

A. ROSA, A. ATZERI,
M. DEIANA, M.P. MELIS,
A. INCANI, D. LORU,
B. CABBOI, M.A. DESSÌ

Bottarga di muggine come fonte di acidi grassi n-3: stabilità ossidativa e modulazione del profilo lipidico in cellule epiteliali intestinali Caco-2

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 14, N. 3, 186-193, 2012

TITLE

Mullet bottarga as source of n-3 fatty acids: oxidative stability and modulation of lipid profile in intestinal epithelial Caco-2 cells

KEY WORDS

Mullet bottarga; lipid peroxidation; Caco-2 cells

PAROLE CHIAVE

Bottarga di muggine; perossidazione lipidica; cellule Caco-2

Dipartimento di Biologia
Sperimentale, Sezione di Patologia
Sperimentale, Università degli Studi
di Cagliari, Cittadella Universitaria
Monserrato (CA)

Indirizzo per la corrispondenza:

Dr. Antonella Rosa,
Dipartimento di Biologia Sperimentale,
Sezione di Patologia Sperimentale,
Università degli Studi di Cagliari,
Cittadella Universitaria SS 554,
09042 Monserrato, Cagliari, Italy
Tel. +39 070 6754124
Fax +39 070 6754032
E-mail: anrosa@unica.it

Summary

The importance of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) intake has long been recognized in human nutrition, lowering the incidence of atherosclerosis, coronary heart disease, inflammatory disease and cancer. Although health benefits, n-3 PUFA are subject to rapid and/or extensive oxidation during processing and storage, resulting in potential alteration in nutritional composition and quality of food. Bottarga, the salted and semidried mullet (*Mugil cephalus*) ovary product, is proposed as important source of n-3 PUFA, having high levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). In this work we investigated the extent of lipid oxidation of grated bottarga samples during 7 months at different storage conditions (-20°C, 2°C, room temperature under light/dark exposure). Cell viability, lipid composition and lipid peroxidation were measured in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers after 6-48 h incubation with lipid and hydrophilic extracts obtained from bottarga samples at different storage conditions. Storage of bottarga did not affect the n-3 PUFA level, but significant differences were observed in hydroperoxide and malondialdehyde levels of samples from different storage conditions. Bottarga extracts did not show a toxic effect on cell viability. Epithelial cells incubated with bottarga oil had significant changes in fatty acid composition with an accumulation of EPA, DHA, and 22:5, however, did not accumulate more cholesterol than control cells.

Riassunto

Da lungo tempo è stata riconosciuta l'importanza, nella nutrizione umana, dell'assunzione degli acidi grassi polinsaturi n-3 (n-3 PUFA), in grado di ridurre l'incidenza di aterosclerosi, malattie coronariche, patologie infiammatorie e cancro. Nonostante gli effetti benefici, gli n-3 PUFA sono soggetti ad una rapida e/o estesa ossidazione durante le fasi di lavorazione e conservazione, inducendo una potenziale alterazione della composizione nutrizionale e della qualità dei prodotti. La bottarga, prodotto ottenuto dalla salagione ed essiccazione delle ovaie di muggine (*Mugil cephalus*), è considerata un'importante fonte di n-3 PUFA, in quanto possiede elevati livelli degli acidi eicosapentaenoico (EPA) e docosaeisenoico (DHA). In questo lavoro abbiamo studiato la degrada-

zione ossidativa dei componenti lipidici in campioni di bottarga macinata durante 7 mesi a diverse modalità di conservazione (-20°C, 2-3°C, temperatura ambiente con esposizione luce/buio). È stata valutata la vitalità cellulare, la composizione lipidica e il grado di ossidazione in monostrati di cellule epiteliali intestinali Caco-2 dopo incubazione, per 6-48 ore, in presenza di estratti lipidici ed idrofilici ottenuti dai campioni di bottarga sottoposti alle diverse condizioni di conservazione. La conservazione non ha indotto alcuna modifica dei livelli di n-3 PUFA, ma sono state osservate differenze significative nei livelli di idroperossidi e malonildialdeide nei campioni alle diverse modalità di conservazione. Gli estratti della bottarga non hanno indotto alcun effetto tossico sulla vitalità cellulare. Le cellule epiteliali, incubate con l'olio di bottarga, hanno evidenziato dei cambiamenti significativi nella composizione in acidi grassi, con un accumulo di EPA, DHA e 22:5, mentre non hanno mostrato un maggiore accumulo di colesterolo rispetto alle cellule di controllo.

Introduzione

Gli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 (n-3 PUFA), come il 20:5 (EPA) e il 22:6 (DHA), hanno un ruolo importante nel trattamento e nella prevenzione di varie condizioni patologiche come aterosclerosi, malattie coronariche, patologie infiammatorie intestinali e cancro al colon (1, 2). Nonostante gli effetti benefici, gli n-3 PUFA sono soggetti ad una rapida e/o estesa ossidazione per esposizione all'aria, luce e temperatura durante le fasi di lavorazione e conservazione, inducendo una potenziale alterazione della composizione nutrizionale e della qualità

dei prodotti che li contengono (3, 4). La bottarga è il prodotto finale di una serie di trattamenti (salagione ed essiccazione) sulle ovaie di muggine (*Mugil cephalus*) (5, 6). La Sardegna vanta un'antica tradizione per la produzione di bottarga d'elevata qualità; il prodotto finale è venduto come bottarga in baffe, impacchettata sotto vuoto, o grattugiata, in barattolo (5). La bottarga contiene elevati livelli di lipidi totali (200-325 mg/g di porzione edibile) (5-7), rappresentati prevalentemente da cere (fino al 70% dei lipidi), con minori quantità di trigliceridi, fosfolipidi, colesterolo e colesteril-esteri; costituisce inoltre un'ottima fonte di

EPA e DHA (6-15 e 12-30 mg/g di porzione edibile) (5-7). Nonostante la minore suscettibilità alla degradazione ossidativa degli n-3 PUFA esterificati nelle cere (6, 8), nei campioni di bottarga in baffe e grattugiata è stata riscontrata la presenza di idroperossidi a dieni coniugati (HP), intermedi primari della perossidazione dei PUFA, responsabili di effetti biologici dannosi (9, 10). Elevati livelli di HP nell'intestino possono indurre disfunzioni negli enterociti e patologie nel tratto digestivo (9). Il processo ossidativo a carico degli acidi grassi insaturi nella bottarga è risultato correlato alla presenza di un elevato livello di acidi grassi

liberi, dovuti alle procedure di salagione ed essiccazione, allo stato fisico (in bafra o macinata) e alla modalità di conservazione (5-7). Inoltre durante la lavorazione e conservazione, la bottarga è soggetta al fenomeno dell'imbrunimento (imbrunimento non enzimatico) in grado di alterarne le proprietà nutrizionali e la salubrità (11). In questo lavoro abbiamo valutato l'andamento della degradazione ossidativa dei componenti lipidici (acidi grassi e colesterolo) in campioni di bottarga macinata durante 7 mesi a diverse modalità di conservazione (-20°C, 2-3°C, temperatura ambiente con esposizione luce/buio). Lo stato ossidativo è stato monitorato attraverso la determinazione dei livelli di HP e malonildialdeide (MDA). È stata quindi valutata la vitalità cellulare, la composizione lipidica e il grado di ossidazione in monostrati di cellule epiteliali intestinali Caco-2 dopo incubazione, per 6-48 ore, in presenza di estratti lipidici ed idrofilici ottenuti dai campioni di bottarga conservati a -20°C e a temperatura ambiente/luce, con diverso grado di imbrunimento ed ossidazione, per una valutazione di un eventuale effetto tossico in relazione alla conservazione e per una preliminare determinazione dell'assorbimento degli n-3 PUFA della bottarga e dell'effetto sul profilo lipidico in cellule intestinali.

Materiali e metodi

Campioni e modalità di conservazione

È stato utilizzato un campione commerciale di bottarga di muggine (*Mugil sp.*) grattugiata, prodotta in Sardegna. Gli ingredienti riportati sull'etichetta erano: uova di muggine e sale. Il campione (Ctrl) è stato immediatamente sottoposto all'estrazione e analisi della frazione lipidica e idrofilica. Dopo ripartizione in bottigliette di vetro, ben chiuse, i campioni sono stati sottoposti, per 7 mesi, a diverse modalità di conservazione (-20°C, 2-3°C, temperatura ambiente con esposizione luce/buio). Aliquote dei campioni sono state prelevate a diversi tempi (1, 2, 3, 5 e 7 mesi) per le analisi sulle frazioni lipidica e idrofilica e i test in colture cellulari. Il processo di imbrunimento è stato determinato attraverso osservazione fotografica digitale.

Colture cellulari

Le cellule Caco-2, acquistate dalla ECACC, sono state coltivate in fiasche di coltura T-75 in 20 ml di terreno MEM contenente 10% di siero fetale bovino, 1% di aminoacidi non essenziali, L-glutamina 2 mM, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml). Le subcolture sono state preparate 2 volte alla settimana staccando le

cellule con 1% di tripsina-EDTA. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C, in un'atmosfera al 5% di CO₂.

Preparazione degli estratti lipidici e idrofilici dai campioni di bottarga

Dai campioni di bottarga (60 mg) sono stati estratti i lipidi totali mediante l'utilizzo della miscela cloroformio/MeOH (2/1, v/v) (12). Dopo addizione di H₂O e centrifugazione, è stato separato l'estratto lipofilico cloroformico dalla frazione MeOH/H₂O (estratto idrofilico). Dalla fase cloroformica sono state prelevate aliquote per le analisi dei componenti lipidici. I lipidi totali sono stati quantificati con il metodo di Chiang (13). La frazione MeOH/H₂O è stata utilizzata per l'analisi dell'MDA.

Test sulle colture cellulari

Gli estratti idrofilici e lipofilici di bottarga (da campioni conservati circa 1 mese a -20°C e 5-7 mesi a temperatura ambiente/luce) sono stati testati sulle cellule Caco-2 per la valutazione della citotossicità e della modulazione del profilo lipidico. Le cellule, seminate in piastre da 24 pozzetti (densità di 10⁵ cellule/ml) per la citotossicità e in capsule Petri (10⁶ cells/10 ml) per l'analisi dei lipidi, sono state mantenute in coltura e fatte crescere e differenziare per 21 giorni.

Dopo l'eliminazione del terreno, i monostrati sono stati lavati e al terreno di crescita completo sono state aggiunte aliquote degli estratti lipofilici in EtOH (0.2-1 mg/ml per la citotossicità e 100 µg/ml per i lipidi, utilizzando EtOH come controllo sulle cellule) e idrofilici (aliquote in soluzione acquosa, corrispondenti a 0.1-4 ml di estratto MeOH/H₂O ottenuto da 60 mg di bottarga per la citotossicità e 100 µl/ml per i lipidi). Dopo 24 ore di incubazione, è stato effettuato il test di vitalità cellulare Alamarblue (14) e si è proceduto all'estrazione dei componenti lipidici dai pellet cellulari (12).

Analisi di colesterolo, acidi grassi, HP e MDA

La separazione del colesterolo, degli acidi grassi e degli HP è stata effettuata mediante blanda saponificazione dell'estratto cloroformico ottenuto dai pellet cellulari e dai campioni di bottarga (6). Una aliquota degli acidi grassi liberi è stata utilizzata per la preparazione degli esteri metilici (6, 15). L'analisi degli acidi grassi insaturi, del colesterolo e degli HP è stata eseguita in un sistema DAD-HPLC 1100 Agilent Technologies. La determinazione della concentrazione di MDA è stata effettuata mediante lettura in HPLC dell'addotto MDA-TBA (16).

Figura 1 - Valori degli acidi grassi 20:5n-3 (EPA) (A) e 22:6n-3 (DHA) (B) e del colesterolo (C) (espressi come mg/g di porzione edibile) misurati nel campione di controllo (Ctrl) e nei campioni di bottarga a diverse modalità di conservazione (-20°C, 2-3°C, temperatura ambiente/buio e temperatura ambiente/luce) per 1-7 mesi. a = p<0.001; b = p<0.01; c = p<0.05 verso il controllo; (n = 3)

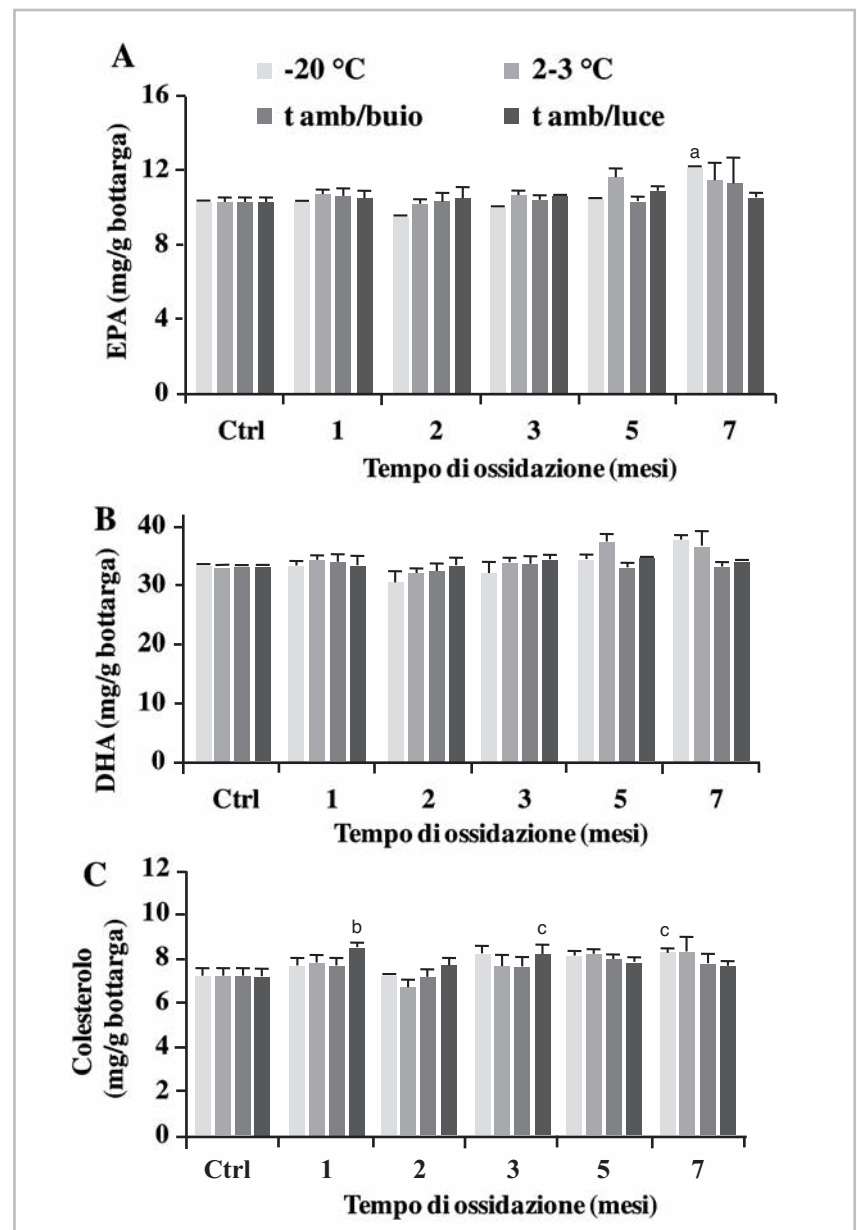
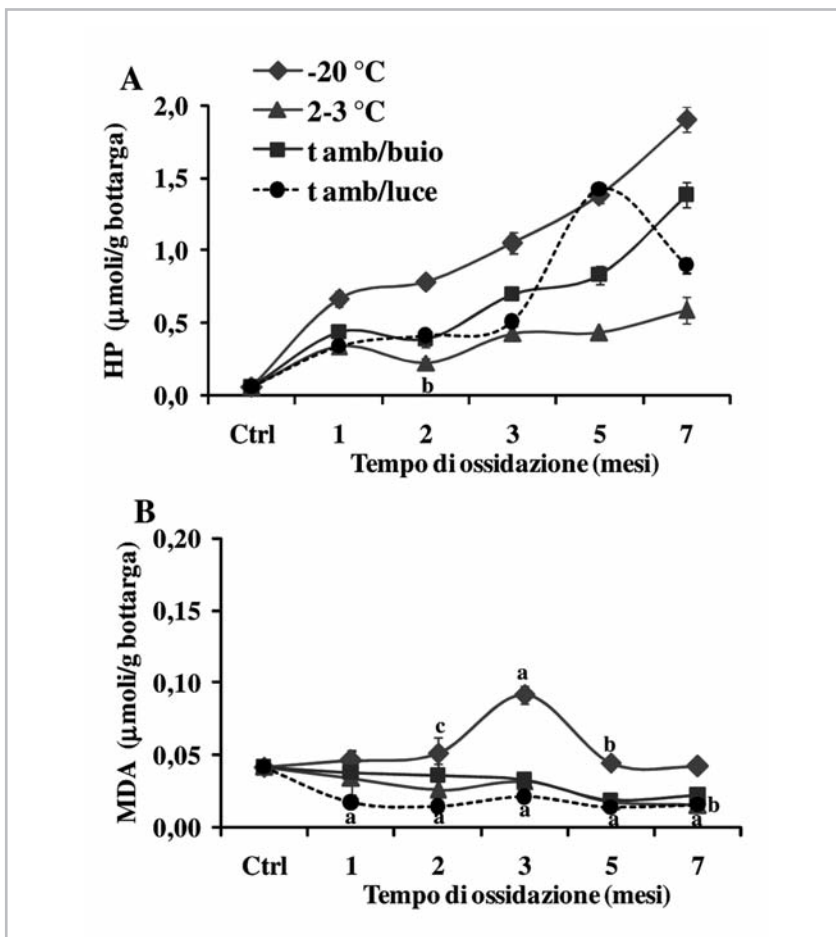


Figura 2 - Valori degli idroperossidi a dieni coniugati degli acidi grassi (HP) (A) e della malonildialdeide (MDA) (B) (espressi come $\mu\text{moli/g}$ di porzione edibile) misurati nel campione di controllo (Ctrl) e nei campioni di bottarga a diverse modalità di conservazione (-20°C , $2-3^\circ\text{C}$, temperatura ambiente/buio e temperatura ambiente/luce) per 1-7 mesi. a = $p < 0.001$; b = $p < 0.01$; c = $p < 0.05$ verso il controllo; per tutti i valori degli HP non indicati, $p < 0.001$ verso il controllo; (n = 3)



L'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi è stata effettuata tramite un gascromatografo Hewlett-Packard HP-6890 dotato di rilevatore a ionizzazione di fiamma (6).

Analisi statistiche

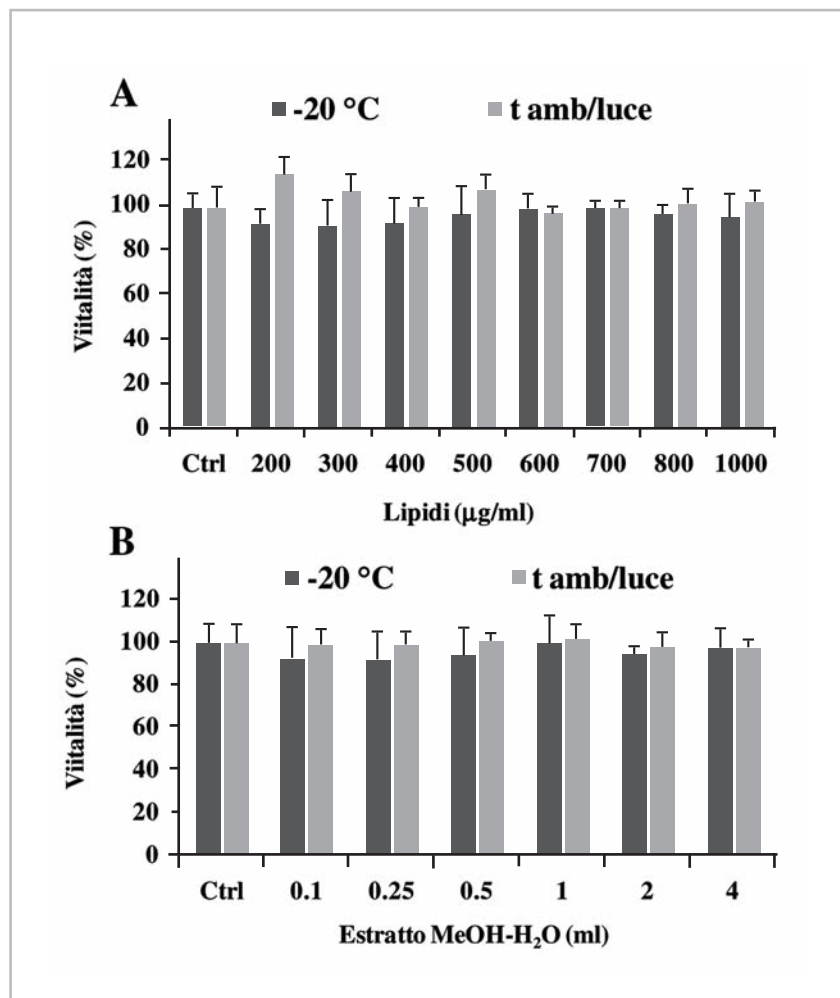
Per evidenziare la significatività fra le medie dei diversi gruppi è stata effettuata l'analisi "one-way-ANOVA" della varianza mediante

il programma GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, USA).

Risultati e discussione

Dal campione di bottarga grattugiata, appena preparata, è stata effettuata l'estrazione dei componenti lipidici e si è proceduto alla valutazione del tenore in lipidi totali (280 mg/g di porzione edibile), colesterolo (7.4 mg/g) ed acidi grassi; tra i più abbondanti: 16:1 n-7 (19% del totale, 35 mg/g di porzione edibile), DHA (18%, 34 mg/g), 18:1 n-9, 16:0, EPA (7%, 11 mg/g) seguiti dal 18:1 n-7 e 22:5 n-3. La conservazione (7 mesi) della bottarga non ha indotto evidenti modifiche nei livelli degli acidi grassi n-3 EPA (Fig. 1A) e DHA (Fig. 1B) e del colesterolo (Fig. 1C) a tutte le modalità di conservazione. La maggiore resistenza alla degradazione degli n-3 PUFA nella bottarga durante la conservazione, rispetto agli oli di pesce, è dovuta al fatto che una porzione elevata di questi acidi grassi si trova esterificata nelle cere, che mostrano una minore suscettibilità ossidativa (8). In tutti i campioni, nel corso dei 7 mesi, è stato osservato un significativo aumento dei livelli di HP, con una cinetica di formazione differente a seconda della modalità di conservazione (Fig. 2A). Nel campione

Figura 3 - Vitalità (espressa come % del controllo) misurata nelle cellule epiteliali Caco-2 (metodica alamarblue) dopo incubazione per 24 ore in presenza degli estratti lipofili e idrofilici ottenuti dai campioni di bottarga conservati a -20°C e a temperatura ambiente/luce; (n = 6)

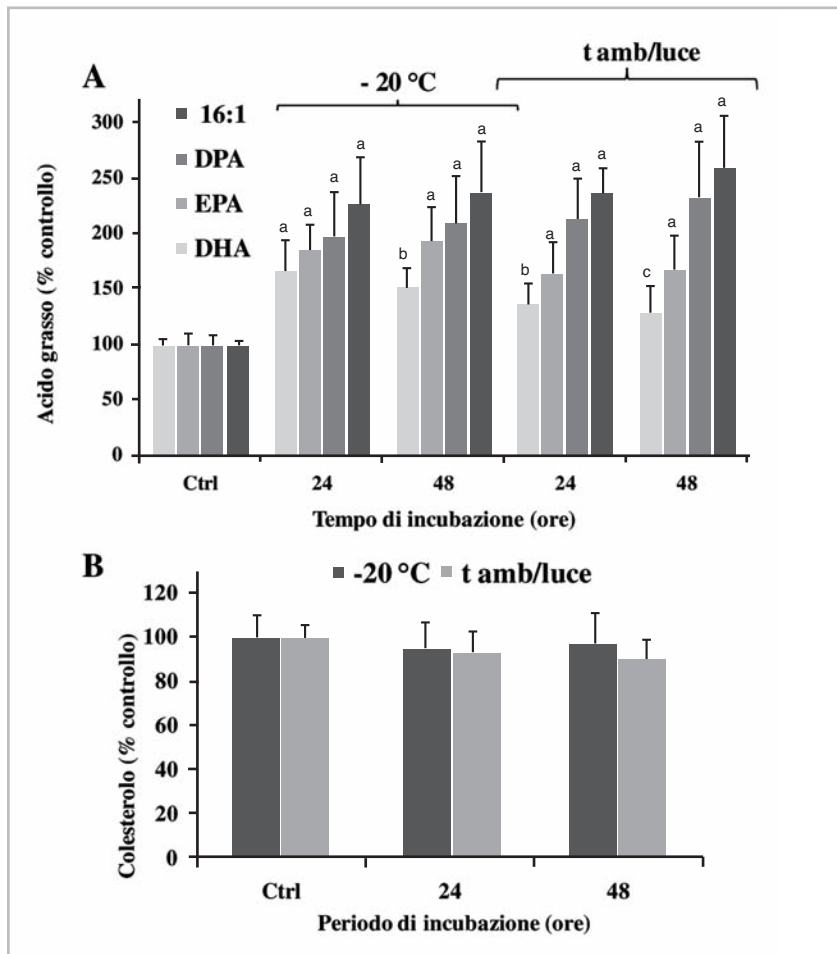


conservato a -20°C è stato osservato un incremento lineare degli HP che raggiungono dei valori più elevati rispetto a quelli misurati alle altre condizioni di conservazione, mentre nel campione a $2-3^{\circ}\text{C}$ è stato osservato l'incremento più

ridotto. La conservazione a -20°C ha preservato però la bottarga dal fenomeno dell'imbrunimento. Nel campione a $2-3^{\circ}\text{C}$ è stato evidenziato, verso i 7 mesi, un certo imbrunimento rispetto al controllo, decisamente inferiore rispetto a

quello osservato, fin dal 1 mese, nei campioni a temperatura ambiente. Nelle uova di muggine il fenomeno dell'imbrunimento (imbrunimento protein-lipide) è strettamente correlato all'interazione dei composti carbonilici, provenienti dalla degradazione degli idroperossidi lipidici, con proteine, amine, aminoacidi; durante la lavorazione delle uova aumenta il livello di aminoacidi liberi con elevato grado d'imbrunimento (11). Dai dati ottenuti, la temperatura di conservazione è risultata il fattore determinante in grado di influenzare le cinetiche di formazione/degradazione e quindi la stabilità degli idroperossidi e il fenomeno di imbrunimento. Nei campioni sono stati misurati dei livelli bassi di MDA (Fig. 2B), rispetto ai valori degli HP, dipendenti probabilmente da uno stato ossidativo non avanzato o da un diretto coinvolgimento dell'aldeide nel fenomeno d'imbrunimento. Gli HP sono responsabili di una serie di effetti biologici dannosi, come citotossicità, induzione di apoptosi e danno di membrana (9, 10); elevati livelli di HP nell'intestino possono indurre patologie nel tratto digestivo come infiammazione e tumore al colon (9). Inoltre il processo di imbrunimento, oltre a modificare l'aspetto dell'alimento, ne influenza il sapore, il valore nutrizionale e la salubrità (11). Molti metaboliti a basso peso

Figura 4 - Valori degli acidi grassi 16:1, 20:5n-3 (EPA), 22:5n-3 (DPA), 22:6n-3 (DHA) (A) e del colesterolo (B) (espressi come % del controllo) misurati nelle cellule Caco-2 dopo incubazione, per 24 e 48 ore, in presenza degli estratti lipidici ottenuti dai campioni di bottarga conservati a -20°C e a temperatura ambiente/luce. a = $p < 0.001$; b = $p < 0.01$; c = $p < 0.05$ verso il controllo; (n = 8)



molecolare, che si liberano in seguito a processi degradativi (aminoacidi da proteolisi, acidi organici, colina, amine biogene, trimetilamina), sono solubili in H_2O (17). È stato quindi valutato

l'effetto degli estratti lipofilici ed idrofilici, ottenuti dalla bottarga conservata per poco tempo a -20°C (basso livello HP e colore ambrato) e a temperatura ambiente/luce (colore scuro, HP più ele-

vati), sulla vitalità cellulare in monostrati di cellule epiteliali Caco-2, modello ampiamente utilizzato per studi di assorbimento, metabolismo e tossicità intestinale (9). Tutti gli estratti testati non hanno indotto alcun effetto tossico sulla vitalità cellulare (Fig. 3). Le cellule epiteliali sono state quindi incubate (6-48 ore) con concentrazioni non citotossiche della frazione lipidica e idrofila della bottarga. In Fig. 4A sono riportati i valori di 16:1, EPA, 22:5n-3 (DPA) e DHA misurati nelle cellule Caco-2 dopo incubazione, per 24 e 48 ore, in presenza degli estratti lipidici ottenuti dai campioni di bottarga conservati a -20°C e a temperatura ambiente/luce. Entrambi gli estratti sono risultati in grado di indurre dei cambiamenti significativi nella composizione in acidi grassi, con un selettivo aumento nei livelli cellulari di EPA, DHA, 22:5, mentre non è stata osservata alcuna variazione nei livelli cellulari di 18:1, 20:3n-9 e 20:4; inoltre le cellule incubate con l'estratto lipidico (olio) di bottarga non hanno mostrato un maggiore accumulo di colesterolo rispetto alle cellule di controllo (Fig. 4B). Nelle cellule trattate è stato riscontrato un aumento dei livelli di HP, che è risultato correlato al valore iniziale nell'estratto utilizzato, ma non in grado di indurre alcuna tossicità sulle cellule epiteliali intestinali. Gli estratti idrofilici non hanno

indotto alcuna modifica nel profilo lipidico cellulare, con valori di acidi grassi, colesterolo e HP identici al controllo. Dai dati ottenuti la bottarga di muggine si qualifica come una importante fonte naturale, biodisponibile, di n-3 PUFA, che per la struttura in cui sono presenti (cere solide), risultano più stabili ai fenomeni ossidativi. Una adeguata preparazione e conservazione sono necessarie per preservare le proprietà nutrizionali di questo alimento tradizionale della Sardegna.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dalla Fondazione Banco di Sardegna. Si ringrazia l'azienda "Stefano Rocca s.r.l." per aver fornito i campioni.

Bibliografia

- Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 668-79.
- Beelen VA, Roeleveld J, Mooibroek H, et al. A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 716-24.
- Boran G, Karaçam H, Boran M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chem* 2006; 98: 693-8.
- Baron CP, Kjørsgård IVH, Jessen F, Jacobsen C. Protein and lipid oxidation during frozen storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Agric Food Chem* 2007; 55: 8118-25.
- Scano P, Rosa A, Cesare Marincola F, et al. ¹³C NMR, GC and HPLC characterization of lipid components of the salted and dried mullet (*Mugil cephalus*) roe bottarga. *Chem Phys Lipids* 2008; 151: 69-76.
- Rosa A, Scano P, Melis MP, Deiana M, Atzeri A, Dessì MA. Oxidative stability of lipid components of mullet (*Mugil cephalus*) roe and its product "bottarga". *Food Chem* 2009; 115: 891-6.
- Rosa A, Scano P, Melis MP, et al. Studio della componente lipidica della bottarga di muggine mediante l'utilizzo di diverse tecniche analitiche. *Ingredienti Alimentari* 2010; 2: 17-23.
- Gorreta F, Bernasconi R, Galliani G, Salmona M, Tacconi MT, Bianchi R. Wax esters of n-3 polyunsaturated fatty acids: a new stable formulation as a potential food supplement. 1 - Digestion and absorption in rats. *Lebenson Wiss Technol* 2002; 35: 458-65.
- Wijeratne SSK, Cuppett SLJ. Lipid hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4476-81.
- Kanner J. Dietary advanced lipid oxidation induced endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1094-101.
- Doe PE, Sikorski Z, Haard N, Olley J, Sun Pan B. Basic Principles. In Doe P E: *Fish Drying & Smoking: Production and Quality*. Lancaster: Technomic Publishing Company, Inc, 1998: 13-45.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- Chiang SD, Gessert CF, Lowry OH. Colorimetric determination of extracted lipids. An adaptation for microgram amounts of lipids obtained from cerumen. *Curr List Med Lit Res Rep* 1957; 33: 56-113.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5421-6.
- Christie WW. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In Christie WW: *Advantage in lipid methodology - Two*. Dundee: The Oily Press, 1993: 69-111.
- Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 946-51.
- Mannina L, Sobolev AP, Capitani D, et al. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta* 2008; 77: 433-44.