinazione della %N è stata utile per capire quanto enzima utilizzare per massa di substrato (campione di pesce) utilizzato. La determinazione della %N nei campioni utilizzati è stata fatta con “Analizzatore Elementare Vario Macro Cube”, un forno con $T_{\text{comb}} = 1050^{\circ}\text{C}$.

2.6. Design Of Experiments (DOE)

Il Design Of Experiments (DOE) è il nome che viene dato alle tecniche utilizzate per poter scegliere in modo efficiente gli esperimenti da eseguire su un determinato studio. I dati vengono analizzati con metodi statistici appropriati utilizzando i principi base del disegno sperimentale: la replica, la randomizzazione e il blocco. *Replica (o replication)* consiste nella ripetizione di un esperimento per ottenere un risultato più preciso e per stimare l'errore sperimentale. *Randomizzazione (o randomization)* si riferisce all'ordine casuale con cui devono essere svolti gli esperimenti. In questo modo, le condizioni di un esperimento non dipenderanno dalle condizioni del precedente e non condizioneranno il successivo. *Blocco (o blocking)* mira a isolare un noto effetto di bias sistematico e ad impedire che ne oscuri gli effetti principali, per fare ciò si dividono gli esperimenti in gruppi simili tra loro. Inoltre, per eseguire un DOE è necessario definire il problema e scegliere le variabili, chiamate anche *fattori*. Deve essere definito uno spazio di progettazione, o *regione di interesse*, che consiste in intervalli di variabilità per ogni variabile. Con il termine *livelli* si intende il numero di diversi valori che una variabile può assumere in base alla sua discretizzazione e solitamente tutte le variabili hanno lo stesso numero di livelli.¹⁴ Per questo studio sono stati presi in considerazione il pH della soluzione, il rapporto tra enzima (E) e substrato (S) e il tempo. La temperatura è stata considerata un parametro costante a 55°C. La tecnica usata è stata la CCF, o *central composite*

faces, in cui ogni fattore è composto da tre livelli. Per k fattori, il numero di esperimenti sarà di $2^k + 2k + 1$.¹⁴ La Figura 2.5 mostra graficamente il disegno sperimentale del CCF. La Tabella 2.1 mostra i fattori e i diversi livelli utilizzati per ognuno di loro, sono stati aggiunti gli esperimenti 16 e 17 (uguali al 15) che rappresentano le repliche del punto centrale.

Tabella 2.1 DOE. Design degli esperimenti dove i tre fattori (pH, E/S, tempo) hanno ognuno tre livelli.

N° esperimento	pH	E/S	Tempo(min)
1	6,5	0,1	30
2	8,5	0,1	30
3	6,5	1	30
4	8,5	1	30
5	6,5	0,1	120
6	8,5	0,1	120
7	6,5	1	120
8	8,5	1	120
9	6,5	0,55	75
10	8,5	0,55	75
11	7,5	0,1	75
12	7,5	1	75
13	7,5	0,55	30
14	7,5	0,55	120
15	7,5	0,55	75
16	7,5	0,55	75
17	7,5	0,55	75

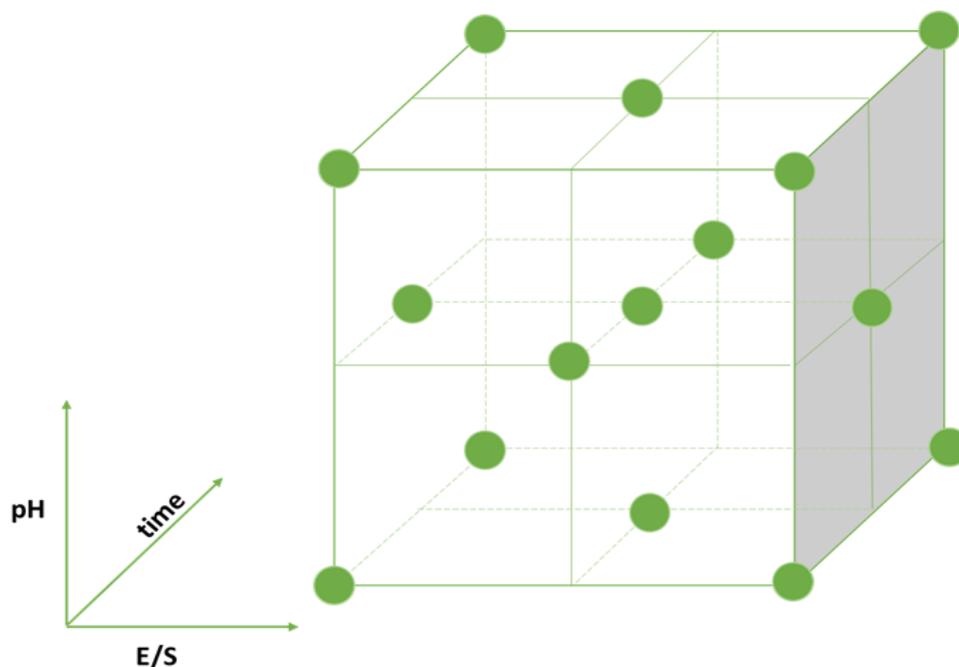


Figura 2.5 Rappresentazione grafica della tecnica CCF utilizzata per gli esperimenti.

2.7. Estrazione Enzimatica

Una quantità pari a 20 g di campione di tonno omogeneizzato è stata inserita in una Falcon da 50 ml con il Buffer a pH corrispondente all'esperimento che si vuole effettuare, in rapporto 1:1 (pesce : buffer). È stata riscaldata a 90°C con un bagno d'acqua per 10 minuti utilizzando riscaldatore a piastra Argo Lab M2-A, in questo modo sono stati disattivati gli enzimi endogeni presenti all'interno del campione. Successivamente la Falcon è stata messa in un incubatore Enviromental Shaker – Incubator ES-20/60 a 200 rpm e a 55°C per mezz'ora. L'idrolisi enzimatica inizia una volta che viene aggiunta la quantità di enzima corrispondente al rapporto E/S in Tabella 2.2. Dopo aver idrolizzato per il tempo necessario (Tabella 2.1), la miscela è stata posta in un bagno d'acqua a 90°C per 10 minuti per disattivare l'Alcalase.

Tabella 2.2 Valori utilizzati per l'aggiunta di Alcalase durante la procedura sperimentale di estrazione di olio dal campione di tonno.

E/S	μL
0,1	180
0,55	980
1	1,780

Tutta la miscela infine viene fatta raffreddare e centrifugata con SL 16R Centrifuge a 5000 rpm per 40 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione si può notare la formazione di 3 fasi separate: la fase inferiore che contiene ciò che non è digerito, sopra di questa vi è l'idrolizzato enzimatico e la fase superiore che rappresenta lo strato di olio (Figura 2.4). L'olio è stato separato tramite l'aspirazione con micropipetta. Per essere sicuri di aver recuperato solo lo strato lipidico, questo è stato lavato con Diclorometano sotto cappa. La stessa procedura è stata ripetuta per tutti gli esperimenti ed è descritta in Figura 2.5.¹⁵

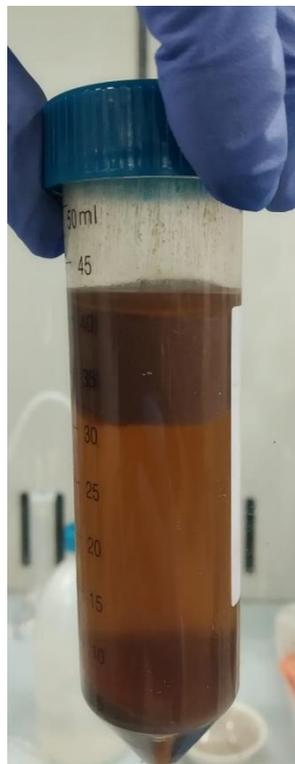


Figura 2.4 Falcon in cui si notano i tre strati formati dopo centrifugazione. Superiormente si nota lo strato oleoso, in mezzo quello proteico e il fondo di scarti solidi.

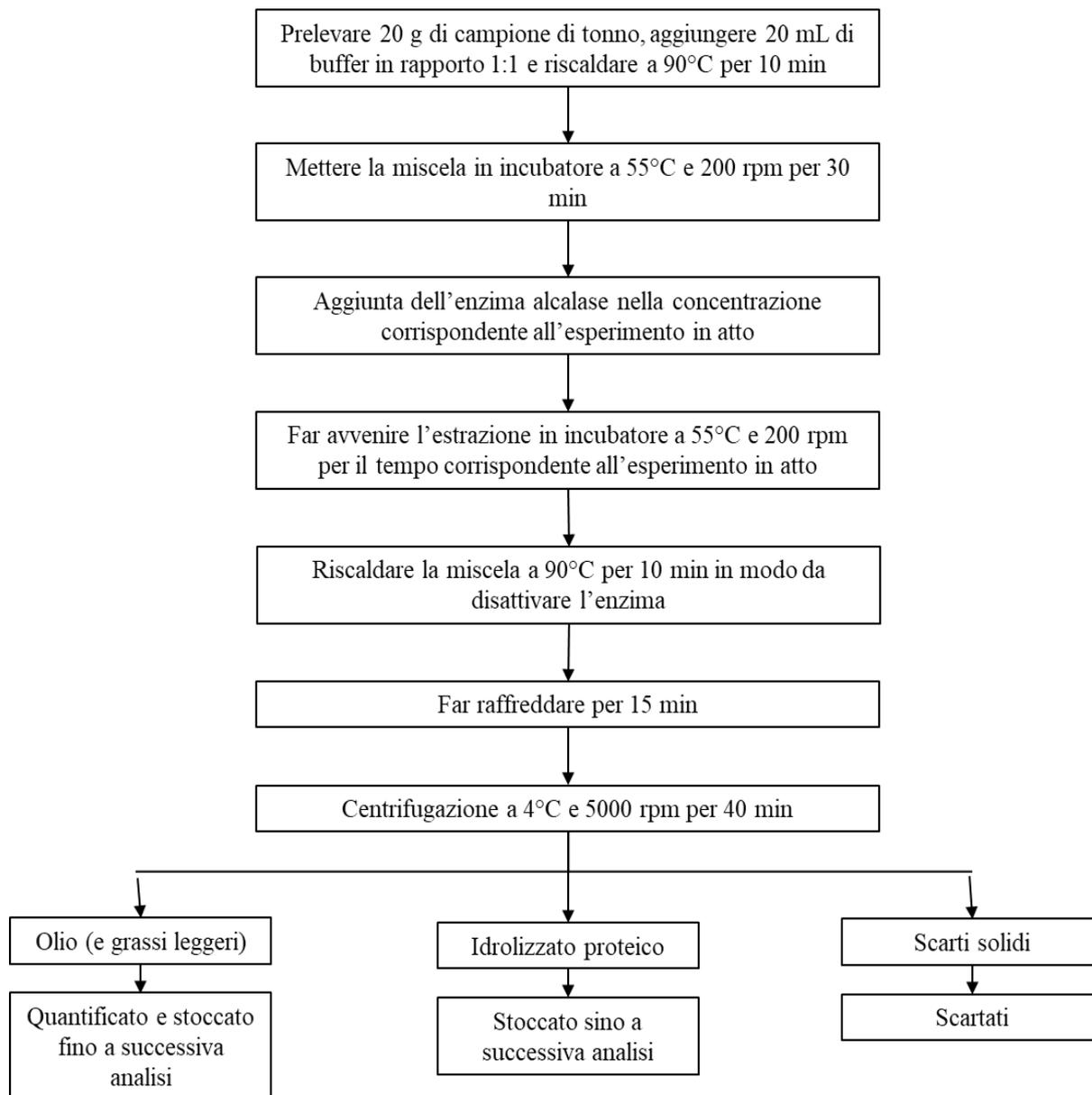


Figura 2.5 Schema per l'estrazione enzimatica utilizzato in questo studio.

2.8. Determinazione dell'olio

L'olio è stato ottenuto dallo strato superiore della Falcon durante il processo di estrazione. Il sottile strato di olio è stato prelevato con una pipetta e per essere sicuri di aver prelevato solo la frazione oleosa, questa è stata lavata con Diclorometano. Prima della sua quantificazione in peso il campione è stato fatto essiccare per una notte, rimuovendo in questo modo possibile presenza di umidità. La determinazione in peso è avvenuta facendo la differenza tra la boccetta contenente l'olio dopo essiccazione con la stessa boccetta vuota usando la stessa bilancia digitale. La resa in olio è stata calcolata utilizzando la massa ottenuta dopo estrazione appena descritta diviso i g di olio presenti nel campione ed il tutto moltiplicato per cento:

$$Resa\ in\ olio\ (\%) = \frac{(\text{peso boccetta piena} - \text{peso boccetta vuota})}{g\ di\ olio\ nel\ campione} \times 100 \quad (2.2)$$

I “g di olio nel campione” sono stati calcolati moltiplicando i g di tonno usati per ogni esperimento con la media percentuale di olio calcolato utilizzando il metodo descritto da E.G Bligh e W. J. Dyer e approfondito nel paragrafo successivo.¹⁶

2.9. Quantificazione del grasso totale presente nel campione di pesce

Questo metodo viene descritto da E. G. Bligh e W. J. Dyer.¹⁶ ed è solitamente utilizzato per tessuti che contengono circa l'80% di acqua. Ogni campione di pesce omogeneizzato dal peso di 100 g è stato inizialmente miscelato con 100 mL di Cloroformio e 200 mL di Metanolo. A questa miscela sono stati aggiunti altri 100 mL di Cloroformio e dopo una miscelazione di 30 secondi, 100 mL di acqua con successiva miscelazione per 30 secondi. L'omogeneizzato è stato filtrato attraverso un filtro di carta Whatman No. 1 in un imbuto Coors No. 3 Buchner con leggera aspirazione. Il filtrato è stato trasferito in un cilindro graduato da 500 mL, e, dopo aver aspettato alcuni minuti per la completa separazione e chiarificazione, il volume dello strato di Cloroformio (almeno 150 mL) è stato registrato e lo strato alcolico rimosso tramite aspirazione. il cloroformio viene eliminato tramite Rotovapor sotto cappa ed il residuo oleoso pesato su una bilancia analitica.

Per questo metodo sono permesse un certo numero di alterazioni della procedura ma è imperativo che il volume di Cloroformio, Metanolo e acqua, prima e dopo la diluizione, rimanga rispettivamente nelle proporzioni 1:2:0.8 e 2:2:1.8. Nel caso in cui il volume di acqua non sia dell'80% dev'essere aggiunta acqua distillata e nel caso in cui venga usato campione con molto contenuto lipidico o quando il materiale a disposizione è poco si può ridurre la grandezza del campione scalando come da proporzione la quantità di solventi.¹⁶

2.10. Determinazione di Omega-3

La determinazione di acidi grassi essenziali come gli Omega-3, con enfasi su EPA (Acido EicosaPentanoico) e DHA (Acido DocosaEsanoico), nell'olio estratto è stata condotta attraverso una gas cromatografia accoppiata ad una spettrometria di massa (GC-MS). L'attuazione di questo metodo, tuttavia, ha reso necessaria una derivatizzazione per trasformare gli acidi grassi nei loro corrispettivi esteri metilici di acidi grassi volatili (fatty acid methyl esters, FAMES).

La composizione dei FA è stata determinata con i metodi standard UNI EN ISO 12966-2:2017 e UNI EN ISO 12966-4:2015. Gli acidi grassi sono stati analizzati nella forma di metil esteri (FAME) usando un gas cromatografo equipaggiato con un analizzatore di massa. Per preparare i FA metil esteri sono stati dissolti circa 100 mg di campione in 3 mL di KOH metanolico (0.6 M) in una provetta falcon e miscelato per 10 s con un flusso di N₂ per evitare l'ossidazione del composto. La soluzione è stata riscaldata usando un bagno d'acqua a 70°C e agitata per 10 min. Dopodiché, una volta avvenuta la completa dissoluzione dell'olio, sono stati aggiunti 3 mL di H₂SO₄ al 5% in metanolo e la soluzione è stata scaldata nuovamente a 70°C per 5 min. Successivamente sono stati aggiunti 2 mL di una soluzione satura di NaCl e 2 mL di Esano per poi centrifugare a 400 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto, diluito 1:2, e trasferito in una fiala per l'analisi al GC-MS.¹⁶ L'analisi dei FAME è stata condotta utilizzando un gas cromatografo (Agilent 7890A GC System) equipaggiato con una colonna ZB-FAME (30 m x 0.25 mm ID x 20 µm; Zebron Phenomenex) e un rivelatore di massa a quadrupolo (Agilent 5975 C VL MSD). L'Elio è stato utilizzato come gas di trasporto con un flusso di 0.4 mL/min, il volume iniettato è stato di 1 µL utilizzando la modalità split con un rapporto di split di 20:1 a 240°C.

La colonna è stata inizialmente mantenuta a 100°C per 2 min e poi la temperatura si è innalzata sino a 240°C con un aumento di 5°C/min e tenuta costante ad ogni aumento per 8 min.¹⁶ L'analizzatore di massa ha utilizzato una ionizzazione elettronica con energia di ionizzazione di 70 eV, e in modalità di scansione completa tra i 50 e i 600 a.m.u. Le temperature della sorgente e del quadrupolo sono state mantenute rispettivamente a 230°C e 150°C. La quantificazione dei FAME è stata determinata mediante curve di calibrazione preparate utilizzando gli standard di EPA e DHA.

2.11. Indice di Solubilità-TCA

Per calcolare il TCA-solubility index è stata preparata una soluzione di acido tricloroacetico (TCA) al 20% (100 g in 500 ml di acqua distillata). Questa soluzione è stata miscelata in parti uguali con la soluzione di proteine idrolizzate sino ad ottenere una concentrazione di acido finale del 10%. Dopo aver centrifugato a 5000 rpm per 10 min con SL 16R Centrifuge è stata prelevata una quantità di surnatante ed è stata analizzata la %N con Analizzatore Elementare Vario Macro Cube. È stato calcolato come segue:¹⁸

$$\begin{aligned} \text{TCA – solubility index, \%} \\ = \frac{\text{N solubile nel campione con 10\% TCA}}{\text{N totale nel campione}} \times 100 \end{aligned} \quad (2.3)$$

2.12. Cinetica e grado di idrolisi

Esistono diversi modi per determinare il grado di idrolisi (DH); i più comunemente usati includono il pH-stat, trinitrobenzensolfonico (TNBS), o-ftaldialdeide (OPA), acido tricloroacetico azoto solubile (SN-TCA) e titolazione in formolo. Il pH-stat è il più semplice ed il più comune metodo utilizzato, si basa sul numero di protoni rilasciati durante l'idrolisi. Tuttavia, non determina direttamente i legami peptidici. Durante l'idrolisi del legame peptidico un carbossile e un gruppo ammino vengono liberati. Quando ciò avviene ed il pH è alcalino sia i gruppi amminici che quelli carbossilici saranno o parzialmente o totalmente deionizzati a seconda del pH del mezzo di reazione e dall'amminoacido in questione. I protoni liberi risultanti provocano una diminuzione del pH della miscela di reazione, e l'aggiunta di una base è necessaria per mantenere il pH costante.¹⁹

Questo semplice metodo è stato utilizzato per capire il tipo di cinetica della reazione di idrolisi dei nostri esperimenti. Grazie ad uno scale-up in un bioreattore Biostat con miscelazione con pale Rushton, è stato possibile controllare il pH della reazione. Sono stati utilizzati 200 g di campione di pesce, a cui sono corrisposti 3.148 mL di enzima Alcalase, e buffer Borato a pH 8.5, la base di controllo è stata NaOH 0.5 M.

2.13. Determinazione attività antiossidante

Gli antiossidanti sono i composti che contrastano i radicali liberi mediati da processi ossidativi. Questi antiossidanti sono anche prodotti da sistemi biologici e sono presenti naturalmente in moltissimi cibi. Tra i metodi per la determinazione della capacità di potenziale antiossidante vi è il saggio DPPH (α, α -dyphenyl- β -picrylhydrazyl C₁₈H₁₂N₅O₆, M=394.33). In questo caso è stato usato semplicemente per confrontare i diversi estratti e non per sapere esattamente quanto fossero antiossdanti. Il saggio si basa sulla misurazione della capacità di scavenging degli antiossidanti nei suoi confronti. L'elettrone dispari dell'atomo di azoto in DPPH viene ridotto ricevendo un atomo di idrogeno dagli antiossidanti alla corrispondente idrazina. DPPH mostra una forte banda di assorbimento a 517 nm a causa del suo elettrone dispari e la soluzione appare

di un profondo colore viola. Il saggio DPPH è considerato un metodo accurato, facile ed economico per valutare l'attività di scavenging degli antiossidanti dal momento che il composto radicale è stabile e non deve essere rigenerato. L'efficienza antiossidante è misurata a temperatura ambiente in modo da eliminare il rischio di degradazione termica delle molecole testate.

Il metodo è stato condotto con metanolo poiché facilita l'estrazione dei composti antiossidanti dal campione. È stata preparata una soluzione 0.16 mM di DPPH in metanolo (0.031546 g di DPPH in 0.5 L di metanolo). Successivamente il campione è stato diluito in metanolo (100 µL in 2 mL di metanolo) e in una Falcon da 20 mL sono stati inseriti 2 mL di DPPH diluito con 2 mL di campione diluito per un totale di 4 mL. Grazie ad un vortex è stata miscelata bene la soluzione e messa al buio per 30 min poiché DPPH risulta sensibile alla luce. Dopodiché sono state utilizzate delle cuvette per contenere la soluzione da analizzare con spettrofotometro a 517 nm.²⁰ L'attività di scavenging è stata così calcolata:

$$\textit{Attività di scavenging} = \left\{ 1 - \left[\frac{(A_{\text{campione}} - A_{\text{bianco}(\text{metanolo})})}{A_{\text{controllo}(\text{DPPH})}} \right] \right\} \times 100 \quad (2.4)$$

3. Risultati

3.1. Analisi Preliminari

Sono stati considerati i calcoli e le procedure antecedenti all'estrazione enzimatica. Inoltre, è stata scelta la massa di campione di pesce con cui è stata fatta l'estrazione, calcolando quindi la quantità di Alcalase da utilizzare.

Inizialmente è stata calcolata la quantità di proteine presenti per g di campione di pesce. Dopo aver pesato la massa è stato utilizzato l'Analizzatore Elementare per capire la % di N presente all'interno del campione. In Tabella 3.1 sono mostrati i risultati ottenuti.

Tabella 3.1 Risultati della quantità di N su g di campione di pesce ottenuti grazie all'utilizzo dell'Analizzatore Elementare Vario Macro Cube

Pesce (mg)	N%	N (mg)	mg N/ g pesce
106	3.12	3.3072	31.2
195.4	3.17	6.1942	31.7
50	3.19	1.5950	31.9

Da questi valori di azoto presente all'interno del campione di pesce sono state calcolate le proteine presenti all'interno del campione, i cui valori sono mostrati in Tabella 3.2, utilizzando un fattore di conversione azoto-proteine pari a 5.6.²¹

Tabella 3.2 Quantità di proteine presenti nel campione di pesce. È stato utilizzato un fattore di conversione pari a 5.6. Infatti, la colonna corrispondente a mg proteine/ g pesce è stata ottenuta moltiplicando per 5.6 i valori presenti in mg N/ g pesce e Proteine% è stata ottenuta moltiplicando per 5.6 i valori presenti in N%.

mg N/ g pesce	N%	mg proteine/ g pesce	Proteine%
31.2	3.12	174.72	17.472
31.7	3.17	177.52	17.752
31.9	3.19	178.64	17.864

Successivamente sono state calcolate la media, la deviazione standard e la deviazione standard percentuale, presenti in Tabella 3.3.

Tabella 3.3 Media, Deviazione Standard, Deviazione Standard% di mg N/ g pesce e mg proteine/ g pesce.

	mg N / g pesce	mg proteine / g pesce
Media	31.075	176.96
Deviazione Standard	1.0905	2.0191
Deviazione Standard%	3.5092	1.141

La scelta della massa di campione di pesce da utilizzare è stata di 20 g, da cui è derivata la quantità di Alcalase da utilizzare durante l'estrazione enzimatica. Dal saggio di Bradford sono stati ricavati i mg proteine/ml dell'Alcalase, come media del triplicato usato per il saggio. In Tabella 3.4 sono riportati i valori sopra citati.

Tabella 3.4 Massa di campione di pesce utilizzata per gli esperimenti da cui è stata ricavata la quantità di proteine presenti nel campione, mostrata nella colonna centrale. Nella colonna a destra abbiamo i mg proteine/ ml dell'enzima utilizzato, l'Alcalase.

Campione pesce (g)	Proteine (mg)	mg proteine/ml (Alcalase)
20	3539,2	112.445

Da questi valori è stata calcolata la quantità in μL di enzima da utilizzare, in riferimento ai tre livelli di E/S% scelti nel Design Of Experiments. In Tabella 3.5 sono mostrati i valori ottenuti, dove E (g proteine) è stato ottenuto come semplice moltiplicazione di E/S% con S e dividendo per 100 e mL E è stato ottenuto moltiplicando E (g proteine) per il valore di mg proteine/ml (Alcalase) presente in Tabella 3.4.

Tabella 3.5 Quantità di Alcalase da utilizzare in relazione alla massa del campione di pesce scelta per gli esperimenti e al rapporto E/S%.

E/S%	S (g)	E (g proteine)	mL E	μL E
0.1	20	0.02	0.1778	178
0.55	20	0.11	0.9782	978
1	20	0.2	1.7786	1779

3.2 Resa dell'Estrazione Enzimatica

Inizialmente è stato utilizzato il metodo di E. G. Bligh e W. J. Dyer¹⁶ per ricavare la percentuale di olio presente all'interno di campione. In Tabella 3.6 sono mostrati i risultati del triplicato analizzato.

Tabella 3.6 Risultati delle analisi condotte per conoscere l'olio% all'interno del campione di pesce. I pesi dei palloni sono in g.

Campione (g)	Pallone vuoto	Pallone pieno	Olio (g)	Olio%
40.4652	100.183	101.2328	1.0498	2.594327
20.721	59.1721	59.6894	0.5173	2.496501
20.2313	62.3637	62.901	0.5373	2.655785

Dai valori di olio% è stata fatta la media ottenendo 2.582204%.

Questo valore è stato usato per poter calcolare i g di olio presenti in ognuno dei 17 campioni posti ad estrazione e poter calcolare, dopo l'estrazione, la resa. Richiamando la numerazione degli esperimenti presente in Tabella 2.1, ognuno dei quali con il proprio tempo e il proprio rapporto E/S%, vengono mostrati i valori di resa che sono stati ottenuti a seguito dell'estrazione enzimatica con Alcalase. Dai risultati mostrati in Tabella 3.7 è stato dedotto che, a parità di pH, un rapporto E/S% maggiore favorisce l'aumento della resa. Il tempo influisce fortemente sulla resa, infatti i valori degli esperimenti N°3 e N°5 sono molto vicini nonostante sia E/S% che il tempo siano diversi.

Tabella 3.7 Valori ottenuti utilizzando una soluzione con pH 6. L'enzima è stato fatto agire con tempi diversi, in particolare: 30 minuti per N°1 (0.1 E/S%) e N°3 (1 E/S%), 120 minuti per N°5 (0.1 E/S%) e N°7 (1 E/S%), 75 minuti per N°9 (0.55 E/S%).

pH 6.5					
N°	Campione (g)	Olio campione (g)	Peso vuoto (g)	Peso pieno (g)	Resa%
1	19.9744	0.5157799	15.0754	15.1526	14.968
3	19.9773	0.5158548	15.1275	15.2564	24.988
5	20.7844	0.5366958	15.2493	15.2819	24.120
7	19.9457	0.5150388	15.0373	15.0939	55.956
9	20.9363	0.5406181	15.1437	15.2623	21.942

Dai risultati mostrati in Tabella 3.8 è stato dedotto che utilizzando un pH più alcalino le rese migliorano notevolmente. In particolare, è di rilievo l'81.402% ottenuto con il campione N°8, 1 E/S% e tempo 120 minuti, che ha mostrato come a questo pH l'enzima funzioni meglio e l'estrazione sia più efficiente. Inoltre, i risultati degli altri esperimenti corroborano la tesi per cui il tempo influisca particolarmente nel processo di estrazione enzimatica ma probabilmente di meno rispetto al pH e al rapporto E/S%.

Tabella 3.8 Valori ottenuti utilizzando una soluzione con pH 8.5. L'enzima è stato fatto agire con tempi diversi, in particolare: 30 minuti per N°2 (0.1 E/S%) e N°4 (1 E/S%), 120 minuti per N°6 (0.1 E/S%) e N°8 (1 E/S%), 75 minuti per N°10 (0.55 E/S%).

pH 8.5					
N°	Campione (g)	Olio campione (g)	Peso vuoto (g)	Peso pieno (g)	Resa%
2	20.3165	0.5246136	15.0678	15.2341	31.700
4	20.1088	0.5192504	15.2866	15.5424	49.260
6	19.9860	0.5160794	15.2430	15.3332	33.473
8	20.0098	0.5166940	15.1491	15.6328	81.402
10	19.9678	0.5156095	15.2546	15.6494	76.570

Nella Tabella 3.9 vengono mostrati i risultati degli esperimenti condotti a pH 7.5. Anche in questo caso si può notare che ad un rapporto E/S% maggiore corrisponda una resa maggiore, come nell'esperimento N°12.

Tabella 3.9 Valori ottenuti utilizzando una soluzione con pH 7.5. L'enzima è stato fatto agire con tempi diversi, in particolare 30 minuti per N°13 (0.55 E/S%), 120 minuti per N°14 (0.55 E/S%), 75 minuti per N°11 (0.1 E/S%), N°12 (1 E/S%), N°15 (0.55 E/S%), N°16 (0.55 E/S%) e N°17 (0.55 E/S%).

pH 7.5					
N°	Campione (g)	Olio campione (g)	Peso vuoto (g)	Peso pieno (g)	Resa%
11	20.2672	0.5233406	15.2032	15.9483	27.726
12	20.0354	0.5173550	14.9487	15.1920	47.028
13	20.1537	0.5204098	14.9338	15.0968	31.321
14	20.1638	0.5206706	15.0588	15.2829	43.041
15	20.1408	0.5200767	14.8644	15.0452	34.764
16	20.1905	0.5213600	14.9735	15.1752	38.687
17	20.1488	0.5202833	15.0410	15.2622	42.515

L'estrazione di olio con idrolisi enzimatica è meno efficace rispetto a quella effettuata con il metodo di Bligh e Dyer. I valori ottenuti sono tutti molto bassi, con eccezione per i campioni N°8 e N°10 che rappresentano in qualche modo le condizioni ottimali per lo sviluppo di un processo in cui l'estrazione di olio attraverso idrolisi enzimatica con Alcalase possa competere, in termini di quantità di olio estratto, con il metodo di Bligh e Dyer. È da notare, inoltre, che la quantità di olio estratta riferita al peso iniziale del campione di pesce è inferiore rispetto alle quantità ottenute con altri metodi, come quello di Soxhlet^{22,23}. Da notare che questi ultimi non partivano da scarti di lavorazione del tonno in scatola ma da parti specifiche (testa, pelle, viscere) di diverse specie di tonno.

I risultati ottenuti nelle tabelle precedenti derivano da un DOE. È necessario quindi un modello per comprendere e valutare questi valori. I dati sono stati analizzati con il software CAT ed il modello MLR (Multi Level Relational). È stata ottenuta un'equazione per il modello:

$$y = \beta_0 + \beta_{pH} \cdot a + \beta_{E/S} \cdot b + \beta_{time} \cdot c \quad (3.1)$$

I valori di y, a, b e c rappresentano, rispettivamente, resa%, pH, E/S e il tempo. Il programma CAT, utilizzando i valori degli esperimenti ha calcolato i coefficienti β , mostrati in Tabella 3.10 e in Figura 3.1:

Tabella 3.10 Valori di β ottenuti da CAT, utilizzando il modello MLR.

β_0	β_{pH}	$\beta_{E/S}$	β_{time}
39.968	13.043	12.665	6.575

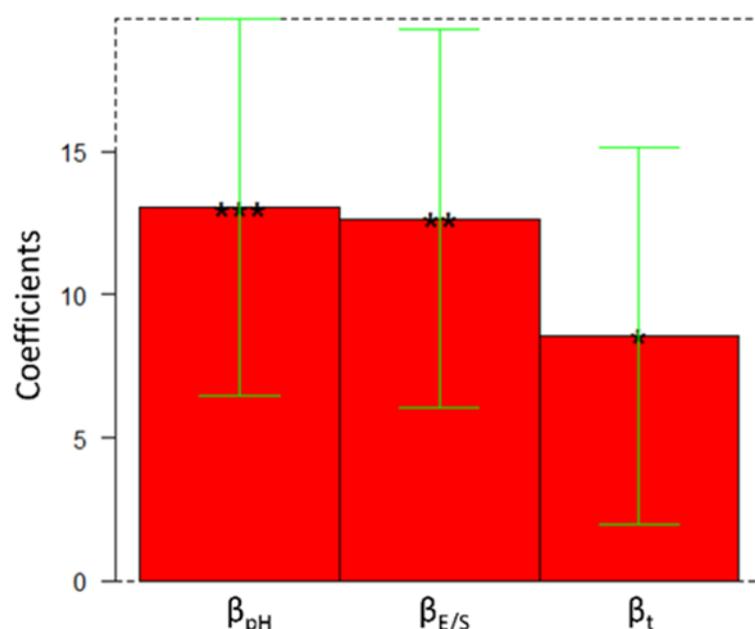


Figura 3.1 Valori di β ottenuti da CAT, utilizzando il modello MLR.

Questi valori di β mostrano che l'influenza maggiore viene esercitata dal pH e quella minore dal tempo. In generale si può dire che l'aumento di pH, E/S% e tempo aumento la resa in olio. In Figura 3.2A, Figura 3.2B e Figura 3.2C sono mostrate graficamente le varie dipendenze. L'analisi dei dati è risultata buona perché il modello ha permesso di spiegare 71.58% della varianza dei dati ottenuti dal DoE.

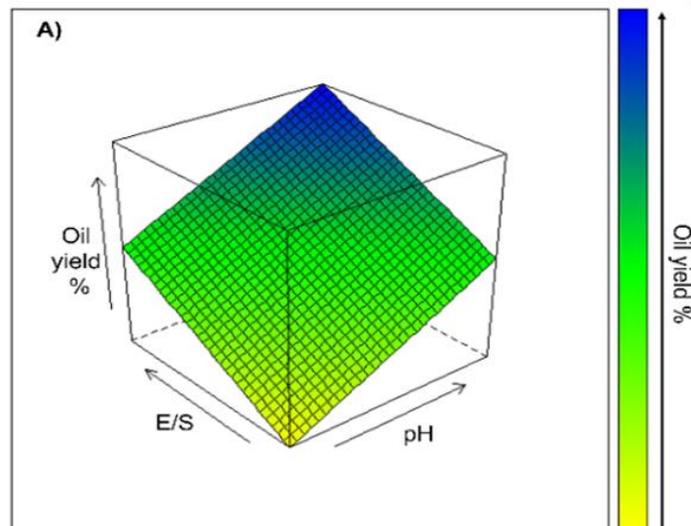


Figura 3.2A Superfici di risposta della resa in olio che aumenta all'aumentare di E/S e pH.

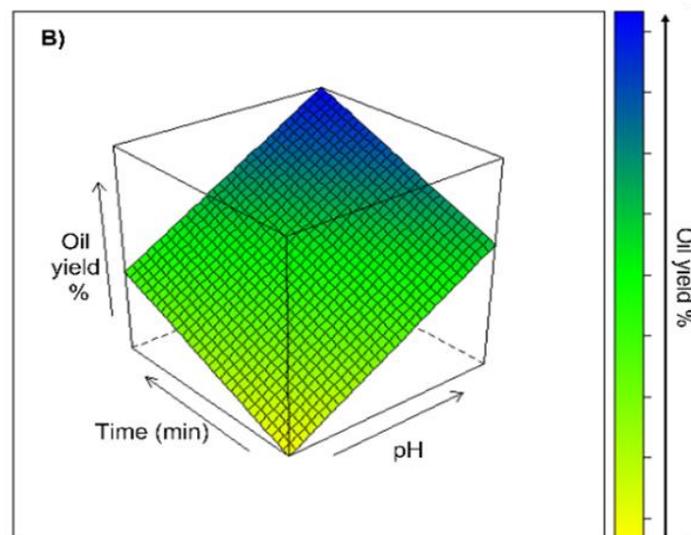


Figura 3.2B Superfici di risposta della resa in olio che aumenta all'aumentare di tempo e pH.

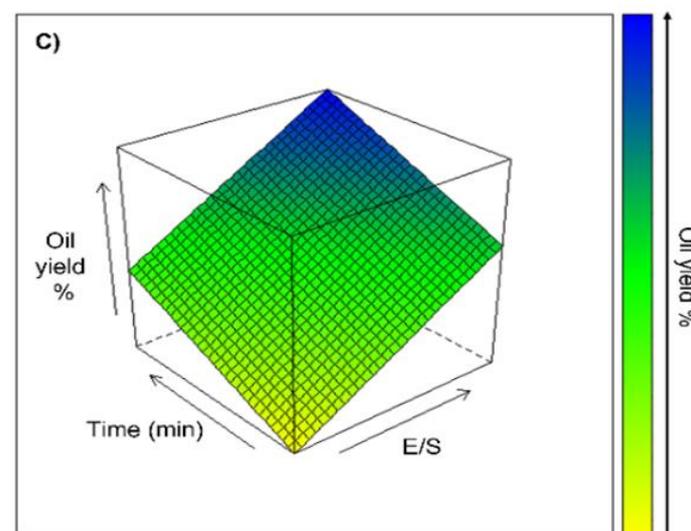


Figura 3.2C Superfici di risposta della resa in olio che aumenta all'aumentare di tempo e E/S

Le tendenze notate nell'estrazione enzimatica con scarti di lavorazione del tonno in scatola con Alcalase sono state sottolineate anche da altri studi. L'estrazione enzimatica per la produzione di olio da scarti di processo di sgombro (testa, pinne e pelle) con Alcalase e pH fisso a 7.5, infatti, ha mostrato come aumentando il rapporto enzima-substrato (E/S) e la durata dell'idrolisi, la resa in olio di tutte le parti analizzate aumenta. In questo caso il tempo di idrolisi viene fatto variare da 1 ora sino a 4 ore. L'analisi della resa rispetto a questo parametro mostra come durante la prima ora vi sia un significativo aumento della resa in olio, seguito da un lento incremento nelle successive 3 ore.¹⁵ Questa tendenza è presente anche nelle analisi svolte in questo studio nonostante l'analisi condotta non sia andata oltre le 2 ore come tempo massimo, considerato ottimale per l'estrazione di olio.³¹ La concentrazione dell'enzima invece è stata analizzata per un massimo del 2%, in cui è stata ottenuta la resa in olio maggiore; tuttavia, è stato dimostrato che un incremento maggiore del 1% non aumenta significativamente la resa in olio a causa della disponibilità di substrato per l'enzima.¹⁵

I risultati ottenuti in questo studio hanno mostrato che un incremento del rapporto E/S% aumenta la resa di estrazione di olio (Tabella 3.11, Tabella 3.12, Tabella 3.13), dipendendo però dal tempo di reazione e dal pH.

Tabella 3.11 Esperimenti condotti con E/S% pari a 0.1.

E/S 0.1%			
N° Esperimento	pH	Tempo (min)	Resa in olio (%)
1	6,5	30	14.968
2	8,5	30	31.700
5	6,5	120	24.120
6	8,5	120	33.473
11	7,5	75	27.726

Tabella 3.12 Esperimenti condotti con E/S pari a 0.55.

E/S 0.55%			
N° Esperimento	pH	Tempo (min)	Resa in olio (%)
9	6,5	75	21.942
10	8,5	75	76.750
13	7,5	30	31.321
14	7,5	120	43.041
15	7,5	75	34.764
16	7,5	75	38.687
17	7,5	75	42.515

Tabella 3.13 Esperimenti condotti con E/S pari a 1.

E/S 1%			
N° Esperimento	pH	Tempo (min)	Resa in olio (%)
3	6,5	30	24.988
4	8,5	30	49.296
7	6,5	120	55.956
8	8,5	120	81.402
12	7,5	75	47.028

A parità di pH e di E/S% maggiore è il tempo di idrolisi maggiore è la resa in olio. Inoltre, più è alto il rapporto E/S% maggiore è la differenza tra la resa in olio di un campione fatto idrolizzare per 30 minuti rispetto ad uno fatto idrolizzare per 120 minuti. L'Alcalase è stato utilizzato anche per l'estrazione di olio da teste di salmone, mettendolo a confronto con Neutrase e Protamax, altre due proteasi. In condizioni di 60°C e 2 ore, l'Alcalase si è dimostrato l'enzima più efficiente per l'estrazione di olio.²⁹ L'Alcalase è stato comparato ad altri enzimi anche per l'estrazione di olio da krill proveniente dall'Antartico.³⁰ Le condizioni operative per l'Alcalase sono state: temperatura 55°C, pH 8.0 e tempo 3 ore. Anche in questo caso l'Alcalase ha avuto una resa in olio maggiore rispetto alle altre proteasi, evidenziandone l'efficacia per l'estrazione di olio da scarti di pesce.

Un altro studio ha utilizzato Alcalase (180 min, 50 °C e pH 8) per estrazione enzimatica da scarti di pesce generici da un mercato di pesce. L'analisi degli andamenti della resa in olio ha sottolineato il fatto di come il rapporto E/S% sia una variabile importante del processo. In particolare, viene dimostrato di come questa variabile sia la più influente nel processo questo perché ad alte concentrazioni relative di enzima ci sono più siti attivi disponibili per idrolizzare il substrato.³² Inoltre, ad un maggiore grado di idrolisi corrisponde un maggiore recupero di olio.³²

In tutti gli studi visti la temperatura per l'estrazione enzimatica è stata considerata tra i 50 °C e i 60°C, che è in linea con i 55 °C utilizzati per l'idrolisi enzimatica in questo lavoro di tesi. Il pH invece è stato utilizzato in un range tra i 7.5 e 8.5, dove ha ottenuto i risultati migliori per recupero di olio. Il tempo di reazione è stato fatto variare in range diversi, fino alle 4 ore addirittura. Tuttavia, gli andamenti analizzati hanno mostrato come effettivamente nella prima ora di idrolisi venga estratto la maggior parte dell'olio.

3.3 Omega-3

Per calcolare EPA e DHA presente nel campione sono state utilizzate delle curve di calibrazione ottenute da standard di metil-esteri di EPA e di DHA, Tabella 3.14, Figura 3.3 e Figura 3.4.

Tabella 3.14 Equazioni delle curve di calibrazione (dove “y” corrisponde all’area del cromatogramma corrispettiva a EPA e DHA, e “x” ai ppm del componente) e coefficiente di determinazione (R²).

	Eq. curva di calibrazione	R²
EPA	$y = 684582x - 2 \cdot 10^7$	0.997
DHA	$y = 620177 - 3 \cdot 10^7$	0.999

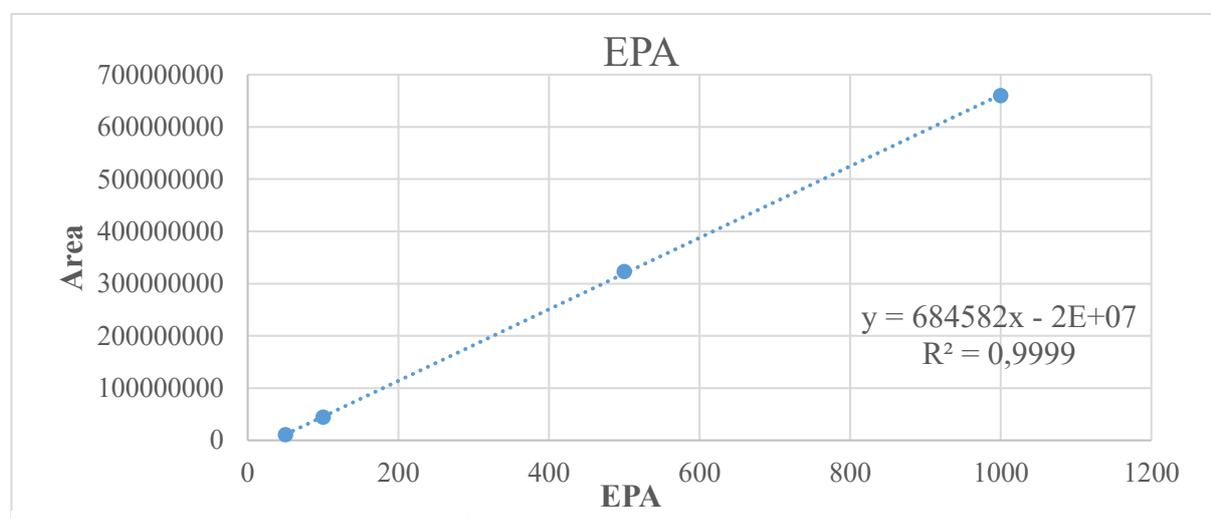


Figura 3.3 Curva di calibrazione per EPA.

Per poter calcolare i ppm di EPA e DHA nel campione si sono calcolate le aree del cromatogramma in corrispondenza dei picchi di EPA e DHA. Il campione N°8 di olio dal peso di 112.2 mg è stato utilizzato per fare un triplicato (8a, 8b, 8c). Tabella 3.15 mostra le aree del cromatogramma ottenute per 8a, 8b e 8c, questi valori sono stati inseriti come ordinata (y) nelle rispettive equazioni presenti in Tabella 3.14 per poter ottenere i ppm diluiti (x) di EPA e DHA, Tabella 3.16.

Tabella 3.15 Aree del cromatogramma di 8a, 8b e 8c per EPA e DHA.

area		
	EPA	DHA
8a	279567486	$1.272 \cdot 10^9$
8b	350262559	$1.328 \cdot 10^9$
8c	278800304	$1.077 \cdot 10^9$

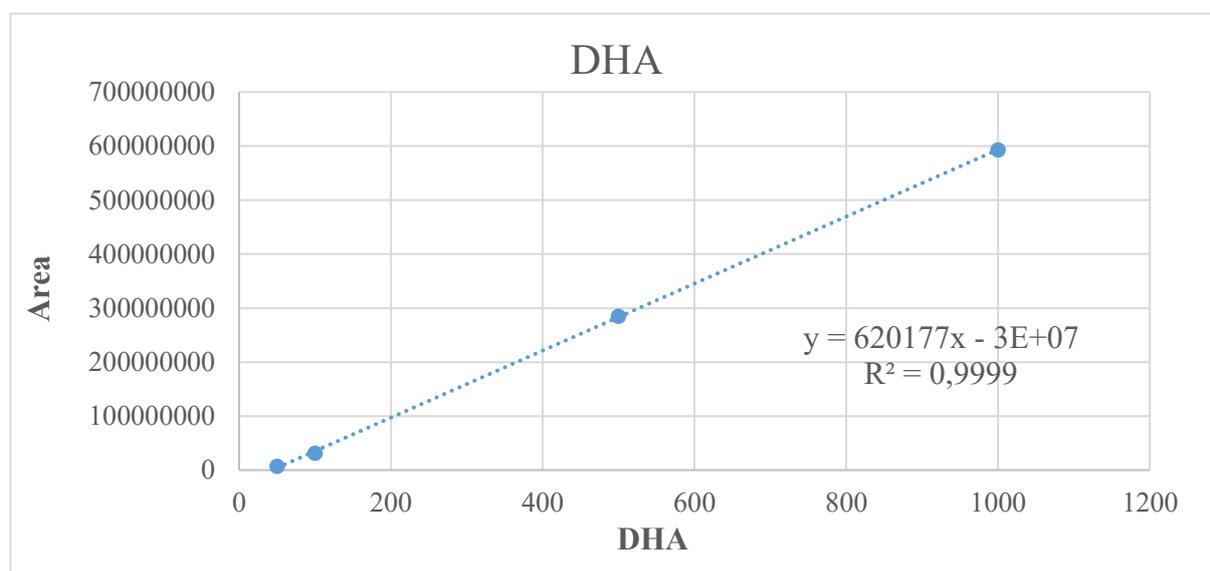


Figura 3.4 Curva di calibrazione per DHA.

Tabella 3.16 Quantità di 8a, 8b e 8c per EPA e DHA in ppm per il campione diluito. Ottenuta grazie all'equazione della curva di calibrazione.

ppm diluito		
	EPA	DHA
8a	431.29175	2099.0606
8b	533.07249	2189.6145
8c	430.18723	1785.2236

La Tabella 3.17 mostra i ppm di EPA e DHA non diluiti, ottenuti moltiplicando i valori presenti in Tabella 3.16 poiché la diluizione era in rapporto 1:2.

Tabella 3.17 Quantità di 8a, 8b e 8c per EPA e DHA in ppm per il campione non diluito.

Ppm		
	EPA	DHA
8a	862.58349	4198.12120
8b	1066.14499	4379.22910
8c	860.374452	3570.44720

Nella Tabella 3.18 vi sono i mg di EPA e DHA ottenuti per 8 a, 8b e 8c. Il volume della vial è di 0.003 L e moltiplicandolo per i ppm si ottengono i mg.

Tabella 3.18 Quantità di 8a, 8b e 8c per EPA e DHA in mg.

mg		
	EPA	DHA
8a	2.5877	12.5943
8b	3.1984	13.1377
8c	2.5811	10.7113

In Tabella 3.19 sono stati riportati il rapporto tra mg ottenuti e la quantità iniziale di olio in g (0.1122). Inoltre, sono state calcolate la media e la deviazione standard.

Tabella 3.19 Triplicato, media e deviazione standard di EPA e DHA del campione N°8 espressi in mg su g di olio

mg/g olio		
	EPA	DHA
8a	23.0637	112.2492
8b	28.5065	117.0917
8c	23.0047	95.4665
Media	24.8583	108.2691
Deviazione Standard	3.1596	11.3487

La Tabella 3.20, invece, mostra la percentuale di EPA e DHA. I valori presenti in Tabella 3.15 sono stati divisi per 1000 (per avere stessa unità di misura) e moltiplicati per 100.

Tabella 3.20 Percentuale di EPA e DHA presenti nel triplicato, media e deviazione standard.

%		
	EPA	DHA
8a	2.30637	11.22492
8b	2.85065	11.70917
8c	2.30047	9.54665
Media	2.48583	10.82691
Deviazione Standard	0.31596	1.13487

Confrontando i valori percentuali ottenuti di EPA e DHA con altri studi si può notare come la percentuale di EPA e DHA dipenda molto dalla specie analizzata e dalla diversità del substrato di partenza.²³ Nella nostra analisi DHA risulta maggiore rispetto ad EPA e questo è un trend molto comune nei processi di estrazione che utilizzano specie di tonno come substrato.^{23,24,25} In

particolare, si nota come la quantità di EPA e DHA, ed in generale di PUFA, ottenuta con il metodo di estrazione Bligh e Dyer, (EPA 0.32 e DHA 1.27) sia notevolmente più bassa rispetto ad una corrispettiva estrazione con idrolisi enzimatica con Alcalase (EPA 6.05 e DHA 27.15).²⁴ Si può dedurre quindi che nonostante una minore resa in quantità di olio estratto, il metodo di estrazione enzimatica preserva meglio le caratteristiche tipiche dell'olio ottenuto da scarti di tonno.

3.4 Indice di Solubilità-TCA e attività antiossidante

Per poter effettuare il calcolo del TCA-Solubility Index è stato calcolato inizialmente il quantitativo di N all'interno dei campioni di pesce. È stato ricavato dall'analisi elementare il valore di N%, pari a 3.1075. Questo valore è stato moltiplicato per i vari campioni di pesce ed è stata ottenuta l'ultima colonna presente in Tabella 3.18 e rappresenta il denominatore dell'equazione (2.3).

Tabella 3.21 N in g presente nei campioni di pesce. È stato utilizzato il valore percentuale di 3.1075 ricavato da analisi elementare.

N°	pH	E/S	Tempo (min)	Campione (g)	N (g) campione
1	6.5	0,1	30	19.9744	0.62070448
2	8.5	0,1	30	20.3165	0.631335238
3	6.5	1	30	19.9773	0.620794598
4	8.5	1	30	20.1088	0.62488096
5	6.5	0,1	120	20.7844	0.64587523
6	8.5	0,1	120	19.986	0.62106495
7	6.5	1	120	19.9457	0.619812628
8	8.5	1	120	20.0098	0.621804535
9	6.5	0,55	75	20.9363	0.650595523
10	8.5	0,55	75	19.9678	0.620499385
11	7.5	0,1	75	20.2672	0.62980324
12	7.5	1	75	20.0354	0.622600055
13	7.5	0,55	30	20.1537	0.626276228
14	7.5	0,55	120	20.1638	0.626590085
15	7.5	0,55	75	20.1408	0.62587536
16	7.5	0,55	75	20.1905	0.627419788
17	7.5	0,55	75	20.1488	0.62612396

Successivamente, la parte proteica dei 17 estratti ottenuti con estrazione enzimatica è stata filtrata, miscelata con una quantità pari di soluzione TCA (20 mL) e analizzata con Analizzatore Elementare Vario Macro Cube per valutarne il contenuto di N%. Sono stati prelevati circa 0.1 g da ogni campione, Tabella 3.22.

Tabella 3.22 Valori di N% e di N (g) per gli estratti proteici dei 17 campioni miscelati con soluzione TCA.

N°	Peso (g)	N%	N (g)
1	0.1097	0.59	0,000647
2	0.105	0.61	0,000641
3	0.0991	0.50	0,000496
4	0.1049	0.65	0,000682
5	0.102	0.44	0,000449
6	0.1072	0.59	0,000632
7	0.1074	0.52	0,000558
8	0.1026	0.62	0,000636
9	0.1023	0.56	0,000573
10	0.1095	0.52	0,000569
11	0.1042	0.58	0,000604
12	0.1099	0.65	0,000714
13	0.0944	0.49	0,000463
14	0.1066	0.54	0,000576
15	0.1097	0.65	0,000713
16	0.1097	0.64	0,000702
17	0.1048	0.66	0,000692

La Tabella 3.23 mostra la quantità di N (g) estratti totali. La quantità di N presente in Tabella 3.22 è stata infatti divisa per 0.1 mL che rappresenta la quantità di soluzione TCA utilizzata per l'analisi. N (g/mL) non diluito è il doppio rispetto a N (g/mL) diluito perché le quantità di estratto e soluzione TCA sono uguali.

Tabella 3.23 Quantità di N diluito, non diluito ed estratto. In particolare, i N estratti sono stati ottenuti moltiplicando i N non diluito per i 20 mL utilizzati per miscelare ogni campione di estratto proteico con la quantità di soluzione di TCA.

N°	N (g/ml) diluito	N (g/ml) non diluito	N (g) estratti
1	0.0064723	0.0129446	0.258892
2	0.006405	0.01281	0.2562
3	0.004955	0.00991	0.1982
4	0.0068185	0.013637	0.27274
5	0.004488	0.008976	0.17952
6	0.0063248	0.0126496	0.252992
7	0.0055848	0.0111696	0.223392
8	0.0063612	0.0127224	0.254448
9	0.0057288	0.0114576	0.229152
10	0.005694	0.011388	0.22776
11	0.0060436	0.0120872	0.241744
12	0.0071435	0.014287	0.28574
13	0.0046256	0.0092512	0.185024
14	0.0057564	0.0115128	0.230256
15	0.0071305	0.014261	0.28522
16	0.0070208	0.140416	0.280832

17	0.0069168	0.0138336	0.276672
----	-----------	-----------	----------

Per ottenere l'Indice di Solubilità-TCA è stata utilizzata la formula 2.3 i cui risultati sono in Tabella 3.24.

Tabella 3.24 Indice di solubilità – TCA %.

N°	pH	E/S	Tempo (min)	Indice di solubilità - TCA %
1	6.5	0.1	30	41.7
2	8.5	0.1	30	40.6
3	6.5	1	30	31.9
4	8.5	1	30	43.6
5	6.5	0.1	120	27.8
6	8.5	0.1	120	40.7
7	6.5	1	120	36.0
8	8.5	1	120	40.9
9	6.5	0.55	75	35.2
10	8.5	0.55	75	36.7
11	7.5	0.1	75	38.4
12	7.5	1	75	45.9
13	7.5	0.55	30	29.5
14	7.5	0.55	120	36.7
15	7.5	0.55	75	45.6
16	7.5	0.55	75	44.8
17	7.5	0.55	75	44.2

L'Indice di Solubilità – TCA ha il grande vantaggio di essere un metodo molto semplice da applicare. Tuttavia, ha una grande serie di svantaggi, tra cui l'assunzione che l'azoto TCA – solubile derivi solo da piccoli peptidi e aminoacidi, che può non essere corretta dal momento che non tutte le proteine intatte vengono fatte precipitare dal TCA. Questo metodo, infatti, sovrastima il DH e quindi si preferisce chiamarlo TCA – N Solubile, e questo è più appropriato dal momento che non misura la rottura di legami peptidici.¹⁹

L'attività antiossidante degli estratti proteici risulta alta e con valori simili in tutti i campioni, sottolineando come questa non dipenda dalle condizioni con cui l'idrolizzato viene formato. L'Alcalase risulta essere un ottimo enzima per la formazione di estratti proteici con alta attività di eliminazione dei radicali liberi da diverse specie marine.⁸

3.5 Cinetica

Sono state effettuate due prove per il calcolo del DH, che ha permesso la valutazione della cinetica del processo. In Tabella 3.25 sono mostrati i valori ottenuti, insieme alla media ed alla deviazione standard.

Tabella 3.25 Misurazioni del grado di idrolisi durante per valutare la cinetica. Valori delle due prove DH 1 e DH 2, media e deviazione standard.

Tempo (min)	DH 1	DH 2	Media	Deviazione Std.
1	0.500954	0.167896	0.334425	0.235508
2	1.502862	1.007375	1.255118	0.350363
3	3.005725	2.518437	2.762081	0.344565
4	5.009541	4.701082	4.855311	0.218114
5	7.514312	6.883727	7.199019	0.445891
6	10.01908	9.905851	9.962466	0.080067
11	13.52576	12.76008	13.14292	0.541419
16	15.02862	16.45379	15.7412	1.007742
21	17.70038	17.29326	17.49682	0.287873
26	18.5353	19.14012	18.83771	0.427669
31	19.53721	19.8117	19.67446	0.194094
36	19.87118	20.81908	20.34513	0.670264
41	19.87118	20.98697	20.42908	0.788984
46	20.20515	21.49066	20.8479	0.908993
51	20.87309	21.82645	21.34977	0.674129
56	20.87309	22.16224	21.51767	0.911569
61	21.37404	22.33014	21.85209	0.676062
66	21.37404	22.49803	21.93604	0.794782
71	21.37404	22.49803	21.93604	0.794782
86	22.04198	22.66593	22.35396	0.441198
101	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486
116	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486
131	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486
146	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486
180	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486
240	22.37595	23.00172	22.68884	0.442486

I valori ottenuti sono stati elaborati mediante il software “Σ-plot”. In Tabella 3.26 sono presenti i valori ottenuti utilizzando “Σ-plot” da cui poi è stato ricavato il grafico presente in Figura 3.5.

Tabella 3.26 Valori di DH ottenuti con l’utilizzo del software “Σ-plot” utilizzati per capire il modello cinetico del sistema.

Tempo (min)	DH						
1	2.1131	1.9336	3.7897	2.8672	5.2399	3.8008	6.5064
4.7344	7.6222	5.668	8.6127	6.6016	9.4978	7.5352	10.2935
8.4688	11.0126	9.4023	11.6658	10.3359	12.2617	11.2695	12.8076
12.2031	13.3094	13.1367	13.7723	14.0703	14.2007	15.0039	14.5982
15.9375	14.9682	16.8711	15.3133	17.8047	15.636	18.7383	15.9384
19.6719	16.2224	20.6055	16.4896	21.5391	16.7414	22.4727	16.9791
23.4063	17.204	24.3398	17.4169	25.2734	17.6189	26.207	17.8107
27.1406	17.9931	28.0742	18.1668	29.0078	18.3323	29.9414	18.4903
30.875	18.6413	31.8086	18.7857	32.7422	18.9238	33.6758	19.0563
34.6094	19.1832	35.543	19.3051	36.4766	19.4222	37.4102	19.5348

38.3438	19.6431	39.2773	19.7473	40.2109	19.8478	41.1445	19.9447
42.0781	20.0381	43.0117	20.1284	43.9453	20.2155	44.8789	20.2998
45.8125	20.3812	46.7461	20.4601	47.6797	20.5364	48.6133	20.6103
49,5469	20,682	50,4805	20,7514	51,4141	20,8188	52,3477	20,8842
53.2813	20.9477	54.2148	21.0094	55.1484	21.0693	56.0820	21.1276
57.0156	21.1843	57.9492	21.2394	58.8828	21.2931	59.8164	21.3453
60.75	21.3962	61.6836	21.4458	62.6172	21.4941	63.5508	21.5412
64.4844	21.5871	65.418	21.6319	66.3516	21.6757	67.2852	21.7184
68.2188	21.7601	69.1523	21.8008	70.0859	21.8405	71.0195	21.8794
71.9531	21.9174	72.8867	21.9545	73.8203	21.9909	74.7539	22.0264
75.6875	22.0612	76.6211	22.0952	77.5547	22.1285	78.4883	22.1611
79.4219	22.1931	80.3555	22.2244	81.2891	22.255	82.2227	22.2851
83.1563	22.3145	84.0898	22.3434	85.0234	22.3717	85.957	22.3994
86.8906	22.4267	87.8242	22.4534	88.7578	22.4796	89.6914	22.5053
90.625	22.5306	91.5586	22.5554	92.4922	22.5797	93.4258	22.6036
94.3594	22.6271	95.293	22.6502	96.2266	22.6952	97.1602	22.6952
98.0938	22.7171	99.0273	22.7386	99.9609	22.7598	100.8945	22.7806
101.8281	22.801	102.7917	22.8212	103.6953	22.841	104.6289	22.8605
105.5625	22.8796	106.4961	22.8985	107.4297	22.9171	108.3633	22.9353
109.2969	22.9533	110.2305	22.9711	111.1641	22.9885	112.0977	23.0057
113.0313	23.0226	113.9648	23.0393	114.8984	23.0557	115.832	23.0719
116.7656	23.0878	117.6992	23.1035	118.6328	23.119	119.5664	23.1343
120.5	23.1493	121.4336	23.1642	122.3672	23.1788	123.3008	23.1932
124.2344	23.2075	125.168	23.2215	126.1016	23.2353	127.0352	23.249
127.9688	23.2624	128.9023	23.2757	129.8359	23.2889	130.7695	23.3018
131.7031	23.3146	132.6367	23.3272	133.5703	23.3396	134.5039	23.3519
135.4375	23.364	136.3711	23.376	137.3047	23.3878	138.2383	23.3995
139.1719	23.411	140.1055	23.4224	141.0391	23.4336	141.9727	23.4447
142.9063	23.4557	143.8398	23.4666	144.7734	23.4773	145.707	23.4879
146.6406	23.4983	147.5742	23.5086	148.5078	23.5189	149.4414	23.529
150.375	23.5389	151.3086	23.5488	152.2422	23.5585	153.1758	23.5682
154.1094	23.5777	155.043	23.5871	155.9766	23.5965	156.9102	23.6057
157.8438	23.6148	158.7773	23.6238	159.7109	23.6327	160.6445	23.6415
161.5781	23.6502	162.5117	23.6589	163.4453	23.6674	164.3789	23.6759
165.3125	23.6842	166.2461	23.6925	167.1797	23.7007	168.1133	23.7087
169.0469	23.7168	169.9805	23.7247	170.9141	23.7325	171.8477	23.7403
172.7813	23.748	173.7148	23.7556	174.6484	23.7631	175.582	23.7706
176.5156	23.778	177.4492	23.7853	178.3828	23.7925	179.3164	23.7997
180.25	23.8068	181.1836	23.8138	182.1172	23.8208	183.0508	23.8277
183.9844	23.8345	184.918	23.8412	185.8516	23.8479	186.7852	23.8546
187.7188	23.8612	188.6523	23.8677	189.5859	23.8741	190.5195	23.8805
191.4531	23.8868	192.3867	23.8931	193.3203	23.8993	194.2539	23.9055
195.1875	23.9116	196.1211	23.9176	197.0547	23.9236	197.9883	23.9296
198.9219	23.9355	199.8555	23.9413	200.7891	23.9471	201.7227	23.9528
202.6563	23.9585	203.5898	23.9641	204.5234	23.9697	205.457	23.9752

206.3906	23.9807	207.3242	23.9862	208.2578	23.9916	209.1914	23.9969
210.125	24.0022	211.0586	24.0075	211.9922	24.0127	212.9258	24.0179
213.8594	24.023	214.793	24.0281	215.7266	24.0331	216.6602	24.0381
217.5938	24.0431	218.5273	24.048	219.4609	24.0529	220.3945	24.0578
221.3281	24.0626	222.2617	24.0673	223.1953	24.0721	224.1289	24.0768
225.9961	24.086	226.9297	24.0906	227.8633	24.0951	228.7969	24.0997
229.7305	24.1041	230.661	24.1086	231.5977	24.113	232.5313	24.1173
233.4648	24.1217	234.3984	24.126	235.332	24.1303	236.2656	24.1345
237.1992	24.1387	238.1328	24.1429	239.0664	24.147	240	24.1511

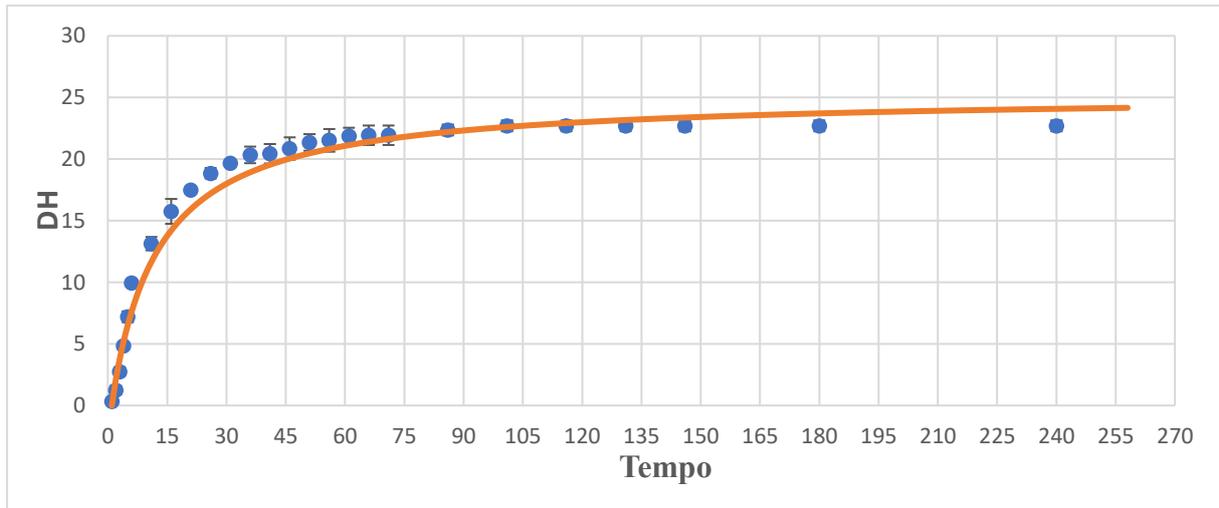


Figura 3.5 Andamento della cinetica del sistema. I punti blu rappresentano la media delle misurazioni fatte con DH1 e DH2, in arancione la curva ricavata dai valori ottenuti con Σ -plot.

L'equazione che descrive il modello e con cui conoscendo il tempo trovo la percentuale DH è la seguente:

$$\%DH = \frac{a \cdot bt}{1 + ct} \quad (3.1)$$

Il valore dei coefficienti a, b e c e del loro errore standard sono elencati in Tabella 3.27.

Tabella 3.27 Coefficienti ed errori standard di a b e c.

	Coefficienti	Errore Standard
a	-5.0027	0.825
b	3.6432	0.2947
c	0.1492	0.0132

La bontà degli esperimenti effettuati è corroborata dai valori di R e R^2 , presenti in tabella 3.28.

Tabella 3.28 Valori di R e R^2 per il modello cinetico.

R	R^2
0.9966	0.9932

Il meccanismo di idrolisi delle proteine del tonno è relativamente complesso poiché è formato per gran parte da proteine insolubili. È stato suggerito che la reazione completa possa avvenire in due step. Il primo corrispondente all'innalzamento iniziale del grado di idrolisi (DH) (Figura 3.5) avviene rapidamente a causa della rapida rottura di tante catene polipeptidiche che causa un rilascio di una grande quantità di materiale solubile nella soluzione. Successivamente vi è una reazione più lenta e in cui vengono digerite proteine del nucleo interno.^{26, 28}

La Figura 3.5 inoltre mostra che a valori di DH inferiori al 10% i valori sperimentali (in blu) sono in linea con i valori teorici (linea arancione), quando il DH supera il 10% c'è una piccola variazione con l'aumento del tempo di reazione.²⁷

L'andamento ottenuto in Figura 3.5 rispecchia gli andamenti trovati in letteratura per tonno, sardine e salmone.^{26,27,28} La concentrazione iniziale dell'enzima risulta importante per ottenere uno stazionario più elevato nel tempo. Uno studio ha condotto idrolisi enzimatica su stomaco di tonno a pinna gialla utilizzando Alcalase, sottolineando come un'aggiunta di substrato fresco durante la fase stazionaria (quindi dopo circa 90/120 minuti) si abbia un notevole incremento relativo del grado di idrolisi a seconda di quanta massa di substrato venga aggiunta.²⁸ In un altro studio l'utilizzo di scarti di salmone per l'idrolisi ha fatto ottenere un grado di idrolisi dell'estratto con stesso andamento, sia utilizzando l'Alcalase (55°C, E/S% 0.5, pH 7.5) sia utilizzando altre proteasi.²⁶

4. Conclusioni

Il processo di produzione del tonno in scatola produce una quantità di sottoprodotti tale da rendere obbligatorio il loro utilizzo per lo sviluppo di prodotti ad alto valore aggiunto. I classici processi che sfruttano questi sottoprodotti producono principalmente farina di pesce e come prodotto secondario olio di pesce. I processi utilizzati maggiormente, tra cui la pressatura a umido, non vengono modificati da 70 anni. Tuttavia, negli ultimi decenni sempre più ricerche scientifiche si sono concentrate su metodi innovativi per poter sfruttare al massimo tutti i sottoprodotti dell'industria ittica. Tra questi metodi quello dell'idrolisi enzimatica è stato uno dei più studiati. L'idrolisi enzimatica permette di ottenere, partendo da una qualsivoglia tipologia di substrato di origine marina, un idrolizzato proteico ricco di peptidi e olio di pesce. Tra gli enzimi più efficaci ed utilizzati per l'idrolisi enzimatica vi è l'Alcalase poiché permette, a determinate condizioni (pH, E/S% e tempo di reazione), sia di estrarre olio con una resa confrontabile con quella più classica di Bligh e Dyer, avendo un superiore quantitativo di EPA e DHA, sia ad ottenere un idrolizzato proteico ricco in peptidi dall'alta attività antiossidante. EPA e DHA sono tra i più importanti e più presenti PUFA nell'olio di pesce (nel tonno in particolare risulta un maggior contenuto di DHA che di EPA) e sono due tra gli omega-3, importanti acidi grassi nelle diete umane e nell'aiutare a combattere diverse malattie.

Gli scarti di produzione del tonno in scatola sono risultati essere sia un buon substrato per l'estrazione di olio con Alcalase rispetto al metodo di Bligh e Dyer poiché a pH 8.5, temperatura 55°C, E/S% 1 durata di 120 è stata ottenuta una resa dell'81% con un contenuto di circa il 10% di DHA, e sia per la produzione di un estratto proteico con un grado di idrolisi del 25%, in linea con quelli ottenuti in altri studi, ricco in peptidi dall'alta attività antiossidante che non è dipesa dalle diverse condizioni in cui sono stati prodotti gli estratti.

Questo studio ha dimostrato la fattibilità tecnica di un'estrazione enzimatica a partire dagli scarti della lavorazione del tonno in scatola. Questi scarti vengono così trasformati in una risorsa, donando nuova vita ad un sottoprodotto che altrimenti verrebbe smaltito e seguendo in questo modo i principi di un'economia più circolare.

5. Bibliografia

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. *The state of world fisheries and aquaculture 2018 : meeting the sustainable development goals*.
2. Arvanitoyannis, I. S. & Kassaveti, A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology* **43**, 726–745 (2008).
3. Kim, S. K. & Mendis, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International* **39**, 383–393 (2006).
4. Gamarro, E. G. Orawattanamateekul, W. Sentina, J. Gopal, T.K. S. By-products of tuna processing. *Globefish Research Programme* **112**, (2013).
5. Adeoti, I. A. & Hawboldt, K. A review of lipid extraction from fish processing by-product for use as a biofuel. *Biomass and Bioenergy* **63**, 330–340 (2014).
6. Bonilla-Mendez, Jeimmy Rocio, & Hoyos-Concha, Jose Luis. Methods of extraction refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Ciencia y Tecnologia Agropecuaria*, **19**(3), 645-668 (2018).
7. Ivanovs, K. & Blumberga, D. Extraction of fish oil using green extraction methods: A short review. in *Energy Procedia* vol. 128 477–483 (Elsevier Ltd, 2017).
8. Tacias-Pascacio, V. G. *et al.* Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 165 2143–2196 (2020).
9. Kim, J., Kwon, M. Y. & Kim, S. Biological Degumming of Silk Fabrics with Proteolytic Enzymes. *Journal of Natural Fibers* **13**, 629–639 (2016).
10. Kanelli, M. Vasilakos, S. Ladas, S. Symianakis, E. Christakopoulos, P. Topakas, E. Surface modification of polyamide 6.6 fibers by enzymatic hydrolysis, *Process Biochemistry*.
11. Klomklao, S. & Benjakul, S. Utilization of Tuna Processing Byproducts: Protein Hydrolysate from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Viscera. *Journal of Food Processing and Preservation* **41**, (2017).
12. Bimbo, A. P. *Marine Oils*. <http://www.fao.org/shery/topic/16140/en>.
13. Sigma-Aldrich, Enzymatic Assay Of Protease Using Casein As a Substrate. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-protease-casein-as-a-substrate.html>
14. Cavazzuti, M. Design of Experiments. *Optimization Methods*, 13-42 (2013).
15. Ramakrishnan VV, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM (2013) Extraction of Oil from Mackerel Fish Processing Waste using Alcalase Enzyme. *Enzyme Engineering* **2**: 115 (2013).
16. Bligh, E. G. Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, (1959).
17. Brotas S. C. Milenam, Carvalho A. Grazielle, Pereira A. P. Pedro Determination, through Derivatization and GC-MS Analysis, of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Fish Oil Capsules Sold in Salvador, Bahia, *J. Braz. Chem. Soc.* **31**, 447-455, (2020).
18. Hoyle, N. Merritt, J. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* **59**, (1994).
19. Rutherford, S. M. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International* **93**, (2010).
20. Kedare, S. Singh, R. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* **48**, 412-442, (2011).
21. Mariott, F. Tomé, D. Mirand, P. Converting Nitrogen into Protein – Beyond 6.25 and Jones’ Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48**, 177-184, (2008).

22. Luque de Castro, M. D. Priego-Capote, F. Soxhlet Extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* 1217, 2383-2389, (2010).
23. Ferdosh, S. Sarker, Z. I. Norulaini, N. Oliveira, A. Yunus, K. Chowdury, A. J. Akanda, J. Omar, M. Quality of Tuna Fish Oils extracted from processing the by-products of three species of Neritic Tuna Using Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN, (2014).
24. Oliveira, D. A. S. B. Licodiedoff, S. Furigo Jr., A. Ninow, J. L. Bork, J. A. Podestà, R. Block, J. M. Waszczyński, N. Enzymatic extraction of oil from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products: a comparison with other extraction methods. *International Journal of Food Science and Technology* **52**, 699 – 705, (2017).
25. Novizar, N. Ayu, D. Kesuma, S. Physicochemical and Fatty Acid Profile of Fish Oil from Head of Tuna (*Thunnus albacares*) Extracted from Various Extraction Method. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* **7**, (2017)
26. Linder, M. Fanni, J. Parmentier, M. Proteolytic Extraction of Salmon Oil and PUFA Concentration by Lipases. *Marine Biotechnology* **15**, 70-76, (2005).
27. Qian, J., Zhang, H. & Liao, Q. The properties and kinetics of enzymatic reaction in the process of the enzymatic extraction of fish oil. *Journal of Food Science and Technology* **48**, 280 – 284 (2011).
28. Guerard, F. Dufossé, L. De La Broise, D. Binet A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 1051 – 1059, (2001).
29. Gbogouri, G. A. Linder, M. Fanni, J. Parmentier, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European Journal Lipid Science Technology* **108**, 766-775, (2006).
30. Wang, L. Yang, F. Rong, Y. Yuan, Y. Ding, Y. Shi, W. Wang, Z. Effect of different proteases enzymatic extraction on the lipid yield and quality of Antarctic krill oil. *Food Science & Nutrition* **7**, 2224-2230, (2019).
31. Mbatia, B. Adelercreutz, D. Adelercreutz, P. Mahadhy, A. Mulaa, F. Mattiasson, B. Enzymatic oil extraction and positional analysis of ω -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads. *Process Biochemistry* **45**, 815-819, (2010).
32. Araujo, J. Sica, P. Costa, C. Marquez, M.C. Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products.

6. Ringraziamenti

Questa Tesi è il picco della mia carriera universitaria. Sono riuscito a concludere questa Tesi e questo percorso grazie a persone che meritano più di quanto io possa fare con questi ringraziamenti.

Prima di tutto voglio ringraziare Silvia che mi ha permesso di lavorare su questo argomento tanto particolare quanto importante. Il suo rispetto, la sua fiducia e la sua passione per questo progetto sono stati fondamentali per me. Grazie, davvero.

Ringrazio i miei Genitori. Mi avete permesso di diventare ciò che sono grazie ai Vostri insegnamenti, ai Vostri sacrifici, alla Vostra immensa forza ed alla Vostra fiducia incondizionata verso di me. Se sono arrivato fino a qui lo devo principalmente a Voi e sul Vostro non avere mai dubbio sul fatto che non potessi riuscirci. Questo è un Nostro traguardo, non lo dimenticate mai perché io non dimenticherò mai tutto quello che Voi avete fatto e farete per me. Vi amo.

Ringrazio mia Sorella. Il nostro è un rapporto speciale, invidiabile da tutti. Non so se sei la sorella migliore che si possa avere ma sicuramente sei la sorella migliore che io abbia mai potuto desiderare. Siamo caratterialmente complementari e forse è per questo che ci sopportiamo a vicenda da un bel po' di anni. Anni che tu hai reso più facili per me, anche se magari per te non lo sono sempre stati. Sono qui per Te, come tu ci sempre stata per me, e lo sarò sempre, incondizionatamente. Ti amo.

Ringrazio Michela con Marco e Giovanni con Francesca per il costante supporto, spero di essere d'esempio per le vostre figlie come voi lo siete sempre stati per me.

Ringrazio Zio Lello e Zia Alberta per il proficuo aiuto e per la sincerità con cui hanno sempre creduto in me.

Ringrazio Zia Piera, il suo puntuale interesse è sempre stato significativo e di valore.

Inoltre, voglio ringraziare i miei più cari amici che mi hanno supportato (e sopportato) in questi anni e durante la stesura di questa Tesi.

Ringrazio Erica e Martina, due persone incredibili che sanno bene quanto siano fondamentali per me. La loro presenza giornaliera ha cambiato la mia vita in meglio. Sono onorato di conoscerle e di aver condiviso con loro tutti questi anni.

Ringrazio Sofia per la sua sincerità e i momenti di confronto.

Ringrazio Marcella e Tommaso per la loro energia e i ricordi indelebili dei momenti passati.

Ringrazio Andrea, Alessio, Davide, Edoardo, Francesca e Riccardo. Le persone con cui ho condiviso praticamente tutta la mia vita fino ad ora. Non potevo chiedere di meglio.

Infine, un ringraziamento speciale alle mie due nonne, Giuannica e Anna Maria. Lo spessore delle vostre vite mi ispira ogni giorno. Vi amo.