

## **PROGETTO P.RI.S.MA.-MED**

### **“PIANO RIFIUTI E SCARTI IN MARE DI PESCA, ACQUACOLTURA E DI PORTO NEL MEDITERRANEO”**

#### **COMPONENTE T3.1 “Best practice”**

**“Schema di Atto del Protocollo di buone prassi gestione integrata  
dei rifiuti urbani e speciali”**

**Prodotto T3.1.1 – PARTE II**  
**MODALITA' PER IL RIUTILIZZO DEI SOTTOPRODOTTI E DEGLI SCARTI**  
**DELLA PESCA E DELL'ACQUACOLTURA – ECONOMIA CIRCOLARE**



## Sommario

<b>Premessa .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Rapporto di Caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei prodotti residui di pesca e dell'acquacoltura .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Introduzione e metodiche di preparazione dei campioni.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Caratterizzazione microbiologica delle matrici organiche.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Caratterizzazione chimica delle matrici organiche .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Considerazioni finali .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Studio di Fattibilità per il Riutilizzo dei Residui Organici .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Valutazione normativa rispetto all'utilizzo di "scarti" della filiera ittica per estrazione di materie prime secondarie.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Regolamentazione generale sull'obbligo di sbarco e sull'impiego degli scarti .....	18
2.1.2 Obblighi nazionali di organizzazione, per l'ottemperanza all'obbligo di sbarco e l'impiego degli scarti.....	19
2.1.3 Competenza delle Organizzazioni di Produttori nella gestione degli scarti .....	20
2.1.4 Oggetto e scopo della regolamentazione europea: prodotti per fini diversi dal consumo umano.....	21
2.1.5 Interventi a supporto delle attività di sbarco e di impiego degli scarti.....	22
2.1.6 Regole applicabili agli scarti .....	23
<b>2.2 Scarti della pesca: studio dello stato dell'arte .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Caratterizzazione delle principali tipologie di pesca demersale e stima degli scarti...	24
2.2.2 Gestione dello scarto - aspetti logistici.....	28
<b>2.3 Utilizzo dello scarto organico: studio dello stato dell'arte .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 Composti bioattivi.....	32
2.3.2 Opzioni di gestione degli scarti – il Collagene.....	35
<b>2.4 Considerazioni .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 Studio sperimentale.....</b>	<b>46</b>

## Premessa

Il presente documento ha lo scopo di riassumere in unico documento quanto sviluppato nel progetto PRISMAMED in conclusione delle azioni pilota specifiche e sulla base dei risultati ottenuti, avviando l'ultima fase del progetto, consistente nella condivisione e successiva attuazione dei protocolli di *best practices* per la gestione dei rifiuti derivanti dalle attività di pesca, acquacoltura e diporto.

In particolare, tale azione risulta rilevante al fine di assicurare la governance dei rifiuti in ambito portuale e, ove possibile, il loro riutilizzo; nello specifico, riguarda la redazione di un protocollo di buone prassi per gestione integrata dei rifiuti urbani e speciali tra operatori/enti locali/autorità portuali/gestori, in grado di:

- fornire ai soggetti gestori le indicazioni sul corretto dimensionamento e allestimento dei punti di raccolta e stoccaggio dei rifiuti organici e speciali in funzione della tipologia e quantità, nonché le diverse modalità di smaltimento degli stessi, nonché fornire agli operatori della pesca e dell'acquacoltura adeguate modalità e procedure per il loro corretto smaltimento.
- definire modalità applicative tese ad avviare nuove attività produttive legate al recupero del materiale organico residuo.

A tale scopo il documento si compone di due sezioni, sviluppate come detto all'interno del progetto, che si prestano alla consultazione da parte dei soggetti interessati, ed in particolare:

### **SEZIONE I - GESTIONE DEI RIFIUTI**, a sua volta articolata in:

- ***Rapporto finale di caratterizzazione dei rifiuti assimilabili urbani e speciali*** che, attraverso una accurata analisi normativa, si prefigge lo scopo di classificare i rifiuti prodotti e raccolti occasionalmente da pescatori e acquacoltori che operano nell'areale di cooperazione. In questa sezione sono riportati anche specifici **approfondimenti** effettuati attraverso apposite campagne di raccolta rifiuti, finalizzate a definirne tipologia e quantità;
- ***Linee guida per l'allestimento di punti di raccolta di rifiuti urbani e speciali*** tra operatori/enti locali/autorità portuali/gestori, in cui sono definite le modalità e le procedure di gestione e/o di percorsi alternativi per l'individuazione e il dimensionamento di spazi fisici - adeguati alla qualità e alla quantità dei rifiuti - da adibire a punti di raccolta o simili all'interno dei porti, necessari per il successivo allestimento ad hoc di punti di conferimento e stoccaggio adeguati alle esigenze. Collegati alle Linee guida e riportati in appendice, è possibile consultare i seguenti documenti:

- quattro modelli di **Questionario** elaborati a seconda della categoria di appartenenza degli intervistati, utili in fase di dimensionamento dei punti di raccolta per i pescatori, ossia per chiarire qualità e quantità dei rifiuti prodotti e raccolti nella situazione oggetto di studio per far emergere esigenze sito-specifiche delle aree interessate. Le categorie considerate sono state i diportisti, gli enti gestori del servizio rifiuti, pescatori e produttori (mitilicoltori, piscicoltori, acquacoltori),
  - una Sintesi del rapporto finale di monitoraggio quali-quantitativo sui rifiuti prodotti e raccolti, recante le risultanze ottenute dall'attività di monitoraggio e classificazione dei rifiuti realizzata attraverso la somministrazione dei questionari indicati al punto precedente;
- ***Linee guida relative all'autorizzazione per i nuovi impianti di stoccaggio rifiuti.***

**SEZIONE II - MODALITA' PER IL RIUTILIZZO DEI SOTTOPRODOTTI E DEGLI SCARTI DELLA PESCA E DELL'ACQUACOLTURA – ECONOMIA CIRCOLARE**, dedicata all'esplorazione di nuove e innovative modalità di riutilizzo dei prodotti residui dei pesca e acquacoltura in un'ottica di economia circolare e articolata in:

- ***Rapporto di caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei prodotti residui di pesca e dell'acquacoltura;***
- ***Studio di fattibilità per il riutilizzo dei residui organici***

**La seconda sezione è oggetto della presente pubblicazione.**

---

**SEZIONE II – ECONOMIA CIRCOLARE**  
**MODALITA' PER IL RIUTILIZZO DEI SOTTOPRODOTTI E DEGLI SCARTI**  
**DELLA PESCA E DELL'ACQUACOLTURA**

# 1. Rapporto di Caratterizzazione chimico-fisica e biologica dei prodotti residui di pesca e dell'acquacoltura

## 1.1 Introduzione e metodiche di preparazione dei campioni

Attività fondamentale per la definizione di modalità applicative tese ad avviare nuove attività produttive legate al recupero del materiale organico - attraverso il riutilizzo diretto come alimento, o per la produzione di farine animali da utilizzare come mangime, o ancora per utilizzi alternativi e innovativi - è la **caratterizzazione dei residui organici derivanti dall'attività di pesca e acquacoltura**: analisi di tipo microbiologico, chimico e fisico per tipologia di frazione organica, al fine di stabilire le proprietà intrinseche di tale materiale e suggerirne la gestione successiva.

Le analisi sopra indicate, condotte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte, Liguria, Valle d'Aosta (IZS PLV) su incarico di Regione Liguria, hanno riguardato *in primis* il reperimento dei campioni biologici su cui avviare le indagini analitiche. In particolare:

- per quanto attiene l'attività di pesca, sono stati reperiti 12 sub-campioni a partire da campionamenti provenienti dalle peschate commerciali di motopescherecci professionali della marineria di S. Margherita Ligure operanti nel Golfo del Tigullio. Gli esemplari pescati appartengono a specie di acque profonde (OTB\_DWS, Bottom Otter Trawl - Deep Water Species, n=6) e specie demersali (OTB\_DES, Bottom Otter Trawl - Demersal Species, n=6) raccolti con la tecnica a strascico a due differenti livelli di profondità, da pescherecci lungo la piattaforma e la scarpata continentali comprese nella zona tra S. Margherita Ligure (GE) e Monterosso (SP). I campioni di scarto sono stati raccolti durante l'attività di pesca, separati dal resto del pescato e conservati in cassette in polistirolo destinate alla raccolta del pesce; immediatamente dopo lo sbarco, il materiale organico è stato classificato e congelato a -20°C in attesa della seguente lavorazione, propedeutica sia alle analisi chimiche sia a quelle microbiologiche. Al fine di verificare le differenze tra il pesce mantenuto a temperatura di refrigerazione per 24 -48 ore e quello conservato a -20°C, tre campioni raccolti tra Dicembre 2019 e Gennaio 2020 sono stati esaminati sia freschi (mantenuti a 4°C) che a 20° C. I campioni scongelati (circa 10-15 giorni dopo il prelievo) sono stati opportunamente esaminati, una porzione del campione è stata selezionata in modo da essere rappresentativa del campione di rifiuto organico prelevato durante l'intera pescata. Il materiale è stato omogenato attraverso apposito frullatore ed il composto ottenuto è stato in parte analizzato e in parte nuovamente congelato a -20°C per successive indagini di laboratorio

- per quanto attiene l'attività di acquacoltura, si è proceduto al reperimento di:

- n. 1 campione di itticultura, consistente in materiale organico costituito principalmente da prodotti di eviscerazione e in minor misura da pesci morti; il campione è stato suddiviso in diverse aliquote e congelato a -20°C in attesa delle successive analisi.
- n. 1 campione di molluschicoltura, rappresentato principalmente da valve vuote di mitili; il campione è stato pressato e sminuzzato in modo da ottenere un tritato uniforme, in parte analizzato e in parte congelato a -20°C.

Sono stati raccolti un totale di 14 campioni descritti in tabella 1

N° Camp	ACC.	DATA	MATRICE	TIPO PESCA	PROFONDIT A' (m.)	ZONA	T° conservaz. Campione
1	23514	26/02/2019	eviscerato di pesce	allevamento	-	Lavagna (GE)	-20°C
2	68650	31/05/2019	molluschi bivalvi	allevamento	-	Sardegna	-20°C
3	68682	11/07/2019	organico da pesca strascico	OTB_DWS	540-660	S. Margherita - Monterosso; Scarpata continentale	-20°C
4	68687	24/07/2019	organico da pesca strascico	OTB_DES	85-95	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	-20°C
5	68702	07/08/2019	organico da pesca strascico	OTB_DWS	540-610	S. Margherita - Monterosso; Scarpata continentale	-20°C
6	69346	22/08/2019	organico da pesca strascico	OTB_DES	60-100	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	-20°C
7	78397	12/09/2019	organico da pesca strascico	OTB_DES	55-80	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	-20°C
8	78645	27/09/2019	organico da pesca strascico	OTB_DWS	510-670	S. Margherita - Monterosso; Scarpata continentale	-20°C
9	97759	23/10/2019	organico da pesca strascico	OTB_DWS	510-635	S. Margherita - Monterosso; Scarpata continentale	-20°C
10	97764	30/10/2019	organico da pesca strascico	OTB_DES	55-90	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	-20°C
11	98886	26/11/2019	organico da pesca strascico	OTB_DES	55-90	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	-20°C
12	106594/1	19/12/2019	organico da pesca strascico	OTB_MIX	110-630	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma e Scarpata continentale	4°C
	106594/2	"	"	"	"	"	-20°C

13	10657/1	30/01/2020	organico da pesca strascico	OTB_DES	52-62	S. Margherita - Monterosso; Piattaforma continentale	4°C
	10657/2	"	"	"	"	"	-20°C
14	13090/1	06/02/2020	organico da pesca strascico	OTB_DWS	540-610	S. Margherita - Monterosso; Scarpata continentale	4°C
	13090/2	"	"	"	"	"	-20°C

**Tabella 1. Elenco dei campioni raccolti, tipologia (OTB\_DWS = Bottom Otter Trawl - Deep Water Species OTB\_DES = Bottom Otter Trawl - Demersal Species) zona e profondità di raccolta e temperature di refrigerazione.**

## 1.2 Caratterizzazione microbiologica delle matrici organiche

Per la caratterizzazione dei campioni raccolti e la conseguente valutazione dal punto di vista microbiologico, sono state predisposte una serie di analisi per il rilevamento di microrganismi indicatori, la cui presenza, a definite concentrazioni, può essere impiegata per valutare la qualità microbiologica del prodotto. Le analisi microbiologiche condotte riguardano sia la ricerca degli agenti patogeni più significativi per la tipologia di matrice, quali salmonella e listeria, sia microrganismi tossigeni (stafilococchi coagulasi positivi ed anaerobi solfito riduttori); inoltre è stata inserita la valutazione degli agenti responsabili del deterioramento. In particolare, il controllo della carica mesofila e psicrofila può essere un importante indicatore sia della qualità dei processi produttivi e/o di manipolazione sia della qualità della materia prima.

Il controllo delle temperature è l'elemento principale per garantire la corretta conservazione del materiale organico: conservare alle temperature appropriate significa ridurre al minimo il rischio microbiologico derivante dalla moltiplicazione batterica. Durante lo svolgimento delle prove, al termine del periodo T1-T3, si è resa evidente la necessità di raccogliere informazioni relative all'introduzione di variabili nelle modalità di conservazione dello scarto organico.

Relativamente ai campioni derivanti dall'attività di pesca, il confronto pratico con gli operatori del settore ha fatto emergere alcune difficoltà legate al processo di raccolta dei campioni di scarto della pesca e alla loro conservazione a terra, riguardanti la logistica del trasporto e la dotazione di strumenti atti al corretto mantenimento della "catena del freddo" (in particolare congelatori); tale problematica ha indotto a effettuare sui campioni raccolti una caratterizzazione dal punto di vista microbiologico, prima del congelamento, con conservazione in ambiente refrigerato (2-8°C) per 24-72 h e dopo congelamento a -20°C.

E' stato possibile condurre tale valutazione solo sui campioni di scarto organico raccolti a partire dal mese di Dicembre 2019 che, pertanto, sono stati identificati con doppio n° di accettazione a seconda

delle modalità di conservazione (Tabella 1): 106594/1 (refrigerato) e 106594/2 (congelato), 10657/1 (refrigerato) e 10657/2 (congelato), 13050/1 (refrigerato) e 13050/2 (congelato).

Fatta eccezione per il primo campione raccolto, a cui è stato assegnato il n° di accettazione 23514 e per il campione con n° di accettazione 10657/1, per i quali, per esigenze contingenti del laboratorio, sono stati utilizzati metodi di isolamento e conta secondo le procedure tradizionali descritte dalla normativa ISO, tutti gli altri campioni sono stati analizzati utilizzando il metodo di conta automatizzata denominato TEMPO® (Biomérieux), cui sono stati affiancati un test tradizionale, secondo procedura ISO, per il rilevamento di batteri anaerobi solfito riduttori e il test immunoenzimatico ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) per l'identificazione di specifici antigeni somatici di *Salmonella* e *Listeria*.

Tutti i metodi di analisi utilizzati mostrano caratteristiche di elevata accuratezza, precisione e specificità e sono riconosciuti (ISO) e certificati (AFNOR).

Di seguito viene riportato l'elenco dei test eseguiti:

- Rilevamento di ***Salmonella spp.***
- Rilevamento di ***Listeria monocytogenes***,
- Rilevamento di **Mesofili Aerobi**;
- Rilevamento di **Psicrofili Aerobi**;
- Rilevamento di **Enterobatteriaceae**;
- Rilevamento di **Anaerobi Solfito Riduttori**;
- Rilevamento di **Stafilococchi**, rappresentati principalmente da *S. aureus*, *S. intermedius* e da alcuni ceppi di *S. hyicus*.

Al termine delle prove sono stati rilevati i risultati illustrati in tabella 2 .

N° Camp	ACC.	T° conser vaz. Campi one	RISULTATI						
			Salmo nella (ELFA)	Listeria (ELFA)	Carica Mesofila Totale (TEMPO) UFC/g	Carica Psicrofila Totale (TEMPO) UFC/g	Enterobatte ri (TEMPO) UFC/g	Anaerobi Solfito Riduttori (ISO) UFC/g	Stafilococc hi UFC/g
1	23514	-20°C	NEG	NEG	3.400.000 (ISO)	6.600.000 (ISO)	250000 (ISO)	320	<100 (ISO)
2	68650	-20°C	NEG	NEG	1.100.000	<100	3.850	70	200
3	68682	-20°C	NEG	NEG	570.000	<100	18.000	<10	<100
4	68687	-20°C	NEG	NEG	290.000	<100	29.000	<10	100
5	68702	-20°C	NEG	NEG	125.000	<10	57	<10	<10
6	69346	-20°C	NEG	NEG	52.000	<10	<10	<10	<10
7	78397	-20°C	NEG	NEG	12.000	<10	100	<10	<10
8	78645	-20°C	NEG	NEG	100	<10	<10	<10	<10
9	97759	-20°C	NEG	NEG	9.500	<10	<10	<10	<10

10	97764	-20°C	NEG	NEG	5.000	<10	21	<10	<10
11	98886	-20°C	NEG	NEG	2.400	<100	130	<10	<10
12	106594/1	4°C	NEG	-	-	-	26.000	-	10
	106594/2	-20°C	NEG	NEG	3.250	>490.000	<100	<10	<10
13	10657/1	4°C	NEG	POS	190.000 (ISO)	<10 (ISO)	<10 (ISO)	1.400	160 (ISO)
	10657/2	-20°C	NEG	NEG	2.100.000	>490.000	10.000	320	<10
14	13090/1	4°C	NEG	NEG	6.800.000	<10 (ISO)	290.000	<10	<10
	13090/2	-20°C	NEG	NEG	430.000	>490.000	<100	36	<10

**Tabella 2 Risultati analisi microbiologiche dei 14 campioni raccolti, vengono riportate le unità formanti colonia (ufc) per le analisi quantitative e la presenza/assenza per quelle qualitative.**

### **Scarti della pesca:**

Dall'analisi dei risultati emerge che, all'interno dei campioni analizzati, in un unico caso (1/12) è stato rilevato un microrganismo patogeno per uomo ed animali (*Listeria monocytogenes*, campione n° 1065) analizzato dopo conservazione in ambiente refrigerato per circa 3 giorni (n° accettazione 10657/1). *L. monocytogenes* nell'uomo è trasmessa dagli alimenti attraverso l'ingestione di cibo contaminato, può causare un quadro clinico asintomatico, paucisintomatico o severo, con tassi di mortalità elevati soprattutto in soggetti fragili quali neonati, anziani, donne gravide e adulti immuno-compromessi.

*L. monocytogenes* è un batterio ubiquitario, molto diffuso nell'ambiente e si trova comunemente nel suolo, nell'acqua, nella vegetazione e nelle feci di numerose specie animali, senza che questi mostrino sintomi apparenti. Tollera gli ambienti salati, può crescere e riprodursi a temperature variabili da 0 a 45°C, presenta una buona stabilità ambientale e un'ottima resistenza al freddo. Poiché il batterio persiste nell'ambiente per lunghi periodi, la sua presenza indica generalmente una contaminazione ambientale del prodotto, oppure dovuta a manipolazione da parte di soggetti asintomatici successiva al campionamento.

Dalle analisi effettuate, non è stato rilevato alcun microrganismo patogeno per uomo ed animali appartenente al genere *Salmonella*, mentre ceppi enterotossici di Stafilococchi, che sono all'origine delle più comuni tossinfezioni alimentari, sono stati rilevati in tre campioni di scarto organico della pesca (68687, 106594/1 e 10657/1), ma in tutti i casi si trattava di una presenza in UFC inferiori a quelle che l'attuale normativa tollera nei prodotti alimentari ittici destinati al consumo umano (prodotti sgusciati di crostacei e molluschi cotti hanno valori tollerati compresi tra 100 e 1000 UFC/g - REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 e sm.i.).

Il rilevamento della presenza di Enterobatteriacee e di microrganismi anaerobi solfito riduttori, molto diffusi nelle acque e potenziali indicatori di contaminazioni di tipo fecale, era del tutto atteso in

considerazione del tipo di matrici analizzate, per la presenza dei visceri e delle interiora dei pesci che costituivano il prodotto di scarto (campioni costituiti sia da muscolo che visceri per i campioni DWS e DES). Considerato quanto detto, il conteggio delle relative colonie di Enterobatteriacee può essere considerato accettabile poiché i valori tollerati per alimenti crudi destinati al consumo umano sono fino a 10.000 UFC.

Anche il rilevamento della presenza di batteri psicrofili, normalmente diffusi nell'ambiente marino per la loro capacità di crescere e di moltiplicarsi a temperature comprese tra 0 e 20 °C, è stato riscontrato con valori da considerarsi nella norma sebbene non esistano dei valori di riferimento per i prodotti ittici destinati al consumo.

I campioni tenuti a 4°C prima del congelamento mostrano mediamente un aumento dei valori di contaminazione batterica. Infatti, il processo di analisi, in questo caso, prevede tempi prolungati di permanenza a temperature inferiori a <20°C prima del congelamento con relativa proliferazione batterica. Questo incremento evidenzia l'importanza di una corretta conservazione dello scarto organico da pesca, che, nell'ottica di un successivo utilizzo, deve essere congelato nel più breve tempo possibile dalla raccolta per evitare fenomeni di proliferazione batterica; in alternativa è necessario prevedere un processo di sanificazione durante la produzione del derivato finale.

In conclusione, la caratterizzazione dei campioni raccolti ha fornito risultati soddisfacenti (soprattutto se correttamente conservati), evidenziando la presenza di materiale organico che, dal punto di vista microbiologico, non incontra impedimenti ad un suo riutilizzo in campi diversi, quale per esempio quello mangimistico oltre che come fertilizzante.

**Tra le destinazioni d'uso della biomassa ittica di scarto che normalmente viene smaltita, è stato proposto anche un possibile riutilizzo per l'isolamento di molecole biologicamente attive, come il collagene, per il quale esiste un'elevata domanda di mercato.**

A tale fine sono stati analizzati 10 campioni (9 campioni provenienti dalla pesca e uno di eviscerato) per il dosaggio di collagene attraverso il Kit Sensitive Tissue Collagen (QuickZyme BioScience). Il dosaggio misura la quantità totale di idrossiprolina, aminoacido che, nei mammiferi, si trova principalmente nel collagene, senza discriminare tra i diversi tipi di collagene e tra pro-collagene, collagene maturo e prodotti di degradazione della molecola (Anal. Biochem., 1960, 1: 228-239).

Dalla analisi eseguite è stata rilevata una quantità media di circa **695 µg di collagene totale /ml** nei campioni di organico da pesca costituiti da specie di acque profonde (Deep Water Species – DWS),

mentre in alcuni dei campioni sottotaglia (Demersal Species - DES) (Tabella 3) è stata rilevato circa il doppio della quantità, per una media di **1212 µg di collagene totale /ml** (Tabella 3).

<b>ID CAMP</b>	68682	68702	78645	23514	68687	69346	78397	97759	97764	98886
<b>TIPO CAMP</b>	DWS	DWS	DWS	Eviscerato	DES	DES	DES	DWS	DES	DES
<b>Quantificazione (µg/ml)</b>	<b>784,3</b>	<b>651</b>	<b>614,3</b>	<b>754,3</b>	<b>1347,6</b>	<b>464,3</b>	<b>1144,3</b>	<b>731</b>	<b>2774</b>	<b>331</b>

**Tabella 3. Quantitativo di collagene totale rilevato in 10 dei 14 campioni raccolti.**

Esplorare vie alternative di riciclo dei rifiuti della pesca è uno degli obiettivi principali del progetto PRiSMa-Med e la produzione di collagene attraverso la lavorazione degli scarti del prodotto ittico è stata proposta come valida alternativa. Il collagene sarebbe utilizzato soprattutto in ambito cosmetico e farmacologico. I dati raccolti, sebbene assolutamente parziali e preliminari, rivelano la possibilità di perseguire anche questa filiera produttiva, che permetterebbe di trasformare lo scarto, con relativi costi di smaltimento, in risorsa di valore commerciale, secondo una concezione di economia circolare. Attualmente sono in corso valutazioni in merito ai costi/benefici di questa ipotesi anche in relazione ai quantitativi di scarto disponibili e di risultati economici vantaggiosi.

#### **Scarti dell'acquacoltura:**

Non è stato rilevato alcun microrganismo patogeno per uomo ed animali appartenente al genere *Salmonella* e *L. monocytogenes*; sono stati rilevati ceppi enterotossici di Stafilococchi nel campione costituito dallo scarto della molluschicoltura (68650), ma con presenza in UFC tollerate, secondo l'attuale normativa, anche nei prodotti alimentari ittici destinati al consumo umano.

Enterobatteriacee e microrganismi anaerobi solfito riduttori sono stati rinvenuti nel campione derivante dall'itticoltura (23514), ma tale presenza era del tutto attesa in considerazione del tipo di matrici analizzate, costituite da visceri e interiora dei pesci. Considerato quanto detto, il conteggio delle relative colonie relative alle Enterobatteriacee può essere considerato accettabile poiché i valori tollerati per alimenti crudi destinati al consumo umano sono fino a 10.000 UFC.

Anche il rilevamento della presenza di batteri psicrofili, normalmente diffusi nell'ambiente marino per la loro capacità di crescere e di moltiplicarsi a temperature comprese tra 0 e 20 °C, è stato riscontrato soltanto nel campione derivante dall'itticoltura (23514), ma, come già descritto, con valori da considerarsi nella norma.

La caratterizzazione dei campioni raccolti derivati da attività di acquacoltura (itticoltura e molluschicoltura), ha fornito, analogamente ai sotto prodotti della pesca, risultati soddisfacenti,

evidenziando la presenza di un rifiuto organico che, dal punto di vista microbiologico, potrebbe essere riutilizzato in campo mangimistico, come fertilizzante e, limitatamente all'itticoltura, per l'utilizzo di molecole particolari come il collagene.

### 1.3 Caratterizzazione chimica delle matrici organiche

I contaminanti chimici valutati sono stati:

- idrocarburi policiclici aromatici (IPA),
- Policlorobifenili (PCB),
- Mercurio,
- Piombo,
- Cadmio.

Il grado di degradazione dei rifiuti invece è stato valutato mediante l'analisi dell'istamina.

Le determinazioni analitiche impiegate per la caratterizzazione dei contaminanti chimici si basano su metodiche interne in conformità alla norma ISO/IEC 17025 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura".

Le tecniche analitiche utilizzate sono:

1. cromatografia liquida ad elevate prestazioni accoppiata ad un rivelatore fluorimetro (HPLC-FLD) per la determinazione degli IPA;
2. sistema HPLC accoppiato con un rivelatore UV-VIS (array di fotodiodi) per la valutazione dell'istamina
3. spettroscopia di assorbimento atomico con fornetto a grafite (GFAAS) per il Piombo e Cadmio;
4. analizzatore automatico (TDA) per il Mercurio;
5. gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) per la determinazione dei PCB non diossina simili (NDL).

In tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti; nelle figure 10 e 11 sono riportati i risultati delle analisi in formato grafico, mancano i valori di istamina e IPA in quanto presentano livelli non quantificabili per la quasi totalità dei campioni.

Risultati analisi chimiche progetto PRISMA-MED				Idrocarburi policiclici aromatici		Metalli pesanti			Bifenili Policlorurati	ISTAMINA
N° Camp	N°Acc	Data prelievo	Matrice	Benzo(a)pirene (µg/Kg)	Somma <sup>(2)</sup> (µg/Kg)	Pb mg/Kg	Cd mg/Kg	Hg <sup>(4)</sup> mg/Kg	NDL-PCB <sup>(5)</sup> (ng/g di peso umido)	Istamina (mg/Kg)
1	23514	26/2/19	Eviscerato di pesce	Non quantificabile	2.2 <sup>(3)</sup>	0.03	<b>0.089</b>	0.01	36,0 <sup>(6)</sup>	26.7

				(1)						
2	68650	31/5/19	Molluschi bivalvi	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.37	0.063	0.01	36,0 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
3	68682	11/7/19	Organico da pesca (DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.30 <sup>(7)</sup>	0.105 <sup>(7)</sup>	0.36	37,1 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
4	68687	24/7/19	Organico da pesca (DES)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.17	0.032	0.21	55,5 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
5	68702	7/8/19	Organico da pesca (DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.23	0.089 <sup>(7)</sup>	0.45	36,3 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
6	69346	22/8/19	Organico da pesca (DES)	0.7	1.4 <sup>(3)</sup>	0.19	0.032	0.10	36,0 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
7	78397	12/9/19	Organico da pesca (DES)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.52 <sup>(7)</sup>	0.045	0.09	36,0 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
8	78645	27/9/19	Organico da pesca (DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.07	0.075 <sup>(7)</sup>	0.25	36,0 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
9	97759	23/10/19	Organico da pesca (DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.15	0.040	0.29	39,6 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
10	97764	30/10/19	Organico da pesca (DES)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.33 <sup>(7)</sup>	0.017	0.10	71.3 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
11	98886	26/11/19	Organico da pesca (DES)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.23	0.020	0.10	36,1 <sup>(6)</sup>	30.1
12	10659 4	19/12/19	Organico da pesca (Mix DES e DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.05	0.145 <sup>(7)</sup>	0.22	49,9 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
13	10657	30/01/20	Organico da pesca (DES)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.16	0.018	0.09	37,2 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>
14	13090	06/02/20	Organico da pesca (DWS)	Non quantificabile (1)	Non quantificabile <sup>(3)</sup>	0.06	0.162 <sup>(7)</sup>	0.32	36,0 <sup>(6)</sup>	Non quantificabile <sup>(8)</sup>

**Tabella 4 Risultati analisi chimiche: idrocarburi e metalli pesanti, Bifenili policlorurati e Istamina.**

**DWS = Bottom Otter Trawl - Deep Water Species**

**DES = Bottom Otter Trawl - Demersal Species**

(1) Inferiore al limite di quantificazione del metodo (0.5 µg/kg per singolo IPA)

(2) Somma di quattro IPA; Benzo[a]pirene (BaP), Benzo[a]antracene (BaA), Crisene (CHR) e Benzo[b]fluorantene (BbFA).

(3) Le concentrazioni sono calcolate con l'approccio lower bound ipotizzando che tutti i valori delle quattro sostanze inferiori al limite di quantificazione siano pari a zero.

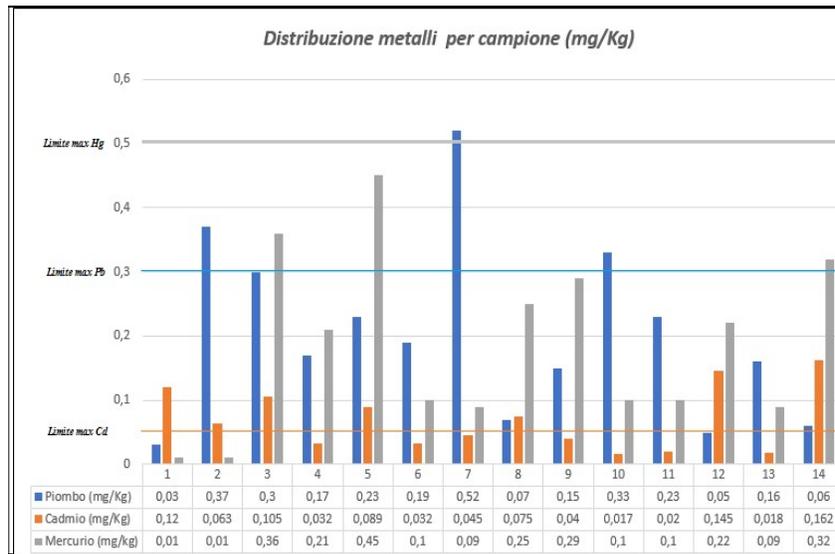
(4) Concentrazioni corrette per il recupero ottenuto in fase di validazione.

(5) Somma di PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180.

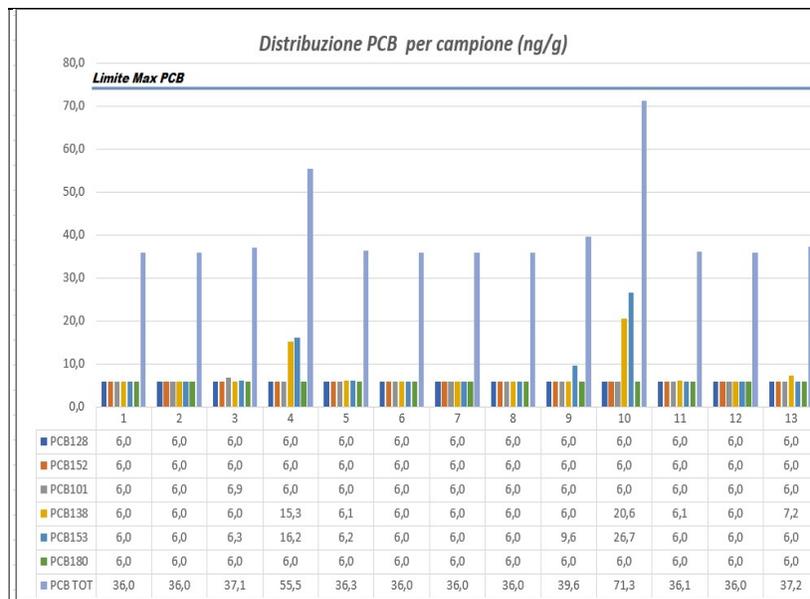
(6) Le Concentrazioni sono calcolate con l'approccio upper bound ipotizzando che tutti i valori dei vari congeneri inferiori al limite di quantificazione siano pari al limite di quantificazione (6.0 ng/g per ciascun PCB).

(7) Campioni non conformi se si considerano i limiti di legge riportati nel Regolamento (CE) n° 1881/2006 e s.m.i; Al risultato indicato in tabella è stato già sottratto il valore dell'incertezza estesa.

(8) Inferiore al limite di quantificazione del metodo (20 mg/Kg).



**Figura 1. Distribuzione dei valori (mg/kg) di Piombo Cadmio e Mercurio nei 14 campioni analizzati, è evidenziato il valore soglia di legge.**



**Figura 2. Distribuzione dei valori (ng/kg) di PCB nei 14 campioni analizzati, viene evidenziato il valore soglia di legge.**

Secondo quanto previsto nel progetto PRiSMaMeD mirato all'implementazione di un'economia circolare in ambito marittimo, i rifiuti organici della pesca, molluschicoltura e acquacoltura potrebbero essere riutilizzati come alimenti/integratori o impiegati come materie prime per la produzione di farine animali, da impiegare ad uso zootecnico. Per tale ragione la valutazione preliminare per la caratterizzazione dei rifiuti è stata effettuata confrontando i valori di concentrazione trovati rispetto ai limiti imposti dalla normativa negli alimenti e nei mangimi.

I tenori massimi ammissibili negli alimenti di alcuni composti indesiderati, tra cui IPA, i PCB e i metalli pesanti sono matrici dipendenti e indicati nel regolamento (CE) n. 1881/2006 e s.m.i.; i tenori

massimi di istamina sono riportati nel regolamento (CE) n. 2073/2005 e s.m.i e definiti per quei prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche con un tenore elevato di istidina.

Per quanto riguarda gli IPA, i tenori massimi sono espressi in funzione della somma di quattro congeneri quali; Benzo[a]pirene(BaP), Benzo[a]antracene(BaA), Crisene (CHR) e Benzo[b]fluorantene (BbFA) mantenendo però allo stesso tempo anche un tenore massimo per il benzo(a)pirene, composto di riferimento classificato dallo IARC come probabile cancerogeno per l'uomo. Nel Regolamento viene indicato il tenore massimo per i molluschi freschi, mentre per l'eviscerato di pesce, muscolo di pesce e i prodotti della pesca non vengono indicati limiti di riferimento. I limiti sono definiti per il muscolo di pesce solo nel caso in cui questo sia stato sottoposto a processi di affumicamento. Considerata l'assenza di limiti specifici, sono stati considerati i tenori indicati dal Regolamento estendendoli alle matrici analizzate per la valutazione preliminare dello stato di contaminazione chimica dei rifiuti organici. Nei molluschi bivalvi il tenore massimo consentito è di **6,0** µg/Kg per il BaP e 35,0 µg/Kg per la somma dei quattro congeneri. Nei prodotti ittici affumicati invece il tenore massimo è di 2,0 µg/Kg per il BaP e 12,0 µg/Kg per la somma dei quattro congeneri. Il limite di legge dei PCB è pari a 75 ng/g di peso umido. Il tenore massimo consentito di istamina è pari a 100 mg/Kg.

Il piombo e il cadmio nel muscolo di pesce hanno un tenore massimo rispettivamente di 0,30 mg/kg e 0,050 mg/Kg mentre nei molluschi bivalvi 1,5 mg/Kg e 1,0 mg/Kg.

Il mercurio nei prodotti ittici ha un limite di 0,50 mg/Kg e 1,0 mg/Kg a seconda della specie considerata.

### **Scarti della pesca:**

Dai primi risultati ottenuti sugli **IPA** non si osservano superamenti dei limiti proposti. La maggior parte dei campioni è ad una concentrazione non quantificabile. Il campione 69346 (rifiuto organico di pesca DES), presenta una concentrazione inferiore alla metà del tenore massimo indicato per il benzo(a)pirene. La somma dei quattro congeneri invece è ad un livello di circa 9 volte inferiore rispetto a limite di legge dovuta alla presenza contemporanea nel campione di 0,7 µg/Kg di BaP e di 0,7 µg/Kg di CHR. In nessun campione è stata raggiunta la concentrazione del limite di legge per **PCB**. Quantità apprezzabili di Cadmio e Piombo sono state determinate nei campioni sottoposti ad analisi. Si segnala il superamento dei limiti proposti associati ad alcuni campioni: il campione n° 68682 (DWS) presenta una concentrazione di **piombo** uguale al limite massimo consentito pari a 0,30 mg/kg. Non si osserva invece il superamento del tenore massimo per il **piombo** per gli altri campioni DWS. Tutti i campioni dei rifiuti organici della pesca DES presentano concentrazioni inferiori al limite di legge per il

piombo ad esclusione dei campioni n° 78397 e 97764 che presentano una concentrazione di piombo pari a 0,52 mg/Kg e 0,33 mg/kg rispettivamente, superiore al limite di legge (0,30 mg/kg).

Nei campioni n°68682, n°68702, n° 78645, n°106594 e n°13090 (tutti DWS) le concentrazioni di **cadmio** sono pari rispettivamente a 0,105 mg/Kg, 0,089mg/Kg, 0,075 mg/Kg, 0,145 mg/Kg e 0,162 mg/Kg; tutte al di sopra del limite massimo pari a 0,050 mg/Kg. Il solo campione DWS con valori entro i limiti è il 97759 (0,04 mg/Kg). Tutti i campioni dei rifiuti organici della pesca DES presentano concentrazioni inferiori al limite di legge.

La concentrazione del **mercurio** per tutti i prodotti ittici analizzati è al di sotto del tenore massimo consentito pari a 0.5 mg/Kg per le specie ittiche di piccola taglia e di 1.0 mg/Kg per specie ittiche di grande taglia.

In nessun campione sono state trovate concentrazioni di **istamina** superiori a tali limiti (100 mg/Kg).

La valutazione relativa all'impiego delle matrici sottoposte ad analisi come materia prima per la produzione di mangimi è stata effettuata prendendo in considerazione la direttiva 2002/32/CE del 7 maggio 2002 "relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali". La direttiva definisce non conformi i prodotti destinati all'alimentazione degli animali il cui contenuto di sostanze indesiderabili non rispetti i livelli massimi fissati nell'allegato I. Non sono previsti livelli massimi consentiti per gli Idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Il contenuto massimo consentito dei metalli nella materia prima di origine animale è pari a 2 mg/Kg per il cadmio, 10 mg/Kg per il piombo e 0,1 mg/kg per il mercurio. Il contenuto massimo per il mercurio è 0.5 mg/Kg quando la materia prima impiegata è a base di pesce o di altri animali acquatici e dei loro prodotti. Dunque, da una prima valutazione risulta che le matrici analizzate sono idonee all' utilizzo come materia prima per la produzione dei mangimi.

I tenori massimi di istamina invece sono riportati nel Reg. (UE) N. 1019/2013 che modifica l'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 e sono definiti per quei prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche con un tenore elevato di istidina ed in particolare per le specie delle famiglie: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombrosidae. In nessuno dei campioni analizzati il limite di legge è stato raggiunto. Il dato è importante poiché il tenore di istamina definisce lo stato di degradazione dell'alimento ed è un composto termoresistente. Pertanto, la sua presenza deve essere testata in caso di consumo alimentare e per il possibile impiego dei rifiuti organici da pesca come materia prima per la produzione di collagene nell'industria cosmetica.

#### **Scarti dell'acquacoltura:**

Il campione 23514 (eviscerato di pesce di itticoltura) presenta una concentrazione somma dei quattro congeneri pari a 2,2 µg/Kg dovuta alla esclusiva presenza del BbFA. In nessun campione è stata raggiunta la concentrazione del limite di legge per **PCB**.

Entrambi i campioni (molluschi bivalvi e eviscerato di pesce da itticoltura) presentano una concentrazione di **piombo** entro i limiti consentiti.

La quantità di **cadmio** nel campione da itticoltura è pari a 0,089 mg/Kg - superiore al limite di legge; il campione da molluschicoltura presenta una concentrazione entro i limiti consentiti.

La concentrazione del **mercurio** per tutti prodotti analizzati è al di sotto del tenore massimo consentito, analogamente ai **PCB** e all'**istamina**.

Alla luce dei dati ottenuti, analogamente agli scarti della pesca, da una prima valutazione risulta che le matrici analizzate sono idonee all' utilizzo come materia prima per la produzione dei mangimi o per la produzione di collagene nell'industria cosmetica (limitatamente ai prodotti di itticoltura); tuttavia, la scarsa quantità dei prodotti di scarto può rappresentare un fattore limitante.

## 1.4 Considerazioni finali

Il presente rapporto - relativo alla frazione organica dei sotto prodotti della pesca e dell'acquacoltura - ha consentito di fare luce su particolari aspetti relativi al possibile recupero di tale frazione organica, attualmente di scarso o nullo valore commerciale; esso, infatti, ha consentito di definire la tipologia, la quantità, il volume, la qualità microbiologica e ambientale dei sotto prodotti delle attività dei pescatori professionisti e degli acquacoltori che operano nell'areale interessato dal progetto di cooperazione, al fine di un loro possibile reinserimento nella catena produttiva.

In particolare, il rapporto finale contribuisce al raggiungimento dell'obiettivo di recupero del materiale organico in un'ottica di economia circolare, attraverso il riutilizzo come alimento, o per la produzione di farine animali, o altri utilizzi alternativi e innovativi (industria cosmetica, nutraceutica e farmaceutica).

E' importante sottolineare che, dalle analisi quali-quantitative condotte sui prodotti di scarto derivanti da pesca ed acquacoltura, sono emersi alcuni importanti risultati, che sono qui sinteticamente elencati:

- **le matrici analizzate, derivanti da pesca e acquacoltura, sono idonee all'utilizzo come materia prima per la produzione dei mangimi**;

- **le matrici analizzate, derivanti da pesca e acquacoltura, sono idonee per un possibile impiego come materia prima per la produzione di collagene nell'industria cosmetica;**
- **per quanto riguarda lo scarto da pesca, diversi fattori possono contribuire a generare una notevole variabilità nella stima dello stesso, quali ad esempio la zona di pesca e la relativa profondità, il periodo dell'anno (la stagionalità), la biologia delle specie (reclutamento e/o riproduzione), lo sforzo di pesca (ore di attività), nonché la capacità di pesca della barca (tonnellaggio e dimensioni);**
- **la scarsa quantità dei sottoprodotti organici dell'acquacoltura (eviscerato di specie ittiche allevate e mitili morti) costituisce un fattore limitante nel loro possibile riutilizzo in un'ottica di circular economy.**

A partire dai risultati ottenuti, nonché avvalendosi anche dei risultati di progetti già condotti in materia, il presente rapporto finale risulta essere il punto di partenza, basato su criteri oggettivi e realistici, per la esecuzione di uno specifico studio di fattibilità "circular economy" mirato a tracciare i requisiti di impianti di lavorazione dei sotto prodotti dell'attività della pesca e della molluschicoltura, che possa adattarsi alle tipologie del materiale analizzato.

## 2. Studio di Fattibilità per il Riutilizzo dei Residui Organici

Lo studio di fattibilità, realizzato a partire dai risultati derivanti dalla caratterizzazione degli scarti organici della filiera ittica illustrati nel precedente Capitolo 4, è mirato a tracciare la filiera di riutilizzo degli stessi, al fine di verificare la fattibilità tecnica *in primis*.

In questo contesto, oltre ad una prima valutazione normativa, è stata realizzata la presente analisi, basata sia su dati sperimentali riguardanti la stima dello scarto disponibile, sia sullo stato dell'arte per la parte di trasformazione, con i seguenti obiettivi principali:

- Caratterizzare le principali tipologie di pesca demersale e specie che “definiscono” le fishery, interessate dalle disposizioni entrate in vigore il 1° gennaio 2017 e stima dal punto di vista quali/quantitativo degli scarti delle specie aventi taglia minima.
- Valutare gli aspetti logistici legati alla gestione dello scarto a bordo e presso i luoghi di sbarco.
- Valutare la fattibilità di processi di trasformazione o di smaltimento degli organismi soggetti all'obbligo di sbarco.

È importante sottolineare che, dalle analisi quali-quantitative condotte sui prodotti di scarto derivanti da pesca e acquacoltura, sono emersi alcuni importanti risultati, che sono qui sinteticamente elencati:

- l'idoneità delle matrici analizzate, derivanti da pesca e acquacoltura, come materia prima per la produzione dei mangimi;
- l'idoneità delle matrici analizzate per un possibile impiego come materia prima per la produzione di collagene nell'industria cosmetica;
- la variabilità nella stima dello scarto da pesca, derivante da numerosi fattori;
- la scarsa quantità dei sottoprodotti organici dell'acquacoltura (eviscerato di specie ittiche allevate e mitili morti) come fattore limitante al riutilizzo in un'ottica di circular economy.

A partire da tali risultati ottenuti, nonché avvalendosi anche dei risultati di progetti già condotti in materia, è stato possibile eseguire uno studio di fattibilità “circular economy” mirato a tracciare sulla base dell'analisi normativa vigente, della disponibilità del materiale e lo stato dell'arte quale filiera sia possibile percorrere per valorizzare questo genere di scarto, che ha grande potenzialità di riutilizzo.

### 2.1 Valutazione normativa rispetto all'utilizzo di “scarti” della filiera ittica per estrazione di materie prime secondarie

#### 2.1.1 Regolamentazione generale sull'obbligo di sbarco e sull'impiego degli scarti

La possibilità di impiego degli scarti della pesca deriva dall'obbligo per gli operatori del settore alimentare di sbarcare le catture di specie di taglia inferiore alla taglia minima di riferimento sancita

dal Reg. UE 1380/2013 e poi specificata dai successivi regolamenti di attuazione dipendenti dal predetto Regolamento e soggetti a costante aggiornamento.

L'obbligo di sbarco delle specie di taglia inferiore alla taglia minima, con conseguente possibilità di impiego per usi diversi dal consumo umano è poi sancito dall'art. 15 del Regolamento da ultimo citato, che specifica quanto segue:

*Art. 15.11: Per le specie soggette all'obbligo di sbarco di cui al paragrafo 1, l'uso delle catture di specie di taglia inferiore alla taglia minima di riferimento per la conservazione è autorizzato unicamente a fini diversi dal consumo umano diretto, compresi la farina di pesce, l'olio di pesce, gli alimenti per animali, gli additivi alimentari, i prodotti farmaceutici e cosmetici<sup>1</sup>.*

### **2.1.2 Obblighi nazionali di organizzazione, per l'ottemperanza all'obbligo di sbarco e l'impiego degli scarti**

La responsabilità di garantire lo sbarco di tutte le taglie delle diverse specie di pesce pescate, di punire il rigetto in mare non autorizzato e di costruire un sistema di organizzazione degli scarti della pesca, che ne consenta la immissione in un sistema di economia circolare, viene sancito dal Reg. CE 1224/2009, come modificato da successivi Regolamenti che ne hanno adattato il contenuto alla nuova Organizzazione Comune dei Mercati (Reg. UE 1380/2013).

L'Art. 56 del Regolamento 1224 stabilisce tale obbligo come segue:

*Art. 56.1: Ciascuno Stato membro è responsabile, nel suo territorio, del controllo dell'applicazione delle norme della politica comune della pesca in tutte le fasi della commercializzazione dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, dalla prima vendita alla vendita al dettaglio, compreso il trasporto. In particolare, gli Stati membri provvedono affinché l'uso di prodotti della pesca di taglia inferiore alla pertinente taglia minima di riferimento per la conservazione soggetti all'obbligo di sbarco di cui all'articolo 15 del regolamento (UE) n. 1380/2013 sia limitato a fini diversi dal consumo umano diretto.*

In Italia, il recente Decreto Ministeriale MPAAF 17/6/2019 (pubblicato in Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale n. 156 del 5 luglio 2019 - Serie generale) ribadisce l'obbligo sancito dalla disposizione da ultimo citata e fornisce una chiara indicazione del riferimento normativo in cui trovare specie e taglie minime di riferimento interessate dall'obbligo di sbarco e dal divieto di immissione in commercio per il consumo umano dei relativi scarti della pesca.

Di seguito quanto riportato nel predetto Decreto:

---

<sup>1</sup> For the species subject to the landing obligation as specified in paragraph 1, the use of catches of species below the minimum conservation reference size shall be restricted to purposes other than direct human consumption, including fish meal, fish oil, pet food, food additives, pharmaceuticals and cosmetics.

Per le specie soggette all'obbligo di sbarco, le catture di taglia inferiore alla taglia minima di riferimento per la conservazione (riportate nell'allegato III del reg.(CE) 1967/2006), possono essere utilizzate unicamente a fini diversi dal consumo umano diretto, e tra questi usi vi sono ad esempio la farina di pesce, l'olio di pesce, gli alimenti per animali, gli additivi alimentari, i prodotti farmaceutici e cosmetici.

Ovviamente, restano al di fuori di specie e taglie ricomprese nella normativa europea citata dal Decreto ministeriale di cui sopra tutti i casi di esenzione dall'obbligo di sbarco previsti dal Reg. UE 1380/2013, in particolare agli artt. 15.4 (b) e 15.5.

### **2.1.3 Competenza delle Organizzazioni di Produttori nella gestione degli scarti**

In aggiunta a quanto sancito dall'articolo 56 del Regolamento europeo 1224/2009, in cui viene posta in capo agli Stati Membri la competenza per l'organizzazione di un sistema che garantisca l'attuazione del Reg. UE 1380/2013, il Reg. UE 1379/2013 stabilisce disposizioni in materia di gestione degli stock di pesce inferiori alla taglia minima normativamente stabilita, ponendo in capo alle Organizzazioni di Produttori (OP) questa specifica competenza.

Di conseguenza, nel quadro dell'organizzazione deputata a ciascuno Stato Membro, si favorisce il ruolo delle OP nella gestione pratica del sistema, comunque nel quadro di ciascuna disciplina nazionale.

L'art. 7 del Reg. 1379 sopra citato stabilisce formalmente quanto sopra brevemente descritto, come segue:

*Art. 7.1: Le organizzazioni di produttori del settore della pesca perseguono i seguenti obiettivi: (...) b) evitare e ridurre, per quanto possibile, le catture indesiderate di stock commerciali e, ove necessario, farne il miglior uso possibile senza creare un mercato per tali catture che sono al di sotto della taglia minima di riferimento per la conservazione, in conformità dell'articolo 15 del regolamento (UE) n. 1380/2013;*

*Art. 34.2 : Tutti i prodotti della pesca sbarcati, compresi quelli non conformi alle norme comuni di commercializzazione, possono essere utilizzati per fini diversi dal consumo umano diretto, compresi farina e olio di pesce, additivi alimentari, alimenti per animali familiari, prodotti farmaceutici o cosmetici.*

In buona sostanza, in considerazione del fatto che per ora non è codificato un rimborso per i costi sostenuti dal pescatore per il trasporto a terra delle catture indesiderate di pesce, in teoria la combinazione di rimborso minimo e di costi elevati per lo stoccaggio e il trattamento di queste catture, riduca l'incentivo per i pescatori a sbarcare e/o a segnalare queste catture, creando i presupposti per una elusione degli obblighi stabiliti nel Regolamento UE 1380.

In questo ambito, volendo leggere l'intento del legislatore europeo, le Organizzazioni di Produttori sono deputate a svolgere un ruolo cruciale, in quanto una più stretta collaborazione dei pescatori e delle OP con i porti e gli operatori di mercato che dispongono di infrastrutture esistenti per la raccolta degli scarti di pesce e di altre materie prime per la produzione di farina, olio di pesce e altri prodotti non destinati al consumo umano, potrebbe potenzialmente ridurre l'onere dei costi per gli operatori del settore della pesca nella gestione di queste catture indesiderate e aumentare la probabilità che si ottemperi agli obblighi previsti dai regolamenti europei.

### **2.1.4 Oggetto e scopo della regolamentazione europea: prodotti per fini diversi dal consumo umano**

Sul piano di cosa effettivamente possa costituire prodotto "*per fini diversi dal consumo umano*", la Commissione Europea (DG MARE) è stata interrogata una prima volta nel 2015 dagli aggiudicatari di un progetto approvato nell'ambito del programma Horizon 2020 e con riferimento alle modalità di esecuzione dello stesso.

In tale prima occasione di chiarimento, la Commissione ha specificato per quali scopi gli scarti della pesca NON possano essere impiegati, e con quali finalità economiche essi possano invece essere reimmessi in un sistema di economia circolare.

La DG MARE ha infatti chiarito che gli scarti della pesca debbano essere impiegati per utilizzo industriale – per la produzione, tra gli altri, olio di pesce, mangimi, additivi alimentari e prodotti farmaceutici e cosmetici – e mai per il consumo umano diretto.

Con l'occasione, come precedentemente accennato, la Commissione ha anche precisato che lo spirito del Reg. 1380 è quello di evitare la creazione di un mercato parallelo di scarti della pesca, quale base per un'attività di carattere lucrativo. In termini di destinazione e valore, dunque, il legislatore non intende assolutamente comparare la pesca destinata al commercio per il consumo umano con l'attività di impiego degli scarti di pesce di taglio inferiore alla dimensione minima consentita.

Ciò che è invece consentito dal Regolamento, secondo l'interpretazione della Commissione, consiste nell'impiego degli scarti della pesca in attività commerciali utili a coprire i costi dello sbarco obbligatorio<sup>2</sup>.

Nel 2017, alla Commissione europea è stato chiesto se la lista di impieghi degli scarti della pesca specificata all'art. 15.11 del Regolamento 1380 fosse una lista positiva – quindi chiusa – o esemplificativa e dunque aperta anche ad eventuali ulteriori impieghi rispetto a quelli ivi indicati.

---

<sup>2</sup> DG MARE (Ref. Ares(2015)4278639 - 14/10/2015) - ([http://www.discardless.eu/media/results/East\\_Med\\_Year2.pdf](http://www.discardless.eu/media/results/East_Med_Year2.pdf))

Nel rispondere al quesito posto, la Commissione europea ha precisato che gli studi condotti durante la valutazione di impatto antecedente alla formulazione dell'art.15 del Reg. 1580 hanno rivelato che la proibizione di immissione in commercio per il consumo umano degli scarti della pesca incide direttamente sul valore di mercato del prodotto pescato e incentiva un aumento della selettività dello stesso, in linea con uno degli obiettivi chiave della nuova Organizzazione Comune del Mercato della pesca: quello di ridurre al minimo gli scarti.

In conseguenza di quanto sopra, nonostante la posizione di alcuni operatori del settore alimentare della pesca – secondo cui l'impiego degli scarti della pesca per il consumo umano possa essere più profittevole di quello per finalità diverse dal consumo umano – non è certo la Commissione europea l'organo deputato a modificare quanto stabilito in sede di Regolamento UE 1380, in quanto al di fuori della propria sfera di competenza.

Al di là della precisazione di cui sopra, la Commissione ha avuto modo di chiarire che l'intento legislativo della Organizzazione Comune del Mercato della pesca è quello di creare i presupposti per il migliore uso degli scarti della pesca, sebbene evitando di creare un contesto di mercato e di lucro per i predetti scarti. In questo spirito, qualunque impiego diverso dalla commercializzazione per il consumo umano è permesso, includendo quindi anche l'impiego in ambito biotecnologico, per la produzione di prodotti a base di proteine e gelatine di pesce<sup>3</sup>.

In linea con quanto sopra precisato, il progetto DiscardLess finanziato dalla UE nell'ambito del programma Horizon 2020 ha individuato 27 possibili impieghi degli scarti di pesce, delineando per ciascuno di essi una dettagliata fact-sheet<sup>4</sup>.

### **2.1.5 Interventi a supporto delle attività di sbarco e di impiego degli scarti**

Su impulso di alcune parti interessate, nel 2015 è stata discussa in Parlamento Europeo la questione relativa a quale soggetto potesse eventualmente intervenire a supporto dei pescatori per favorire l'attuazione dell'obbligo di sbarco ed il reimpiego degli scarti della pesca, intesi come il pescato di taglia minima da potersi utilizzare per fini diversi dal consumo umano.

La risposta fornita dalla Commissione Europea in sede parlamentare è consistita nel chiarire che il Fondo europeo per la salvaguardia della fauna marittima e della pesca (FEAMP) si propone di aiutare i pescatori nell'ottemperare all'obbligo di sbarco; inoltre, il Regolamento 508/2014 offre un supporto

---

<sup>3</sup> Q&A EU Parliament 19/6/2017  
([https://www.europarl.europa.eu/RegData/questions/reponses\\_qe/2017/002297/P8\\_RE\(2017\)002297\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/questions/reponses_qe/2017/002297/P8_RE(2017)002297_EN.pdf))

<sup>4</sup>[http://www.discardless.eu/valorisation\\_module](http://www.discardless.eu/valorisation_module)

economico finalizzato ad aiutare la graduale eliminazione degli scarti della pesca, che comunque vanno sbarcati.

In conclusione, viene anche chiarito che il FEAMP può supportare investimenti, tra l'altro, per trovare nuovi mercati e migliorare le condizioni di introduzione sul mercato degli scarti che vengono sbarcati e la relativa lavorazione finalizzata alla preparazione di prodotti non destinati al consumo umano.

### 2.1.6 Regole applicabili agli scarti

Per quanto concerne le regole applicabili agli scarti destinati alla commercializzazione per scopi direttamente connessi al consumo umano (es. produzione di additivi alimentari, estrazione di proteine del pesce, produzione di olio di pesce per il consumo umano), gli scarti devono essere trattati secondo le normali regole europee di igiene (EU Reg. 852/2004 e 853/2004) applicate lungo tutta la supply chain.

**Gli scarti destinati alla commercializzazione per scopi non direttamente connessi al consumo umano** (es. mangimi, prodotti cosmetici, prodotti farmaceutici, fertilizzanti) **devono invece seguire la disciplina europea relativa ai sottoprodotti di origine animale**, sub specie i sottoprodotti ascrivibili alla Categoria 3. La medesima disciplina deve essere seguita anche in relazione ai prodotti descritti nel precedente capoverso, rispetto ai quali non siano state rispettate le regole generali di igiene o che non abbiano trovato acquirenti per un periodo di tempo tale da rendere i predetti prodotti non più idonei alla luce dei principi di buone prassi di conservazione e igiene.

Di seguito le fonti normative europee e nazionali relative alla disciplina generale dei sottoprodotti di origine animale:

- Reg. CE 1069/2009 (<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX:02009R1069-20140101> ) Linee Guida nazionali applicative del Reg. CE 1069/2009 (<http://www.reteambiente.it/normativa/18266/accordo-conferenza-unificata-7-febbraio-2013/> )
- Reg. CE 142/2011 (<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX:02011R0142-20150223> ) Linee Guida applicative del Reg. CE 142/2011 ([https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animals-products-eu-rulesguidance\\_doc\\_r142\\_2011\\_7\\_1\\_2012\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animals-products-eu-rulesguidance_doc_r142_2011_7_1_2012_en.pdf) )
- D. Lgs. 186/2012 (<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2012/10/31/012G0206/sg>)

## 2.2 Scarti della pesca: studio dello stato dell'arte

Oltre alla valutazione normativa è stato realizzato un report tecnico avente i seguenti obiettivi principali:

1. Caratterizzare le principali tipologie di pesca demersale e le specie che “definiscono” le fishery, interessate dalle disposizioni entrate in vigore il 1° gennaio 2017 e stimare gli scarti dal punto di vista quali/quantitativo delle specie aventi taglia minima,
3. Valutare gli aspetti logistici legati alla gestione dello scarto a bordo e presso i luoghi di sbarco,
4. Valutare la fattibilità di processi di trasformazione degli organismi soggetti all'obbligo di sbarco.

### 2.2.1 Caratterizzazione delle principali tipologie di pesca demersale e stima degli scarti

Per valutare lo stato dell'arte sono stati presi in esame numerosi studi e sono stati accolti dati bibliografici sugli scarti della pesca di specie demersali in Italia e in Liguria. Questi dati biologici ed economici sulla pesca demersale sono stati raccolti per mezzo del programma DCF.

I dati DCF sono stati analizzati per due finalità principali:

- 1) Caratterizzazione delle principali “fishery” e segmenti di pesca demersali dei mari italiani. Ciascuna fishery è stata caratterizzata in termini di sforzo di pesca, sbarcato ed aspetti socio economici. Per ogni GSA sono state identificate le specie che caratterizzano le fishery, definite come le specie che hanno contribuito al 75% della percentuale cumulata dello sbarcato, sia in termini ponderali che in valore economico.
- 2) Caratterizzazione, per ciascuna GSA, dello **scarto** delle principali fishery demersali, per le specie soggette ad obbligo di sbarco. Per ciascuna specie, GSA e fishery, sono state prodotte le seguenti elaborazioni:
  - a. Stime di sbarcato totale, scarto totale e scarto di esemplari sotto la taglia minima di riferimento per la conservazione (MCRS).
  - b. Stime della percentuale (in peso) di scarto totale e di scarto di esemplari sotto la taglia minima.
  - c. Struttura in taglia della frazione sbarcata e di quella commercializzata e stime di taglia media, taglia modale e taglia alla quale il 50% degli esemplari catturati è stato scartato, per specie, fishery o attrezzo.

Lo studio ha preso in considerazione ciascuna fishery caratterizzata in termini di capacità (numero di barche) e sforzo di pesca (nominale e GT\*giorni di pesca).

Per evidenziare le specie che “definiscono” le fishery, ovvero le specie bersaglio di ciascuna combinazione attrezzo-métier, sono state individuate quelle specie che hanno contribuito a formare il 75% della percentuale cumulata, sia in volume che in valore economico, dello sbarcato.

Per la pesca a strascico (OTB), tre sono le specie elencate che hanno un ruolo di primaria importanza in tutte le GSA: il **nasello** *M. merluccius*, la **triglia di fango** *M. barbatus*, il **gambero rosa** *P. longirostris*.

Queste specie hanno taglia minima di riferimento per la conservazione. Per la pesca con attrezzi da posta (tramaglio, GTR, e reti a imbrocco, GNS), seppure le informazioni siano più frammentarie, una delle specie che maggiormente “definisce” le fishery nelle varie GSA è la **triglia di scoglio**, *M. surmuletus*, specialmente per il tramaglio; questa specie ha taglia minima. Altre specie bersaglio sono la seppia ed il polpo comune, che tuttavia non hanno taglia minima.

La **sogliola**, *S. solea*, specie con taglia minima, è la principale specie bersaglio della pesca della GSA 17.

### **Stime di scarto per specie con taglia minima di riferimento per la conservazione (MCRS)**

Le analisi dei dati DCF delle specie demersali effettuate dallo studio preso in esame hanno permesso di caratterizzare lo scarto per le specie soggette a taglia minima (MCRS), per GSA, trimestre e fishery.

La stima dello scarto di **nasello** e **triglia di fango** ha prodotto valori abbastanza differenti nelle varie GSA, anche se la percentuale di scarto raramente ha superato il 20% della biomassa totale catturata.

Lo scarto di nasello in peso è variato da percentuali non superiori al 5% nelle GSA 16, 19, 18 e 17, al 12% nella GSA 10, al 21% nella GSA 9 ed, infine, a circa il 30% nella GSA11. In tutte le GSA la quasi totalità dello scarto è dovuta ad esemplari inferiori alla MCRS.

Anche per la triglia gran parte della biomassa scartata è ascrivibile ad esemplari inferiori alla MCRS, ad eccezione della GSA 17, ove lo scarto sembrerebbe costituito essenzialmente da esemplari superiori a MCRS.

Per il pagello fragolino, le stime di scarto dello studio preso in esame, ad eccezione della GSA16, si sono attestate su valori superiori, tra il 24 ed il 72% della biomassa totale catturata. Lo scarto risulta quindi prevalentemente costituito da esemplari inferiori a MCRS, ma in alcune GSA anche da esemplari superiori alla taglia minima, a dimostrazione che per questa specie hanno interesse commerciale solo per le taglie grandi.

I due sugarelli, *T. trachurus* e *T. mediterraneus*, sono le specie che hanno fatto registrare le più alte stime di scarto, in particolare il sugarello maggiore, *T. trachurus*.

Per questa specie lo scarto ha costituito percentuali comprese tra il 61 e 94% nelle varie GSA. I sugarelli sono scartati anche se di dimensioni superiori a MCRS, perché generalmente non hanno valore commerciale.

A livello di singole GSA sono stati stimati quantitativi importanti di scarto anche per specie come l'**acciuga**, *E. encrasicolus*. Nella GSA17 questa specie viene catturata accidentalmente, ma in quantitativi considerevoli, dalla flotta a strascico, ma non ha interesse commerciale.

Per le specie ove erano presenti consistenti dati di taglia, è stata stimata la taglia media e la taglia modale degli esemplari scartati e la taglia alla quale il 50% degli esemplari catturati è stato scartato, per ciascuna fishery o attrezzo.

È stata studiata la struttura in taglie della frazione sbarcata e di quella commercializzata, sempre per le specie con maggiori dati disponibili, per GSA, fishery o attrezzo.

Nelle stime di scarto ottenute dallo studio preso in esame sono riscontrabili differenze, talvolta anche sensibili, tra le varie GSA indagate. I fattori che possono contribuire a generare queste differenze sono molteplici; lo scarto della pesca a strascico è causato essenzialmente dal valore commerciale del prodotto e dalla presenza di esemplari di taglia inferiore alla taglia minima. Tali fattori possono mostrare differenze, anche importanti, in funzione della zona e del periodo dell'anno. In effetti, per le specie con picco temporale di reclutamento, lo scarto ha mostrato sensibili differenze stagionali.

Nonostante la qualità dei dati sia migliorata negli anni, i dati disponibili contengono ancora disomogeneità a livello spaziale e temporale, che possono avere causato differenze nelle stime di scarto tra GSA.

Altre differenze possono essere state generate da diversi approcci adottati per il campionamento dello scarto, o nelle successive procedure di espansione del dato campionario all'universo statistico di riferimento, anche se ormai le procedure di raccolta ed analisi dati seguono un protocollo standardizzato.

Un ulteriore elemento che può aver contribuito a generare delle differenze nelle stime dello scarto è la presenza di esemplari inferiori alla taglia minima nello sbarcato. Tale aspetto, seppure con incidenza differente a seconda delle GSA, è stato osservato in tutte le aree e fishery indagate ed è riscontrabile nelle analisi della struttura in taglia dello sbarcato e dello scarto.

### **Stime di scarto per GSA**

Secondo lo studio preso in esame, per quasi tutte le specie soggette al Reg. 1380/2013 lo scarto, ove presente, è costituito prevalentemente da esemplari inferiori alla taglia minima. Lo scarto è dovuto al

fatto che, per gran parte delle specie, la popolazione nelle aree sfruttate dalla pesca è dominata da esemplari di piccola taglia, inferiori alla MCRC.

Occorre notare che per queste specie la presenza di esemplari inferiori alla taglia minima nelle catture commerciali è inferiore a quella stimata nella popolazione a mare. La pesca commerciale attua quindi una certa selezione sulle popolazioni sfruttabili, sia per la selettività degli attrezzi, sia sfruttando maggiormente areali ove sono meno abbondanti i pesci di piccola taglia.

Sulla base dei dati dello studio preso in esame, sembra che le percentuali di scarto siano rimaste stabili o siano leggermente aumentate nel tempo. Questi sono con tutta probabilità effetti dell'entrata in vigore del regolamento sulla taglia minima, che ha portato ad una riduzione della percentuale di esemplari sbarcati di piccola taglia.

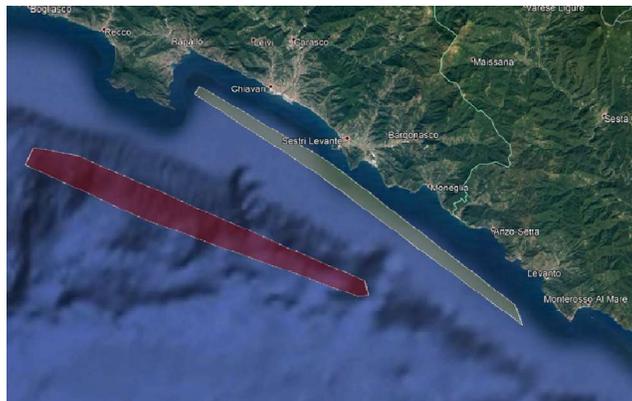
I dati campionari di scarto sono stati espansi per ottenere stime assolute dello scarto prodotto in ciascuna GSA. Tali stime, seppure caratterizzate da una certa variabilità ed incertezza, possono fornire un'indicazione utile sull'entità delle biomasse che potrebbero essere gestite nell'immediato futuro con l'ottemperanza dell'obbligo di sbarco. Confrontando i quantitativi percepiti di scarto riportati dalle interviste e quelli stimati attraverso i dati raccolti DCF, i valori appaiono sostanzialmente confrontabili nelle varie GSA, soprattutto per quanto riguarda la percezione dello scarto delle specie dell'Allegato III. Alcuni lavori presi in esame evidenziano comunque che non raramente è emersa da parte dei pescatori una conoscenza non dettagliata dei nuovi regolamenti; spesso gli operatori ritenevano che ad essere soggette ad obbligo di sbarco fossero solo le specie più abbondanti ed importanti commercialmente, come nasello, triglia, gambero rosa.

Per quanto riguarda la pesca con reti da posta, i dati riportati dai pescatori appaiono sostanzialmente in linea con quelli stimati dai dati DCF nell'indicare quantitativi di scarto trascurabili.

Nelle interviste effettuate da studi precedenti i pescatori dello strascico riportavano come motivazione prevalente dello scarto lo scarso o nullo valore commerciale del prodotto, seguito dalla taglia degli esemplari catturati. Gli operatori della piccola pesca riportavano, tra le cause principali, anche il danneggiamento degli esemplari catturati. Da rilevare comunque che tra gli operatori viene denunciata poca chiarezza del Regolamento in merito agli aspetti pratici delle nuove norme e al controllo e sulla gestione degli sbarchi.

### **Stime di scarto per GSA9**

Nell'ambito del progetto PRISMAMED sono stati effettuati una serie di campionamenti presso la marineria di Santa Margherita la cui flotta peschereccia opera principalmente nel Golfo del Tigullio (figura 3).



**Figura 3. Principali aree di pesca monitorate nel corso dei campionamenti: in giallo la zona battuta dai pescherecci di piattaforma (50-150m), in rosso la zona di scarpata (500-700 m) della pesca ai “gamberi rossi”.**

Sono stati effettuati n. 9 campionamenti da luglio a novembre 2019, sui quali sono state stimate le quantità dello “scarto organico” (specie scartate dalla pesca perché sottomisura o di scarso o nullo valore commerciale).

Da una analisi preliminare è stato osservato che i quantitativi maggiori di scarto sono attribuibili principalmente alla pesca effettuata sulla piattaforma (OTB\_DES), con tassi di scarto variabili tra il 19% e il 42% delle catture totali.

Considerando l'insieme delle 9 giornate di pesca monitorate, si stima che un motopeschereccio a strascico può produrre mediamente 29,5 kg (dev.st. 34,5 kg) di scarto per giornata di pesca, in massima parte (84%) costituito da pesci ossei.

Tenuto conto che in media un motopeschereccio a strascico in Liguria lavora circa 165 giorni/anno, valore medio ricavato da una serie storica di 12 anni (fonte IREPA, 2000-12), ipotizzando uno scarto di circa 30 kg/giorno (pari al valore medio ricavato dalle 9 giornate monitorate), lo scarto totale stimato nell'arco di un anno per l'intera flotta a strascico ligure (n=72 unità da pesca) potrebbe aggirarsi intorno alle 350 tonnellate.

### 2.2.2 Gestione dello scarto - aspetti logistici

L'analisi dei dati economici DCF effettuati dallo studio preso in esame e illustrato nel paragrafo precedente ha permesso inoltre di delineare un quadro conoscitivo di partenza per le successive

valutazioni sulle implicazioni di natura economica relative all'implementazione del regolamento sull'obbligo di sbarco.

Sono stati raccolti questionari e interviste per raccogliere informazioni sugli aspetti logistici (a bordo, presso i luoghi di sbarco) correlati alla gestione degli scarti e sulle possibilità di utilizzazione del materiale scartato. È stato elaborato un format comune di questionario, incentrato sulla raccolta di informazioni sui quantitativi, la distribuzione temporale e spaziale e la gestione logistica degli scarti, sia a bordo dei pescherecci che nei luoghi di sbarco. I questionari sono stati sottoposti a pescatori liguri seguendo un piano strutturato per luogo e tipologia di pesca.

Sono state realizzate interviste con rappresentanti di ditte che operano la trasformazione di materiale ittico e con diversi stakeholder che si è ritenuto possano avere un ruolo e una partecipazione attiva nella gestione degli scarti in seguito alle future disposizioni del Reg. 1380/2013. È stata quindi valutata la fattibilità della realizzazione di un'infrastruttura per la trasformazione dello scarto.

Sono stati inoltre presi in considerazione gli effetti economici dell'obbligo di sbarco, in quanto la gestione del maggiore quantitativo di prodotto da tenere a bordo e sbarcare e il lavoro necessario allo smistamento e stoccaggio di tale prodotto, porterebbe determinare l'aumento dei costi e del lavoro. Questo come già sottolineato in precedenza potrebbe causare il mancato rispetto del Reg. UE 1380/2013.

Le interviste effettuate fanno emergere una forte preoccupazione riguardo al conferimento ed al trattamento dello scarto a terra, in quanto non esiste ancora una logistica per gestire questi aspetti. La maggiore preoccupazione, che si correla alla criticità dell'aspetto gestione degli scarti, è stata l'assenza di infrastrutture a terra atte ad accogliere e stoccare i volumi di scarto, seppure ciclici e stagionali.

## **2.3 Utilizzo dello scarto organico: studio dello stato dell'arte**

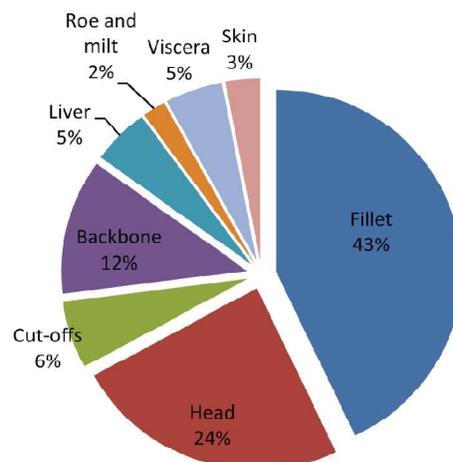
Nel 2017 la produzione ittica globale era stata stimata intorno ai 175 milioni di tonnellate, ma stime recenti prevedono che essa raggiungerà i 194 milioni di tonnellate entro il 2026 (FAO, 2018).

Nello stesso periodo, la pesca di cattura è diminuita da 92,4 a 90,9 MT mentre la produzione di acquacoltura è aumentata da 41,9 a 80,0 MT (FAO, 2018) Secondo la FAO (2018), l'espansione della lavorazione del pesce sta creando quantità crescenti di "flussi produttivi collaterali" e di rifiuti di filiera, quali: pelle, teste, squame, visceri e scarti di taglio dalla filettatura del pesce. Questi sottoprodotti possono rappresentare fino al 70% del pesce utilizzato nella trasformazione industriale. Inoltre, la

cattura di pesci di basso valore e le specie ittiche sottoutilizzate (che generalmente potremo definire come “by-catches” o “unwanted catches”, abbreviati con l’acronimo “UWC”) costituiscono un'altra fonte di sottoprodotti della lavorazione ittica che è stata stimata mediamente essere pari al 18.6% del pescato totale.

Questi sottoprodotti (o “flussi produttivi collaterali”), quando scartati e “gettati” nell'ambiente, generano notevoli problemi ambientali e importanti sfide tecnico-alimentari a causa del loro elevato carico enzimatico e microbico, che li rende suscettibili a un rapido degrado se non trattati correttamente o conservati in condizioni appropriate. Nella migliore delle ipotesi essi vengono destinati alla formulazione di prodotti a basso valore commerciale, quali mangimi per animali (es. mangimi per acquacoltura).

Arason et al. (2009) hanno stimato che nella lavorazione industriale del merluzzo bianco solo il 40% della materia prima è utilizzato per la produzione alimentare e i “flussi collaterali” rappresentano quasi il 60% della produzione totale (Figura 4).



**Figura 4. Prodotti e flussi collaterali della filiera “merluzzo lavorato a terra” (adattato da Arason, S. et al. (2009). Maximum Resource Utilisation – Value Added Fish Byproducts. Nordic innovation Centre, Oslo, Norway**

Nel 2019 Al Khawli et al. hanno rivisto questi dati riportando che, in relazione ai diversi settori della pesca, i sottoprodotti non utilizzati per il consumo umano diretto sono stimabili tra il 30% e l'85% del peso del pesce a seconda delle diverse tipologie di cattura. Questo intervallo percentuale così ampio è dovuto al fatto che il rapporto pesce/sottoprodotto varia in base alla zona di pesca, alla stagione, alle dimensioni e alle specie del pesce preso in esame.

Oltre alle catture accessorie (UWC), i sottoprodotti della pesca e dell'acquacoltura comprendono i già citati scarti che mediamente sono stati stimati avere le seguenti proporzioni: le teste rappresentano il 9% -12%, i visceri il 12% -18%, la pelle l'1% -3%, le ossa 9% -15% e le squame ca. 5% in peso del pesce intero. La composizione chimica del pesce varia in base al tipo di specie, sesso, età, stato nutrizionale, periodo dell'anno e stato di salute. Tuttavia, la maggior parte dei pesci contiene il 15-30% di proteine, 0-25% di grassi e il 50-80% di umidità. Ad esempio, i pesci bianchi come merluzzo e nasello sono specie magre, contenenti ca. 20% di proteine, 80% di acqua e livelli di lipidi piuttosto bassi (0,5% -3%), mentre i pesci grassi, come lo sgombro e il salmone, contengono il 20% di proteine, il 10% -18% di lipidi e un contenuto d'acqua di conseguenza inferiore (62% -70%).

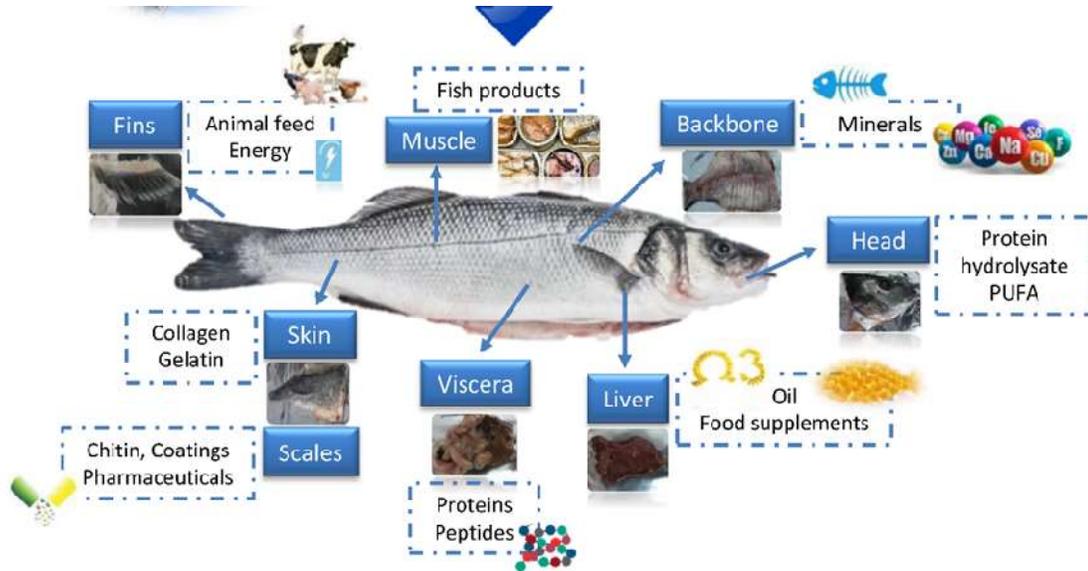
I sottoprodotti della pesca possono essere classificati in due tipologie: uno che include prodotti facilmente degradabili con alto contenuto di enzimi, come i visceri e il sangue, e un secondo che include i prodotti più stabili (ossa, testa e pelle).

Inutile sottolineare il fatto che la loro tempestiva raccolta così come l'opportuno trattamento iniziale per stabilizzarli siano passaggi fondamentali per preservarne la qualità e renderli riutilizzabili come materia prima di prodotti ad alto valore aggiunto. Ne consegue, quindi, che per riuscire ad utilizzare le risorse ittiche in modo responsabile ed efficiente, è indispensabile stabilire metodi efficienti e sicuri per l'estrazione dei nutrienti e di altri composti bioattivi target.

Ad oggi, la lavorazione di tale biomassa comprende tecniche convenzionali (ad es. estrazioni con solventi organici, con soluzioni acide e basiche, etc.) già ampiamente consolidate per la produzione di farine e oli di pesce o derivati quali acidi grassi omega 3 quali: l'eicosapentenoico (EPA) e il docosaesaenoico (DHA). Questi metodi sebbene efficienti, presentano alcuni svantaggi importanti, quali ad esempio: l'elevato consumo di energia, il potenziale degrado termico dei prodotti finali (a causa delle elevate temperature di lavorazione), l'utilizzo di solventi organici di estrazione (i cui eventuali residui possono comportare rischi per la salute umana e dell'ambiente), tempi lunghi di lavorazione.

L'utilizzo dei sottoprodotti della pesca sta attirando l'attenzione dei ricercatori e delle aziende in quanto, oltre a quelli già menzionati (prodotti a basso valore aggiunto, quali farine e oli), altri composti a più alto valore aggiunto quali: chitina, collagene, peptidi, carotenoidi e minerali, possono essere estratti e riutilizzati come ingredienti nutraceutici o additivi nelle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche. Inoltre, possono rappresentare anche una fonte promettente per la produzione di biocarburanti. La Figura 5, estrapolata dalla pubblicazione di Al Khawli et al., riassume

in uno schema i possibili composti bioattivi estraibili dai diversi sottoprodotti della lavorazione del pesce.



**Figura 5. Possibilità di ottenimento di composti bioattivi dai sottoprodotti della lavorazione del pesce**

### 2.3.1 Composti bioattivi

Una panoramica più dettagliata dei composti bioattivi ottenibili dai sottoprodotti della pesca e dai UWC e dei possibili ambiti di utilizzazione industriale è di seguito riportata.

#### 1) Composti Azotati

a) Peptidi bioattivi: dall'idrolisi enzimatica estensiva delle proteine del pesce. Alcuni sono dotati di attività farmacologiche (antiipertensive, antibatteriche, anticoagulanti, antinfiammatorie, antiossidanti...). Valorizzabili nell'industria farmaceutica, alimentare, cosmetica e mangimistica.

b) Proteasi ed enzimi proteolitici: estratti prevalentemente dai visceri che contengono una notevole quantità di enzimi digestivi con funzioni specifiche diverse. Sono attivi a bassi valori di T° e pH, es. collagenasi, tripsina, pepsina, chimotripsina, elastasi, carbossipeptidasi. Possono avere applicazioni biotecnologiche e nell'industria alimentari (food processing)

c) Collagene: è ottenuto con un trattamento di idrolisi acida o basica (estrazione tradizionale) da spine, squame e pelle. Il contenuto di aminoacidi del collagene differisce dalle altre proteine a causa del suo alto contenuto di prolina e idrossiprolina. Il collagene è ampiamente usato nell'industria farmaceutica e cosmetica e come integratore alimentare.

d) Gelatina: si ottiene dall'idrolisi parziale del collagene. Esistono due tipi principali di gelatine: il tipo A si ottiene dalla procedura di idrolisi acida e il tipo B dalla idrolisi alcalina. La gelatina viene utilizzata come agente gelificante nei prodotti alimentari, farmaceutici e cosmetici. Le gelatine di pesce sono preferite per le esigenze di gelificazione a bassa temperatura.

e) Protamina: è una miscela purificata di proteine semplici ottenute principalmente dallo sperma di salmone selvatico. La protamina solfato è una proteina a basso peso molecolare (intorno a 4-5 kDa) che lavora per mantenere e proteggere il DNA dai danni. È usato in campo farmaceutico come farmaco che inverte gli effetti anticoagulanti dell'eparina legandosi ad essa (antidoto antagonista dell'eparina).

f) Proteoso-Peptoni: prodotti dall'idrolisi enzimatica controllata delle proteine. Sono una miscela di polipeptidi e aminoacidi che si formano durante la degradazione enzimatica delle proteine. Sono la principale fonte di azoto nei terreni organici per le colture batteriche. Sono utilizzati nella produzione di terreni di coltura per microbiologia e biotecnologie industriali.

g) Insulina: estratta dai visceri di vari pesci. È un ormone peptidico prodotto dalle cellule beta degli isolotti pancreatici e dal corpo di Brockmann in alcuni pesci teleostei. L'insulina è usata come farmaco per il trattamento del diabete.

## **2) Composti Lipidici**

a) Fosfolipidi (PL): vengono estratti dall'olio di pesce con procedure diverse. I PL di origine marina contengono PUFA omega-3, alcuni dei quali sono presenti solo nelle fonti marine. I PL sono usati come emulsionanti nell'industria alimentare o nei cosmetici o come eccipienti nell'industria farmaceutica.

b) Squalene: idrocarburo terpenico (isoprenoide) intermedio nella sintesi del colesterolo e di altri ormoni steroidei e della vitamina D. Viene utilizzato nell'industria alimentare (integratore, presunta capacità di proteggere dallo stress ossidativo il DNA, le proteine e i lipidi, sebbene ad oggi, nessun health claim è stato concesso da EFSA) e farmaceutica (nei vaccini).

c) Vitamina A: presente in natura in varie versioni: come retinolo o altri composti analoghi, detti retinoidi (tutti di origine animale), oppure sotto forma di carotenoidi (di origine vegetale), che ne rappresentano i precursori.

d) Vitamina D: scarsamente presente negli alimenti (alcuni pesci grassi, latte e derivati, uova, fegato e verdure verdi). L'unica eccezione è data dall'olio di fegato di merluzzo. Viene in gran parte accumulata dal nostro organismo attraverso l'esposizione ai raggi solari e va integrata solo in situazioni particolari, legate alla crescita, alla gravidanza e all'allattamento.

### **3) Chitina e Chitosano**

La Chitina o poli  $\beta$ - (1-4) N-acetil-D-glucosamina è il secondo polimero naturale più abbondante sulla terra dopo la cellulosa mentre il Chitosano (1-4) -2-amino-2-desossi- $\beta$ -D-glucano) è una molecola ottenuta dalla deacetilazione parziale della chitina con metodi chimici o biologici. Allo stato puro, la chitina è inodore, insapore, di colore bianco o giallastro. Le biomolecole di chitina e i suoi derivati hanno un'eccellente biodegradabilità e biocompatibilità nel corpo umano. Inoltre, hanno mostrato numerose proprietà biologiche (antimicrobiche, antitumorali, anticoagulanti, antiossidanti, antimutagene, ...). A causa delle loro varie proprietà tecno-funzionali, la chitina e i suoi derivati hanno svariati campi di applicazione. Nell'applicazione biomedica, i derivati della chitina vengono utilizzati per la ricostituzione artificiale di alcuni tessuti come pelle, ossa e cartilagine. Viene anche utilizzata nell'industria alimentare per la produzione di film biodegradabili e l'incapsulamento di additivi e integratori alimentari. Inoltre, la chitina e i suoi derivati sono anche utilizzati dalle industrie farmaceutiche come eccipienti per i farmaci. I sottoprodotti della lavorazione del pesce, in particolare i crostacei (gamberi, granchi, aragoste e krill) sono le principali fonti di chitina per uso commerciale.

### **4) Pigmenti Naturali**

I carotenoidi sono i principali pigmenti liposolubili presente nel pesce, nei crostacei e nei frutti di mare. L'astaxantina (3,3-diidrossi- $\beta$ ,  $\beta$ -carotene-4,4-dione), è noto per essere il principale carotenoide dei pesci e rappresenta il 74-98% del totale dei pigmenti nei gusci dei crostacei. Si trova nei frutti di mare come estere o in forma libera. La sua struttura contiene gruppi funzionali chetonici e idrossilici e una catena di doppi legami coniugati, responsabili delle sue ottime proprietà antiossidanti.

Alcuni studi riportano per questa molecola attività antitumorali e immunostimolanti. L'astaxantina è ampiamente utilizzata nell'industria alimentare e farmaceutica come precursore di coloranti, antiossidanti e della vitamina A.

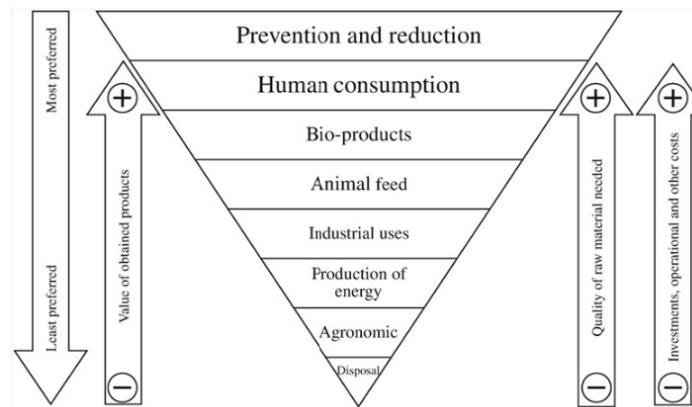
### **5) Elementi Minerali**

La sfilettatura dei pesci genera un'enorme quantità di lisce. I minerali inorganici costituiscono circa il 60% delle ossa di pesce (lisce). Le lisce sono un'importante fonte di idrossiapatite, calcio, fosfato, zinco, selenio e ferro. Calcio, fosfato, zinco e ferro possono essere utilizzati come integratori alimentari. L'idrossiapatite, presente nella lisca dei pesci, può essere estratta e utilizzata in campo medico e odontoiatrico. Sebbene sia un minerale abbastanza raro, l'idrossiapatite costituisce il maggiore componente delle ossa, infatti il 99% del calcio presente nell'organismo umano è immagazzinato nel tessuto osseo sotto questa forma. L'idrossiapatite è inoltre presente nello smalto

dei denti che costituisce il tessuto più duro del corpo umano. Lo smalto è costituito infatti per circa il 96% da idrossiapatite, dall'1% da matrice organica e dal 3% da acqua.

### 2.3.2 Opzioni di gestione degli scarti - il Collagene

Scartare il pesce, quindi, rappresenta un evidente spreco di risorse marine che potrebbero essere utilizzate in modo produttivo, quando economicamente fattibile e tenendo in debito conto l'obiettivo ecologico complessivo per ridurre al minimo gli scarti nella pesca europea secondo quanto prescritto dall'art. 15 del Reg. 1380/2013 e dalla gerarchia europea delle possibili opzioni di gestione degli scarti agro-alimentari (Figura 6).



**Figura 6. Possibili opzioni di gestione degli scarti agro-alimentari.**

Per esempio, le catture indesiderate potrebbero essere portate a terra e trattate non solo per produrre farine di pesce, oli di pesce o per altri usi "tradizionali", ma essere materie prime destinate ad altri tipi di utilizzo per i mercati "di nicchia" il che contribuirebbe ad aggiungerne valore. Sebbene, da un lato sarebbe utile perseguire una pratica di pesca più selettiva al fine di massimizzare la produzione primaria, tuttavia, anche i metodi di pesca altamente selettivi producono alcune catture accessorie ("catture indesiderate": UWC), che se utilizzate in modo razionale potrebbero rappresentare un'ulteriore opportunità economica ecosostenibile di filiera. Una strategia razionale del trattamento delle UWC nelle acque europee meridionali eventualmente combinata con gli avanzi, visceri e cutoff da lavorazioni intermedie deve tener conto delle specificità del territorio nazionale, dove la maggior parte del pesce è sbarcato fresco per il consumo umano. Questa modalità tradizionale predominante del consumo di pesce, accoppiata al basso volume di produzione ittica ha portato storicamente a pochi investimenti produttivi in questo settore di "riciclo virtuoso", probabilmente perché ha bisogno di superare importanti barriere legate ad una percepita mancanza

di incentivi per il settore della pesca, la mancanza di infrastrutture sufficienti per l'utilizzo e le questioni giuridiche connesse alla manipolazione o all'eliminazione dei sottoprodotti di origine animale (da ricordare l'elevata deperibilità da un punto di vista igienicosanitario di tali prodotti).

Tuttavia, questi sottoprodotti "ittici" rappresentano un'importante fonte potenziale di composti bioattivi, con importanti proprietà funzionali che potrebbero essere isolate e concentrate, conferendo loro un valore aggiunto nei mercati di fascia più alta, come ad esempio nutraceutici e cosmetici.

Questa valorizzazione dei sottoprodotti del pesce è in linea con la sempre crescente consapevolezza dei consumatori in merito al rapporto tra dieta e salute, che cercano negli alimenti non solo una fonte di nutrienti e qualità organolettiche elevate, ma si interessano sempre di più alle proprietà nutrizionali e funzionali unitamente a quelle etiche e di sostenibilità degli alimenti che consumano.

Per ottenere composti naturali da queste fonti marine con tutti i requisiti utili alle richieste del mercato quali: buone proprietà organolettiche, nutrizionali, funzionali/salutistiche e possibilmente eco-compatibili, la selezione di metodi di estrazione adeguati è un passaggio fondamentale. A questo proposito, negli ultimi anni, numerose tecnologie estrattive "green" sono state impiegate in campo alimentare, come ad esempio: l'estrazione assistita dagli ultrasuoni (UAE), l'estrazione con fluidi supercritici (SFE), l'estrazione assistita con microonde (MAE), l'estrazione con i campi elettrici pulsati, l'estrazione assistita con le alte pressioni, l'estrazione con i fluidi supercritici (SFE), l'estrazione con acqua subcritica (SWE), la filtrazione con membrane, l'estrazione enzimatica.

Queste tecnologie innovative sono diventate un'alternativa più sicura ed efficiente rispetto ai metodi convenzionali nell'isolamento di composti preziosi dai sottoprodotti e dagli scarti del pesce e dei molluschi. Esse presentano numerosi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali, preservando e persino migliorando la qualità e l'efficienza di estrazione, nonché minimizzando le perdite di proprietà funzionali dei composti bioattivi estratti dai sottoprodotti marini. Oltre alle loro attività biologiche, i composti bioattivi ottenuti da tecnologie alternative innovative possono presentare proprietà tecnologiche e igienico-sanitarie più elevate, consentendone persino l'utilizzo in altri alimenti.

L'estrazione di prodotti naturali è stata considerata per molto tempo "pulita" se confrontata con altri processi chimici-industriali, ma in realtà è stato recentemente valutato che il suo impatto ambientale è molto maggiore di come era apparso inizialmente. L'impatto ambientale complessivo di un ciclo di estrazione non è facilmente stimabile, tuttavia è noto che richiede almeno il 50% dell'energia di tutto il processo industriale; inoltre, nonostante l'elevato consumo di energia e l'utilizzo di grandi quantità di solventi, spesso il rendimento è basso.

Al giorno d'oggi è quasi impossibile trovare un processo di produzione in campo alimentare, cosmetico o farmaceutico che non faccia ricorso a tecniche di estrazione come, ad esempio,

macerazione, distillazione in corrente di vapore, pressatura, percolazione. Tendenze recenti nelle tecnologie estrattive si sono in gran parte concentrate sulla ricerca di soluzioni che riducano al minimo l'uso di solventi, consentendo anche l'aumento di efficienza del processo e una produzione economicamente vantaggiosa di estratti di alta qualità.

Queste nuove tecnologie si basano sui "Sei Principi dell'Estrazione Green di Prodotti Naturali", descritti e proposti come fasi innovative per le industrie:

- **1° Principio - Utilizzo di risorse rinnovabili e non a rischio di estinzione.** La crescente domanda di prodotti ed estratti naturali sta portando ad un eccessivo sfruttamento delle risorse naturali e quindi all'estinzione di alcune specie.
- **2° Principio - Utilizzo di solventi alternativi** e principalmente acqua o agrosolventi come l'etanolo. Questi hanno in vantaggio di essere biodegradabili, non tossici e non infiammabili, a differenza della maggior parte dei solventi organici che sono tra le principali cause dell'inquinamento ambientale.
- **3° Principio - Riduzione del consumo di energia** attraverso l'ottimizzazione dei processi esistenti, il recupero dell'energia liberata durante il processo di estrazione, eventuali innovazioni di processo.
- **4° Principio - Produzione di co-prodotti anziché di rifiuti.**
- **5° Principio - Riduzione delle operazioni unitarie attraverso l'innovazione** tecnologica favorendo processi sicuri e controllati. Diminuire il numero di passaggi (step) in un processo industriale comporta, infatti, un abbattimento dei costi e una migliore efficienza energetica.
- **6° Principio - Ottenimento di un estratto termicamente inalterato**, biodegradabile e senza contaminanti residui.

Tra i diversi composti bioattivi estraibili, il collagene è stato scelto come obiettivo principale del progetto. In latino il collagene "*colla et genmen*" vuol dire *produrre colla*. Il collagene rappresenta la colla del corpo. In altre parole, rappresenta il materiale e la colla che tiene insieme i tessuti connettivi del nostro corpo (ossa, cartilagini, muscoli, tendini, legamenti, pelle).

### **Estrazione di Collagene**

Il collagene è la principale proteina fibrosa e strutturale della matrice extracellulare degli animali e contribuisce alle funzioni fisiologiche dei tessuti nella cartilagine, nella pelle, nelle ossa e nei tendini. Il collagene è un termine generale per definire un gruppo di proteine ad alto peso molecolare abbondanti sia negli organismi invertebrati sia vertebrati. È una macromolecola proteica fibrosa, a

forma elicoidale costituita da tre catene  $\alpha$ , ciascuna delle quali è costituita da una specifica unità ripetitiva di glicina-prolina-idrossiprolina. La gelatina è una macromolecola proteica ottenuta per denaturazione termica del collagene (come la maggior parte delle proteine, se il collagene viene scaldato perde completamente tutte le sue strutture ad eccezione di quella primaria, cioè la tripla elica si svolge e le catene si separano. Quando la massa di proteine denaturate si raffredda, assorbe come una spugna l'acqua circostante, formando la gelatina. Questo processo di denaturazione da trattamenti termici oppure da trattamenti chimici è storicamente sfruttato per la produzione della "colla" da cui il nome di collagene). Le caratteristiche strutturali e funzionali del collagene lo rendono un obiettivo primario per le industrie alimentari, farmaceutiche, biomediche, di pelletteria, cosmetica e di ingegneria dei materiali. Ha una vasta gamma di applicazioni nei settori della salute, vale a dire industria farmaceutica e biomedica (compresa la chirurgia plastica, ortopedia, oftalmologia e odontoiatria). Nei settori non sanitari, un uso notevole del collagene si ha nella cosmetica, nell'industria alimentare (come additivo e come sostanza nutraceutica).

Vi è una forte domanda nel settore alimentare per collagene e gelatina anche per le loro proprietà funzionali, quali la capacità di assorbire acqua, la capacità di formare gel e di stabilizzare le emulsioni. La gelatina derivata dai frutti di mare rilascia un aroma e un sapore particolare e possiede una maggiore digeribilità rispetto alla gelatina animale di origine suina o bovina. Nel biomedicale e nel settore farmaceutico, il collagene ha diverse applicazioni; è usato come eccipiente per i farmaci, in campo biomedico per la produzione di sostituti della pelle umana, di vasi sanguigni e legamenti. Tradizionalmente, il collagene e i prodotti derivati dal collagene provengono principalmente da fonti bovine e suine (nei mammiferi il collagene rappresenta fino al 25% delle proteine totali). Ad oggi, l'80% della gelatina alimentare prodotta in Europa è derivata dalla cotenna del maiale. Il 15% viene ricavato dal bifido bovino, cioè da uno strato sottile presente sotto la pelle. Il rimanente 5% viene ricavato quasi tutto da ossa di maiali e bovini.

Tuttavia, il collagene suino e bovino, sebbene caratterizzato da una stabilità termica superiore a quella del collagene marino, desta preoccupazioni religiose e igienico-sanitarie che rendono interessanti eventuali alternative come quella di origine marina.

L'incidenza su vasta scala dell'epidemia di encefalopatia spongiforme bovina (BSE) ha portato di conseguenza alla sfiducia dei consumatori sui prodotti a base di collagene da fonti bovine e suine; il mondo intero è quindi alla ricerca di fonti alternative di collagene.

Il collagene ha una complessa organizzazione strutturale e gerarchica e finora sono stati segnalati più di 28 tipi di collageni diversi in base alla loro specifica organizzazione in tessuti distinti.

I diversi tipi di collageni sono infatti diversamente distribuiti nei tessuti animali. Il seguente elenco fornisce esempi di tessuti in cui sono presenti i tipi più abbondanti di collagene:

- Tipo I: osso, derma, tendine, legamenti, cornea;
- Tipo II: cartilagine, corpo vitreo, nucleo polposo;
- Tipo III: pelle, parete vasale, fibre reticolari della maggior parte dei tessuti (polmoni, fegato, milza, eccetera.);
- Tipo IV - membrane basali;
- Tipo V - spesso si distribuisce con il collagene di tipo I nella cornea.

Essendo queste tipologie (collageni da I a V), le più abbondanti (i primi 4 tipi rappresentano circa il 90% di tutti i collageni), sono anche quelle maggiormente sfruttate a livello commerciale: isolandoli e purificandoli, principalmente da tessuti bovini e suini, da processi di produzione convenzionali e ad alto rendimento, che portano a lotti di collagene di alta qualità.

Generalmente, i collageni sono formati da catene polipeptidiche costituite da triplette ripetute le più comuni delle quali sono Gly-Pro-X e GlyX-Hyp, dove X è qualsiasi aminoacido diverso dalla glicina (Gly), prolina (Pro) o idrossiprolina (Hyp).

Esiste una quantità variabile di cross-link tra le eliche delle molecole di collagene. In questo modo si formano aggregati ben organizzati, come le fibrille. Le fibrille di collagene sono l'aggregazione di diverse sub-unità, chiamate tropocollagene.

Queste fibrille sono aggregati semi-cristallini di molecole di collagene. Le fibre di collagene sono fasci di fibrille. Queste fibre sono un componente importante della matrice extracellulare che supporta la maggior parte dei tessuti e fornisce struttura alle cellule dall'esterno).

Quando si parla di "collagene idrolizzato" (detto anche idrolizzato di collagene) si intende un prodotto che viene ottenuto dal collagene tramite un processo di idrolisi della sequenza amminoacidica primaria. Ed è la forma più frequentemente presente in prodotti commerciali quali integratore alimentari pubblicizzati per la salute delle articolazioni nella prevenzione di artrosi e osteoporosi nonché come trattamento anti-aging a livello della cute.

I collageni marini possono essere ottenuti da diverse fonti. Spugne, meduse e frattaglie di pesce come lische, pelle, squame e pinne possono servire come fonti alternative di collagene. I collageni marini sono fibrillari e non fibrillari, hanno temperature di gelificazione e fusione inferiori rispetto al collagene dei mammiferi, ma viscosità relativamente più elevate rispetto ad analoghi composti di natura bovina. Il collagene di pesce è più sensibile al calore a causa di legami crociati labili rispetto a quello dei mammiferi (quindi più facilmente denaturabile). Diversi studi presenti in letteratura scientifica si sono concentrati proprio sui collageni marini, in particolare sulla sua estrazione da

diverse fonti, come pesci o invertebrati animali marini, quali spugne marine o meduse (Silva et al. 2014).

Si ottiene prevalentemente collagene di tipo I da pelle, tendini, lische e muscoli (epimisio), che peraltro è il tipo più abbondante di collagene.

Tuttavia, si può ottenere anche collagene di tipo II se si utilizzano le cartilagini di pesce come fonti principali.

La diversa solubilità del collagene dipende dall'età degli animali: il collagene degli animali più anziani hanno un numero maggiore di cross-link, che li rende più difficili da solubilizzare rispetto ai collagene di animali giovani. Inoltre, i pesci che seguono una dieta povera in nutrienti sembrano produrre più collagene rispetto ai pesci ben nutriti. A seconda della diversa fonte di collagene, sono state proposte diverse tecniche per estrarlo.

Tuttavia, è possibile definire una metodologia generale per isolare il collagene dai sottoprodotti di pesce e da altre fonti marine, che prevede tre importanti passaggi: preparazione, estrazione e recupero.

### **1) Preparazione**

La preparazione dei residui di pesce comporta:

- la pulizia
- la separazione delle diverse parti animali
- la riduzione delle dimensioni mediante taglio o macinazione dei campioni e un pretrattamento chimico per rimuovere: le proteine diverse dal collagene e la frazione lipidica.

Nelle meduse, ad esempio, è pratica comune separare i tentacoli dall'ombrello e separare quest'ultimo a sua volta in mesoglea, esombrella e subombrella. Nel caso dei pesci, si suddividono le pelli, le squame, le pinne e lische di pesce, poiché la loro composizione è diversa e quindi la metodologia applicata per estrarre il collagene deve prevedere questi passaggi preparatori aggiuntivi.

La macinazione per ridurre le dimensioni del materiale da trattare è un passo fondamentale in qualsiasi caso. Il metodo più comune per rimuovere le proteine diverse dal collagene è l'uso dell'idrossido di sodio (NaOH).

L'efficacia della rimozione dipende dal tempo, dalla temperatura e dalla concentrazione della soluzione di NaOH. Sadowska et al. hanno anche proposto l'uso di cloruro di sodio (NaCl), oltre all' NaOH, per rimuovere le proteine diverse dal collagene dalla pelle di merluzzo. Tuttavia, la soluzione NaCl ha dimostrato una minore efficacia nella rimozione di albumine e globuline rispetto all'NaOH. La rimozione dei lipidi e dei pigmenti può essere ottenuta rispettivamente mediante l'uso di alcoli (alcol butilico o etanolo) e perossido di ossigeno. Per le ossa/lische, cartilagini e squame, l'uso di acido

etilendiamminotetraacetico (EDTA) è raccomandato per effettuare una demineralizzazione preventiva, in virtù della sua azione chelante sugli ioni calcio, per una migliore estrazione del collagene. In alternativa, può essere utilizzata un'idrolisi acida con HCl 1M anche per scopi di demineralizzazione, con rapporti circa 1: 3 (p / v).

## 2) Estrazione

Esistono diverse possibilità:

- *Estrazione acida*: E' utilizzata una soluzione acida per la solubilizzazione del collagene; la frazione così estratta viene genericamente indicata come "Collagene Solubile in acido" (ASC). Skierka e Sadowska hanno studiato l'effetto di acidi diversi (compresi cloridrico, citrico, acetico e lattico) sulla resa estrattiva in collagene a partire dalla pelle di merluzzo. Lo studio ha evidenziato come l'acido acetico e lattico comportino rese maggiori rispetto agli altri acidi testati. Tuttavia, il processo di estrazione del collagene mediante "soluzione acida" normalmente ha basse rese estrattivi.
- *Estrazione enzimatica*: Si attua utilizzando enzimi proteolitici non specifici per il collagene per aiutare nel processo di solubilizzazione. Sono utilizzati enzimi quali: tripsina, pancreatina, ficina, bromelina, papaina o pepsina. La pepsina è il più usato e il collagene estratto con questo enzima prende il nome di "Collagene solubile in pepsina" (PSC) o atelo-collagene. Questo trattamento è molto utile, poiché si rompe il collagene in peptidi specificamente nella regione telopeptidica del collagene, che sono estremità non elicoidali e, quindi aumenta la purezza del collagene così ottenuto. L'estrazione è più efficiente e l'estratto ha una maggiore solubilità.

Esistono anche altri metodi per estrarre il collagene.

Ad esempio, il collagene da frutti di mare può essere estratto utilizzando una soluzione di NaCl e il collagene risultante è indicato come collagene solubilizzato con sale (SSC). Tuttavia, il metodo di solubilizzazione del sale è stato usato raramente per l'estrazione di collagene.

L'estrazione assistita con ultrasuoni è una tecnologia emergente nel campo dell'estrazione di prodotti naturali in campo alimentare. Essa sfrutta il fenomeno della cavitazione per rompere le membrane cellulari e favorire la fuoriuscita dei contenuti intracellulari. Gli ultrasuoni sono onde meccaniche che richiedono un mezzo elastico per diffondersi. La differenza tra il suono e gli ultrasuoni è la frequenza dell'onda: le onde sonore arrivano alle frequenze percepite dall'orecchio umano (da 16 Hz a 16-20 kHz) mentre gli ultrasuoni hanno frequenze più elevate, ma al di sotto delle frequenze delle microonde (da 20 kHz a 10 MHz). Quando un'onda sonora passa attraverso un mezzo elastico, essa induce uno spostamento longitudinale di particelle che si traduce in una successione di fasi di compressione e rarefazione nel mezzo. Ogni mezzo ha una distanza molecolare critica: al di

sotto di questo valore il liquido rimane intatto, ma al di sopra di questa distanza esso si rompe e si possono generare dei vuoti. Nel caso degli ultrasuoni, se il ciclo di rarefazione è sufficientemente forte, la distanza tra le molecole contigue può superare la distanza molecolare critica del liquido; i vuoti creati nel mezzo sono le bolle di cavitazione che rispondono all'effetto ultrasonico. Il collasso delle bolle di cavitazione vicino alla superficie solida genera onde d'urto (*microjets*), ad alte temperatura e pressione, che distruggono le pareti cellulari della matrice, con il conseguente passaggio del loro contenuto nel solvente di estrazione.

Kim, Kim, Park e Lee nel 2013 hanno sfruttato la UAE per estrarre collagene da fonti marine. I campioni sono stati pretrattati immergendoli in acido acetico per 12 ore. Successivamente, il collagene è stato estratto utilizzando un processore ad ultrasuoni a sonda. La resa in collagene dipende dalle ampiezze e dalla durata del trattamento ad ultrasuoni (le estrazioni UAE riducono drasticamente i tempi di estrazione rispetto alle metodiche tradizionali). Da questo lavoro è risultato evidente che UAE consente rese superiori rispetto ai processi tradizionali esposti in precedenza. Inoltre, gli autori non hanno evidenziato cambiamenti nei principali componenti del collagene dopo il trattamento ad ultrasuoni. Pertanto, il metodo assistito da ultrasuoni potrebbe offrire promettenti applicazioni pratiche nella produzione industriale di collagene marino.

Tra le tecnologie estrattive innovative, ad oggi applicate e riportate in letteratura scientifica, oltre alla UAE troviamo anche quelle che sfruttano le alte pressioni. Esse si basano sull'uso di solventi ad alte temperature e pressioni (50-200°C e 3,5-20 MPa). A volte, l'acqua viene utilizzata come solvente di estrazione; quindi questo metodo viene anche chiamato estrazione con acqua subcritica, o estrazione con acqua surriscaldata, o estrazione con acqua calda pressurizzata. E' un processo veloce che richiede una bassa quantità di solvente rispetto ai metodi di estrazione tradizionali. Questo metodo è in grado di ridurre drasticamente la durata del processo e anche di produrre una gelatina di alta qualità. Tuttavia, questi processi di estrazione portano facilmente all'estrazione di gelatina e non di collagene, in quanto i parametri di processo conducono facilmente alla trasformazione del collagene in gelatina.

E' da notare che le rese più alte si ottengono utilizzando i metodi in serie e/o in combinazione (ad esempio utilizzando gli ultrasuoni e gli enzimi insieme). Molte di queste combinazioni di metodiche non sono ancora state esplorate e potranno essere oggetto della progettualità futura.

### **3) Recupero**

Per la fase di recupero, il collagene deve essere precipitato, generalmente ottenuto aggiungendo una soluzione salina tamponata con Tris-HCl (pH 7,5). Il precipitato risultante viene raccolto mediante centrifugazione, ridissolto in acido acetico 0,5 M, dializzato e liofilizzato.

### **Tecniche Statistiche multivariate (chemiometriche)**

Oggi sono disponibili tecniche statistiche multivariate che potrebbero giocare un ruolo determinante: dalla scelta del corretto piano sperimentale all'elaborazione finale dei dati ottenuti, alla loro interpretazione e presentazione (mediante tecniche esplorative dei dati, di classificazione/modellamento e di regressione). Solo procedendo secondo questa logica razionale, le prove di laboratorio potranno fornire delle chiare indicazioni su come procedere nello scale-up industriale e permetterne un'indicazione economica a priori (sostenibilità economica).

In dettaglio queste tecniche potrebbero essere applicate:

1) nella fase di definizione del problema sperimentale: la scelta del processo estrattivo (l'abbinamento in serie o in parallelo di più tecniche estrattive), la scelta dei fattori che influenzano il/i processo/i estrattivo/i (es. tempo, temperatura, pH, etc.), in quale range far variare detti fattori (il cosiddetto dominio sperimentale), quali grandezze si vogliono misurare per valutare gli esperimenti (risposta/e sperimentali, quali ad esempio: la resa estrattiva, il tipo di collagene ottenuto, le sue caratteristiche tipo purezza, caratteristiche tecnologiche, antigenicità...), quali strumenti e metodi si possono usare, quali informazioni sono già disponibili, quali sono i limiti pratici...). Per fare ciò sarà necessario scegliere un piano sperimentale e proprio a questo livello si collocano le tecniche di disegno sperimentale, che consentono di progettare razionalmente "gli esperimenti" (le prove) con cui ottimizzare il processo estrattivo, riuscendo ad ottenere la massima informazione dal sistema in oggetto, eseguendo il minore numero possibile di prove. In un disegno sperimentale tutte le variabili (sopracitate) che descrivono il sistema sono variate contemporaneamente, in modo sistematico. In questo modo non solo è possibile studiare il singolo effetto di ogni variabile, ma anche le interazioni tra le stesse.

In altre parole, un disegno sperimentale appare come una matrice (o sequenza) di prove sperimentali da effettuare, per studiare e ottimizzare un sistema.

Usualmente il risultato di ogni esperimento dipende da più fattori che agiscono contemporaneamente. Per ottimizzare le condizioni sperimentali, al fine di ottenere il risultato più favorevole, si deve quindi considerare l'azione di tutte queste variabili e le loro interazioni. E', quindi, conveniente progettare una serie di esperimenti facendo uso della tecnica delle matrici sperimentali che consente di sviluppare uno o più disegni sperimentali adatti allo scopo. Tali prove sono

opportunamente progettate per poter riuscire ad ottenere la massima informazione dal sistema in oggetto, per investigarne le superfici di risposta, eseguendo il minore numero possibile di prove. Le superfici di risposta sono la rappresentazione grafica della risposta (o di più risposte) di un sistema, rappresentata in funzione del sistema stesso.

Questo approccio sperimentale si differenzia da quello classico (OVAT: one variable at the time), che prevede di variare una variabile per volta, mantenendo le altre ferme. La metodica classica oltre ad essere enormemente dispendiosa in termini di tempo rispetto a DoE non porterà mai ad una conoscenza completa del sistema, in quanto si perderà completamente l'informazione inerente le interazioni tra variabili sperimentali.

2) Dopo la realizzazione degli esperimenti progettati con il DoE e realizzati in laboratorio (prove di laboratorio), sarà effettuata la raccolta dei risultati e un'analisi preliminare dei dati. A questo livello si collocano le tecniche chemiometriche esplorative. Queste tecniche si propongono di visualizzare l'informazione ottenuta dal set di dati; evidenziare anomalie ed errori; isolare gruppi di oggetti (prove sperimentali) e/o variabili simili; correlare le diversità tra gli esperimenti o tra gruppi di esperimenti con alcune variabili; selezionare le variabili più interessanti.

## 2.4 Considerazioni

Come desunto dalla fase preliminare di caratterizzazione descritta nel Capitolo 4, sia dai rifiuti organici derivati da attività di acquacoltura e di pesca, sia da quelli raccolti da attività di molluschicoltura, sono stati ottenuti risultati soddisfacenti (soprattutto se la conservazione dello scarto avviene in maniera corretta), evidenziando che, dal punto di vista microbiologico, non si incontrano impedimenti ad un riutilizzo degli scarti così caratterizzati in campi diversi, quale per esempio quello mangimistico oltre che come fertilizzante.

Tra le destinazioni d'uso della biomassa ittica di scarto, questi sottoprodotti "ittici" rappresentano un'importante fonte potenziale di composti bioattivi, con importanti proprietà funzionali che potrebbero essere isolate e concentrate, conferendo loro un valore aggiunto nei mercati di fascia più alta, come ad esempio nutraceutici e cosmetici. In questo contesto, è stato proposto ed analizzato un possibile riutilizzo per l'ottenimento di molecole biologicamente attive, come il **collagene**, per il quale esiste un'elevata domanda di mercato, soprattutto per quello di provenienza marina.

Per ottenere composti naturali da queste fonti marine con tutti i requisiti utili alle richieste del mercato quali: buone proprietà organolettiche, nutrizionali, funzionali/salutistiche e possibilmente eco-compatibili, la selezione di metodi di estrazione adeguati risulta uno step fondamentale.

Lo studio effettuato sia della normativa vigente, sia dello stato dell'arte riguardante i metodi estrattivi applicabili ha messo in evidenza i seguenti fattori determinanti, da tenere in considerazione nell'analisi di fattibilità della filiera di riutilizzo alla quale ci si vuole rivolgere:

- Il Regolamento Comunitario **1380 del 2013** sulla riforma della Politica Comune della Pesca, all'Articolo 15, prevede **l'obbligo per i pescatori di sbarcare gli «scarti»** delle specie soggette a taglia minima (Reg. UE 1967/2006).
- Questi «scarti» **non potranno essere destinati al consumo umano** diretto, ma potranno essere destinati alla produzione di mangimi o prodotti affini, oppure dovranno essere smaltiti come rifiuti, **purché questi utilizzi non creino economia rilevante** per i pescatori.
- Secondo le dichiarazioni degli operatori, l'ottemperanza al nuovo regolamento comporterà un sicuro aggravio di lavoro a bordo stimato in un incremento medio del carico di lavoro di almeno 2 ore al giorno per assolvere alle operazioni aggiuntive di smistamento e stoccaggio degli scarti destinati ad essere sbarcati.
- Risulta quindi fondamentale essere in grado di **valorizzare lo SCARTO** per **compensare i costi** dovuti alla gestione del Regolamento e soprattutto risulta fondamentale **allestire sul territorio un sistema** che garantisca con continuità il **ritiro e lo stoccaggio** degli scarti facendo in modo che questo non si trasformi in **RIFIUTO**.
- La disamina dello stato dell'arte tecnologico si è rivolto principalmente ad innovative tecnologie estrattive "green" che costituiscono un'alternativa più efficiente in termini di migliore preservazione del prodotto di partenza, migliore qualità finale degli estratti, maggiore efficienza di estrazione, minimizzazione delle perdite di proprietà funzionali dei composti bioattivi estratti, proprietà tecnologiche e igienico-sanitarie più elevate dei prodotti ottenuti.
- Tra i diversi composti bioattivi estraibili, il **COLLAGENE** è stato scelto come obiettivo principale del progetto, per il quale esiste una forte domanda.
- Vi è una forte domanda nel settore alimentare per collagene e gelatina anche per le loro proprietà funzionali, quali la capacità di assorbire acqua, la capacità di formare gel e di stabilizzare le emulsioni e la provenienza marina risulta maggiormente apprezzata per diverse motivazioni.
- Esiste una metodologia generale per isolare il collagene dai sottoprodotti di pesce e da altre fonti marine, che prevede tre importanti passaggi: preparazione, estrazione e recupero.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, si è proceduto a condurre uno studio sperimentale per mettere a confronto diverse metodologie di estrazione del collagene, a partire dallo stesso materiale organico di partenza, e valutarne anche gli impatti in termini ambientali ed energetici, con lo scopo di verificare sia la fattibilità dal punto di vista tecnico, sia dal punto di vista della sostenibilità ambientale dell'intero processo integrato individuato.

## 2.5 Studio sperimentale

L'utilizzo del collagene di origine marina sta crescendo rapidamente grazie alle sue proprietà, uniche rispetto al collagene di origine animale, come l'assenza di rischio di trasmissione di malattie, il suo facile assorbimento da parte del corpo umano, la biocompatibilità, un processo conveniente e l'assenza di vincoli religiosi.

E' stato chiaro fin da subito, in fase di progettazione, che era necessaria una tempestiva azione per bloccare i processi degradativi. Negli scarti del pesce sono presenti microorganismi che in presenza di acqua possono degradare istidina presente in quantità, soprattutto in alcune tipologie di pesce. Se l'istidina viene degradata si ottiene istamina e questo è un grave problema perché l'ingestione di cibi ricchi di istamina può provocare intossicazione e sindrome sgombroide.

La prima fase del progetto ha quindi messo in contrapposizione la refrigerazione degli scarti rispetto ad una veloce disidratazione; successivamente si sono valutati diversi metodi estrattivi per ottenere molecole di collagene, valutando sia gli ultrasuoni sia le microonde, mettendole in paragone con l'estrazione classica con enzimi idrolitici.

Il progetto ha valutato le diverse rese di estrazione di collagene effettuate con tecnologie estrattive ad oggi applicate e riportate in letteratura scientifica.

Oltre alle metodologie classiche, come tecnologie innovative sono stati valutati gli UAE e quelle che sfruttano le alte pressioni, che si basano sull'uso di solventi ad alte temperature e pressioni (50-200 ° C e 3,5-20 MPa). L'acqua utilizzata come solvente di estrazione fa sì che questo metodo venga chiamato estrazione con acqua subcritica, o estrazione con acqua surriscaldata, o estrazione con acqua calda pressurizzata. E' un processo veloce che richiede una bassa quantità di solvente rispetto ai metodi di estrazione tradizionali; questo metodo è stato in grado di ridurre drasticamente la durata del processo e anche di produrre una gelatina di alta qualità.

Tuttavia, questi processi di estrazione portano facilmente all'estrazione di gelatina e non di collagene, in quanto i parametri di processo conducono facilmente alla trasformazione del collagene in gelatina.

La ricerca si è invece focalizzata sulla messa a punto di un processo estrattivo ecocompatibile per l'estrazione del collagene solubile in acido (Acid Soluble Collagen, ACS), utilizzando **l'estrazione pulsata ad ultrasuoni** (Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction, PUAE) e confrontando questa metodica con un protocollo estrattivo convenzionale. Sono state effettuate numerose prove ed i dati presentati mostrano il dato medio dell'estrazione con ultrasuoni (PROVE A) rispetto al dato medio ottenuto con l'estrazione classica (PROVE B).

Tutte le prove sono partite da pelle di cefalo congelata e conservata a -20 °C fino al successivo utilizzo.

Il protocollo sperimentale seguito è schematizzato in Tabella 5:

<b>Estrazione Acid Soluble Collagen (ACS) da pelle di cefalo</b>		
Step	Solvente\Trattamento	Tempo
0	Congelamento	3 giorni
1	Pretrattamento	lavaggio con H <sub>2</sub> O, sminuzzamento
2	Rimozione delle proteine non collageniche	0.1 M NaOH: campione/soluzione 1:10 (w/v), in agitazione
3	Neutralizzazione	lavaggio con H <sub>2</sub> O
4	Rimozione della frazione lipidica	10% Alcool butilico: campione/soluzione 1:10 (w/v), in agitazione
5	Lavaggio	lavaggio con H <sub>2</sub> O
6	Estrazione	0.5 M Acido acetico: campione/soluzione 1:10 (w/v), in agitazione
		PROVA A: estrazione assistita con gli ultrasuoni in modalità pulsata (PUAE). PROVA B: Estrazione convenzionale, senza attivazione con ultrasuoni.
7	Centrifugazione	18.000 X g 4 °C
		Sopranatante
8	Precipitazione	precipitazione con NaCl 2.3 M finale in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5)
9	Centrifugazione	18.000 X g 4 °C
10	Risospensione del precipitato	Il pellet è risospeso in 10 ml di Acido acetico 0.5 M
11	Dialisi	Tubi da dialisi: Merck, # D6191, Dialysis sacks Avg. flat width 25 mm (1.0 in.), MWCO 12,000 Da) contro 5 L di 0.1 M acido acetico a 4°C
12	Congelamento a -80°e liofilizzazione	18 ore di congelamento 24 ore di liofilizzazione

**Tabella 5: Protocollo sperimentale.**

## DESCRIZIONE PROTOCOLLO

**Step 1** - La pelle congelata viene sciacquata sotto acqua corrente e tamponata su carta assorbente. Successivamente, viene manualmente sminuzzata in pezzi della dimensione di circa 1 cm. È stato preliminarmente valutato il contenuto di umidità della pelle, utilizzando una termobilancia, che è risultato pari al 62.75% + 0.10.

**Step 2** - La pelle sminuzzata (5 g) viene trattata con una soluzione di NaOH 0.1 M (50 mL) al fine di rimuovere le proteine non collageniche (rapporto soluto:solvente= 1/10 w/v) in agitazione continua per 24 h, effettuando cambio di soluzione ogni 8 h (vedi Figura 2).

**Step 3** - La soluzione è filtrata su Buchner (sottovuoto, tempo richiesto circa 20 secondi) e si effettua un lavaggio con H<sub>2</sub>O (50 mL) fino a pH neutro.

**Step 4** - La pelle viene trattata con una soluzione di Alcool butilico al 10% al fine di rimuovere la frazione lipidica (rapporto soluto:solvente= 1/10 w/v) in agitazione continua per 24 h, effettuando cambio di soluzione ogni 8 h.

**Step 5** - Successivamente, la soluzione è filtrata e si effettua un lavaggio con H<sub>2</sub>O (50 mL) della pelle per rimuovere la fase butanolica. L'estratto butanolico è portato a secco in rotavapor e il contenuto lipidico è determinato per via gravimetrica (contenuto lipidico pari a 354 mg, ossia 7%).

**Step 6** - La pelle viene estratta con una soluzione di Acido acetico 0.5 M (rapporto soluto:solvente= 1/10 w/v).

Si procede al confronto tra un processo estrattivo ecocompatibile per l'estrazione del collagene solubile in acido (Acid Soluble Collagen, ACS) (PROVE A), ed un protocollo estrattivo convenzionale (PROVE B):

**Prove A:** estrazione del collagene assistita con gli ultrasuoni in modalità pulsata (PUAE).

**Prove B:** estrazione del collagene senza l'attivazione con gli ultrasuoni.

**Prove A:** L'estrazione prevede l'utilizzo di un sonicatore avente una frequenza operativa pari a 26 kHz, output pari a 200 W e munito di un sonotrodo (probe) in titanio di 7 mm. Le condizioni estrattive utilizzate sono riportate in Figura 7:

<i>Condizioni sperimentali</i>	
<i>Solvente estrattivo</i>	CH <sub>3</sub> COOH 0.5 M
<i>Tempo di estrazione</i>	30 minuti
<i>Rapporto solido/solvente</i>	1:10 w/v
<i>Amplitude</i>	80%
<i>Duty cycle</i>	50%
<i>Temperatura</i>	Max 30°C

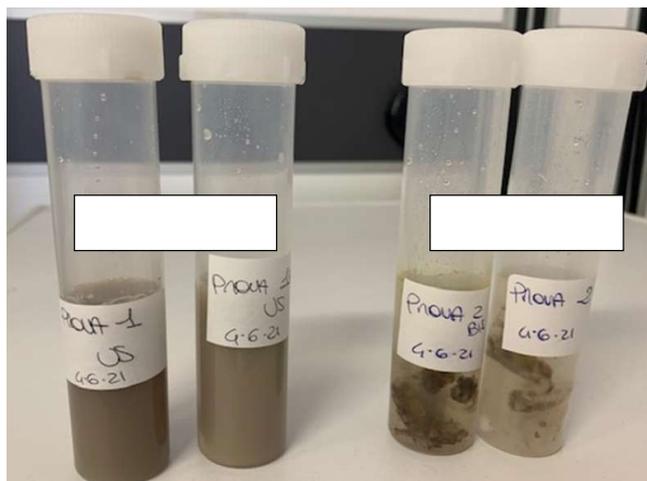


**Figura 7. Condizioni sperimentali PUAE.**

L'estrazione con ultrasuoni è effettuata in bagno di ghiaccio, al fine di controllare l'innalzamento della temperatura e mantenerla per tutto il processo al di sotto dei 30°C (sono utilizzati 6 cubetti di ghiaccio per ciascuna estrazione).

Concluso il processo di sonicazione, l'estratto ottenuto è mantenuto in agitazione continua per 3 giorni prima degli step successivi.

**Prove B:** La pelle viene estratta con una soluzione di Acido acetico 0.5 M (rapporto soluto:solvente= 1/10 w/v), in agitazione continua per 3 giorni (senza utilizzo degli ultrasuoni). In Figura 8 sono messi a confronto gli estratti ottenuti rispettivamente dalle PROVE A e PROVE B al termine dello Step 6:

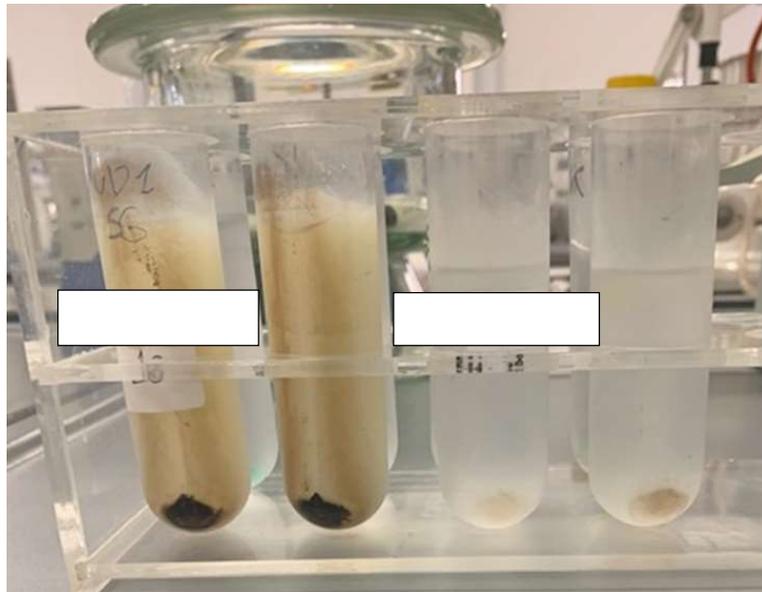


**Figura 8: Estratti ottenuti a seguito dello Step 6.**

**Step 7** - Gli estratti ottenuti sono centrifugati a 18.000 g X per 1 h, mantenendo la temperatura a 4°C.

**Step 8** - La fase liquida (sopranatante), che si separa a seguito della centrifugazione (Step 7), viene precipitata con una soluzione di NaCl 2.3 M in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) e mantenuta in agitazione per 18 h prima della successiva centrifugazione (Step 9).

**Step 9** - Gli estratti sono centrifugati a 18.000 g X per 1 h, mantenendo la temperatura a 4°C (vedi Figura 7).



**Figura 5.**

**Step 10** - Il precipitato ottenuto nello step precedente (Figura 5) viene risospeso in 10 mL di Acido acetico 0.5 M e conservato in frigorifero fino ai successivi step analitici (dialisi, liofilizzazione e caratterizzazione).

**Step 11** - Le 4 sospensioni di collagene ottenute nello step 10 vengono dializzate (Tubi da dialisi: Merck, # D6191, Dialysis sacks Avg. flat width 25 mm (1.0 in.), MWCO 12,000 Da) contro 5 L di 0.1 M acido acetico, a 4°C, su agitatore magnetico (Vengono fatti 4 cambi dopo un minimo di 3 h).

**Step 12** - Al termine i campioni dializzati vengono recuperati, congelati a -80°C per 18 ore (Angelantoni PLATILA 500 V-3-STD) e quindi liofilizzati a freddo in Freeze Dryer Edwards per 24 ore. Le polveri ottenute vengono quindi pesate su bilancia analitica (Gibertini Europe 60 ) per il calcolo della resa e quindi conservate a 4°C.

.....

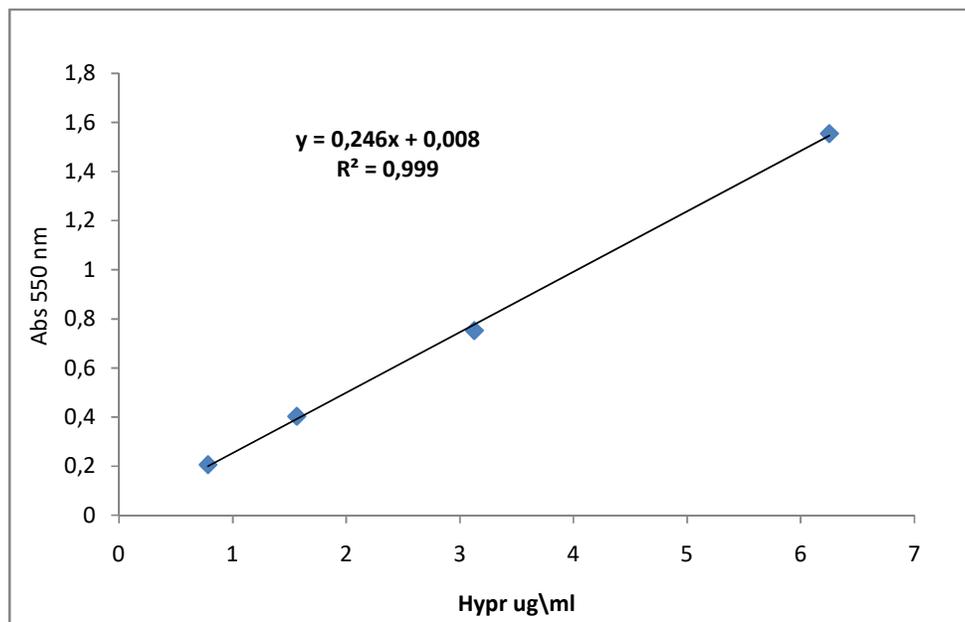
Per paragonare i diversi metodi è stato quindi effettuato un dosaggio quantitativo dei collagene estratti attraverso l'uso del Sircol Kit assay. Limite di rilevamento: 1,0 µg. Tempo richiesto: 1,5 ore

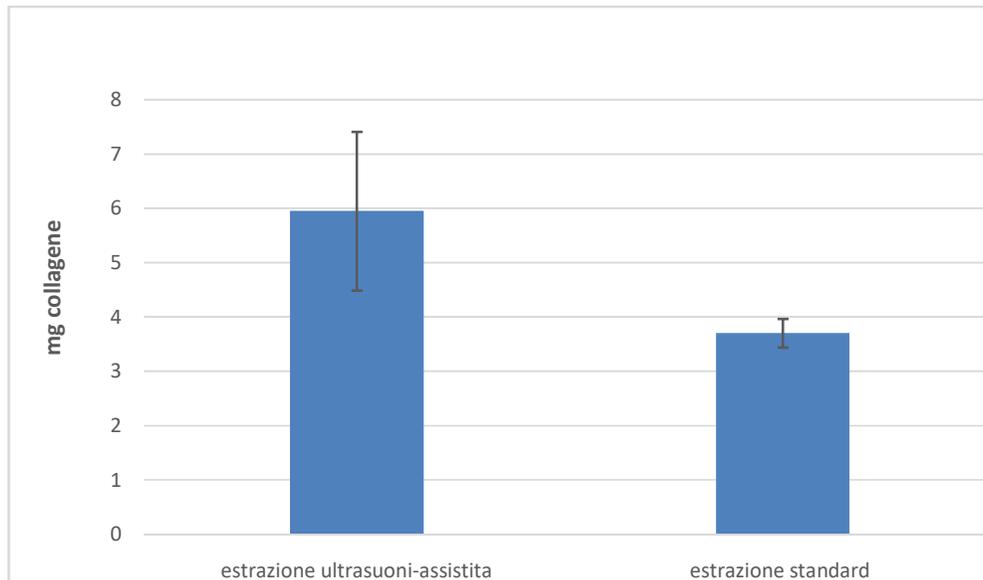
Il saggio Sircol è una procedura colorimetrica, pertanto i materiali di prova per l'analisi devono essere esenti da materiale particolato, come detriti e frammenti insolubili, il campione deve inoltre essere completamente trasparente poiché la torbidità può causare assorbimento e dispersione della luce.

I campioni provenienti dai diversi esperimenti, solubilizzati in una soluzione di acido acetico diluito, alcune volte presentavano dei particolati o delle torbidità per cui i risultati ottenuti evidenziavano sì una maggiore quantità di collagene nelle prove effettuate con ultrasuoni ma i dati ottenuti con Sircol non erano riproducibili se si effettuavano test ripetuti per valutare precisione e accuratezza del dato. Per questo si è preferito inserire un ulteriore test dosando l'idrossiprolina.

L'idrossiprolina è un amminoacido non standard, componente del collagene e si trova quasi esclusivamente in questa proteina; a seconda della specie presa in esame ne costituisce circa il 11-14%. Nel collagene i ponti idrogeno tra i gruppi ossidrilici dell'idrossiprolina e dell'idrossilisina stabilizzano la struttura.

Come è ben evidente dalle figure sottostanti, i test effettuati su due campioni delle Prove A e su due campioni delle Prove B evidenziarono che c'è sicuramente un incremento in quantità di collagene estratto se si utilizza la tecnologia ad ultrasuoni.





Con il metodo che utilizza Ultrasuoni, l'estrazione di collagene - valutando a parità di peso iniziale 2,5 g, la quantità di idrossiprolina presente - passa **da 3,7 mg a quasi 6 mg**.

Oltre alle rese in estrazione di collagene, in futuro si dovranno determinare le modifiche indotte dalle diverse tecniche estrattive sulla qualità finale del prodotto ottenuto: ad esempio, si dovrà valutare il grado di idrolizzazione del collagene ottenuto con i diversi metodi.

Successivamente sarà importante valutare il grado di purezza e le proprietà tecnologiche, ecc.).

Per arrivare ad un vero prodotto finale sarà quindi importantissimo valutare la riproducibilità di lotti di collagene marino estratto, saranno quindi necessarie analisi atte a garantire l'identità/(sottotipo) di collagene, il peso molecolare e la presenza di prodotti di idrolisi.