

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI AGRARIA
DIPARTIMENTO DI ORTO-FLORO-ARBORICOLTURA E TECNOLOGIE ALIMENTARI (DISPA)

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

XXV CICLO

Giuseppina Rosaria Antonella Alberio

**Indagini analitiche ed enzimatiche per la
valutazione di qualità del pesce locale giornaliero
del Mediterraneo**

DISSERTAZIONE FINALE

Tutor:

Prof. Giovanni Spagna

Coordinatore:

Prof. Giovanni Spagna

TRIENNIO 2009-2012

INDICE	pag.2
1. SCOPO DEL LAVORO E ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA	pag.3
2 INTRODUZIONE	pag.5
3. STATO DELL'ARTE	pag.8
3.1 Pesce freschissimo locale giornaliero del Mediterraneo (SLD)	pag.8
3.2 Alterazioni enzimatiche del pesce freschissimo locale giornaliero (SLD)	pag.17
3.2.1 Enzimi proteolitici: calpaine e catepsine	pag.18
3.2.2 Trattamenti tecnologici degli enzimi proteolitici	pag.25
3.2.3 Enzimi lisosomiali: α -glucosidasi	pag.30
3.2.4 Trattamenti tecnologici degli enzimi lisosomiali	pag.31
3.2.5 Enzimi ossidativi: polifenolossidasi	pag.33
3.2.6 Trattamenti tecnologici della melanososi	pag.38
4 .LAVORI PUBBLICATI E IN CORSO DI STAMPA	pag.52
BIBLIOGRAFIA	pag.94

1. SCOPO DEL LAVORO E ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA

Nel presente lavoro sono state oggetto di studio le varietà di pesci che popolano il Mar Mediterraneo ed il Golfo di Sicilia e che costituiscono una risorsa inestimabile per il nostro Paese sia sotto il profilo nutrizionale che quello economico. Il consumo inoltre del prodotto non cotti, recente innovazione della cucina italiana mediata da quella dei popoli orientali, sta rivoluzionando negli ultimi anni il mercato ittico. Ciò se da un lato ha creato grandi opportunità nel settore, dall'altro ha posto problemi non irrilevanti circa la necessità di mantenere il pescato il più possibile integro e sicuro per il consumatore. Numerose sono infatti le alterazioni a cui va incontro il pesce appena pescato (rottura di strutture cellulari, flora microbica, microrganismi, idrolisi della sostanza proteiche strutturali lipidiche e fosfolipidi che) a cui si aggiunge l'effetto negativo degli enzimi proteolitici (calpaine e catpsine) la cui struttura e meccanismo d'azione è notevolmente complesso nonché quello degli enzimi lisosomiali e degli enzimi ossidativi che danno origine alla melanososi (tirosinasi).

La ricerca da me svolta fornisce come premessa un'esposizione ragionata dello stato dell'arte relativo ai diversi trattamenti tecnologici in grado di influenzare l'attività degli enzimi proteolitici che aggrediscono il pescato (alte pressioni, irradiazioni, uso di cistatine) degli enzimi lisosomiali (congelamento) e degli enzimi ossidativi (agenti riducenti, agenti solfitanti, acido ascorbico, acidificanti, chelanti, EDTA, fosfati, acido Kojco) e dei rispettivi pesci a cui finora tali tecnologie sono state applicate. L'obiettivo specifico è stato invece l'analisi delle seguenti problematiche :

- Studiare l'aspetto qualitativo e nutrizionale di specie di pesce azzurro di piccola taglia come sardine (*S. Pilchardus*) e alici (*E. Engrasilocus*)
- Studiare i principali indici di freschezza di sardine (*S. Pilchardus*) e alici (*E. Engrasilocus*)
- Stabilire una correlazione tra tecniche di cattura artigianali utilizzate nel Golfo di Catania e freschezza di sardine (*S. Pilchardus*) e alici (*E. Engrasilocus*)
- Analizzare tecniche tradizionali e innovative per differenziare il pesce fresco dal congelato e smacherare frodi commerciali.
- Proporre specie alternative di mercato di crostacei (*Parapeneus Longirostris*) per la realizzazione di prodotti pronti all'uso.
- Fornire una guida normativa di riferimento del settore ittico per tutelare e orientare l'imprenditore ittico e il consumatore nella seguente materia

Nell'ambito delle tematiche analizzate sono state realizzate varie pubblicazioni e nove lavori di tesi, congressi e seminari che verranno approfonditi nell'ultima parte di questo lavoro. Inoltre è stato realizzato un lavoro sull'uva di IV gamma di Mazzarone in fase di pubblicazione.

A latere è stato pubblicato il testo d'esercizi i Operazioni Unitarie.

2. INTRODUZIONE

Il Mediterraneo rappresenta uno dei mari più ricchi al mondo per la presenza di milioni di specie di pesci tra ossei e cartilaginei che rispondono pienamente alle attuali tendenze nutrizionali. Negli ultimi anni infatti si è sempre più evidenziata l'importanza economica, commerciale e nutrizionale del consumo di pesce fresco appena pescato il SLD ("seafood local daily") reperibile quotidianamente nei mercati ittici del territorio e commercializzati sotto forma di prodotti minimamente trasformati. Nel Golfo di Catania i principali SLD sono rappresentate da specie di pesce azzurro di piccola taglia come sardine (*S. Pilchardus*) e alici (*E. Engrasilocus*) e da una particolare tipologia di crostacei rappresentata dalle specie di gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*). Questi prodotti presentano per quanto riguarda l'aspetto economico, nutrizionale e commerciale caratteristiche importanti. Il pesce azzurro (alici e sardine) è caratterizzato da una composizione in grassi ricca di composti insaturi ($\omega 3$ - $\omega 6$) capaci di migliorare la fluidità del sangue e prevenire malattie cardiovascolari (Albert et al. 1998; Alberio et al. 2012). Tale composizione nutrizionale è influenzata dalle condizioni dell'ecosistema marino (salinità del mare 38-39%; temperature medie comprese tra i 12-24°C), dal periodo (inverno ed estate) e dalla modalità di cattura artigianali. Quest'ultima viene effettuata con reti da circuizione (il cianciolo) tramite l'impiego di fonti luminose (lampare) conferiscono alla carne di tali specie caratteristiche qualitative peculiari. Infatti, una volta catturate, queste specie subiscono una morte per decapitazione dovuta al continuo tentativo fatto di scappare che si traduce , in fase di post-mortem, in livelli ematici elevati che conferiscono alla muscolatura della specie caratteristiche

sensoriali e qualitative pregiate (Alberio et al. 2012). Per quanto riguarda la specie di gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*) essa presenta dal punto di vista nutrizionale, le medesime caratteristiche ad eccezione dell'elevato contenuto di colesterolo che si trova per lo più nella parte non edibile (il pereion). La cattura e il periodo di cattura con reti da circuizione permette una reperibilità giornaliera di tale prodotto sia al consumatore diretto, sia che alla trasformazione che ha come scopo la creazione di prodotti innovativi minimamente processati. La normativa di riferimento dei *SLD* è molto complessa (Sciacca et al.2011) e mira a tutelare gli elementi fondamentali che influenzano la scelta del consumatore. Tali prodotti ittici, infatti, essendo consumati freschi, vanno incontro a diverse problematiche quali traumi fisici che determinano l'instaurarsi di flore microbiche sulla cute, branchie ed intestino dovute a microrganismi (Jiang et al. 1990, Koohmaraie M., 1996 , Koutsoumanis, Nychas, 1999). Tali microrganismi scompare le difese naturali del pesce e risolto il rigor mortis, sono in grado di moltiplicarsi attivamente ed invadere i tessuti con la possibilità di rilasciare enzimi proteolitici (calpaine) e autocatalitici (Aoki et al, 1997). Queste alterazioni, catalizzate da enzimi, causano un rapido decadimento della qualità sensoriale e nutrizionale dei prodotti che inevitabilmente si traduce in una riduzione della shelf-life degli stessi. Tali alterazioni risultano maggiori in seguito a frodi commerciali e si traducono nell'abbassamento del pH (da 7.0 a 6.2), dovuto all'accumulo di acido lattico e alla presenza di ioni H⁺ derivanti dall'idrolisi dell'ATP che fa sì che gli enzimi catalizzino le reazioni di alterazione menzionate (Chéret et al. 2005). Un altro problema a cui questi pesci vanno incontro è l'idrolisi delle sostanze proteiche strutturali, lipidiche e fosfo-lipidiche e la loro successiva ossidazione, con enzimi della via della lipossigenasi (LOX) e in alcuni casi attraverso la polifenolossidasi (PPO), il cui risultato finale è

l'alterazione di colore, lo sviluppo di off-flavours, la perdita di consistenza, che rendono il pesce non appetibile dal punto di vista sensoriale. Infine uno dei principali problemi a cui vanno incontro i crostacei è la melanosi in correlazione alle diverse fasi di intermuta.

3. STATO DELL'ARTE

3.1 Pesce Freschissimo Locale Giornaliero Del Mediterraneo (*Sld*)

Nel Golfo di Catania i principali *SLD* sono rappresentate da specie di pesce azzurro di piccola taglia come sardine (*S. Pilchardus*) e alici (*E. Engrasilocus*) e da una particolare tipologia di crostacei rappresentata dalle specie di gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*). Questi prodotti presentano per quanto riguarda l'aspetto biochimico, nutrizionale e commerciale caratteristiche importanti.

Pesce Azzurro Locale Giornaliero (SLD): L'alice (*E. Engrasilocus*) e Sardina (*Sardina Pilchardus*) sono pesci azzurri che presentano una colorazione dorsale tra il blu scuro e il verde-blu, mentre il ventre tende a presentarsi di colore argenteo. Essi mostrano dal punto di vista anatomico un endoscheletro osseo che consiste essenzialmente in un cranio (provvisto di mascelle in cui si trovano i denti), una colonna vertebrale, costole e ossa di varie forme che sostengono le pinne. La contrazione alternata dei muscoli situati lateralmente alla colonna vertebrale permette la locomozione dei pesci azzurri. I vari muscoli dei pesci azzurri sono composti da segmenti detti miomeri, costituiti da due tipi di fibre muscolari: fibra rossa e fibra bianca (**Fig.1**). La fibra rossa è altamente vascolarizzata ed è ricca di mioglobina e mitocondri, e di conseguenza si adatta a lavorare in condizioni anaerobiche, con contrazioni lente che permettono di sopportare bene la fatica. Al contrario, la fibra bianca non presenta questi caratteri e si presta meglio a delle condizioni anaerobiche e a contrazioni più rapide ma con poca resistenza alla fatica. I rapporti tra le

due fibre sono differenti tra i vari generi di pesci e quindi per effetto dell'evoluzione dal relativo habitat e stile di vita. La muscolatura è composta dal tessuto muscolare scheletrico o striato. Le fibrocellule o fibre muscolari che compongono tale tessuto sono elementi cellulari lunghi, sottili e polinucleati; ogni nucleo è posto appena al di sotto del sarcolemma, cioè della membrana cellulare della fibra muscolare.

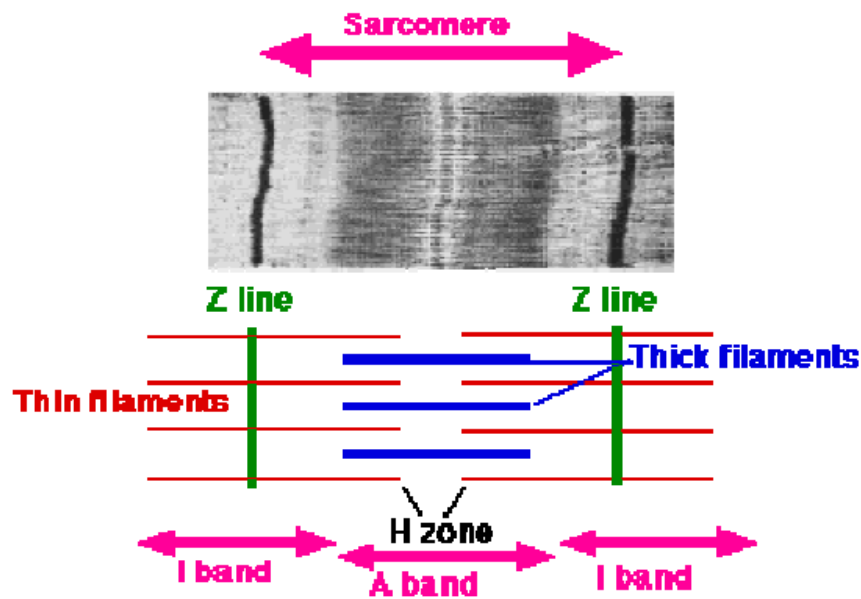


Fig. 1 Immagine di un sarcomero al microscopio elettronico a trasmissione, sotto, rappresentazione schematica del sarcomero

Nel sarcoplasma sono presenti un centinaio di miofibrille, disposte parallelamente tra di loro; sono anche presenti numerosi apparati di Golgi e mitocondri, e un reticolo endoplasmatico liscio molto sviluppato denominato reticolo sarcoplasmatico, la cui funzione è quella di rappresentare un deposito di ioni calcio, necessari per permettere la contrazione (Cabras et al. 2004). Ogni miofibrilla è composta da filamenti spessi e filamenti sottili associati tra di loro. I filamenti spessi sono costituiti da miosina, una proteina costituita da una “testa” globosa ed una

“coda” filamentosa. Le varie molecole di miosina si aggregano tra di loro formando un filamento spesso che si dispone con le code rivolte verso il centro e le teste verso l'estremità e che sporge verso l'esterno costituendo i ponti trasversali. I filamenti sottili sono composti dall'actina, una proteina globulare che polimerizza formando dei filamenti più sottili e più chiari rispetto a quelli della miosina: da qui la denominazione di “muscolatura striata”. L'unità contrattile della miofibrilla è il sarcomero. Il sarcomero si presenta come un'alternanza di bande chiare e bande scure ed è delimitato alle estremità da due linee scure dette linee z; ai lati delle linee z si trovano le bande I, costituite dai filamenti di actina. Spostandosi ancora verso l'interno si osserva una banda scura denominata banda A composta da filamenti di actina e miosina annessi interposti tra di loro. Al centro della banda A vi è una banda più piccola detta banda H, al cui centro si trova (ma è possibile osservarla in determinate condizioni) una linea scura chiamata linea M costituita da proteine che permettono l'interconnessione dei filamenti di miosina .

Inoltre l'alice (*E. Engrasilocus*) e sardina (*Sardina Pilchardus*) sono specie pelagiche del Mar Mediterraneo. In particolare l'alice (*E. Engrasilocus*) è un pesce pelagico che appartiene all'ordine dei clupeiformi, famiglia *Engraulidae*. Questo pesce azzurro è particolarmente presente intorno alle coste siciliane (**Fig. 2**). Si caratterizza per un muso appuntito, mascella corta, striatura argentea lungo i fianchi, colorazione del blu scuro del dorso; la lunghezza massima è di 20 cm, mentre la lunghezza media è di 13.5; l'età massima riscontrata è di 3 anni. L'alice vive durante il periodo riproduttivo (aprile-settembre) in prossimità delle coste, attirata anche dal plancton di cui si nutre, la tendenza a formare ampi banchi; tollera salinità di 5-41 ppt, quindi ampie differenze di concentrazione di sale, e per questo motivo si può rinvenire anche in lagune, stagni salmastri ed estuari. Tende

a spostarsi, in particolare, verso il nord e in superficie in estate, mentre si ritira e si sposta in acque più profonde in inverno. Nel Mediterraneo è particolarmente diffusa nel canale di Sicilia, nel golfo di Genova e nell'Adriatico. La composizione chimica delle carni di alici fresche presenta una parte edibile del 75%, di cui acqua per il 76.5%, proteine 16.8%, lipidi 2.6%, carboidrati disponibili 1.5%; il contenuto in Sali minerali e vitamine è il seguente (su 100 g di prodotto considerato): 278 mg di K, 2.8 mg di Fe, 148 mg di Ca, 196 mg di P, 0.06 mg di tiamina, 0.26 mg di riboflavina, 14.0 di niacina, 32 µg di retinolo. L'apporto energetico di 100 g di prodotto è di 403 kJ (96 kcal) (Cappelli e Vannucchi, 2000).



Fig. 2- Alice E. Engrasilocus

In Sicilia, l'acciuga è nota, con diversi termini dialettali, come: "anciova", derivante dal catalano "anxova", denominazione dialettale ampiamente diffusa in tutta la Sicilia, e in modo particolare nella provincia di Palermo; "masculinu" a Siracusa o "masculina da magghia" nella provincia di Catania, in seguito al metodo di cattura, legato al fatto che le acciughe rimangono incastrate nelle maglie delle reti da pesca (denominate nel catanese "reti menaidi"), con la conseguenza che il pesce va incontro a dissanguamento, che migliora la qualità della carne stessa; "ancidda", sempre nel catanese; "corinedda" a Trapani.

Infine la Sardina (*Sardina Pilchardus*) è un pesce pelagico appartenente all'ordine dei Clupeiformi, famiglia *Clupeidae*, particolarmente rinvenibile in prossimità delle coste siciliane. La sardina presenta un corpo subcilindrico, pancia alquanto arrotondata che, nel caso di giovani esemplari, risulta più contenuta; la colorazione del corpo tipica dei pesci azzurri, è caratterizzata dal dorso grigio-azzurro con riflessi iridescenti, mentre il ventre è bianco-argenteo. Sul fianco, invece, è possibile osservare (difficilmente in vivo) una serie di macchie scure (**Fig. 3**). La sardina può raggiungere la lunghezza massima di 27.5 cm, con una media di 20 cm; l'età massima riscontrata è di 15 anni. La sardine è in genere una specie litorale ma, in particolare durante le stagioni calde, può anche allontanarsi parecchio dalle coste.



Fig. 3- Sardine (*Sardina Pilchardus*)

Vive formando ampi banchi in profondità che, di giorno, spaziano da 25 a 100 m mentre, di notte, da 10 a 35 m; l'alimentazione si basa prevalentemente su plancton; la riproduzione può avvenire in mare aperto o in prossimità della costa. La composizione chimica delle carni fresche della sardine prevede una parte edibile del 70%, di cui acqua per il 73.0%, proteine 20.8%, lipidi 4.5%, carboidrati disponibili 1.5%; il contenuto in sali minerali e vitamine è il seguente (su 100 g di prodotto considerato): 66 mg di Na, 630 mg di K, 1.8 mg di Fe, 33 mg di Ca, 215 mg di P, 0.02 mg di tiamina, 0.25 mg di riboflavina, 9.70 di niacina, 28 µg di retinolo.

L'apporto energetico di 100 g di prodotto è di 541 kJ (129 kcal) (Cappelli e et al. 2000). Le sardine vengono catturate mediante reti da circuizione, per poi essere commercializzate come pesce fresco (anche congelato) o trasformato, previa essiccamento, affumicamento, salagione, uppertizzazione. I nomi dialettali con cui è nota in Sicilia la *Sardina pilchardus* sono: sadda o sadduzza, in provincia di Messina; sarda, in provincia di Palermo.

Crostaceo Locale Giornaliero (SLD): Il Gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*) è un crostaceo caratterizzato dalla presenza di dieci arti (decapodi) e da una corazza dura, con funzioni di scheletro esterno diviso in due regioni (**Fig. 4**).

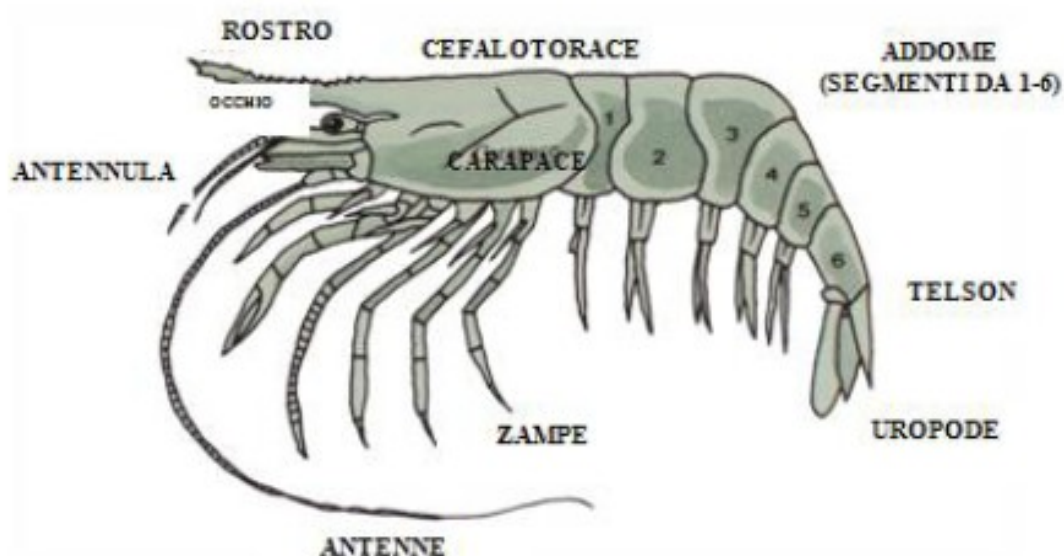


Fig. 4- Anatomia del crostaceo

Il Cefalotorace che comprende il Carpace, la parte più dura dell'animale, perché contiene molta chitina e si prolunga anteriormente nel Rostro. Il Rostro è un importante elemento per l'identificazione tassonomica dei gamberetti; le antenne, contenute nel Rostro, sono molto sensibili,

svolgono funzioni tattili e servono a coadiuvare il movimento e l'orientamento del crostaceo; la regione boccale è costituita da tre appendici mantibole, mascelle I e emascelle II; il Torace, infine, in cui sono annesse tre paia di massilli (i primi due servono a portare il cibo in bocca, il terzo paio serve per la deambulazione) e cinque paia di pereiopodi (svolgono funzioni di locomozione e presentano le chele importanti per la raccolta del cibo). L'addome comprende i segmenti addominali, i Pleopodi che hanno la funzione di ossigenare le uova nelle femmine, il Talson che è una parte terminale dei segmenti addominali in cui sono annessi gli Uropodi, strutture che formano una sorta di ventaglio caudale.

In particolare il gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*) appartiene alla famiglia delle Penaeide (**Fig. 5**). Essa una specie molto comune nel mar Mediterraneo e nell'Atlantico occidentale (dal Massachusetts alla Guyana francese) e orientale (dal Portogallo all'Angora).



Fig. 5- Gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*)

La sua presenza risulta molto più abbondante nel Canale di Sicilia, Tirreno centrale, nello Ionio. Vive sui fondali fangosi e sabbiosi a profondità piuttosto elevate (180-450 metri) anche se oltre i 400 metri diventa poco

frequente. Le dimensioni medie del gambero rosa sono 15-20 cm. (Falciai L. et al., 1992)

Presenta un corpo compresso lateralmente, di colore rosa-arancio tendente al rosso- violaceo sul carpace. Nelle femmine la colorazione delle gonadi varia dal bianco al verde in funzione dello stadio di maturità sessuale. Questa specie presenta dimorfismo sessuale e le femmine sono più grandi dei maschi. Il corpo è costituito da Cefalotorace con il carpace caratterizzata da tredici paia di appendici; a livello della regione gastrica è presente un caratteristico dente che permette di distinguere facilmente il gambero rosa dagli altri Peneidi. La superficie esterna del gambero è liscia e priva di setole. Il rostro presenta una parte convessa provvista di sette denti e con la punta concava leggermente rivolta in alto; la forma e la dentatura del rostro è un'altra caratteristica che distingue la specie da altri Peneidi. Il telson presenta un solco mediano dorsale ristretto con tre denti fissi; gli occhi sono pedunculati e privi di tubercoli. L'addome (parte posteriore) è composto da sei segmenti; la deposizione delle uova si verifica nel periodo che va da Agosto-Settembre da parte delle le femmine che raggiungono la piena maturità sessuale tra l'autunno e l'inverno. Nel mar Mediterraneo la specie raggiunge la maturità sessuale entro il primo anno di età. (Falciai L. et al., 1992). Il gambero rosa rappresenta la voce di mercato di maggior rilievo per alcune marinerie italiane ed in particolare per quelle della Sicilia nord occidentale (Porticello, Terrasini, Trapani) e di altre ubicate lungo la fascia sud della Sicilia (Sciacca, Licata, Mazara del Vallo, Portopalo di Capo Passero); è una specie molto apprezzata per la bontà delle sue carni. Nel dialetto siciliano viene comunemente chiamato "Ammiru biancu". Viene catturato quasi esclusivamente con reti a strascico su fondali sabbio-fangosi ad una profondità tra 50-500 metri (Fig.8). L'eccessivo sfruttamento di *Parapeneaus longirostris* nelle acque siciliane

già denunciato da Arena e Bombace (1970) e confermato da Arculeo et al. (1988) si è manifestato nella sensibile riduzione delle catture e nella modificazione della struttura di taglia. Una delle cause è proprio il prelievo eccessivo operato dalla pesca a strascico. (Arculeo M., 2003).

3.2 Alterazioni Enzimatiche Del Pesce Freschissimo Locale Giornaliero Del Mediterraneo (Sld)

Il *Pesce Freschissimo Locale Giornaliero (SLD)* essendo consumato fresco va incontro a diverse problematiche quali traumi fisici che determinano l'instaurarsi di flore microbiche sulla cute, branchie ed intestino dovute a microrganismi (Jiang et al. 1990, Koohmaraie M., 1996 , Koutsoumanis, Nychas, 1999). Tali microrganismi, scomparse le difese naturali del pesce e risolto il rigor mortis, sono in grado di moltiplicarsi attivamente ed invadere i tessuti con la possibilità di rilasciare enzimi proteolitici (calpaine) e autocatalitici (Aoki et al, 1997). Queste alterazioni, catalizzate da enzimi, causano un rapido decadimento della qualità sensoriale e nutrizionale dei prodotti che inevitabilmente si traduce in una riduzione della shelf-life degli stessi. Tali alterazioni si traducono nell'abbassamento del pH (da 7.0 a 6.2), dovuto all'accumulo di acido lattico e alla presenza di ioni H⁺ derivanti dall'idrolisi dell'ATP che fa sì che gli enzimi catalizzino le reazioni di alterazione menzionate (Chéret et al. 2005). Un altro problema a cui questi pesci vanno incontro è l'idrolisi delle sostanze proteiche strutturali, lipidiche e fosfo-lipidiche e la loro successiva ossidazione, con enzimi della via della lipossigenasi (LOX) e in alcuni casi attraverso la polifenolossidasi (PPO), il cui risultato finale è l'alterazione di colore, lo sviluppo di off-flavours, la perdita di consistenza, che rendono il pesce non appetibile dal punto di vista sensoriale.

Inoltre uno dei principali problemi a cui vanno incontro i crostacei è la melanosi in correlazione alle diverse fasi di intermuta. Infatti durante il periodo di intermuta, quando non vi è né calcificazione, né preparazione alla muta successiva, gli scambi di calcio tra gambero ed ambiente si

presentano in equilibrio elettrochimico. La reazione è catalizzata dall'enzima polifenol-ossidasi, conosciuto anche come fenolossidasi, fenolasi, monofenolo ossidasi, difenolo ossidasi e tirosinasi. La presenza dell'enzima nei crostacei non influenza però in maniera incisiva la qualità del prodotto finale e conseguentemente l'accettabilità da parte del consumatore. (Girardi M., 2008).

3.2.1 Enzimi Proteolitici: Calpaine e Catepsine

Per enzimi proteolitici o proteasi si intende una vasta gamma di enzimi appartenenti alle idrolasi che catalizzano l'idrolisi del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico di due amminoacidi adiacenti. Si parla di idrolisi poiché il meccanismo di reazione fa sì che la rottura del legame avviene per effetto di una molecola d'acqua (**Fig. 6**).

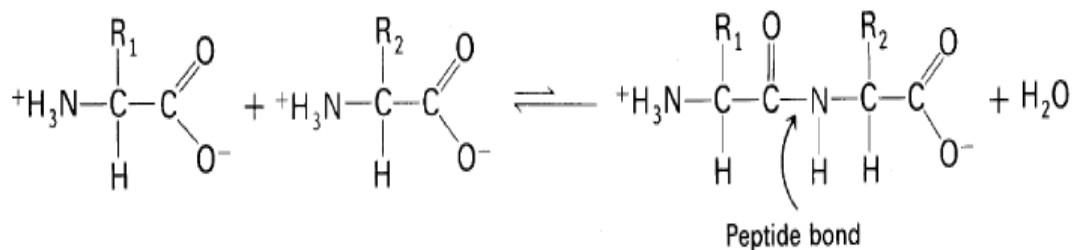


Fig. 6 Attività generale degli enzimi proteolitici

Generalmente, gli enzimi proteolitici sono presenti in tutti i tessuti, ma le distribuzioni dei vari enzimi e le relative attività variano in funzione di numerosi aspetti. In particolare, le maggiori attività si osservano nel tratto intestinale e nel fegato. Tuttavia non va trascurato anche il contenuto di questi enzimi nei tessuti muscolari, per lo più localizzati nei fluidi intracellulari, nel sarcoplasma o in organelli intracellulari. Quando i pesci

sono in vita queste proteasi entrano in gioco nel turnover delle proteine, ma con il *post mortem* si ha la perdita dei meccanismi di regolazione, per cui tali enzimi iniziano ad agire dopo risoluzione del *rigor mortis* (Foegeding et al., 1996). È opportuno precisare che, oltre ad essere coinvolti nei processi catabolici, questi enzimi sono molto importanti anche nella produzione delle gonadi durante il processo di maturazione sessuale e le migrazioni riproduttive (Haard, 1992)

Le calpaine appartengono alla famiglia delle proteasi cisteiniche neutre intracellulari (**Fig. 7**). Esse sono attivate da una serie di processi, tra i quali sono compresi l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , fosforilazioni ed eventi proteolitici.

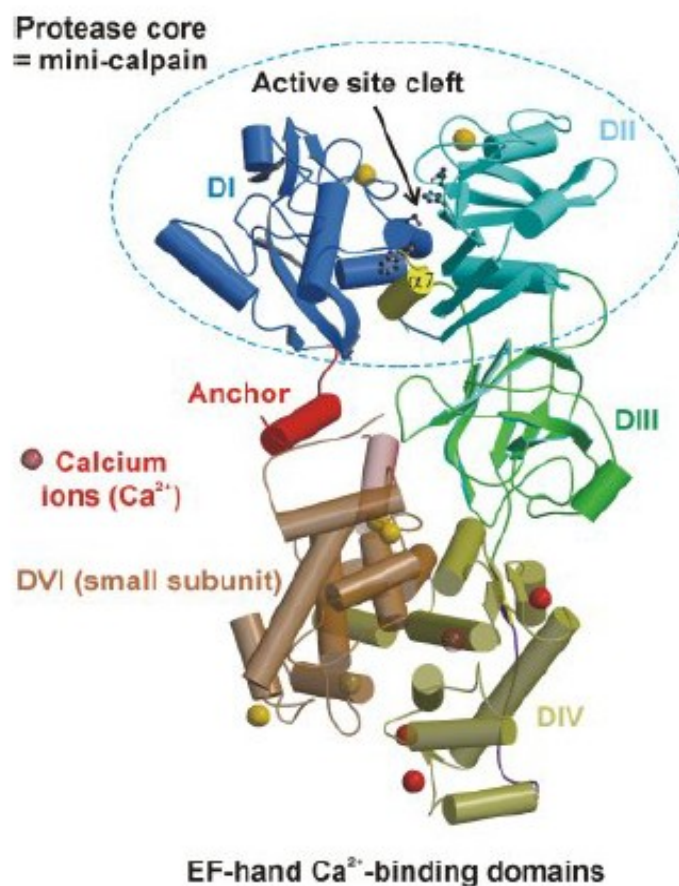


Fig.7 Struttura delle calpaine

Esistono due forme di calpaine distribuite nel citoplasma di tutte le cellule dell'intero regno animale e sono le micro(μ)-calpaine e le milli(m)-calpaine. Questa distinzione è legata alla concentrazione di ioni calcio necessaria per attivare le calpaine stesse: le μ -calpaine necessitano di concentrazioni micromolari di ioni calcio, mentre le m-calpaine di concentrazioni millimolari (Ladrat et al., 1999). Esse sono eterodimeri, costituiti da due subunità: una maggiore di 80 kDa ed una minore di 28 kDa. In particolare la subunità più piccola riveste un ruolo di regolazione, comportandosi come uno chaperone (Suzuki et al., 1986). Nella sub-unità maggiore è presente il sito attivo, ma la piena attività è osservabile solo se è presente anche la subunità minore (Tsuji e Imahori, 1981). Il meccanismo di proteolisi *post mortem* delle calpaine è caratterizzato dal distacco di filamenti intatti di actina e miosina, eventuali substrati del proteasoma e delle catepsine. Questo determina un conseguente intenerimento della carne (Fig. 8).

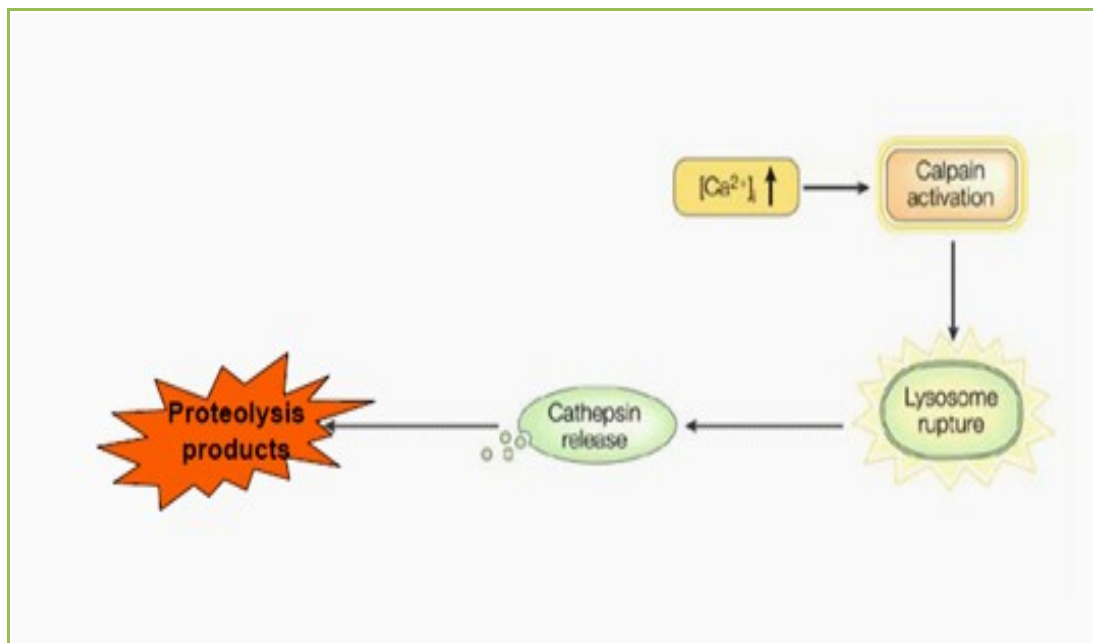


Figura 8 – Meccanismo d'azione delle calpaine e catepsine

Le calpaine hanno un pH ottimale di 6.9-7.5 e una temperatura ottimale di 30°C (Kolodziejska and Sikorski, 1996). Le calpastatine sono conosciute come i principali inibitori delle calpaine.

Le Catepsine sono acido proteasi localizzate nei lisosomi. Il meccanismo di proteolisi post mortem delle catepsine avviene successivamente all'azione delle calpaine: le prime, infatti, causano lisi cellulare liberando le catepsine sia nel citoplasma che negli spazi intercellulari (**Fig. 9**). I lisosomi contengono 13 tipi di catepsine (Goll et al., 1983) che vengono distinte in base al sito attivo (aspartico, cisteina, serina e metalloproteasi). In particolare quelle che svolgono un ruolo fondamentale nel *post mortem* sono le catepsine B (EC 3.4.22.1), L (3.4.22.15), H (3.4.22.16), D (3.4.22.5). Le catepsine B, H e L sono regolate da inibitori proteasici chiamate cistatine (Turk & Bode, 1991).

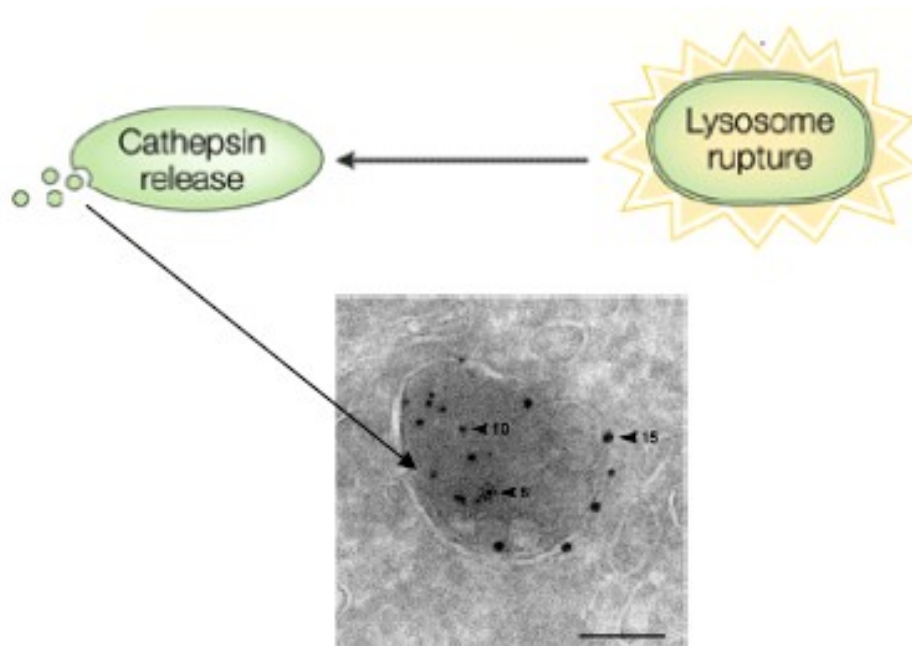


Fig. 9 Schema dimostrativo della rottura del lisosoma e rilascio delle catepsine nel mezzo; in basso, foto al microscopio elettronico delle catepsine all'interno del lisosoma.

Diversi ricercatori si sono impegnati a chiarire i meccanismi che coinvolgono le calpaine nel processo *post mortem*. Gli studi più interessanti sono elencati in ordine cronologico in **tab. 1**.

AUTORE	PESCE	ENZIMA	STUDIO	METODOLOGIA	TRATTAMENTI INIBIZIONE
Jiang et al (1990)	Tilapia	Pepstatine, catepsine D	Ruolo di proteasi sensibili alle pepstatine sui cambiamenti post mortem sui muscoli miofibrillari	SDS-PAGE; Attività delle catepsine D	L'attività proteolitica decresce quando gli enzimi sono incubati a pH 6.5 in presenza di pepstatine
Yamashita e Komagaya (1990)	Salmone	Catepsine B e L	Contributo delle catepsine L nel rammollimento estensivo nei muscoli di salmone catturato durante le migrazioni riproduttive	Misure reologiche; SDS-PAGE; Dosaggio dei prodotti solubili nel TCA	
Aoki e Ueno (1997)	Sgombro	Catepsine B e L	Coinvolgimento delle catepsine B ed L nell'autolisi del muscolo in fase di post mortem	Attività catepsine B, D, L; Dosaggio proteine; SDS-PAGE	
Ogata et al (1998)	Carpa	Catepsine L	Degradazione proteolitica dei componenti miofibrillari	Attività idrolitica; Dosaggio proteine; Attività caseinolitica; Attività proteolitica	
Geesink e Koohmaraie (1999)	Carne bovina	Calpaine	Effetti delle calpastatine sulla degradazione di proteine miofibrillari da parte delle μ -calpaine nelle condizioni di post mortem	Saggio di attività delle calpaine in funzione del pH e concentrazione di sale; SDS-PAGE; Immunoblotting	Inibizione delle μ -calpaine al pH del mezzo in fase post mortem; Inibizione delle μ -calpaine autolisate per effetto di un'elevata forza ionica
Ho et al (1999)	Sgombro	Calpaine, catepsine L e L-like	Effetti di tali enzimi sulla degradazione del surimi di sgombro	Saggio di attività delle catepsine L e L-like; SDS-PAGE	
Ladrat et al (1999)	Branzino	Calpaine	Valutazione del polimorfismo e aspetti biochimici; valutazione della degradazione post mortem della carne di pesce.	Saggio di attività delle calpaine; Saggio di attività inibitoria delle calpastatine; Filtrazione su gel Sephacryl S300; Calcio libero.	

Geesink et al (2000)	Salmone	Calpaine	Purificazione e caratterizzazione delle calpaine e valutazione del loro ruolo nella proteolisi post mortem	Saggio attività calpaine; Saggio attività in funzione della richiesta di calcio, dell'autolisi, attività specifica nei confronti della caseina; SDS-PAGE, Western-blotting, dosaggio proteine	
Ladrat et al (2002)	Branzino	Catepsine B, D ed L	Proteolisi in vitro delle proteine miofibrillari e sarcoplasmatiche dei muscoli bianchi	Digestione proteolitica; SDS-PAGE; Western Blot	

Aoki et al (2003)	Gambero settentrionale	Catepsine L-like	Studio delle proprietà molecolari ed enzimatiche delle catepsine L-like	SDS-PAGE; Attività catepsine L-like; Northern blot	
Delbarre-Ladrat et al (2003)	Branzino	Calpaine	Studio del potenziale proteolitico nei muscoli bianchi durante la fase post mortem tramite congelamento: cambiamenti tempo-dipendenti dei componenti del sistema calpaina.	Saggio di attività delle calpaine; saggio di attività delle calpastatine.	
Hultmann e Rustad (2004)	Salmone	Catepsine, collagenasi	Effetto delle radiazioni sugli enzimi proteolitici, ossidazione lipidica e colorazione delle carni	Proprietà dei tessuti; Attività proteolitica generale; Determinazione amminoacidi liberi; Analisi dei lipidi	Attività delle catepsine B-like e collagenasi inibite dalle radiazioni
Lakshmanan et al (2004)	Salmone	Calpaine, catepsine B-like e B+L-like	Effetto delle alte pressioni sugli enzimi proteolitici e proteine durante la conservazione a temperature di refrigerazione.	Attività proteolitica generale; attività catepsine B e B+L-like; Attività calpaine; SDS-PAGE.	Le attività di catepsine B-like e calpaine sono state ridotte da trattamenti a pressioni fino a 300 MPa (a 9°C per 20 minuti).
Delbarre-Ladrat et al. (2004)	Branzino	Calpaine e catepsine	Contributo delle calpaine e catepsine nella degradazione delle proteine del	SDS-PAGE; Western blot	

			muscolo		
Salem et al (2005)	Trota iridea	Calpaine, caspasi, catepsine	Caratterizzazione molecolare dell'atrofia muscolare e della proteolisi associata alla riproduzione	SDS-PAGE; Western blot	
Chéret et al (2005)	Branzino	Calpaine e catepsine B, D, H ed L	Effetti dell'alta pressione sui principali enzimi proteolitici coinvolti nella degradazione dei tessuti muscolari durante la conservazione	Attività calpaine; Attività catepsine	L'attività delle catepsine D si riduce oltre una pressione di 300 MPa; le calpaine presentano un'attività nulla oltre i 400 MPa
Chéret et al (2007)	Carne bovina; branzino	Calpaine e catepsine B, D, H ed L	Attività delle calpaine e catepsine in fase di post mortem nel pesce e nella carne	Dosaggio proteine; Attività calpaine; Attività inibitoria delle calpastatine; Attività catepsine B, D, H, L.	

Tab.1 Principali contributi sullo studio delle proteasi

3.2.2 Trattamenti tecnologici in grado di influenzare l'attività degli enzimi proteolitici

I trattamenti basati sulle **alte pressioni** sono delle tecniche di crescente interesse per la conservazione degli alimenti poiché possono causare la disattivazione o il rafforzamento delle attività enzimatiche. Alcuni prodotti trattati con le alte pressioni sono già commercializzati in Giappone, U.S.A., Francia e Spagna (Chéret et al., 2005)..

L'effetto principale delle alte pressioni a livello molecolare è quello di alterare le interazioni idrofobiche ed elettrostatiche, con importanti conseguenze sulle strutture secondarie, terziarie e quaternarie delle proteine (Chéret et al., 2005). Una netta riduzione delle attività autolitiche può essere osservata a pressioni superiori ai 200 MPa ed elevate temperature (Lakshmanan et al., 2004). Alte pressioni (100-200 MPa) possono favorire il rilascio di proteasi lisosomiali poiché inducono la rottura appunto delle membrane lisosomiali.

Le attività di catepsine B-like e calpaine sono state ridotte a pressioni inferiori a 300 MPa (9°C x 20 minuti). In generale, le alte pressioni non influenzano le attività proteolitiche, ma attivano gli enzimi nei muscoli, a livelli di pressione superiori ai 300MPa. In particolare è stato osservato che le proteasi estratte dai pesci sono più sensibili ai trattamenti con alte pressioni rispetto agli stessi enzimi estratti dalle carni dei mammiferi. È stato osservato un incremento delle attività di catepsine e calpaine nei tessuti muscolari di salmone affumicato, dopo 12 giorni di conservazione a temperature di refrigerazione (Lakshmanan et al., 2004). Chéret et al., (2005) hanno invece effettuato un'analogia ricerca sui tessuti muscolari di branzino: pressioni fino a 500 MPa rafforzano l'attività di catepsine B, H

ed L, mentre l'attività della catepsina D incrementa fino a 300 MPa e diminuisce oltre tale valore di pressione. Le calpaine invece presentano attività nulla oltre i 400 MPa. Gli autori dello studio suggeriscono una spiegazione del fenomeno basata sulle simultanee disattivazioni di enzimi e l'aumento della liberazione, da parte dei lisosomi, di catepsine a cui si aggiunge anche la dissociazione in sub unità delle calpaine.

Una significativa riduzione dell'attività autolitica fino ad un livello del 68% è stata osservata in due casi di polpi, conservati per refrigerazione, trattati a 7°C (400 MPa per 15 minuti, pressurizzazione per pulsazioni) e 40°C (400 MPa per 15 minuti o 400 MPa per 35 minuti con pulsazioni) (Chéret et al., 2005); tra il controllo ed il campione trattato ad alte pressioni non vi sono state differenze a livello delle condizioni di stoccaggio. Trattamenti ad altre pressioni di 100-300 MPa con durata varia (superiore a 30 min) su estratti enzimatici di pesce azzurro e *sheephead* (*Semicossyphus pulcher*) hanno influenzato le attività enzimatiche, in particolare di catepsine C, collagenasi, chimotripsina e tripsina.

L'impiego delle radiazioni (**irradiazioni**) costituisce un importante sistema di condizionamento ed estensione della vita commerciale dei prodotti ittici. È utile come trattamento antibatterico su alimenti già confezionati all'origine, su prodotti congelati senza la necessità di scongelamento. Consente inoltre di utilizzare dosi molto elevate senza che compaiano modificazioni sgradevoli delle caratteristiche sensoriale. L'Unione Europea ha disciplinato l'utilizzo delle radiazioni attraverso la direttiva 1999/2/CE che sancisce le norme applicate agli alimenti e ingredienti alimentari trattati con radiazioni ionizzanti. Per il momento in Italia non è consentito l'uso di questa tecnica di "conservazione" sui prodotti di origine animale. Il trattamento con le radiazioni consente in alcuni casi di eliminare odori di

stantio o comunque poco gradevoli per il consumatore. In Belgio ed in Olanda i gamberetti sono irradiati su scala industriale per operare una corretta sanificazione dopo gravi episodi di shigellosi acuta. Negli USA la FDA sta valutando di irradiare i prodotti della pesca dopo averlo già consentito per carni avicole.

I paesi non europei che ricorrono all'utilizzo delle radiazioni sono: il Bangladesh, Vietnam e l'Indonesia irradiano il pesce essiccato e surgelato. Le radiazioni ionizzanti determinano la formazione di radicali liberi dovuti alla ionizzazione di atomi e molecole che producono una modificazione della struttura chimica di un alimento. Ad esempio, nel pesce le radiazioni determinano una parziale denaturazione della molecola proteica minore rispetto a quella indotta da un trattamento termico (cottura o pastorizzazione). Si possono inoltre formare piccole quantità di radicali proteici liberi che danno origine a composti che alterano il sapore e l'odore del pesce. Le radiazioni non intaccano la composizione degli acidi grassi polinsaturi dei pesci se non in maniera marginale o modesta, anzi riducono i processi di ossidazione dopo un iniziale aumento. I prodotti ittici su cui si impiegano maggiormente le radiazioni sono i molluschi bivalvi (al fine di evitare le temperature di refrigerazione che può causare la morte degli stessi), i filetti di pesce spada salato e gamberetti. Tra gli aspetti negativi si riscontra una modificazione della qualità del prodotto. Infatti le carni ad elevato contenuto di grasso sviluppano odori sgradevoli, l'albume d'uovo può diventare lattescente e liquido; le ostriche irradiate possono morire e questo accorcia sostanzialmente la loro vita commerciale. Hultmann e Rustad (2004) hanno condotto delle ricerche su carni di salmone sottoposte a irradiazione, al fine di creare un substrato in cui studiare gli enzimi endogeni senza le interferenze che potrebbero essere generate da enzimi di origine microbica; Hultmann e Rustad hanno anche valutato gli effetti

dell'irradiazione sugli enzimi proteolitici e su altri aspetti, come l'ossidazione lipidica e il colore delle carni. Da questo studio è anche emerso che i microrganismi non svolgono un ruolo fondamentale nei cambiamenti della consistenza del salmone in caso di conservazione tramite congelamento.

Un significativo effetto dell'irradiazione incide sul periodo di conservazione. Un'analisi comparativa tra campione irradiato e un testimone ha mostrato, infatti, che quest'ultimo si presentava più morbido e con minore resistenza alla rottura. Tale risultato sembrerebbe essere dovuto ad un ridotto rilascio di ioni Ca da parte del reticolo sarcoplasmatico nei filetti di pesce irradiati, con l'effetto di una ridotta attività delle calpaine. In confronto al campione di controllo i filetti irradiati erano più consistenti dopo 5 giorni di congelamento, ma mostrano una maggiore gommosità dopo 14 giorni di congelamento. Nei campioni irradiati, l'attività delle catepsine B-like era più alta dopo 14 giorni di congelamento, rispetto al primo giorno di campionamento. Sia le catepsine B-like che le collagenasi risultavano inibite dalle irradiazioni. Tuttavia è stato osservato un incremento delle attività dei due enzimi proteolitici durante la conservazione, per effetto di una lieve riattivazione degli enzimi dopo l'irradiazione o per la possibile perdita degli inibitori endogeni.

Un altro metodo di inibizione delle proteasi riguarda l'uso delle **cistatine** ossia una famiglia di inibitori di proteasi cisteiniche ampiamente diffusi tra i vertebrati e i vegetali. Sono in grado di inibire le catepsine B, H, ed L, la papaina (proteasi estratto dai frutti immaturi di papaia) e actinidia (proteasi estratta dai frutti di piante del genere actinidia). L'inibizione si basa sulla formazione di un complesso inibitore-enzima, con una costante di dissociazione molto bassa, che impedisce di fatto la reazione dell'enzima. Tzeng et al. (2009) hanno dimostrato l'attività inibitrice di queste proteine

isolandole da uova di carpa carassi (*Carassius auratus*) e valutando il loro effetto sulla papaina. Diversamente, Ustadi et al. (2005) hanno isolato le cistatine da uova di cinque differenti specie di pesci tra cui aringhe, salmone, valutando sempre l'effetto sulla papaina. Le cistatine, come già accennato, sono ampiamente estratte da matrici vegetali, come risulta da uno studio effettuato da Wu e Haard (2000) che le hanno isolate dal pomodoro (*Lycopersicon esculentum*). Yamada et al. (2001) hanno isolato le cistatine da piante di mais; Serigado (2002) ha estratto tali inibitori dal riso.

3.2.3 Enzimi Lisosomiali: α -Glucosidasi

L' α -Glucosidasi È una idrolasi (EC 3.2.1.20) che catalizza l'idrolisi del legame 1-4 del residuo terminale non riducente del maltosio, con il rilascio di α -D-glucosio (Schomburg e Schomburg, 2003).

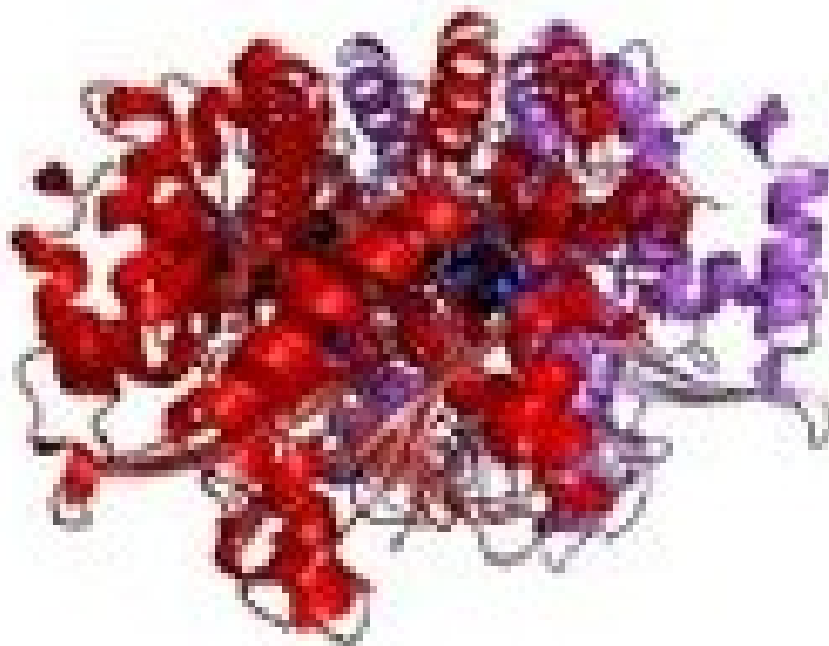


Fig. 10 Modello tridimensionale dell' α -glucosidasi

Le α -glucosidasi possono essere distinte in due gruppi principali: le α -glucosidasi acide, con pH ottimale di 4.0-5.0 e localizzate nei lisosomi; le α -glucosidasi neutre, con pH ottimale 6.0-7.0 distribuite nel citoplasma (Jauhiainen e Vanha-Pettula, 1985).

3.2.4 Trattamenti tecnologici in grado di influenzare gli enzimi lisosomiali

Il **congelamento** e il successivo scongelamento delle carni di pesce causa la rottura delle cellule e dei relativi organelli, con il conseguente rilascio di enzimi mitocondriali e lisosomiali. Un aspetto molto importante dell' α -glucosidasi è che la sua attività può essere considerata uno strumento che permette di discriminare tra pesce freschissimo e pesce congelato-scongelato. Assistiamo infatti ad esempio ad un sensibile rafforzamento dell'attività di α -glucosidasi negli estratti ottenuti da filetti di merluzzo (*Gadus morhua*), scorfano atlantico (*Sebastes marinus*) ed eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) congelati e successivamente scongelati come dimostrano i lavori di Rehbein e Cakli (1998). Essi hanno ricavato l'estratto enzimatico con una centrifugazione del tessuto muscolare ed hanno determinato l'attività utilizzando un substrato come substrato cromogenico, il p-nitrofenil- α -D-glucopiranoside, a pH 4.5. Tale attività è stata valutata considerando il rapporto delle attività del surnatante e del sedimento, al fine di ottenere valori significativi dal punto di vista statistico. Una valida alternativa a tale tecnica enzimatica per differenziare un pesce alterato da un pesce non alterato scongelato è la valutazione dell'ABVT (Vyncke, 1983).

L'attività dell' α -glucosidasi è stata anche determinata anche sull'anguilla (*Anguilla anguilla*), merluzzo carbonaro o nero (*Pollachius virens*) aringhe (*Clupea harengus*) fresche, congelate e congelate-scongelate (Rehbein e Tomie, 1979; Rehbein e Aust, 1980; Rehbein et al., 1982).

Duflos et al. (2002) hanno determinato, invece, l' α -glucosidasi, la β -N-acetilglucosaminidasi e β -idrossiacil-CoA-deidrogenasi, quali indici di

congelamento in tre specie ittiche: platessa (*Pleuronectes platessa*) merlano (*Merlangius merlangus*) e sgombro (*Scomber scombrus*). L' α -glucosidasi è risultata essere l'indice più significativo per quanto riguarda i filetti di platessa e di merlano che hanno presentato valori che indicavano l'avvenuto congelamento.

Infine l' α -glucosidasi è utilizzata nell'allevamento a base di amido dei gamberetti. Tale enzima sopperisce la deficienza dei gamberetti nel digerire i legami α -1,6 dell'amilopectina, permettendo di sostituire le proteine con l'amido, più economico. Arellano-Carbajal e Olmos-Soto (2002) hanno isolato *Bacillus* spp. da sedimenti marini provenienti da una zona vicino a scarichi di pesca. I microrganismi di questo genere sono, infatti, quelli che più si prestano alla produzione di α -glucosidasi con costi minimi.

3.2.5 Enzimi Ossidativi: Polifenolossidasi

La polifenolossidasi è nota anche con il nome di tirosinasi, catecolo ossidasi, catecolasi, difenolossidasi, monofenolossidasi e creolasi. Questo deriva dal fatto che la PPO può agire generalmente su due tipi di substrato.

1. Monoidrossifenoli (come p-cresolo)
2. Diidrofenoili (come catecolo)

Tra le polifenolossidasi si distinguono tre principali famiglie di enzimi:

Monofenolmonossigenasi : Tirosinasi , E.C. 1.14.18.1; Difenolossidasi:

Catecolossidasi, *o*-difenolossigeno-ossidoreduttasi, E.C. 1.10.3.1; Laccasi (*p* difenolossigeno-ossidoreduttasi) E.C. 1.10.3.2 . Questi appartengono tutti alla classe delle ossido reduttasi, ma si differenziano sulla base delle proprietà molecolari e dei substrati utilizzati (Mayer & Harel, 1991; Mayer *et al.*, 1966).

Probabilmente questa classificazione e distinzione delle polifenolossidasi risulta oramai superata. La PPO catalizza due differenti reazioni coinvolte nell'ossidazione dei composti fenolici e precisamente:

1. Idrossilazione di monofenoli a *o*-difenoli (monofenolmonossigenasi E.C. 1.14.18.1) definita come attività cresolasica;
2. Ossidazione degli *o*-difenoli a *o*-chinoni (difenolossidasi E.C. 1.10.3.1) definita come attività catecolasica (Nagai & Suzuki, 2001)

In entrambe le reazioni l'ossigeno molecolare è utilizzato come co-substrato. Nelle piante, nonostante la presenza di entrambe le reazioni, il rapporto tra la cresolasica e la catecolasica è solitamente 1:10 o 1:40 (Nicolas *et al.*, 1994). Lerch e Ettliger (1972) hanno investigato

sull'attività di PPO (tirosinasi) di *Streptomyces glaucescens* su un gran numero di mono- e o-difenoli, arrivando alla conclusione che in tutti i casi l'attività catecolasica era superiore all'attività cresolasica .

Nel processo di melanosì dei crostacei l'enzima coinvolto è la tirosinasi. La tirosinasi (**Fig. 11**) può essere considerata una monossigenasi contenente rame che catalizza sia l'idrossilazione del monofenolo tirosina a dopa sia l'ossidazione dell'o-difenolo, dopa, a dopa chinone. Le due attività enzimatiche sono comunemente riportate come cresolasi , monofenolasi, catecolasi o difenolasi.

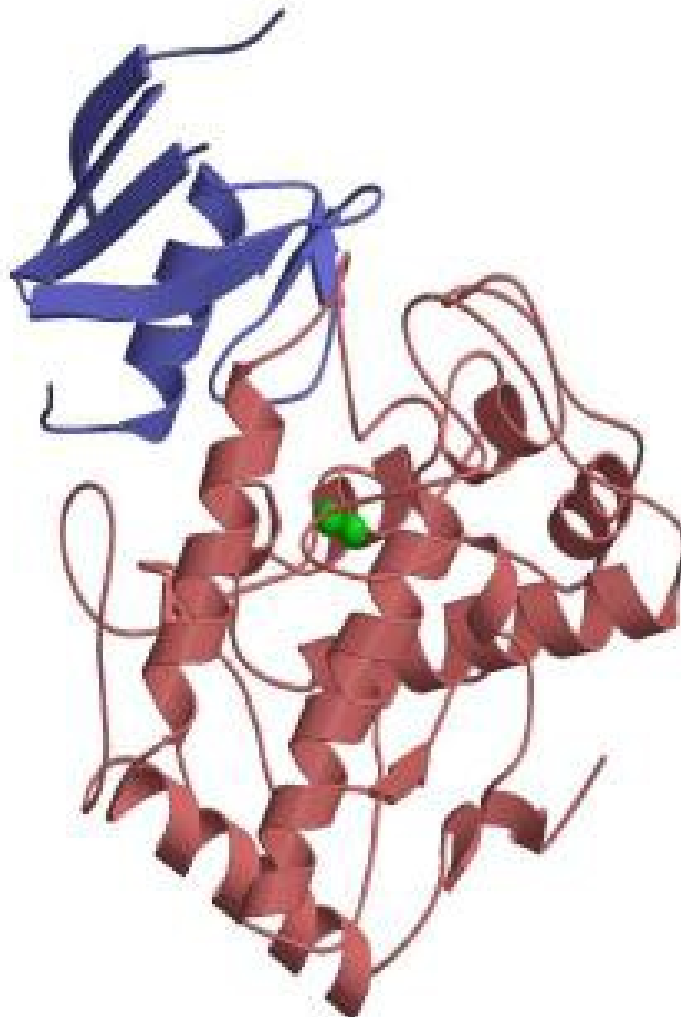


Fig. 11 – Struttura della Tirosinasi

Nonostante la tirosinasi sia stata purificata da varie fonti la determinazione della sua struttura molecolare ha subito un notevole ritardo per la frequente presenza di forme multiple e dei suoi legami con altre proteine strutturali. Dalla purificazione della tirosinasi legata ai melanosomi del melanoma umano maligno, essa risulta essere una glicoproteina di 66,7 kDa contenente acido sialico almeno per il 4,8%. Il suo contenuto in rame è stato stimato nell'ordine di due atomi per molecola (Giannetti, 2001). Attualmente è stata determinata la struttura primaria della proteina presente nel fungo *N. crassa*, nel batterio *S. glaucescens* , nel topo e nella tirosinasi umana. La sequenza amminoacidica nei mammiferi è stata dedotta dal cDNA. Tutte le molecole di tirosinasi analizzate sono proteine monomeriche con una massa molecolare di 30,9 kDa (*S. glaucescens*), 46 kDa (*N. crassa*) e 57,9 kDa (topo) (Whitaker, 1995).

La tirosinasi è localizzata nella corazza del cefalotorace, nella zona caudale e nella cuticola dell'addome, principalmente dove si uniscono i segmenti della cuticola e nel punto di collegamento della cuticola alla pleopodi (Ogawa et al., 1984). Nei gamberi refrigerati, la reazione di melanosomi inizia dalla testa e poi si diffonde nella coda e il tasso di diffusione differisce nelle varie specie (Montero et al., 2001b) La PPO dei gamberi (*Penaeus setiferus*) esprime la sua massima attività a 45°C, mentre la massima attività della PPO in *Penaeus japonicus* pescato in Spagna è di 55°C (Simpson et al 1988). Tale attività diminuisce a pH acidi e alcalini. Il pH ottimale della PPO nei crostacei cambia a seconda della specie. Ad esempio Benjacul et al. (2005) riportano che il pH ottimale del *Kuruma prawn* ha un valore di 6.5 mentre Simpson et al. (1987) sostengono che *Penaeus setiferus* presenta la massima attività a pH 7.0, Montero et al. (2001) invece affermano che il *Penaeus japonicus* presenta la sua massima attività a pH 5.0 e a pH 8.0. Il pH ottimale del gambero tigre nero risulta

essere intorno a 6.0 (Rolle et al., 1991). Il pH ottimale inoltre cambia in relazione alla sezione anatomica del crostaceo; infatti, nel cefalotorace si ha attività valori prossimi a 7.16, mentre nelle cuticole addominali a pH 8.7. Tale enzima determina il processo di melanosi quel fenomeno comune che può essere osservato nella frutta, nella verdura e nei frutti di mare. L'imbrunimento, inizialmente appare a livello del cefalo torace, nelle appendici e nei segmenti della cuticola. Il più grave, tuttavia si manifesta sicché, nella testa infatti dopo averla tolta, bisogna lavare accuratamente la coda in modo da eliminare le proteasi in grado di promuovere la melanosi (Fig. 12).

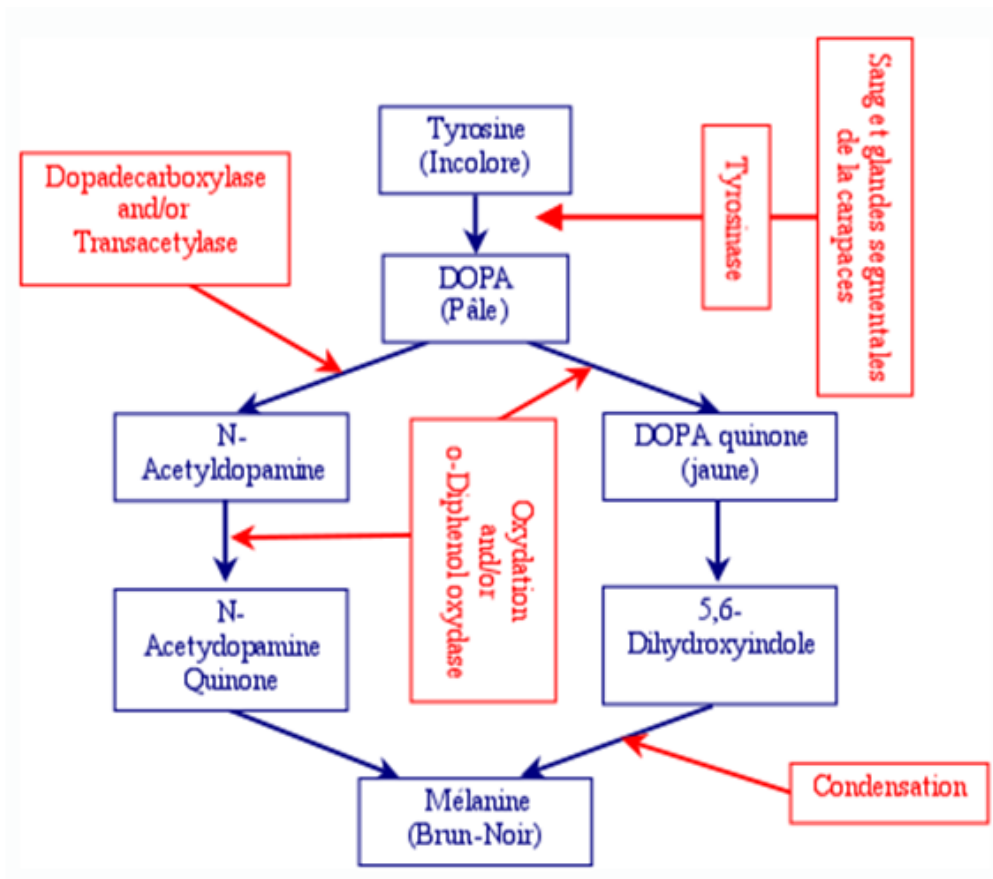


Figura 12 Meccanismi biochimici coinvolti nella formazione di melanosi (Cobb, 1977)

Esistono due meccanismi nella fase *post mortem* che danno luogo alla formazione di questi pigmenti: uno non necessita di enzimi, ma la tirosinasi

è il fattore principale dell'altro. Sotto l'azione di enzimi proteolitici, la tirosina viene rilasciata nel mezzo e subito subisce l'attacco della tirosinasi che la trasforma in DOPA (diidrossifenilalanina) che ha un colore giallo pallido. Sotto l'azione di enzimi polifenolossidasi e dell'ossigeno il DOPA viene trasformato in DOPA-chinone, che tramite una reazione di condensazione, causa la formazione di melanina passando da una colorazione giallo pallida ad una più scura. La PPO svolge un ruolo importante nelle funzioni fisiologiche dei gamberi nel corso del loro sviluppo, nella fase di indurimento del carapace, dopo la muta e dopo la guarigione della ferite. L'attivazione della PPO è molto complessa e potrebbe avere origini diverse. Potrebbe essere attivata da un meccanismo di difesa ospite e può essere indotta da un metabolita prodotto da microrganismi. L'ossigeno ed enzimi epatopancreas sembrano essere i fattori principali nell'attività della PPO. Jiang et al. (1991) hanno individuato 4 proteasi di cui tre tripsin-like che sembrano essere il principale fattore di avvio della melanosì. Questa è direttamente influenzata dalla salute generale dei gamberetti e anche da ferite inferte durante la raccolta. Il meccanismo di guarigione delle ferite, infatti, produce composti a seguito della polimerizzazione dei chinoni che presentano attività antibatterica e antimicotica. Gli elementi chiave che sono coinvolti nella melanosì sono: l'enzima tirosinasi, con specificità ristretta, che viene inibita a pH 3.0 ma queste condizioni denaturano il prodotto; l'ossigeno che agisce direttamente in tutte le reazioni di ossidazione; fondamentale è la presenza di substrati adeguati, come tirosina, DOPA, ecc.; l'influenza di diversi fattori esterni biotici (specie, fase della muta, ecc.) e fattori abiotici (es. temperatura, presenza di ferite, ecc). Una bassa temperatura rallenta le reazioni enzimatiche senza bloccarle.

3.2.6 Trattamenti in grado di inibire il processo di melanosi

Molti studi si sono focalizzati sulla prevenzione e inibizione dell'attività polifenolossidasi. In linea generale tutte le tecniche hanno lo scopo di eliminare uno dei componenti essenziali della reazione: O₂, enzima, ione Cu²⁺ o substrato. Infatti, l'imbrunimento del cibo può essere evitato con la rimozione di ossigeno molecolare, mediante acidificazione (nei casi in cui è permessa) e attraverso la rimozione di polifenoli per complessazione con ciclodestrine e polivinilpirrolidone (PVP) (Billaud *et al.*, 1995). Alcuni composti come l'acido ascorbico, composti tiolici e solfiti possono essere aggiunti per evitare l'imbrunimento di frutta e verdura tagliati; l'acido cinnamico, l'acido *p*-cumarico e l'acido ferulico possono essere aggiunti al succo di mela al fine di inibire l'attività della PPO (Osuga *et al.*, 1994; Walker, 1976). Il 4-esil-resorcinolo è un inibitore sicuro ed efficace di imbrunimento enzimatico e viene spesso utilizzato nella lavorazione di gamberetti (Dawley & Flurkey, 1993). Si è visto, inoltre, che il blocco del rame fa cessare l'attività enzimatica, attraverso l'utilizzo di un gran numero di sostanze inibenti (feniltiourea, tiouracile, cisteina, glutatione) contenenti essenzialmente gruppi solforati che combinandosi col rame ne impedirebbero l'attività. Molti ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione sull'utilizzo della biotecnologia per diminuire il livello di PPO di frutta e verdura. Un esempio dell'utilizzo delle biotecnologie è l'uso di un RNA antisenso specifico per impedire l'espressione della PPO in tessuti d'uva (Martinez Villar, 1996).

Al fine di inibire il fenomeno della melanosi è importante anche che il processo di raccolta deve essere effettuato il più delicatamente possibile per evitare di danneggiare i vegetali o ferire gli animali. Dopo la raccolta,

invece, il problema principale è quello di ritardare l'inizio del fenomeno della melanosi il più a lungo possibile. Per fare questo possono essere applicate varie tecniche durante la trasformazione (refrigerazione, congelamento, riscaldamento, disidratazione o irradiazione) o possono essere usati degli inibitori. In tutti i casi, le tecniche non devono influire sull'aspetto, sulla consistenza, gusto e/o sapore e non devono causare direttamente o indirettamente tossicità. Nessuna delle tecniche di lavorazione permesse dalla legge sono del tutto efficienti nel controllo della melanosi. Con le tecniche di lavorazione è possibile rallentare o addirittura interrompere solo temporaneamente il fenomeno.

Il **congelamento** (-18°C) non distrugge gli enzimi, ma arresta solo la loro attività. Gli enzimi, infatti, saranno riattivati quando il prodotto è riscaldato. Anche il congelamento ha un effetto insidioso. Quando un prodotto è scongelato i batteri che lo colonizzano si sviluppano molto velocemente e la loro attività potrebbe essere un fattore che causa l'apparizione della melanosi. Per essere efficace, la cottura deve essere distruttiva. Nella maggior parte dei casi, i gamberetti sono cotti in un bagno di 95°C per 3 o 4 minuti, a seconda delle dimensioni, ma gli esperimenti hanno dimostrato che per essere efficiente, la cottura deve essere a temperature più alte e più a lungo. Tale temperatura, tuttavia, altera la consistenza e il sapore dei gamberetti che non sarebbero più accettabili da parte del consumatore. Questo è il motivo per cui attualmente per controllare la melanosi si ricorre all'uso di inibitori, che si distinguono in agenti riducenti, chelanti, acidulanti, e inibitori enzimatici.

Per quanto riguarda gli **agenti riducenti** la loro azione nella prevenzione dell'imbrunimento consiste nel ridurre chimicamente gli o-chinoni a difenoli; formare con gli o-chinoni composti incolori; esercitare un diretto effetto inibente sull'enzima. L'efficacia è temporanea perché essi stessi

vengono irreversibilmente ossidati durante il processo. Tra gli agenti riducenti sono compresi i composti solfitanti, l'acido ascorbico e i suoi derivati e i composti solfidrilici.

Tra gli **agenti solfitanti** avremo l'anidride solforosa (SO_2) e i suoi derivati (solfito di sodio, bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio). Essi sono utilizzati come additivi alimentari per le loro proprietà antimicrobiche, antifungine, antiossidanti ed inibitrici dell'imbrunimento enzimatico e ossidativo. La SO_2 presenta un caratteristico odore particolarmente irritante che, tuttavia, pur rappresentando in se uno svantaggio, permette di svelare eccessive quantità aggiunte. Presenta una tossicità acuta piuttosto elevata, ma può anche essere caratterizzata da tossicità cronica. La SO_2 , infatti, interagisce con enzimi cellulari e con alcune vitamine causandone la distruzione. Nell'organismo umano i solfiti vengono ossidati a solfati, sali non tossici, ma che possono legarsi a ponti disolfuro delle proteine formando un gruppo tiolico e uno solfonico che causano l'alterazione del metabolismo. La SO_2 e i solfiti in concentrazione superiore a 10 mg/L, espressi come SO_2 , devono essere dichiarati in etichetta come previsto dalla "Direttiva allergeni" e dal *Joint Expert Committee on Food Additives* (JEFCA) della World Health Organization (WHO) e Food Agricultural Organization (FAO). I Crostacei che hanno un residuo di solfiti superiori a 100 ppm sono considerati adulterati perché nocivi per la salute (Federal Register, 1985). Gli agenti solfitanti riducono l'imbrunimento enzimatico dei crostacei e la crescita microbica durante la conservazione dei gamberi (Chinivasagam et al., 1998; Maldhavi et al., 1998).

Attualmente il trattamento con metabisolfito è la migliore soluzione per controllare l'imbrunimento nei gamberi durante il post raccolta. Tuttavia il trattamento e la refrigerazione immediatamente dopo la raccolta, insieme

ad un rispetto rigoroso della catena del freddo, costituiscono le fasi fondamentali per ottenere un prodotto di buona qualità. Il glutatione (GSH) è un tripeptide che presenta notevoli proprietà antiossidanti. Molti ricercatori hanno focalizzato la propria attenzione sull'uso di glutatione come inibitore dell'imbrunimento enzimatico, data la sua capacità di reagire con gli o-chinoni per formare composti incolori. Dogan et al. (2006) hanno testato l'utilizzo di glutatione e L-cisteina come inibitori di PPO nel timo, affermando che il glutatione è risultato molto più efficace. Molnar-Perl e Friedman (1990) hanno descritto come il glutatione ridotto a N-acetil-L-cisteina rappresenta un'alternativa molto efficace all'uso di solfiti come inibitori d'imbrunimento. Attualmente l'utilizzo di glutatione come agente anti-imbrunimento è molto limitato visto l'elevato costo che lo rende commercialmente inidoneo

Tra gli **agenti complessanti** avremo agenti in grado di intrappolare o formare complessi con i substrati della PPO o con i prodotti della reazione enzimatica. Un esempio di agenti complessanti sono le ciclodestrine, un gruppo di oligosaccaridi ciclici derivanti dall'amido formati da sei, sette o otto monomeri di D-(+)glucopiranosio uniti tra loro con un legame α ,1-4 glucosidico e chiusi ad anello. Presentano una cavità centrale idrofobica e una parte esterna idrofilica. In soluzione acquosa, la cavità centrale può formare complessi d'inclusione con diverse molecole, compresi i fenoli, riducendo quindi la disponibilità di substrato alla PPO. La β -ciclodestrina risulta avere le dimensioni della cavità centrale più appropriate all'intrappolamento dei composti fenolici, ma in soluzioni acquose presenta una scarsa solubilità (Billaud et al., 1995). Si è visto che questo agente complessante è un efficace inibitore d'imbrunimento dei succhi di frutta, mentre non lo è per la frutta a fette (Sapers & Hicks, 1989). Inoltre

l'efficacia inibitoria della β -ciclodestrina varia in funzione dei differenti substrati fenolici, come spiegano Billaud et al. Infatti, nei sistemi modello contenenti un solo composto fenolico, la β -ciclodestrina agisce efficacemente come agente anti-imbrunimento, mentre quando si analizzano miscele di composti fenolici, l'efficacia di tale agente diminuisce notevolmente.

Un ulteriore classe di inibitore è rappresentata dagli **acidificanti**. Infatti i gruppi ionizzanti delle strutture proteiche degli enzimi sono influenzati dal pH degli alimenti. Questi gruppi devono essere in appropriata forma ionica al fine di mantenere la conformazione del loro sito attivo, legare il substrato, o catalizzare le reazioni enzimatiche (Segel, 1976). I cambiamenti nello stato di ionizzazione dell'enzima sono in genere reversibili. Una denaturazione irreversibile può d'altronde verificarsi in condizioni di pH estremo (Marshall et al., 2000). La stabilità del substrato è anche influenzata dalle variazioni di pH, poiché questo può subire degradazione chimica in condizioni estreme di pH. I substrati degradati spesso si comportano come inibitori enzimatici, in quanto condividono le caratteristiche molecolari del substrato di partenza (Tipton e Dixon, 1983). Gli acidificanti sono in genere utilizzati al fine di mantenere il pH ben inferiore a quello richiesto per un'attività ottimale dell'enzima. Acidificanti come acido citrico, malico e fosforico sono in grado di causare l'abbassamento del pH di un sistema, inattivando così la PPO (Richardson e Hyslop, 1985). Sono spesso usati insieme con gli agenti antinbrunimento. L'acido citrico esercita il suo effetto inibente sulla PPO tramite l'abbassamento del pH così come con l'azione chelante nei confronti del rame nel sito attivo dell'enzima (Richardson e Hyslop, 1985).

L'**acido kojico** (5-idrossi-2-idrossimetil-4H-piran-4-one) ha una potenziale applicabilità nella prevenzione della melanosì sia nelle piante che nei prodotti ittici. Questo acido ha mostrato la capacità di inibire la melanosì nel gambero rosa (Applewhite et al., 1990). L'inibizione della tirosinasi con l'acido kojico si pensa sia dovuta all'abilità di quest'acido di legare il rame al sito attivo dell'enzima. Sebbene sia un buon inibitore della PPO, l'acido kojico presenta una preoccupante tossicità. Wei et al. (1991) hanno riportato una debole attività mutagenica di questo acido in un saggio con *Salmonella typhimurium*.

L'**acido ascorbico** è un composto riducente presente in natura come acido, forma dei sali neutri con le basi ed è altamente solubile in acqua. L'acido ascorbico agisce anche come uno scavenger per la rimozione dell'ossigeno molecolare nelle reazioni della PPO (Buta e Moline, 2001). L'inibizione della PPO è dovuta alla riduzione degli o-chinoni formati per via enzimatica dai loro precursori di fenolici (Walker, 1977).

L'acido ascorbico è tuttavia ossidato irreversibilmente ad acido diidroascorbico durante il processo di riduzione, causando imbrunimento al suo esaurimento (**Fig. 13**).

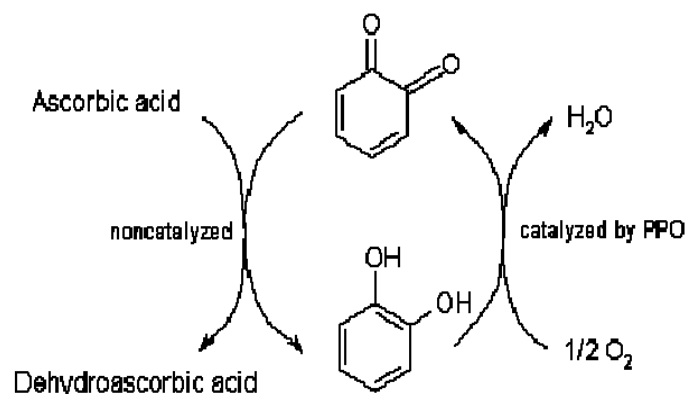


Fig. 13 Meccanismo di prevenzione della formazione di colore con acido ascorbico (Marshall et al., 2000)

Forme più stabili derivate dall'acido ascorbico, come l'acido eritorbico e derivati 2 e 3-fosfato dell'acido ascorbico, sono stati tuttavia sviluppati per superare tali problemi (Sapers e Hicks, 1989). Gli esteri dell'acido ascorbico sono stati anche utilizzati poiché rilasciano tale acido su idrolisi con fosfatasi acida (Liao e Seib, 1988).

L'acido ascorbico causa una discreta colorazione gialla, quando è usato nella prevenzione della melanosi nei gamberetti (Otwell e Marshall, 1986). Esso è, in genere, applicato insieme all'acido citrico al fine di mantenere un pH più acido. Inoltre, si pensa abbia un effetto chelante sul rame del gruppo prostetico della PPO (Whitaker, 1972).

La **cisteina** è un amminoacido non essenziale presente in un'ampia gamma di alimenti, in particolare nei cereali. Molti studi hanno dimostrato la sua capacità inibente nei confronti dell'imbrunimento, agendo sugli *o*-chinoni generati dalla reazione di ossidazione enzimatica. In particolare il gruppo sulfidrilico della cisteina per mezzo di una reazione di addizione nucleofila con i chinoni genera un addotto solforato, la cisteina-chinone (CQAC), che evita la formazione di composti scuri. Richard-Forget *et al.* (1992) hanno rilevato che l'effetto di inibizione del CQAC è direttamente correlato alla concentrazione iniziale di cisteina. In conseguenza a questo si possono avere due diversi risultati sull'inibizione dell'imbrunimento in funzione del rapporto cisteina/polifenoli. Nel caso di un rapporto cisteina/polifenoli superiore a 1 non si ha imbrunimento in quanto i polifenoli sono tutti degradati a CQAC. Invece un rapporto cisteina/polifenoli inferiore a 1 permette soltanto una parziale conversione degli *o*-chinoni nell'addotto solforato e quindi gli *o*-chinoni liberi tenderanno a reagire con i CQAC rigenerando, attraverso reazioni di ossidazione accoppiata, i polifenoli d'origine (che rappresentano

un'ulteriore substrato di reazione per la PPO) (Fig.14). In questo ultimo caso si noterà la formazione di composti bruni (Richard-Forget et al., 1992). Nella pratica, però, la cisteina non può essere addizionata oltre certi limiti, in quanto incide negativamente sulle caratteristiche sensoriali dell'alimento (es. odore di uova marce). È opportuno quindi associare il suo utilizzo ad altri additivi che permettono di ottimizzare il controllo dell'imbrunimento enzimatico (Bay, 2002).

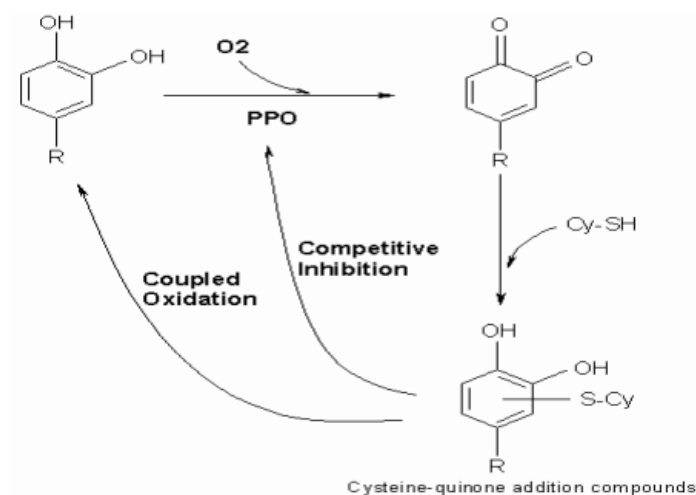


Fig.14 – Effetto della cisteina e del composto cisteina-chinone (CQAC) sull'ossidazione enzimatica degli o-difenoli (Marshall et al., 2000)

Un'ulteriore classe di inibitore è rappresentata dagli **chelanti**. In particolare gli enzimi presentano in genere degli ioni metallici nei loro siti attivi. La rimozione di questi ioni tramite agenti chelanti può quindi inattivare gli enzimi stessi. Gli agenti chelanti formano un complesso con gli agenti pro-ossidativi, come gli ioni di rame e ferro, attraverso una coppia di elettroni non condivisi nella loro struttura molecolare (McEvily et al., 1992). I chelanti utilizzati nell'industria alimentare includono acido sorbico, acidi policarbossilici (acido citrico, malico, tartarico, ossalico e succinico),

polifosfati (ATP e pirofosfati), macromolecole (porfirine e proteine) ed EDTA. Altri agenti chelanti che sono in grado di inibire la PPO sono il cianuro, dietilditiocarbonato, sodio azide e il 2-mercaptobenzotiazolo, monossido di carbonio, mercaptobenzotiazolo e potassio metil xantato (Marshall et al., 2000). Agente chelante il cui uso è permesso nell'industria alimentare come conservante chimico è l'EDTA. Il calcio disodio EDTA (21 CFR 172.120) e il disodio EDTA (21 CFR 172.135) sono stati approvati per essere usati come additivi alimentari dalla United States Food and Drug Administration (Anon, 1992). Dei complessi altamente stabili sono formati attraverso l'azione complessante dei composti dell'EDTA su ferro, rame e calcio. La massima efficienza chelante si verifica al più alto valore di pH dove i gruppi carbossilici sono presenti in uno stato dissociato (Dziezak, 1986). L'EDTA è generalmente utilizzato insieme ad altri trattamenti chimici per la prevenzione dell'imbrunimento enzimatico negli alimenti.

Sono agenti chelanti (polifosfati, pirofosfato acido di sodio e metafosfati) usati come agenti antimbrunimento per frutta fresca pelata ed ortaggi, a concentrazioni comprese fra 0.5 e 2% (concentrazione finale nella soluzione di immersione) (McEvily et al., 1992). Lo SporixTM, una miscela di polifosfati acidi (acido sodio pirofosfato, acido citrico, acido ascorbico e cloruro di calcio), è stato utilizzato per ritardare l'insorgenza dell'ossidazione e dell'imbrunimento enzimatico nei frutti e nei vegetali (Gardner et al, 1991).

L'**esilresorcinolo (4-HR)** è stato usato come un'alternativa ai solfiti per la prevenzione della melanosi dei gamberetti (Lopez-Caballero et al., 2005). All'interno dell'UE è stato incluso provvisoriamente nella lista degli additivi autorizzati, in attesa di un'approvazione definitiva. La massima concentrazione ammessa di E586 in crostacei freschi, congelati e surgelati

è di 2 mg/kg di residui di polpa (allegato XI parte D, Decreto Ministero della Sanità n. 209 del 27/02/1996). Una soluzione contenente 50 mg/L di 4-HR ha mostrato la stessa capacità di prevenire la melanosi di una soluzione contenente 12.5 g/L di solfito (McEvily et al., 1991). Il solfito, un agente riducente, reagisce chimicamente con i precursori delle melanine, mentre il 4-HR agisce come un inibitore specifico della PPO (European Commission, 2003). Le informazioni disponibili concernenti l'aggiunta di questo composto alle varie specie di crostacei, mostrano differenze nelle dosi effettive per la prevenzione della melanosi. McEvily et al. (1991) affermano siano necessari 50 mg/kg nel gambero marrone (*Penaeus aztecus*) e nel gambero rosa (*Penaeus duodarmus*); Otwell et al. (1992) concordano sulla necessità di impiegare 50 mg/kg nel gambero rosa (*Penaeus duodarmus*), mentre Guandalini et al. (1998) propendono per 100mg/kg nel gambero rosa mediterraneo (*Parapenaeus longirostris*). Un'elevata concentrazione (5000 mg/kg, è stata usata nella mazzancolla imperiale (*Penaeus japonicus*) (Montero et al., 2001b).

Guandalini et al. (1998) hanno riportato che la concentrazione più efficace di 4-HR per inibire o rallentare la melanosi nel gambero rosa mediterraneo è di 100 mg/kg in un periodo ottimale di 7 giorni. La melanosi in gamberi tigre (*Marsupenaeus japonicus*) è stata inibita quando si è ricorso a soluzioni differenti contenenti 4-HR (0.1 e 0.05%) insieme con altri acidi organici (citrico, ascorbico e acetico), agenti chelanti (EDTA) e disodio diidrogeno pirofosfato (PPi). L'insieme degli agenti chelanti con il 4-HR ed acidi organici ha dimostrato invece una maggiore efficacia nella prevenzione della melanosi e ha migliorato l'aspetto dei gamberetti (Martinez-Alvarez et al., 2005b).

Montero et al. (2001b) hanno usato una combinazione di 4-HR con acido ascorbico o citrico per inibire la melanosi nei gamberetti (*Penaeus*

japonicus) tramite immersione per 2 h. Hanno trovato che l'effetto di ogni acido è intensificato quando viene combinato con il 4-HR. Tuttavia, nel gambero rosa mediterraneo, gli acidi menzionati non incrementano l'inibizione della melanosì, ma migliorano l'aspetto (Montero et al., 2004). Queste differenze potrebbero essere dovute alle variazioni interspecie, ai cambiamenti ciclici nella suscettibilità fisiologica o alla concentrazione dell'inibitore della melanosì e del metodo di applicazione impiegato (Montero et al., 2006). Il 4-HR è un ottimo inibitore della polifenolossidasi ma vi sono pareri discordanti e studi in corso riguardanti l'impatto sulla salute del consumatore (cancerogenicità).

Uno degli inibitori enzimatici anti-imbrunimento con il maggiore potenziale è il 4-esilresorcinolo, un composto chimico utilizzato a lungo nel campo della medicina. In campo alimentare il 4-esilresorcinolo viene maggiormente utilizzato come agente anti-imbrunimento di crostacei, e in combinazione con l'acido ascorbico come anti-imbrunente della fette di mela. Tale agente presenta una elevata specificità nei confronti della PPO, ed ha ben sostituito l'uso di solfiti data la sua capacità di agire anche a concentrazioni inferiori. Inoltre, a differenza dei solfiti inibisce la PPO presente sia sopra che sotto il guscio dei gamberi, impedendo così la comparsa del "black spot" (Lambrecht, 1995). Tuttavia, sebbene il 4-esilresorcinolo risulta essere un efficiente agente anti-imbrunimento, vi sono studi in corso riguardanti l'impatto sulla salute del consumatore.

L'arbutina è un glicoside di origine vegetale in cui un idrochinone è legato attraverso legame glucosidico a una molecola di glucosio. Con il termine arbutina viene comunemente definito il 4-idrossifenil-O- β -D-glucopiranoside che si distingue per rotazione ottica e specificità di inibizione dal suo isomero 4-idrossifenil-O- α -D-glucopiranoside generalmente chiamato α -arbutina (Sugimoto et al., 2007). I due isomeri,

dunque, mostrano diversi specificità nei confronti delle polifenolossidasi. Infatti, l' α -arbutina, a differenza del suo isomero β , non inibisce la PPO fungina, d'altra parte però, contrasta molto più efficacemente della β -arbutina l'attività della tirosinasi derivata dal melanoma di topo (Funayama et al., 1995). Hori et al. (2004) lavorando con tirosinasi fungina ha ipotizzato che l'azione inibitrice dell'arbutina potrebbe essere basata sulla capacità di questa sostanza di legarsi come un substrato analogo ad un monofenolo alla forma met della PPO, formando in questo modo un complesso inattivo. Inoltre hanno dimostrato che l'associazione dell'arbutina con l'acido L-ascorbico ha un effetto positivo contro l'imbrunimento. La combinazione di queste due sostanze si è rivelata utile soprattutto in condizioni di concentrazioni di ossigeno limitate. Si deve comunque ricordare che l'arbutina, seppur molto lentamente, è anch'essa ossidata dalla PPO come un substrato monofenolico. L'ossidazione dell'arbutina viene accelerata non appena si rende disponibile come cofattore una certa quantità L-Dopa. In ogni caso, l'ossidazione enzimatica dell'arbutina non produce sostanze colorate rilevabili (Hori et al., 2004). È stato testato come il succo di cipolla sia in grado di inibire l'attività polifenolossidasi di fette e succo di mela. Hosoda e Iwahashi (2002) riportano che l'attività della PPO è stata ridotta dell'80% in seguito all'immersione di fette di mela in una soluzione acquosa contenente cipolla. Come studiato da Kim et al. (2007) l'attività inibitoria del succo di cipolla aumenta in funzione dell'aumento della temperatura e del tempo. Inoltre, la sua efficacia è probabilmente dovuta alla sua azione inibitoria nei confronti della PPO.

La carragenina, una gelatina costituita essenzialmente da sali di calcio, di potassio, di sodio e di magnesio di esteri solforici dei polisaccaridi, ed estratta dalle alghe rosse, viene largamente utilizzata in campo alimentare.

Tong e Hicks (1991) hanno studiato il suo effetto inibitorio nei confronti della PPO. È risultato che l'attività polifenolossidasi, in presenza di carragenine, da sole (0,25%) o in combinazione con acido citrico (0,5%), viene inibita quasi al 100%.

La ricerca di inibitori naturali ha portato alla scoperta di una serie di composti attivi, fra cui i calconi e derivati (Nerya et al., 2004). I calconi sono pigmenti vegetali gialli, appartenenti al gruppo dei flavonoidi, che hanno mostrato una discreta capacità inibitoria nei confronti della PPO. Uno studio relativo all'azione di questi composti, ha dimostrato che il numero e la posizione dei gruppi ossidrilici nell'anello A e B dei calconi . influenzano la loro attività inibitoria, anche se l'esatto meccanismo di azione non è ancora ben chiaro (Nerya et al., 2004; Khatib et al., 2005). Tuttavia, è stata analizzata l'effettiva possibilità di fare uso di tali composti, senza alcun esito positivo (Nerya et al., 2006).

Il ghiaccio fluido (*flow ice*) è un sistema bifasico consistente in piccoli cristalli sferici di ghiaccio circondati da acqua di mare, il tutto mantenuto a una temperatura inferiore a 0°C. Si tratta di un'innovativa tecnica utilizzata per la conservazione dei prodotti ittici e presenta due rilevanti caratteristiche: un più rapido tasso di congelamento rispetto alle tecniche classiche per effetto di una maggiore capacità di scambio termico; danno causato ai tessuti dei prodotti alimentari inferiore rispetto a quello causato dalle comuni tecniche di congelamento. A ciò si aggiunge che la completa copertura del pesce con il ghiaccio fluido permette un'ottima protezione dei tessuti dalla disidratazione e dall'ossidazione. Di conseguenza il flow ice può essere combinato con ozono o altri agenti anti imbrunimento ed essere utilizzato quindi anche come mezzo di prevenzione della melanosi (Losada et al., 2004). Tuttavia, quando il flow ice è applicato per la conservazione o il trattamento a bordo di crostacei, esso può accelerare le reazioni di

ossidazione e quindi la melanosi, per cui in questi casi l'aggiunta di inibitori al ghiaccio liquido è una vera e propria necessità.

Aubourg et al. (2007) hanno condotto uno studio sui trattamenti post cattura effettuati sugli scampi confrontando i trattamenti classici con un congelamento con flow ice preceduto da trattamento preliminare con metabisolfito di sodio. Questo studio ha dimostrato che, oltre ad avere dei migliori risultati in termini di conservazione, il flow ice con metabisolfito permette di ottenere una buona prevenzione della melanosi con l'utilizzo di quantità di inibitore nettamente inferiore a quelle utilizzate nei comuni trattamenti.

4. LAVORI PUBBLICATI E IN CORSO DI STAMPA

Durante il corso del dottorato XXV ciclo sono stati realizzati i seguenti lavori:

4.1) 9 Tesi di laurea come RELATRICE

4.2) Stesura del testo “Esercizi di Operazioni Unitarie” (data pubblicazione 2011) come COAUTRICE.

4.3) Partecipazione CONGRESSI INTERNAZIONALI (lavori pubblicati negli atti ai congressi)

4. 4) Pubblicazioni

4. 5) Seminari e Fiere

4. 1 RELATRICE TESI

1) Ricerca e valutazione dei principali indici di freschezza enzimatici di alici (*Engraulis engrasicolus* Linneus, 1758) e sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) del Mediterraneo.(Fsp. 1)

Tesi Sperimentale

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; Prof. Riccardo N. Barbagallo; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Antonio Gibilisco

2) Evoluzione di attività enzimatiche degenerative nella conservazione e trasformazione del pesce azzurro: alici e sardine (Fsp. 2)

Tesi Sperimentale

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; Prof. Riccardo N. Barbagallo; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio** Tesista: Antonio Pastanella

3) Imbrunimento enzimatico: confronto in matrici alimentari di origine animale e vegetale (Fsp. 3)

Tesi di Laurea

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Jessica Genovese

4) Imbrunimento enzimatico del gambero rosa (Parapenaeus Longirostris): Tecniche di conservazione e di inibizione per contrastare il suo effetto (Fsp. 4)

Tesi di Laurea

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Valeria Tignino

5) Parallelismo sull'efficacia dell'Omega 3 e Omega 6 nei prodotti ittici e negli integratori alimentari.(Fsp 5)

Tesi di Laurea

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Ivana Giuffrè

6) Comparto ittico Siciliano: differenze qualitative, commerciali, nutrizionali del pesce azzurro locale giornaliero del Mediterraneo. (Fsp 6)

Tesi di Laurea

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Francesco Papa

7) Tecniche per il Prolungamento della Shelf Life di Uva Da Tavola Di IV Gamma.

Tesi sperimentale (in corso)

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; Prof. Giuseppe Muratore. **Dott.ssa**

Giuseppina R. A. Alberio Tesista: Giardina Giovanni

8) Evoluzione di attività enzimatiche degenerative nella conservazione e trasformazione Parapeneus Longirostris

Tesi sperimentale (in corso)

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; Prof. F. Foti **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Elisa Scarinci

9) Caratteizzazione della tirosinasi nel Parapeneus Longirostris

Tesi di laurea (in corso)

Relatori Prof. Giovanni Spagna ; **Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio**

Tesista: Dario Valvo

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI AGRARIA
Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari
Dipartimento di Orto-Floro-Arbicoltura e Tecnologie Alimentari
(DOFATA)

Antonio Pastanella

**Evoluzione di attività enzimatiche degenerative
nella conservazione e trasformazione del pesce
azzurro: alici e sardine**

—————
Tesi sperimentale di Laurea
—————

Relatori
Prof. Riccardo N. Barbagallo
Prof. Giovanni Spagna
Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio

Anno Accademico 2009-2010

Frontespizio. 1 Tesi sperimentale

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI AGRARIA
Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari
Dipartimento di Orto-Floro-Arboricoltura e Tecnologie Alimentari
(DOFATA)

Antonio Pastanella

**Evoluzione di attività enzimatiche degenerative
nella conservazione e trasformazione del pesce
azzurro: alici e sardine**

—————
Tesi sperimentale di Laurea
—————

Relatori
Prof. Riccardo N. ~~Rafagallo~~
Prof. Giovanni Spagna
Dott.ssa Giuseppina R. A. Alberio

Anno Accademico 2009-2010

Frontespizio. 2 Tesi sperimentale

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI AGRARIA

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari

(DISPA)

Jessica Genovese

**Imbrunimento enzimatico: confronto in matrici
alimentari di origine animale e vegetale**

Elaborato finale

Relatori

Prof. Giovanni Spagna

Dott.ssa Giuseppina R.A. Alberio

Anno Accademico 2010-2011

Frontespizio. 3 Tesi di laurea

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI AGRARIA

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agricole Alimentari

(DISPA)

Valeria Tignino

**Imbrunimento enzimatico del gambero rosa (*Parapenaeus Longirostris*):
Tecniche di conservazione e di inibizione per contrastare il suo effetto**

Elaborato finale

Relatori

Prof. Giovanni Spagna

Dott.ssa Giuseppina R. A. Alborio

Anno Accademico 2010-2011

Frontespizio. 4 Tesi di laurea

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI AGRARIA
Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Dipartimento di Orto-Flora-Arboricoltura e Tecnologie Alimentari (DISPA)

Ivana Giuffrè

**Parallelismo sull'efficacia dell'Omega 3 e Omega 6 nei
prodotti ittici e negli integratori alimentari.**

Elaborato Finale

Relatori

Prof. Giovanni Spagna

Dott.ssa Giuseppina R. A. Albano

Anno Accademico 2011-2012

Frontespizio. 5 Tesi di laurea

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari

(DISPA)

PAPA FRANCESCO

Comparto ittico Siciliano: differenze qualitative, commerciali, nutrizionali del pesce azzurro locale giornaliero del Mediterraneo.

Elaborato finale

Relatori

Prof. Giovanni Spagna





Dott.ssa Giuseppina R.A. Alberio

Anno Accademico 2011-2012

1

Frontespizio. 6 Tesi di laurea

4.2 COAUTRICE LIBRO

<p>progetto grafico INTERIOR DESIGNER Igor Nastasi</p>	<p>02 ESERCIZI</p> <p>Tecnologie Alimentari: Operazioni Unitarie</p>	<p>VOI ESERCIZI</p>  <p>Tecnologie Alimentari: Operazioni Unitarie</p> <p>Giovanni Spagna Giuseppina R. A. Alberio</p>    <p>Edizione limitata* in occasione del ventennale dei corsi di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari</p> <p>LIBRERIA CULC</p>
--	---	--

4.3 CONGRESSI INTERNAZIONALI : ATTI AI CONGRESSI

4.3.1 Nel corso del congresso internazionale **SLIM 2012: 5th Shelf Life Meeting&Worshop on Food Packaging Safety** sono stati presentati 4 lavori:

- 1) **Alberio G.R.A.**, Todaro A., Spagna G., Allegra V, Zarbà S. (2012) The market for alternative species of shrimp processe to increase the shelf-life. *Italian Journal of Food Science (IJFS)*
- 2) Barbagallo R.N, **Alberio G. R. A.**, Spagna G. (2012) Preservation of pink shrimp (*Parapenaeus longirostris* Lucas, 1846) from tyrosinase activity assayed in vitro with some melanosis inhibitors. *Italian Journal of Food Science (IJFS)*
- 3) Barbagallo R.N, **Alberio G. R. A.**, Spagna G. (2012) Tyrosinase change in ready-to-use marinades anchovies (*Engraulis engrasicolus* Linneus, 1758) and sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) . *Italian Journal of Food Science (IJFS)*
- 4) Allegra V, Zarbà S., **Alberio G. R. A.**, Spagna G., Bono G. (2012) The implications on the "shelf life" of international trade flows of shrimp in Italy. *Italian Journal of Food Science (IJFS)*



**5th Shelf Life International Meeting &
Workshop on Food Packaging Safety**

**Changwon Convention Center, Changwon,
South Korea
May 30-June 1, 2012**

**The Korean Society of Food Science &
Nutrition, Busan,
South Korea**

**GSICA (The Italian Scientific Group for
Food Packaging)**



THE MARKET FOR ALTERNATIVE SPECIES OF SHRIMP PROCESSED TO INCREASE THE SHELF-LIFE.

G. R. A. ALBERIO, A. TODARO, G. SPAGNA, V. ALLEGRA, A. S. ZARBÀ

DISPA, Department of Agricultural and Food Science, University of Catania, Italy
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari e Ambientali (G.e.S.A) E-mail:
giusialberio@yahoo.it

ABSTRACT

A reason that has put at the center of attention the crustaceans has been the growing demand for fast food products to which these fishes are particularly suitable. This paper proposes for the first time the use of the species of shrimp *Parapeneus Longirostris* of the Mediterranean sea to realize precooked trays of V range and analyze the evolution of the process of melanosis with respect to commercial products in general coming from the Atlantic Ocean.

Keywords : *Parapeneus Longirostris*, shelf-life (SL), market , PPO , precooked.

INTRODUCTION

In recent years, eating habits have privileged the "pharmafood" products to prevent any diseases. Today the world production of shellfish has increased, recording since the 1980s, an unprecedented boom. This highlights also the dependence of European Mediterranean States from third countries, in particular in other geographical areas, although crustaceans have minor impact on the level of Community trade. Since under this trade category, the total production of shrimp from fish in the Mediterranean Sea (especially those of Italy) proved to be insufficient for a increasing Community market demand. It is of some interest to understand the trends in trade flows in the Mediterranean area, in which the greater supply of such products (fresh and/or "processed") for the Community markets takes place and the *Parapeneus longirostris* feeds traffic flow represented mostly by "transformed" (frozen) product, and the corresponding data that track the trend will be examined here using the international official statistical source of FAO. The aim of the working group is to contribute to the development of Mediterranean fisheries through research and technology transfer of new high-value production processes aimed at sustainable exploitation of fisheries resources and the maximization of the value of the fish. This paper proposes for the first time the use of the species of shrimp *Parapeneus Longirostris* of the Mediterranean and analyze the evolution of the process of melanosis with respect to commercial products in general coming from the Atlantic Ocean. The enzyme polyphenol oxidase (PPO) is responsible for the process of melanosis in shrimp extracts of *Parapeneus Longirostris*. Numerous studies aim to reduce the effects of melanosis using a wide range of treatments inhibitor (Buta et al., 2001 ; Liao et al., 1988; Chinivasagam et al., 1998). It is shown that the effectiveness of the treatments is influenced by the type of the species of the crustacean and the stage of intermuda to which they face.

MATERIAL AND METHODS

The *Parapeneus longirostris* was caught with bottom trawls on sandy-muddy bottoms at depths between 50-500 meters of the Tyrrhenian coast. Shrimp were selected with a size of 16-17 cm, very clear color tending to pink-orange and were discarded those who had trauma from capture. Each sample had a very pronounced rostrum with seven dorsal teeth. The enzymatic analysis included the determination of tyrosinase

spectrophotometrically in according to the method proposed by Leonard et al. (1985). The enzymatic activity was expressed as the change in absorbance at 490 nm per minute per mg protein. The market analysis of *Parapenaeus longirostris* (frozen), and corresponding data that trace the trend will be examined here using the official statistical source FAO International.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1-a shows the enzymatic activity of tyrosinase in commercial samples of shrimp currently available on the local market of the Mediterranean. The heat treatment (blanching) suffered by the minimally processed product with *Tropical Shrimp* shrimp has completely inhibited the enzyme activities differently to those obtained with *Vannamei* *Penaeus* and *Pandalus Borealis*. In order to analyze the products currently available on the market trends have been studied regarding the traffic streams of the crustaceans. In the Mediterranean basin is realized intensive trade in frozen Crustaceans, largely as a result of trends that characterize the group "shrimps and prawns".

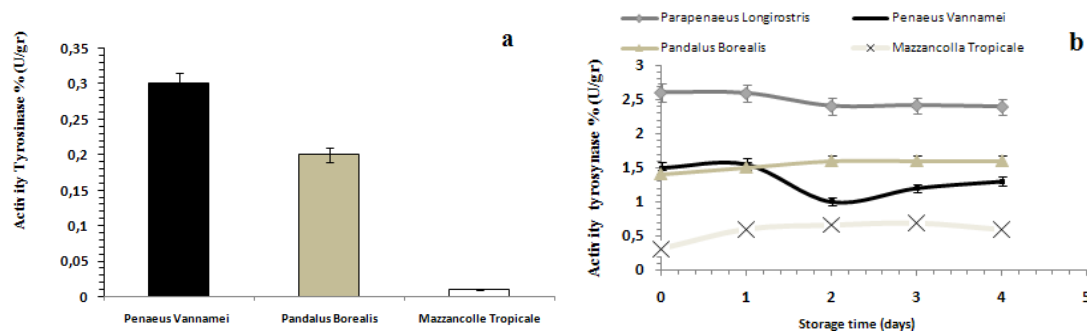


Fig. 1 Activity of tyrosinase in commercial samples (a) and on different species during the freezing (b).

In reality, according to the FAO trade consists in mainly movements in import, so much so that the trade balance of all countries bordering the Mediterranean Sea, was negative; as it is also shown in the balance normalized. This negative balance, however, in the evolution intervened in the last decade, as can be observed from table 1, appears to be increasing by +37% considering all Crustaceans, +46% examining the group the "shrimps and prawns". From the examination of the exposed data, the consumption of "shrimps and prawns" frozen in the Mediterranean would be realized therefore with product of other origin, for the Most oceanic. From market analysis can be seen that however, for certain species belonging to this large group of crustaceans, the production obtained in the Mediterranean, would feed streams of traffic over the same area of the Mediterranean. In this situation the species *Parapenaeus longirostris* is found, in fact the amount of frozen product prevails on its trade balance, a situation that occurred mostly during the decade examined, in fact, against a steady increase in the product realized there is a loss in the trade balance. In particular, *Parapenaeus longirostris* captures in Mediterranean Sea, always with reference to FAO statistic, is mainly used fresh, de facto, only 40% is the share of the production of frozen product. Indeed, as shown in table 2 between the 2001/2003 and 2007/2009, the catches of 30.7 thousand tons, coming to 42.6 thousand tons are brought, the frozen product frozen from 15.1 thousand to 17.9 thousand tons tonnes. At the same time period, the trade balance gradually decreases from 12.2 thousand tons to 9.2 tons.

Commodity	2001 - 2003		2004 - 2006		2007 - 2009
	ton		ton		ton
	<i>Import</i>				
Crustaceans	391.874		467.267		526.661
	<i>100</i>		<i>119</i>		<i>134</i>
Shrimps, prawans	256.778		322.292		362.354
	<i>100</i>		<i>126</i>		<i>141</i>
(b)/(a)*100	65,5		69,0		68,8
	<i>Export</i>				
Crustaceans	71.367		75.465		88.682
	<i>100</i>		<i>106</i>		<i>124</i>
Shrimps, prawans	45.183		46.995		54.445
	<i>100</i>		<i>104</i>		<i>121</i>
(b)/(a)*100	63,3		62,3		61,4
	<i>Trade balance</i>				
Crustaceans	- 320.507		- 391.802		- 437.979
	<i>100</i>		<i>122</i>		<i>137</i>
Shrimps, prawans	- 211.595		- 275.297		- 307.909
	<i>100</i>		<i>130</i>		<i>146</i>
	<i>Balance Normalized (%)</i>				
Crustaceans	-69,2		-72,2		-71,2
Shrimps, prawans	-70,1		-74,5		-73,9

Table 1 - Development of trade Crustaceans, frozen, and frozen shrimps and prawns in the countries of the Mediterranean Sea

Commodity	2001 - 2003	2004 - 2006	2007 - 2009
	ton	ton	ton
Capture production	30.722	40.479	42.637
	<i>100</i>	<i>132</i>	<i>139</i>
Frozen production	15.139	14.728	17.851
	<i>100</i>	<i>132</i>	<i>139</i>
frozen/captured (%)	49,3	36,4	41,9
Import	15.716	13.457	11.091
	<i>100</i>	<i>86</i>	<i>71</i>
Export	3.493	3.077	1.881
	<i>100</i>	<i>88</i>	<i>54</i>

Trade balance	- 12.223	- 10.379	- 9.210
	100	85	75
Balance Normalized (%)	-63,6	-62,8	-71,0

Table 2 - Distribution of production *Parapeneus longirostris* in the countries of the Mediterranean Sea (our calculations based on FAO statistic).

In Figure 1-b shows the relative activity of tyrosinase minimally treated with 4 different fish species. The tyrosinase showed a continuing increase in the species *Pandalus Borealis* until the third day of storage that we set as the limit of shell-life. The activity of tyrosinase *Parapeus Longiristris*, even high than the other species, has been maintained constant in time. It is observed that the main alterations detected in the trays minimally processed are related to the chromatic variations and loss of texture or juiciness. The main issues related to engineering and manufacturing technique are related to tuning and optimization of blanching and portioning of shrimp. The technology used in this preliminary study does not significantly impede the physiological processes of melanosis previously identified as the main qualitative issues. In conclusion, from the data obtained, the species *Parapeneus Longirostris* could be used to obtain minimally processed and pre-cooked shrimp products able to increase the shelf-life (SL) as an alternative to commercial products.

REFERENCES

- Buta J.G., Moline H.E. 2001. Prevention of browning of potato slices using polyphenoloxidase inhibitors and organic acids. *J. Food Qual.* 24: 271–282.
- Chinivasagam H.N., Bremner, H.A., Thrower, S.J., Nottingham S.M. (1998). Spoilage pattern of five species of Australian prawns: deterioration is influenced by environment of capture and mode of storage. *J. Aquat. Food Prod.* 5: 25–50.
- Leonard, C.; Saderhnl, K.; Ratcliffe, N.A. (1985) Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Bk&rus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15:803-810;.
- Liao M.L., Seib P.A. 1988. A stable form of vitamin C: L-ascorbate 2-triphosphate. Synthesis, isolation, and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38: 355–366.

4.3.2 Nel corso del congresso internazionale **XXVII WORKSHOP ON THE DEVOLPMENT IN THE ITALIAN PHD RESEARCH ON FOOD SCIENCE TECNOLOGY AND BIOTECNOLOGY CESENA 21 SETTEMBRE 2012** è stato presentato il seguente lavoro pubblicato negli atti al congresso e presentato come presentazione orale in lingua inglese:

1) **Giuseppina Rosaria Antonella Alberio**: Analytical investigations and enzymatic for the assessment of quality of seafood local daily of Mediterranean.

SESSION V (September 21st 2012, 09:30-11:10)

Session FOOD PACKAGING (Aula A)

Chairpersons: Moresi M., Piergiovanni L.

- 09.30-09.50 **Marwa Al-Moghazy** (Univ. of Modena and Reggio Emilia)
Development of Antimicrobial Packaging Films
- 09.50-10.10 **Carlo Alessio Cozzolino** (Univ. of Sassari and Univ. of Milan)
Modulating the Release Properties of Active Compounds from Packaging Materials by a Physicochemical/Nanotechnology Approach
- 10.10-10.30 **Stefano Molinaro** (Univ. of Udine)
Bio-based Food Packaging: Influence of Formulation and Processing on Functional Properties
- 10.30-10.50 **Fei Li** (Univ. of Milan)
Development of Nano-Material for Food Packaging
- 10.50-11.10 **Laura Introzzi** (Univ. of Milan)
Development of High Performance Biopolymer Coatings for Food Packaging Application

Session FOOD ANALYSIS AND QUALITY (Aula Magna)

Chairpersons: Esti M., Poiana M.

- 09.30-09.50 **Gianluca Picariello** (Univ. of Naples)
Advanced Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Food Lipidomics
- 09.50-10.10 **Stefania Valenzano** (ISPA-CNR, Bari)
Development and Validation of Rapid Methods for the Determination of Mycotoxins in Food Products
- 10.10-10.30 **Lucia Gambacorta** (ISPA-CNR, Bari)
Development and Validation of Biomarkers to Monitor Human and Animal Exposure to the Principal Mycotoxins
- 10.30-10.50 **Eleonora Laura De Paola** (Univ. of Modena and Reggio Emilia)
Study and Development of Fast Analytical and Instrumental Methods for Food Quality Control in Animal and Vegetable Complex Matrices
- 10.50-11.10 **Giuseppina Alberio** (Univ. of Catania)
Analytical and Enzymatic Investigations for the Assessment of Quality of Locally Caught Fresh Seafood of Mediterranean

XVII WORKSHOP ON THE DEVELOPMENTS IN THE ITALIAN PHD RESEARCH ON FOOD SCIENCE TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

CESENA, 19-21 SETTEMBRE 2012

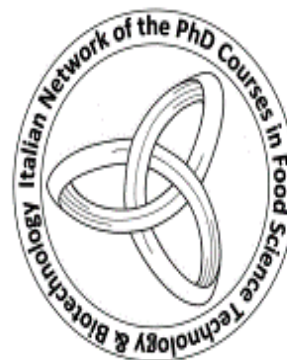
Il Campus di Scienze degli Alimenti di Cesena, Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna, organizza a Cesena dal 19 al 21 settembre 2012 la XVII edizione del

Workshop

“Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology
and Biotechnology”



**Alma Mater Studiorum
Polo Scientifico Didattico di Cesena**



**Italian Network of the PhD Courses
in Food Science Technology &
Biotechnology**

Analytical and Enzymatic Investigations for the Assessment of Quality of Locally Caught Fresh Seafood of Mediterranean

Giuseppina Rosaria Antonella Alberio (giusialberio@yahoo.it)

Dip. di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA) Università degli Studi di Catania, Italy

Tutor: Prof. Giovanni Spagna

This work has as object the evaluation of the quality and freshness of a particular fish species widely distributed in Mediterranean Sea: that of anchovies and sardines. The evaluation was also extended to a type of crustacean very common in the waters of this sea: the pink shrimp. The analytical parameters studied are intended to identify the level of impairment suffered by the product, the causes of that damage as well as some possible solutions to the problem as an alternative to those established by years of research and consecrated by the scientific literature on the topic.

Indagini analitiche ed enzimatiche per la valutazione di qualità del *pesce locale giornaliero del Mediterraneo*

Questo lavoro ha come oggetto la valutazione della qualità e freschezza di una particolare specie di pesci ampiamente diffusa nel Mediterraneo: quella delle alici e sardine. La valutazione si estende anche a un tipo di crostaceo molto frequente nelle acque di questo mare: il gambero rosa. I parametri analitici studiati hanno lo scopo di individuare il livello di alterazione subito dal prodotto, le cause che lo hanno provocato nonché alcune possibili soluzioni al problema in alternativa a quelli consolidati in alternativa a quelli consolidati da anni di ricerca e consacrati dalla letteratura scientifica sull'argomento.

Key words: Anchovie (*E. Engrasilocus*); Sardine (*S. Pilchardus*); *Parapenaeus Longirostris*; freshness; frozen/tawed.

1. Introduction

The Mediterranean is one of the richest seas in the world for the presence of millions of species of fish, including bone and cartilage which fully comply with current nutritional trends. In recent years it has increasingly highlighted the importance of economic, commercial and nutritional consumption of freshly caught fish available daily in the fish markets of the area and sold as minimally processed products. In the Gulf of Catania, the main seafood local daily are represented by species of small blue fish like sardines (*S. pilchardus*) and anchovy (*E. Engrasilocus*) and a particular type of shellfish species represented by the pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). These products present regarding the economic, nutritional and commercial property important characteristics. The blue fish (anchovies and sardines) is characterized by a composition of fats rich in unsaturated compounds ($\omega 3$ - $\omega 6$) that improve blood fluidity and prevent cardiovascular disease (Daviglius *et al.*, 1997; Alberio *et al.*, 2012a; Allegra *et al.* 2012). This nutritional composition is influenced by conditions of the marine ecosystem (38-39% salinity of the sea; average temperatures between 12-24°C), period (winter and summer) and method of capture craftsmanship. This is done with encircling nets (purse seines) through the use of light sources (lampare) which give the meat of these species peculiar qualitative characteristics. In fact, once captured these species suffer death by decapitation due to the continuous attempt to escape that results in post-mortem, in high blood levels that give the muscles of the species precious qualitative and sensory characteristics (Alberio *et al.* 2012b). With regard to species of pink shrimp (*Parapenaeus Longirostris*) it presents from the nutritional point of view the same characteristics with the exception of the high in cholesterol content found mostly in the non-edible portion (the pereion). The capture and the period of capture with purse seine nets permits daily availability both for the consumer, and to the transformation of innovative products minimally processed (Alberio *et al.* 2012e). The reference standard of seafood local daily is very complex (Sciacca *et al.*, 2011) and seeks to protect the fundamental elements that influence consumer choice. These fish products, in fact, being consumed fresh, undergo various problems such as physical trauma that determine the onset of microbial flora on the skin, gill and intestine due to micro-organisms (Jiang *et al.*, 1990; Koohmaraie, 1996; Koutsoumanis and Nychas, 1999). These microorganisms, disappeared natural defenses of the fish and solved the rigor mortis, are able to multiply actively and invade the tissues with the ability to release proteolytic enzymes (calpains) and autocatalytic (Aoki *et al.*, 1997). These alterations, catalyzed by

enzymes, cause a rapid decay of the sensory and nutritional quality OF products which inevitably results in a reduction of the shelf-life of the same. Another problem to which these fish undergo is the hydrolysis of structural proteins substances, lipids and phospho-lipids and their subsequent oxidation with enzymes of the lipoxygenase pathway (LOX) and in some cases by polyphenol oxidase (PPO), whose final result is the alteration of color, the development of off-flavors, loss of consistency, which make the fish not attractive from the sensory point of view. Unlike, one of the main problems crustaceans face is melanosis correlated to the different phases in intermuda. Numerous studies aim to reduce the effects of using a wide range of inhibitor treatments (Buta and Moline, 2001; (Walker, 1977). (Liao *et al.*, 1988). (Whitaker, 1972; Otwell and Marshall, 1986; Chinivasagam *et al.*, 1998). And it is shown the effectiveness of the treatments is influenced by the type of the species of the crustacean and the stages of intermuda to which they face (Leung *et al.* 1996; Alberio *et al.*, 2012c; Barbagallo et al 2012 a,b).

2. Materials and Methods

Different sets of samples of *seafood local daily* were collected, captured and analyzed, in particular:

- 1) 114 Anchovies (*E. Engrasilocus*) captured directly from the Italian ships with night fishing with encircling nets (purse seines);
- 2) 122 Sardine (*S. pilchardus*) caught directly from the Italian ships with night fishing by seine;
- 3) 92 commercial anchovies (*E. Engrasilocus*);
- 4) 92 commercial Sardine (*S. pilchardus*);
- 5) 101 Pink Shrimp (*Parapenaeus longirostris*) captured directly from the Italian ships with night fishing by trawlers.

Immediately after the fishing the samples were placed in tanks with salt water and ice to reach thermal shock. The determination of total protein was carried out with the method proposed by Bradford (1976); According to the method developed by Ho *et al.* (1999) has been carried out the determination of calpain and cathepsin. In order to verify the freshness of the commercial samples was carried out the determination of alfa-glucosidase, B-GAL, B-NA in accordance with the method of Duflos *et al.* (2002) and Sozzi *et al.* (1996). Sensory analysis in accordance with the method of Antrade *et al.* (1997) and Yoshioka and Kitamikadom (1983). Statistical processing of data was performed using the program STATISTICA (ver. 6.1).

3. Results and Discussions

3.1 Verification of freshness index

The morphological-biometric reliefs on samples analyzed immediately after capture, allowed to highlight that the average weight of the types of fish analyzed did not show significant differences. The average weight of anchovy was around 23 g (22.8 g min - max 30.0 g) of the sardines was around 25 g (23.4 g min - max 30.0 g), average length of anchovies 6-9 cm, sardines 10-15 cm. It was observed that on 60 anchovies, more than half (35) showed post-mortem trauma from capture, otherwise only 15 samples of sardines showed stress from capture. This difference among interspecies could be due to increased tissue fragility of anchovies. Overall, the samples had injuries charged to external skin, fins and head (eye-operculum area). In particular, such damage in the samples of anchovies were represented by obvious blood suffusions around the eye, obvious mutilation of the rear fins and in some samples of the entire head. In sardines there were obvious cuts and bruises in the head and 4 samples had at the time of the process of gutting, broken vertebra. Such damage would be caused by crowding of fish around the net and their repeated attempts to escape capture. Through the measure of the parameter of pH it is possible to estimate the state of stress to which the fish has been subjected to at the moment of capture, and in a muscle just cut, also provides a useful method for estimating levels of lactic acid released and then the variations pH and acidity. In the literature, the average values of pH of sardines and anchovies are respectively 6.11 and 6.18 (Sigholt *et al.*, 1997).

In order to monitor this phenomenon in association with stress from capture was analyzed the activity of proteolytic enzymes such as calpain. Figure 1 shows the evolution of the activities of calpain on freshly caught product. The sardines had significantly higher values of activity compared with anchovies, no significant differences in activity were observed on the product under stress from capture. At the beginning of the experiments both anchovies and sardines have presented Quality index (QI) very low which was followed by a rapid increase across the Entire period of storage. This has allowed us to classify both samples belonging to the EXTRAcategory that is as fresh product (Regulation n.2406/96/CEE). The process of conservation of anchovies instead determines a considerable increase in the IQ already after 7 days of storage which corresponds to an apparent loss of gloss of the skin, presence of turbid mucus or eye totally opaque. These visual and sensory evaluations were further expanded by more detailed analysis of skin color, eye, and the process of bleeding (Alberio *et al.*, 2012b).

The skin of anchovy subjected to color analysis bilocalizzata before and during the preservation process, confirmed the values obtained for IQ and reduced opacity, after freezing, it is associated with visible changes in skin color straw yellow around to 21 days. The eye subjected to further analysis according to the method of Yoshioka *et al.* (1983), confirmed the data of IQ is that for anchovies, sardines.

3.2 Activities of enzymatic

Furthermore, the fillets of anchovies and sardines have been characterized with respect to lysosomal-enzyme activities (AG, B-GA, B-NA) in both the fresh product and the frozen product. The AG increases more in sardines and less in the anchovies, the B-GA, on the contrary, it is not useful to differentiate fresh fish from frozen with regard to the sardines, while for the anchovies is useful. Instead AG allows to distinguish in both species, the fresh product from frozen. The B-GA could be used as a marker of freezing occurred only for the anchovies, while you could use the AG for sardines. So the AG confirms the data in literature, because you appreciate his remarkable increase regardless of species (Figure 1)

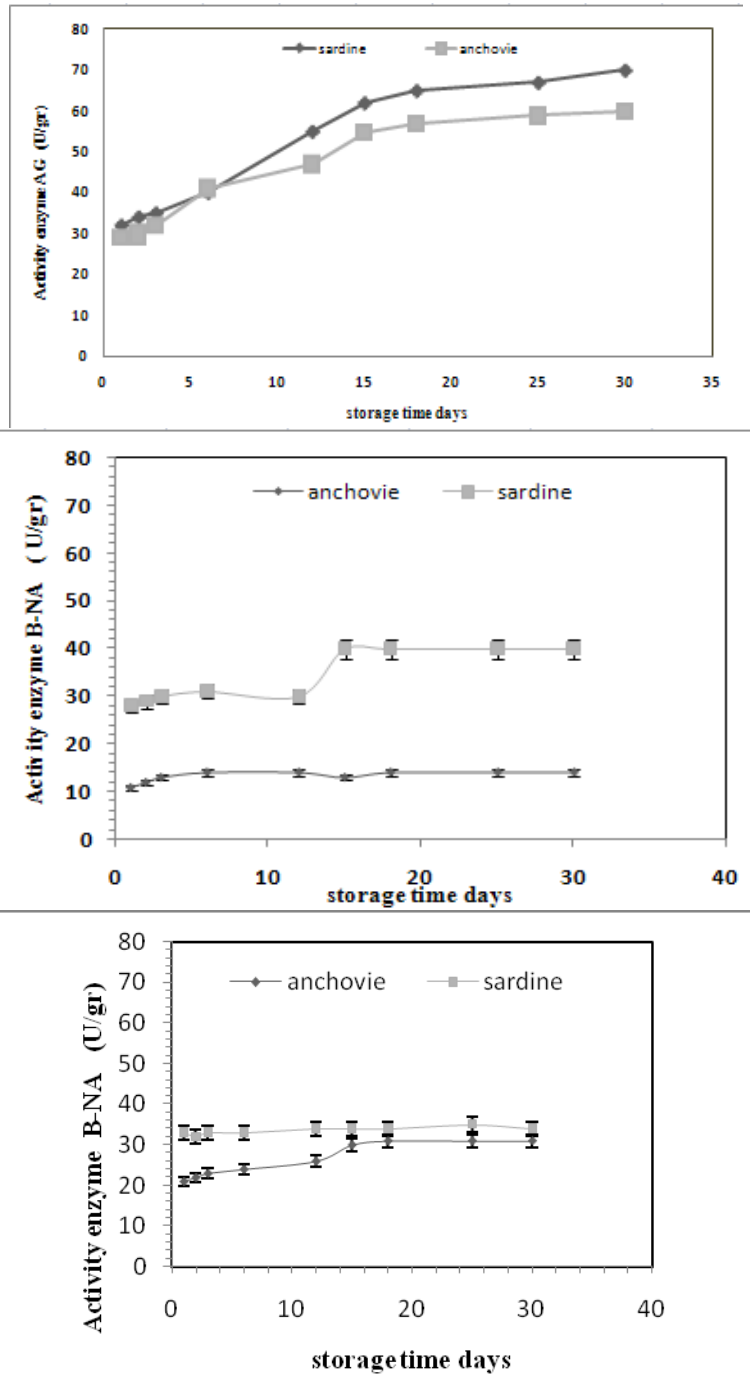
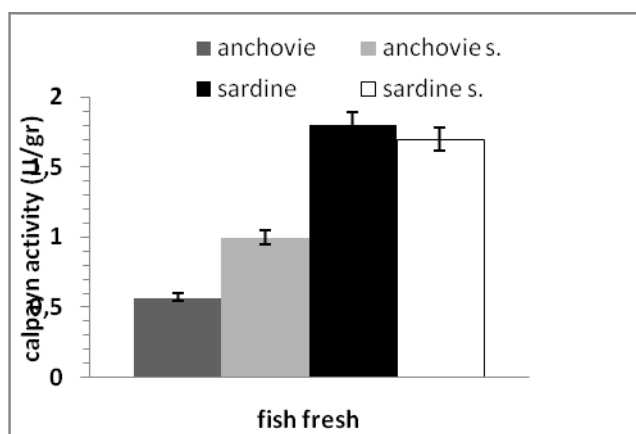


Figure 1 Evolution of the enzymatic activity lysosomal.

The main conclusions to be drawn are as follows: PPO activity tended to decrease in both processed products compared to the fresh product, in terms of specific activity, the process of marinating inhibited PPO activity more intensely than the product simply treated with citric acid (100% reduction in the anchovies, 39.6 and 59.02% for sardines, respectively, at T2 and T3), the lowest activities were found the 2nd day of cold storage for anchovies and in respect of sardines, in terms of exclusive treatment with citric acid, minimal activity was found for sardines marinated in 3rd day of cold storage, the maximum in correspondence of T2. Ultimately, the determination of PPO can not be

used as an "index of freshness" to discriminate between fresh and thawed fish, but it is well suited as an index of freshness of processed fish products. This enzymatic parameter is studied in different species of fish compared with anchovies and sardines, especially in crustaceans, which are more sensitive to oxidation. Phenomenon related to it and alteration of pH is also the so-called "gaping" which consists in breaking of the fish fillets (Figure 2).

Figure 2 Evolution of the enzymatic activity of calpain on freshly caught product (s anchovie.: Anchovie stress; sardines s.: Sardines stress)



4. Conclusions and Perspectives

This study, therefore, allows the following conclusions: Fishing with handicraft systems (purse) to capture the blue fish in the Mediterranean Sea is quite suitable for the preservation of the status of this type of fresh fish in the long term. The analyzes made have shown in anchovies and sardines a series of indices that demonstrate that the stress undergone by the species with this type of capture is normal and does not damage the subsequent operations of conservation. This on the one hand protect the interests of consumers of the products of the Mediterranean environment and opens a debate on the need to increase and preserve up to this type of fishing than the industrial one by providing the most appropriate economic and regulatory instruments.

5. References

- Alberio GRA, Giuffrè I, Sciacca AM, Spagna G (2012a) "Supplements blue" omega three in the Mediterranean: a valuable aid for the "scavengers" of our body. Submitted to the Journal Eurofishmarket.
- Alberio GRA, Barbagallo RN, Todaro A, Bono G, Spagna G (2012b) Use of lysosomal enzymatic activity for the differentiation of fresh small blue fish (anchovies and sardines) from frozen and thawed ones. Submitted to Meat Science.
- Alberio GR.A., Spagna G (2012c) The role of tyrosinase in matrices of animal and vegetable origin. Submitted Meat Science. rewie.
- Alberio GRA, Todaro A, Spagna G (2012d) Correlazione tra indici di freschezza e tecniche di pesca artigianali (a cianciuolo) di specie di pesce azzurro (*E encrasicolus*, *Spilchardus*). Submitted to congress AISSA.
- Alberio G.R.A, Todaro A., Spagna G., Allegra V, Zarbà S. (2012e) The market for alternative species of shrimp processe to increase the shelf-life. 5th Shelf Life International Meeting & Workshop on Food Packaging Safety Changwon Convention Center, Changwon, South Korea.
- Allegra V, Zarbà S., Alberio G. R. A., Spagna G., Bono G. (2012) The implications on the "shelf life" of international trade flows of shrimp in Italy. 5th Shelf Life International Meeting & Workshop on Food Packaging Safety Changwon Convention Center, Changwon, South Korea.
- Antrade A, Nunes ML, Batista I (1997) Freshness quality grading of small pelagic species by sensory analysis In: G Olafsdottotir and others (eds) Methods to determine the freshness of fish in Research and Industry;

- Proceedings of the Final Meeting of the concerted Action Evaluation of fish Freshness" AIR3CT942283 Nantes Conference, Nov 12-14, International Institute of Refrigeration Paris, France, P333.
- Barbagallo R.N, Alberio G. R. A., Spagna G. (2012a) **Preservation of pink shrimp (*Parapenaeus longirostris* Lucas, 1846) from tyrosinase activity assayed *in vitro* with some melanosis inhibitors** 5th Shelf Life International Meeting & Workshop on Food Packaging Safety Changwon Convention Center, Changwon, South Korea.
- Barbagallo R.N, Alberio G. R. A., Spagna G. (2012b) **Tyrosinase change in ready-to-use marinades anchovies (*Engraulis engrasicolus* Linneus, 1758) and sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792)** 5th Shelf Life International Meeting & Workshop on Food Packaging Safety Changwon Convention Center, Changwon, South Korea
- Bradford, M (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Buta JG, Moline HE (2001) Prevention of browning of potato slices using polyphenoloxidase inhibitors and organic acids. *J Food Qual* **24**: 271-282.
- Chinivasagam HN, Bremner, HA, Thrower, SJ, Nottingham SM (1998) Spoilage pattern of five species of Australian prawns: deterioration is influenced by environment of capture and mode of storage. *J Aquat Food Prod* **5**: 25-50.
- Daviglus ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB (1997) Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med* **336**: 1046-1053.
- Duflos G, Le Fur B, Mulak V, Becel P, Malle P (2002) Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *J Sci Food Agric* **82**: 1341-1245.
- Ho ML, Chen GH, Jiang ST (1999) Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation on mackerel surimi. *Fish Sci* **66**: 558-568.
- Jiang ST, Wang YT, Gau BS, Chen CS (1990) Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils. *J Agric Food Chem* **38**: 1464-1468.
- Koohmaraie M (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci* **43**: 193-201.
- Koutsoumanis K, Nychas GJ (1999) Chemical and sensory changes associated with microbial flora of mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Appl Environ Microbiol* **65**: 698-706.
- Liao ML, Seib PA (1990) A stable form of vitamin C: L-ascorbate 2-triphosphate synthesis, isolation, and properties. *J Agric Food Chem* **38**: 355-366.
- Leung P, Chow W, Duffey S, Kwan H, Gershwin M, Chu K (1996) IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacean and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol* **94**: 882-890
- Otwell WS, Marshall MR 1986 Report of the Florida Sea Grant Screenin alternatives to sulphiting agents to control shrimp melanosis (black spot). *Tech Paper* **46**: 1-10.
- Sciaccia AM, Alberio GRA, Belfiore M, Arena E, Fallico B (2011) Guida alla normativa nel settore ittico. Submitted to Ind. Alimentari.
- Sigholt T, Erikson U, Rustad T, Johansen S, Nordvedt TS, Seland A (1997) Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Food Sci* **62**: 898-905.
- Sozzi GO, Cascone O, Frascina AA (1996) Effect of a high-temperature stress on endo-mannase and a and galactosidase activities during tomato fruit ripening. *Postharvest Biol Technol* **9**, 49-63.
- Ueno RT (1997) Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res Int* **30**: 585-591.
- Walker JRL (1977) Enzymatic browning in foods Its chemistry and control. *Food Tech NZ* **12**: 19-25.
- Whitaker JR (1972) Polyphenol oxidase. Principle of enzymology for the food sciences, pp. 571-582
- Yoshioka K, Kitamikado M (1983) Differentiation of freeze-thawed fish from fresh fish by the examination of medulla of cristalline lens. *Bull Jpn Soc Sci Fish* **49**:151-154.

4.3.3 Nel corso del congresso internazionale **WORKSHOP AISSA 2012: LAND AND SOIL: THE ROLE OF AGRICULTURAL SCIENCES FOR THE DEVELOPMENT AND CONTROL OF THE DEGRADATION** : è stato presentato il seguente lavoro pubblicato negli atti al congresso.

1) **Alberio Giuseppina** A. Todaro, G. Spagna: Correlation between indices of freshness and techniques of artisanal fisheries (purse seine) of species of oily fish



Associazione Italiana Società Scientifiche Agrarie - AISSA
Università degli Studi di Palermo



X Convegno AISSA

*Territorio e suolo: il ruolo delle Scienze Agrarie per la valorizzazione
e il controllo del degrado*



28-29 novembre 2012
Aula Magna della Facoltà di Agraria
Viale delle Scienze, 90128 Palermo

Correlazione tra indici di freschezza e tecniche di pesca artigianali (*a cianciolo*) di specie di pesce azzurro (*E. encrasicolus*, *S. pilchardus*)

G.R.A. Alberio, A. Todaro[§], G. Spagna

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA) Università degli Studi di Catania, via S. Sofia, 98 95123 Catania.

[§]Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA) Università degli Studi di Palermo, viale delle Scienze, 13, 90128 Palermo.

Corresponding author: gspagna@unict.it gusialberio@yahoo.it tel. +390957580215; fax +390957141960

Introduzione.

Il Mediterraneo è uno dei mari più ricchi del mondo per specie animali e vegetali, con oltre 540 specie di pesci tra ossei e cartilaginei, di cui ben 75 specie endemiche, una parte delle quali rappresentate da “pesce azzurro”, definizione generica relativa a quei pesci che - presentano una colorazione dorsale tra il blu scuro e il verde-blu ed il cui ventre tende a presentarsi di colore argenteo. Appartengono alla categoria di pesce azzurro i seguenti prodotti ittici: aguglia, alaccia, alice, cicerello, costardella, lanzardo, pesce sciabola, sardina, sgombro, spratto, suro, a cui si aggiungono, di norma, anche, alalunga, alletterato, biso, lampuga, palamita, pesce spada e tonno. Tali specie sono pescate tramite metodi di pesca industriali. Tuttavia, per specie che vivono in piccoli banchi come le alici e le sardine viene praticata un sistema di pesca artigianale (o piccola pesca) che riguarda l'utilizzo di reti da posta fissa e piccole circuizioni. Il tipo più comune di rete da circuizione prende il nome di *cianciolo* ed è orientato alla cattura del pesce azzurro. I banchi di pesci vengono attirati, nelle ore notturne, in prossimità delle barche tramite l'impiego di fonti luminose (lampare). Quando il branco è ben compatto viene stesa intorno a esso una rete rettangolare con sugheri nella parte alta e piombi (lima di piombi) in quella inferiore. Il banco viene così circondato ed i pescatori chiudono subito la parte inferiore della rete che viene lentamente issata fino a quando i pesci sono concentrati in uno spazio piccolo e possono essere recuperati con un coppo. Il pesce azzurro appena pescato è un ottimo prodotto dal punto di vista economico e nutrizionale. Infatti tali specie ittiche hanno proprietà salutistiche interessanti quali elevata presenza di ω -3 e fosfolipidi, scarsa presenza di colesterolo.

Le principali alterazioni a cui sono soggetti i pesci azzurri pescati a *cianciolo* sono riconducibili a traumi fisici che determinano l'instaurarsi di flore microbiche sulla cute, branchie ed intestino (Jiang et al. 1990, Koohmaraie M., 1996, Koutsoumanis, Nychas, 1999). Tali microrganismi, inoltre, scomparse le difese naturali del pesce e risolto il *rigor mortis*, sono in grado di moltiplicarsi attivamente e di invadere i tessuti con la possibilità di rilasciare enzimi proteolitici e autocatalitici (Aoki et al, 1997) Tali alterazioni, catalizzate da enzimi, causano un rapido decadimento della qualità sensoriale e nutrizionale dei prodotti che inevitabilmente si traduce in una riduzione della shelf-life degli stessi. L'abbassamento del pH (da 7.0 a 6.2), dovuto all'accumulo di acido lattico e alla presenza di ioni H⁺ derivanti dall'idrolisi dell'ATP, fa sì che gli enzimi catalizzino le reazioni di alterazione menzionate (Chéret et al. 2005). Infine bisogna considerare l'idrolisi delle sostanze proteiche strutturali, lipidiche e fosfolipidiche e la loro successiva ossidazione, con enzimi della via della lipossigenasi (LOX) e in alcuni casi attraverso la polifenolossidasi (PPO). Connesse alle attività enzimatiche menzionate, si hanno anche attività legate al rigor-mortis (attività della lattato-deidrogenasi, LDH), il cui risultato finale è l'alterazione di colore, lo sviluppo di

off-flavours, la perdita di consistenza, che rendono il pesce non appetibile dal punto di vista sensoriale.

Il presente studio propone, quindi, dopo aver passato in rassegna le principali problematiche relative al “pesce azzurro”, di focalizzare l’attenzione su due casi in studio, alici (*Engraulis engrasicolus* Linneus, 1758) e sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792), cercando di individuare una correlazione tra stress da cattura post mortem e indici di freschezza enzimatici, cercando di contribuire al miglioramento della qualità del pescato del Mediterraneo attraverso il monitoraggio della principale causa di degradazione.

Metodologia.

Campionamento e preparazione dei lotti

I campioni di pesci in esame (alici, *E. engrasicolus* e sardine, *S. pilchardus*) provengono da pesca notturna artigianale, in assenza di luna, effettuata con reti di circuizione (cianciolo) nelle aree marine del Mediterraneo. I campioni sono stati suddivisi in n. 8 lotti, identificati con le sigle S (sardine) e A (alici), di cui n. 60 alici e n. 60 sardine fresche. Subito dopo pesca, i campioni sono stati posti in vasche con acqua salata e ghiaccio fino al raggiungimento della morte per “shock termico”.

Il trasporto in laboratorio è stato effettuato utilizzando cassette di polistirolo contenente ghiaccio a scaglie in rapporto di 2:1. In laboratorio i campioni di pesce hanno subito destinazioni differenti. Sia le alici che le sardine sono state divise in due sottogruppi in base alla presenza di traumi da cattura post-mortem. Un campione di 4 lotti è stato eviscerato e congelato a -18°C. Ognuno dei lotti è stato analizzato a cadenze prestabilite (T0, T3, T6, T9) monitorando nel tempo le variazioni qualitative di alcuni indici di freschezza. I campioni dei restanti 4 lotti sono stati sottoposti a lavaggio, decapitati, eviscerati, deliscati e i filetti ottenuti, ancora lavati e poi asciugati.

Determinazioni eseguite

- Analisi sensoriale (valutazione della freschezza dei pesci e stress da cattura post mortem)
- Analisi enzimatiche (calpaine)
- Analisi chimiche (pH, acidità, proteine totali, proteine solubili)

Risultati e discussioni

I rilievi morfologico biometrici sui campioni analizzati permettevano di evidenziare che il peso medio delle tipologie di pesce analizzato non presenta differenze di rilievo. Il peso medio delle alici si attestava su 23 g (min 22.8 g – max 30.0 g) quello delle sardine a 25 g (min 23.4 g – max 30.0 g); lunghezza media delle alici 6-9 cm, sardine 10-15 cm. Si osservava che su 60 alici più della metà (35) presentavano traumi post-mortem da cattura, diversamente solo 15 campioni di sardine presenta stress da cattura. Tale differenza tra interspecie potrebbe essere dovuta alla maggiore fragilità tissutale delle alici. Complessivamente i campioni presentavano danni fisici esterni a carico della pelle, pinne e testa (zona opercolo-occhio). In particolare tali danni nei campioni di alici erano rappresentati da evidenti soffiusioni ematiche attorno all’occhio, evidenti

mutilazioni delle pinne posteriori e in alcuni campioni dell'intera testa. Nelle sardine evidenti tagli ed escoriazioni sotto la testa e 4 campioni presentavano al momento del processo di eviscerazione, rottura della vertebra come già osservato da Kestin et al. (1995) su specie diverse. Tali danni risulterebbero imputabili all'affollamento dei pesci attorno alla rete e il ripetuto tentativo di evasione alla cattura. Attraverso la misura del parametro del pH è possibile valutare lo stato di stress a cui il pesce è stato sottoposto al momento della cattura e, in un muscolo appena tagliato, fornisce anche un utile metodo di stima dei livelli di acido lattico rilasciato e quindi delle variazioni di pH e acidità. In letteratura i valori medi di pH delle sardine e alici risultano sono pari rispettivamente a 6.11 e 6.18 (Warris e Robb, 1997).

In dettaglio, le alici poche ore dopo la morte presentavano mediamente pH 6.0, quello delle sardine risulta prossimo a 6.10, tali valori rientravano all'interno del range medio. Quando il pesce subisce una morte stressante, con agonia prolungata, si ottengono valori di pH, infatti, più bassi (pH=5), dovuti ad un maggiore accumulo di acido lattico. Bassi valori di pH (inferiori a 7) misurati alla morte e nelle prime ore dopo la morte (fino al *rigor mortis*), indicano che l'animale ha subito uno stress significativo. Al contrario, valori di pH 7.6 e superiori a quelli osservati alla morte, indicano generalmente un animale "riposato" (Bell et al., 2001). Durante il periodo di congelamento, le tipologie di pesce analizzato non mostravano variazioni significative del pH; esso rientrava infatti nel range di variabilità dell'analisi. L'andamento dell'acidità (espressa in g/100 g di acido oleico) in alici e sardine è stato valutato rispettivamente a pH 7.2 e 8.1. I risultati delle determinazioni effettuate a pH 7.2, permettevano di evidenziare che: le alici presentavano un'acidità maggiore delle sardine in corrispondenza del T0, poi le differenze tendevano a ridursi progressivamente; l'acidità delle alici tendeva a diminuire progressivamente fino al raggiungimento dei valori minimi osservati a T6 e T9; l'acidità delle sardine presentava un andamento variabile rispetto a quello osservato nella serie delle alici, con il valore più elevato di acidità osservabile in corrispondenza del T3, cui seguiva un decremento a T6 e un leggero incremento al successivo 9° giorno dal congelamento.

I risultati delle determinazioni effettuate a pH 8.1, risultavano mediamente più elevati di quelli effettuati a pH 7.2 e permettevano di evidenziare che l'acidità massima per entrambe le specie ittiche testate si riscontrava in corrispondenza del T3 mentre negli altri prelievi tale parametro presentava andamenti variabili.

Fenomeno correlato ad esso e alle modificazioni del pH è anche il cosiddetto "gaping" che consiste nella rottura dei filetti di pesce. Al fine di monitorare tale fenomeno in associazione allo stress da cattura è stata analizzata l'attività di enzimi proteolitici come le calpaine. Figura 1 mostrano l'evoluzione delle attività relative delle calpaine sul prodotto appena pescato. Le sardine presentavano dei valori di attività nettamente superiori rispetto alle alici, non si osservavano differenze significative di attività sul prodotto sottoposto a stress da cattura.

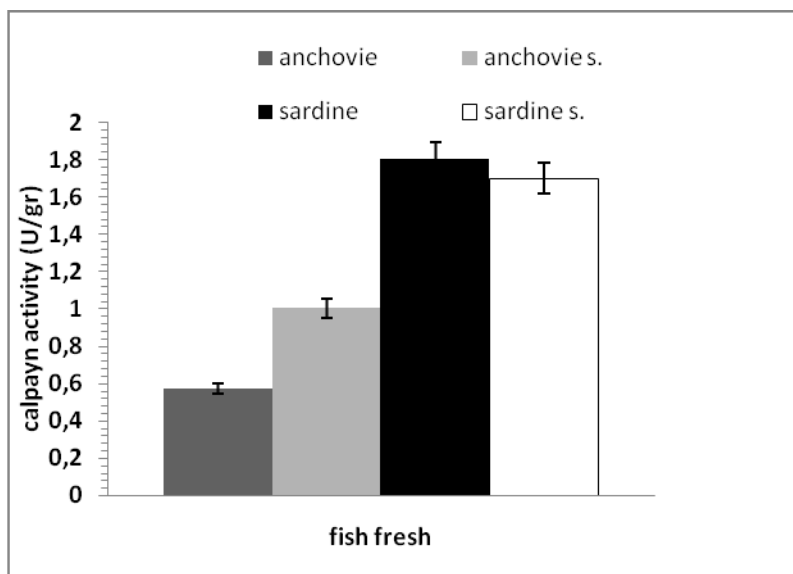


Fig.1 Evoluzione dell'attività enzimatica delle calpaine sul prodotto appena pescato (anchovie s. :anchovie stress; sardine s.: sardine stress)

Conclusioni:

Il presente studio, quindi, permette di giungere alle seguenti conclusioni: la pesca praticata con sistemi artigianali (a cianciolo) per catturare il pesce azzurro nel Mar Mediterraneo si qualifica abbastanza idonea alla salvaguardia della freschezza di questo tipo di pescato nel lungo termine. Le analisi fatte hanno evidenziato nelle alici e nelle sardine una serie di indici (pH ed acidità) che dimostrano che lo stress subito da queste specie con questo tipo di cattura rientra nella norma e non danneggia le successive operazioni di conservazione. Ciò se da un lato tutela gli interessi del consumatore dei prodotti del Mediterraneo e dell'ambiente apre un dibattito sulla necessità di incrementare e tutelare al massimo tale tipo di pesca rispetto a quella industriale fornendo gli strumenti economici e normativi più idonei.

Bibliografia:

- Aoki T., Ueno R. 1997. Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res. Int.* 30: 585-591.
- Chéret R., Delbarre-Ladrat C., De Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V. 2005. High-pressure effects on the proteolytic enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3969-3973.
- Jiang S.T., Wang Y.T., Gau B.S., Chen C.S. 1990. Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1464-1468
- Koohmaraie M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat. Sci.* 43: 193-201
- Koutsoumanis, Nychas, 1999 - Chemical and Sensory Changes Associated with Microbial Flora of Mediterranean Boque (Boops boops) Stored Aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 698-706.

4.3.4 Nel corso del congresso internazionale **WASET 2012** è stato presentato il seguente lavoro pubblicato negli atti al congresso e presentato come presentazione orale in lingua inglese:



Print ISSN 2010-376X
Electronic ISSN 2010-3778

INTERNATIONAL CONFERENCE OBJECTIVES
The conference is an interdisciplinary organization; the papers in each session are drawn from a number of disciplines. The main objective of this conference is to create an effective medium for academics and industries to present and share ideas, innovations and problem solving techniques, the results of their recent research activities in the field of applied science, engineering and technology, as well as social and human sciences.

WASET 2012 PENANG, MALAYSIA INTERNATIONAL CONFERENCE PROGRAM

December 6-7, 2012 Bayview Hotel Georgetown Penang, 25-A Farquhar Street, Penang 10200 Malaysia
Tel:+(604)2633161 Fax:+(604)2634124

Research of the main indexes of freshness anchovy (*Engraulis engrasicolus* Linnaeus, 1758) and sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) of Mediterranean

G.R.A. Alberio, D. Scalone, G. Spagna

Abstract— Anchovy (*Engraulis Encrasicolus*) and sardine (*Sardina Pilchardus*) are blue fishes linked to our alimentary tradition of Mediterranean. In our work, particularly, we tested for the first time physical and enzymatic methods to verify the freshness of species of blue fish, anchovy and sardine of Mediterranean. In connection with to the lowering of the pH after post-mortem stage we assisted to a increase in proteolytic activity of calpaine and catpsine. Already after 2 h in post-mortem there was a significant increase.

Keywords— *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus* , freshness, index rigor.

I N T R O D U C T I O N

ANCHOVY (*Engraulis Encrasicolus*) and sardine (*Sardina Pilchardus*) are always considered the food of the poor, but, slowly, they have been revalued for their high nutritional value. In fact they are highly nutritional products, for their contents in water and protein, rich in vitamins and poor in fat and saturated fat when compared with other protein-rich animal food. It is well known that fish oil is the major and the best source of polyunsaturated fatty acids (PUFA), called omega-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) [1]. Nowadays blue fishes are used to prepare typical traditional products, generally marinated and salted and are parts of exquisite dishes. In fact their richness in water and protein make them suitable to the preparation of ready to eat like live, fresh, chilled, frozen, chopped, dried, salted, pickled, cooked, powder, etc . As seasonal products they must be preserved. One of the main problems related to the trade in fish products not preserved it is given from their easy perishability. After the death, the fish encounters rapidly numerous alterations because of the unstable structure and of the special chemical composition of their tissues [2]. The freshness is the distinctive element of a not damaged product , that does not show marks of alterations and maintains the property of the species unchanged. A fish product is defined fresh when it was caught up to 4 days before, was not damaged and was kept on ice in flakes .It is generally accepted that fresh fish (or fillets/portions) and frozen-thawed fish are types of products which should be differentiated [3]. Fresh fish is understood as being fish freshly caught or which has been chilled and stored for the a short period at normal refrigeration temperature prior to purchase or use. For

R. A. Alberio DISPA, Department of Agricultural and Food Science, University of Catania E-mail: giusialberio@yahoo.it

storage over longer periods freezing is normally utilized. However, while frozen storage is effective in protecting against microbiological deterioration of fish meat, its physicochemical and sensorial properties suffer [4]. The methods developed for differentiating between fresh and thawed fish are evaluated by sensory methods, chemical, physical, biochemical and microbiological processes. In the available literature, there are various methods attempting to distinguish between chilled and thawed fish, used with variable success. In a comparative study with fish using organoleptic parameters, it was demonstrated that the distinction between frozen-thawed and fresh fish from the *Gadidae* family cod and whiting could be very difficult [5]. The microbiological methods of differentiation are based on the fact that thawed fish tissue is a more appropriate medium for growth of some microbial species. In respective comparative investigations, it was observed that after thawing, the number of microorganisms was higher compared to fresh chilled cod and this resulted in a shorter shelf life of thawed products [6]. The biochemical methods evaluate the enzymes released from the organelles contained in the cells of the fish product after freezings and defrostings. The test produced and optimized are about the search for cytochrome oxidase and glutamate aspartate aminotransferase (GO both present in the mitochondria), succinate dehydrogenase and lysosomal enzymes. The aim of our research is to obtain the best methods for assessing the freshness of fresh bluefish. In our work, particularly, we tested for the first time physical and enzymatic methods to verify the freshness of species of blue fish, anchovy and sardine of Mediterranean.

II. Material and methods

Along this work selected blue fishes of Mediterranean species were used from anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardina pilchardus* given by "Cooperativa Ittica" of Catania. The samples of fish come from night fishing with seine (purse seine) in the marine areas of the Mediterranean. The samples were divided into n. 8 lots, identified by the letters S (sardines) and A (anchovies). Immediately after fishing, the samples were placed in tanks with salt water and ice until the death to "thermal shock". Monitoring physical indices was carried out on board. The transport to the laboratory was performed using polystyrene boxes containing ice flakes in a ratio of 2:1. In the laboratory, samples of fish have different destinations. The samples were have been washed, decapitated, eviscerated, and fillets deliscati obtained, again washed and then dried. According to the method developed by Ho et al. (1999)[7] has been carried out the determination of calpain and cathepsin. In order to verify the freshness of samples was carried out the determination of rigor index in accordance with the method [8]. Statistical processing of data was performed using the program STATISTICA (ver. 6.1).

III. Results and discussion

This assessment is also reflected by the enzymatic data obtained by determining the pH. In fact after the death of the cell we assist to a considerable decrease of the pH of the samples around 4,0 in the citosol that activates such enzymes. To confirm the usefulness of the pH measurement in association to the enzymatic analysis, some authors report lower values than the normal one at the time of death, as a stress index in a lot of species: salmon, tuna, gleans and rumble. In literature, the average pH of sardines and anchovies are respectively 6,11 and 6,18. When the fish undergoes a stressful death, with prolonged agony, values of lower pH are obtained, due to a greater

accumulation of lactic acid. Low values of pH (inferior to 7) measured to the death and in the first hours after the death (until the rigor mortis), indicate that animal has undergone a significant stress. In contrast, pH values higher than 7.6 and superior to those observed to the death, generally indicate an animal "rested". After the rigor mortis the pH normally tends to decline rapidly by the first day of storage [9].

This decrease is linked to the accumulation of lactic acid produced by anaerobic glycolysis in post-mortem, the only way to produce ATP in such a situation. An excessive decrease of the pH would an intense denaturation of the proteins that tend to insolubilize and lose some capacity for water retention that will be released by the tissue. In connection with to the lowering of the pH after post-mortem stage we assisted to a increase in proteolytic activity of calpain and catpsine. Already after 2 h in post-mortem there was a significant increase. In fig. 1 and 2 the proteolytic activity was monitored over 12 h post mortem

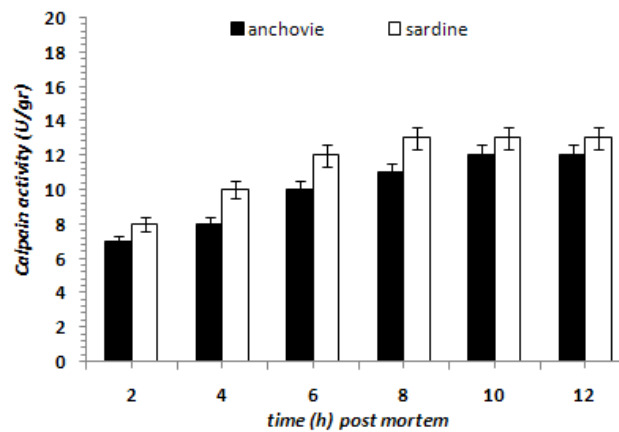


Fig. 1 Calpain activity monitored 12 hours after capture (post mortem)

We observed a maximum activity after 8 h in the sardines, then that value is stabilized. Sardines in a range of proteolytic activity more than anchovies (Fig.1). The mechanism of proteolysis post-mortem of calpain determined the separation of intact filaments of actin and myosin, possible substrates of the proteasome and cathepsins (Fig.2).

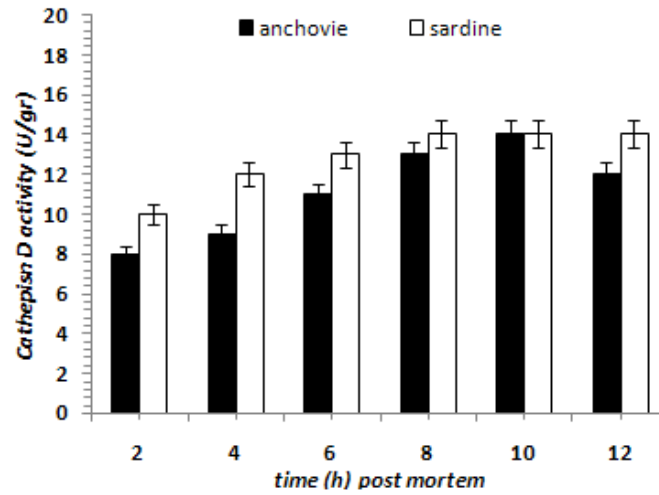


Fig.2 Cathepsin D activity monitored 12 hours after capture (post mortem)

This determined a consequent softening of meat and the consequent lowering of the index of freshness. Different authors have studied this phenomenon but in different species as tilapia[10], the salmon[11,12], the mackerel[13,14], the carp[15,16]. After the step of post-mortem we observed an increase in the index of rigor mortis (Fig.3). This increase was observed [17] in different species as plaice, parrot bass, yellowtail, carp, red sea-bream, striped grunt, tiger puffer and rainbow trout. The sardines had a rigor index less than anchovie.

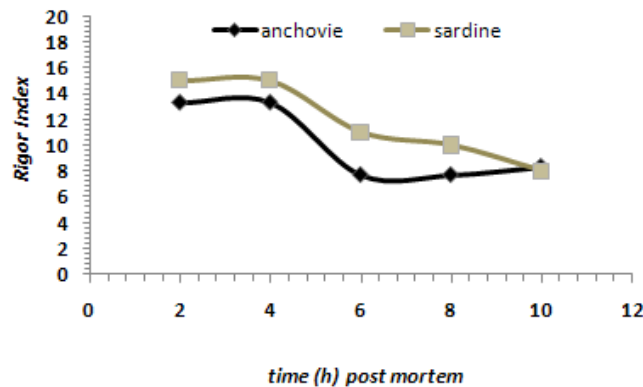


Fig.3 Rigor Index monitored 12 hours after capture (post mortem)

Conclusion

The analyzes show the use of indices of freshness applied for the first time in a species of blue fish. It could be a valid alternative to traditional methods. In particular the increase in the proteolytic activity of cathepsin D confirms the data in the bibliography of the biochemical mechanism of post-mortem . This process results in an increase of cathepsins and reduced activity of calpain, leading the greater calcium concentration in the tissues. The index of rigor mortis determined to those species of small size for the first time was very good. This could be used directly in the fish markets of the Mediterranean to check the freshness of the blue fish.

REFERENCES

- [1] Ozogul, Y., Ozyurt, G., Ozogul, F., Kuley, E., and Polat, A. 2005. Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chem.*, 92, 745-751.
- [2] Ouali A. 1992. Proteolytic and physicochemical mechanism involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265
- [3] Rehbein H. 1979. Development of an enzymatic method to differentiate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets . *Z Lebensm Unters-Forsch.* 169: 263-265
- [4] Uddiin M, Okazaki E. 2004. Classification of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. *J Food Sci.* 69: C665-668.
- [5] Bennett, R. & M. Hamilton, 1986. Consumer acceptability of cod and whiting after chilled storage and freezing and thawing. *Journal of Food Technology*, 21, 311-317.
- [6] Vyncke, W., 1983. Shelf life of thawed cod fillet kept in ice. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 177,1921.
- [7] Ho M.L., Chen G.H., Jiang S.T. 1999. Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation on mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66: 558-568.
- [8] Bito M., Yamada K., Mikuma Y., Amano K. (1983). Tokay Reg. Fish. Res. Lab., No. 109, 89-96.
- [9] Sigholt T., Erikson U., Rustad T., Johansen S., Nordvedt T.S., Seland A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.* 62: 898-905.
- [10] Jiang S.T., Wang Y.T., Gau B.S., Chen C.S. (1990). Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1464-1468.
- [11] Yamashita M, Konagaya S. (1990). Participation of Cathepsin L into extensive softening of muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1271-1272.
- [12] Geesink G.H., Morton J.D., Kent M.P., Bickerstaffe R. (2000). Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. *J. Food Sci.* 65 1318-1324.
- [13] Aoki T., Ueno R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res. Int.* 30: 585-591.
- [14] Ho M.L., Chen G.H., Jiang S.T. (1999). Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation on mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66: 558-568.
- [15] Ogata H., Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. (1998). Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *J Sci Food Agric*, 76, 499-504.
- [16] Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noël J., Fleurence J. (2002). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81: 517-525
- [17] Masashi A., Haruhiko T., Yutuka S., Morihiko S. (1991). Post-Mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(6), 1165-1169.

4.4 PUBBLICAZIONI

- **Alberio GRA**, Barbagallo RN, Todaro A, Bono G, Spagna G (2012) Use of lysosomal enzymatic activity for the differentiation of fresh small blue fish (anchovies and sardines) from frozen and thawed ones. Submitted.
- **G.R.A. Alberio**, G. Muratore*, F. Licciardello, G. Spagna Shelf life study of minimally-processed table grapes as affected by treatment and packaging film. Submitted
- **Alberio GRA**, Giuffrè I, Sciacca AM, Spagna G (2012) "Supplements blue" omega three in the Mediterranean: a valuable aid for the "scavengers" of our body. Journal Eurofishmarket Gennaio 2013.
- **Alberio GR.A.**, Spagna G (2012) The role of tyrosinase in matrices of animal and vegetable origin. Submitted
- **Sciacca AM, Alberio GRA, Belfiore M, Arena E, Fallico B (2012)** Guida alla normativa nel settore ittico. Ind. Alimentari Dicembre 2012
- Todaro A., **Alberio G.R.A.** Limonin in citrus. Submitted Food and Agricultural Journal .
- Palmeri R. **Alberio G.R.A.** Production, characterization and immobilization of glycosidases from *Aspergillus terreus* using "pastazzo" as inducer . Submitted Food and Agricultural Journal.

Submitted

1 **Use of lysosomal enzymatic activity for the differentiation of fresh small blue fish (anchovies**
2 **and sardines) from frozen and thawed ones**

3 G.R.A. Alberio^{a*}, R.N. Barbagallo^a, A. Todaro^b, G.Bono^c, G. Spagna^{a*}

4 ^aDipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA). Università degli Studi di
5 Catania, via S. Sofia, 98 95123 Catania.

6 ^bDipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA)– Università degli Studi di Palermo, viale delle
7 Scienze 13, 90128 Palermo, Italy.

8 ^cIstituto per l'Ambiente Marino Costiero, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via L. Vaccara, 61,
9 91026 Mazara del Vallo, Italy

10 *Corresponding author. E-mail address: gspagna@unict.it giusialberio@yahoo.it - tel.
11 +390957580215; fax +390957141960

12

13 **Abstract**

14 Fish freshness is an important feature for consumers. This study proposes a new strategy for the
15 assessment of small blue fish freshness using unconventional enzymatic methods. The activities of
16 three lysosomal enzymes in extracts of frozen anchovies and sardines (α -glucosidase (AG), β -
17 galactosidase (B-GAL) and β -N-acetylglucosamidase (B-NA)) were measured during a storage
18 period of 21 days. A significant increase in AG activity was observed in both species, with a large
19 increase seen after only one day of storage. B-GAL activity increased in anchovies, but did not
20 show significant changes in sardines, which might make it a useful indicator for anchovy freshness.
21 Finally, B-NA activity increased in sardines over the entire storage time, with dramatic increases
22 evident in the first 24 hours, but did not change in anchovies. B-NA, therefore, may be valuable in
23 evaluating the freshness of sardines. All of these enzyme activities may be helpful predictive
24 markers to limit fraud in these species.

Submitted

1 Shelf life study of minimally-processed table grapes as affected by treatment and packaging film

2

3 G.R.A. Alberio, G. Muratore*, F. Licciardello, G. Spagna

4

5 *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), University of Catania,*

6 *via Santa Sofia 98, 95123 Catania, Italy.*

7

8 ***Corresponding author:**

9 Complete full name: Giuseppe Muratore

10 Complete mailing address: *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari*

11 *(DISPA), University of Catania, via Santa Sofia 98, 95123 Catania,*

12 *Italy.*

13 Telephone: +39 95 7580210

14 Fax: +39 95 7141960

15 E-mail: g.muratore@unict.it

16 **A B S T R A C T:**

17 The research represents the first attempt to assess the effectiveness of Aloe vera on the shelf life
18 extension of minimally processed table grapes (Sugarone, Victoria and Black Magic varieties).
19 Samples were harvested at commercial ripeness, washed and dipped into an Aloe vera solution,
20 packed in ordinary atmosphere and stored at 4°C. The effect of treatment was evaluated during
21 refrigerated storage until 15 days from packaging, by monitoring enzymatic (PPO and PME
22 activities) and physical-chemical parameters (pH, acidity, °Brix), and the gas levels in the package
23 headspace.

24 Samples treated with Aloe vera show significative differences in every considered parameter. Some
25 of the cultivars were more suitable to minimal processing since they could be stored up to 9 days.

26

27 *Keywords:* Aloe vera; Packaging; PPO; Shelf life; Table grape.

LA RICERCA APPLICATA A VALORIZZARE I PRODOTTI ITTICI MADE IN ITALY

“Integratori azzurri” di omega tre del Mediterraneo: un valido aiuto per gli “spazzini” del nostro corpo.

G. R. A. Alberio, (da aggiungere il vostro nominativo), I. Giuffrè, A. M. Sciacca, G. Spagna

Non è più molto raro, ormai, sentire parlare di Omega 3 in contesti mutevoli e vari, come giornali, riviste specializzate o trasmissioni di intrattenimento televisivo. Gli Omega 3 sono tra i più famosi principi che compongono i nostri cibi, e, al pari molto dei benefici che una loro assunzione regolare è in grado di apportare al nostro corpo. Tuttavia è importante acquisire tutte le informazioni utili a riguardo per comprenderne a fondo vantaggi e benefici. Infatti il campo degli integratori ha avuto uno sviluppo notevole dovuto al mutare dei costumi di vita della nostra società e al cambiamento del concetto di salute da semplice assenza di malattia a stato di benessere psico-fisico. Il loro uso è legato al ridotto uso di nutrienti ed all'aumentato fabbisogno individuale. È bene definire in primo luogo cos'è un integratore alimentare. Secondo la Direttiva Comunitaria (2002/46/CE) un integratore alimentare viene definito un prodotto alimentare destinato ad

presentare in forma di tavolette, capsule, polveri e liquidi. Essi si dividono in varie tipologie (vedi tab.1).

Tipologia d'integratore	Caratteristiche
Integratori alimentari mono- o pluricomposti	<ul style="list-style-type: none">• Sono gli integratori semplici di:<ul style="list-style-type: none">• Vitamine• Minerali• Aminoacidi e derivati di aminoacidi• Acidi grassi• Fibre alimentari
Integratori funzionali di campo	<ul style="list-style-type: none">• Sono integratori di:<ul style="list-style-type: none">• Fitoni e micronutrienti• Fitosteroli• Probiotici• Prodotti a base di piante e derivati
Integratori alimentari tecnologicamente modificati	<ul style="list-style-type: none">• Alimenti arricchiti• Alimenti supplementati• Alimenti arricchiti• Alimenti fortificati
Alimenti destinati ad una alimentazione particolare	<ul style="list-style-type: none">• Alimenti per l'infanzia• Dietetici• Alimenti adatti ad un determinato stile di vita



integrare la dieta normale e costituire una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali vitamine e minerali, o altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, sia mono- che pluricomposti. Gli integratori si possono

Come si evince dallo schema gli integratori di omega tre sono integratori di acidi grassi, esclusivamente, ottenuti da olio di pesce ricavato da pesce di ottima qualità.

Nel Mediterraneo il pesce che possiede la più alta percentuale di omega tre è il pesce azzurro e sul quale negli ultimi anni si è purtata l'attenzione di medici e nutrizionisti.

In fig.1 è riportato un flow-sheet di produzione di un integratore omega 3, ossia la descrizione delle varie fasi di produzione di tale prodotto. L'olio di pesce è ottenuto da particolari specie di pesce azzurro del Mare nostrum quali alici, sardine e sgombri. Esso subisce varie fasi di lavorazione. Il processo di ottenimento di una capsula segue generalmente due percorsi differenti.

A. M. SCIACCA; G. ALBERIO; M. BELFIORE; E. ARENA; B. FALLICO

DISPA Sez. Tecnologie Agroalimentari

Università di Catania Via S. Sofia 98 - 95123 Catania

Corresponding author: bfallico@unict.it

Tel.: +390957580214

Keywords: legislazione, prodotti ittici, normativa settore ittico.

Sommario

La normativa del settore ittico è estremamente complessa e articolata, oltre che oggetto di un continuo aggiornamento. Di fatto esistono leggi comunitarie, nazionali, regionali, regolamenti e decreti fra i quali spesso non è facile orientarsi; per questo si è pensato di elaborare una guida pratica che raccogliesse in un insieme organico le norme suddette: se non tutte, almeno le più importanti!

Summary

The regulations of the fishing industry is very complex and articulated, as well as object of a continuous updating. Nowadays there are community, national, regional laws, regulations and decrees among which it is not easy to navigate. For this reason we decided to develop a practical guide that collected in an organic whole those rules: if not all, at least the most important!

Guida alla normativa del settore ittico

Premessa

Elaborare una guida legislativa scevra di errori per un settore così complesso come è quello ittico è impresa ardua e non priva di rischi: esiste sempre la possibilità di una svista o di una distrazione. Con tutta la buona volontà, è inevitabile che ci siano alcune (poche, ci auguriamo) imperfezioni.

Speriamo comunque di avere centrato il nostro obiettivo, che è quello di fornire una guida di facile consultazione che agevoli l'orientamento nella foresta di norme che caratterizzano la filiera del pesce.

Se siamo riusciti nell'intento, lo decideranno i lettori.

Introduzione

Al momento attuale il diritto della pesca e del settore ittico in genere è una disciplina caratterizzata da scarsa omogeneità, risultando per un verso, parte del diritto della navigazione, per un altro - nel caso ci si riferisca all'acquacoltura - parte del diritto agrario.

In pratica, il diritto della pesca può oggi inquadrarsi nell'ambito del diritto agrario, mentre l'aspetto tecnico-strumentale dell'esercizio della nave, rimane disciplinato dal diritto della navigazione.

Partiamo ad esempio dalla figura dell'imprenditore ittico, che è stata delineata in maniera chiara per la prima volta nell'art. 2 del D.L. del 18.05.2001 n.226. La legge delega del 5 Maggio 2001 ed il relativo D.L. 18.05.2001 n. 226 (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 137 del 15 giugno 2001) hanno modernizzato il settore della pesca e dell'acquacoltura. La prima in particolare ha accostato in maniera chiara la pesca all'agricoltura. Infatti l'art. 8 ha posto in primo piano la "definizione dei soggetti imprenditori agricoli, della pesca e forestali" ed ha sottolineato, alla lettera b, "l'equiparazione dell'imprenditore ittico a quello

4.5 SEMINARI COME RELATRICE E FIERE

- European Seafood Exposition Brussels Exhibition Center il 24-26 Aprile 2012
- “Rischi connessi al consumo di pesce crudo”. 2011 Università di Agraria Ragusa (relatrice)
- “Stoccafisso: una tradizione di qualità”. Ciminiere Catania.(relatrice)
- Summer School “Sviluppo sostenibile delle zone di pesca : politiche e governante”
- Corso di “Tecniche di Elettroforesi con Gel di Acrilammide Monodimensionale su Matrici Ittiche”nell’Università di Padova (relatrice)

BIBLIOGRAFIA

Alberio GRA, Giuffrè I, Sciacca AM, Spagna G (2012a) "Supplements blue" omega three in the Mediterranean: a valuable aid for the "scavengers" of our body. Submitted to the Journal Eurofishmarket.

Alberio GRA, Barbagallo RN, Todaro A, Bono G, Spagna G (2012b) Use of lysosomal enzymatic activity for the differentiation of fresh small blue fish (anchovies and sardines) from frozen and thawed ones. Submitted to Meat Science.

Alberio GR.A., Spagna G (2012c) The role of tyrosinase in matrices of animal and vegetable origin. Submitted Meat Science. rewie.

Alberio GRA, Todaro A, Spagna G (2012d) Correlazione tra indici di freschezza e tecniche di pesca artigianali (a cianciolo) di specie di pesce azzurro (*E encrasicolus*, *S pilchardus*). Submitted to congress AISSA.

Alberio G.R.A, Todaro A., Spagna G., Allegra V, Zarbà S. (2012) The market for alternative species of shrimp processe to increase the shelf-life. 5th Shelf Life International Meeting & Workshop on Food Packaging Safety Changwon Convention Center, Changwon, South Korea.

Albert C.M., Hennekens C.H., C.J. O'Donnell, Ajani U.A., Carey V.J., Willett W.C., Ruskin J.N., Manson J.E.. 1998. Fish Consumption and Risk of Sudden Cardiac Death. *JAMA*. 279: 23-28.

Aoki T., Ueno R. 1997. Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Res. Int.* 30: 585–591.

Anon. 1992. Ecochem (Dupont and Conagra Joint Venture, Wilmington, DE) completes lactic acid plant. *Chem. Eng. News*, pp. 20-25.

Applewhite L.A, Otwell W.S., Marshall M.R.. 1990. Kojic acid-A bisulfite alternative *Presented at the Second Joint conference of the Tropical and Subtropical Fisheries Technology and Atlantic Fisheries Technology Societies*, .

Aoki H., Ahsan M.N., Watabe S. 2003. Molecular and enzymatic properties of a cathepsin L-like proteinase with distinct substrate specificity from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *J. Comp. Physiol. B* 174: 59-69.

Arellano-Carbajal F., Olmos-Soto J. 2002. Thermostable α -1,4 and α -1,6-glucosidase enzymes from *Bacillus* sp. isolated from a marine environment. *World J. Microbiol. Biotech.* 18: 791-795.

Aubourg S.P., Losada V., Prado M., Miranda J.M., Barros-Velázquez J. 2007. Improvement of the commercial quality of chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in slurry ice: effects of a preliminary treatment with an antimelanogenic agent on enzymatic browning. *Food Chem.* 103: 741-748.

Bay A. (2002) Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 13(4-5), pp: 213-221

Benjakul S., Visessanguan W., Tanaka M. 2005 - Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kurama prawn (*Penaeus japonicus*). *J. Food Biochem.* 29: 470-485.

Billaud C., Regaudie E., Fayad N., Richard-Forget F., Nicolas J. (1995) Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidase catalyzed by apple polyphenol oxidase. *Enzymatic Browning and Its Prevention*, Lee C.Y., Whitaker J.R. (Eds). *Washington: American Chemical Society*, 600, pp: 295-312

Buta J.G., Moline H.E. 2001. Prevention of browning of potato slices using polyphenoloxidase inhibitors and organic acids. *J. Food Qual.* 24: 271-282.

Cabras P., Martelli A. 2004 - *Chimica degli alimenti*. Piccin-Nuova Libreria, pp. 731.

Chéret R., Delbarre-Ladrat C., De Lamballerie-Anton M., Verrez-Bagnis V. 2005. High-pressure effects on the proteolytic enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3969-3973.

Chinivasagam H.N., Bremner, H.A., Thrower, S.J., Nottingham S.M. 1998. Spoilage pattern of five species of Australian prawns: deterioration is

influenced by environment of capture and mode of storage. *J. Aquat. Food Prod.* 5: 25–50.

Dawley R.M., Flurkey W.H. (1993) 4-Hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *Journal of Food Science*, 58, pp: 609-610,670.

Dogan S., Turan P., Dogan M. (2006) Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thimbra spicata* L. var. *spicata*. *Process Biochemistry*, 41(12), pp: 2379-2385

Duflos G., Le Fur B., Mulak V., Becel P., Malle P. 2002. Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish of fillets. *J Sci Food Agric* 82:1341-1345.

Dziezak J.D. 1986. Antioxidants. *J. Food Tech.* 40: 94–102.

Federal Register. 1985. Notice to shippers, distributors, packers, and importers of shrimp containing sulfites. 50: 2957-2958.

Foegeding E.A., Lanier T.C., Hultin H.O. 1996 - Characteristics of edible muscle tissues. *Food Chem.* pp. 879–942.

Funayama M., Arakawa R., Yamamoto R., Nishino T., Shin M., Murao S. (1995) Effects of α -arbutin on activity of tyrosinase from mushroom and mouse melanoma. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, pp: 143-144.

Gardner J., Manohar S., Borisenok W.S. 1991. Sulfite-free preservative for fresh peeled fruits and vegetables. *Patent number: 4988523.*

Girardi M., Lante A., Zocca F. (2008) Determinazione dell'attività pectin metilesterasica e polifenolossidasi in vitigni a bacca bianca. *Tesi di laurea*

Goll D.E., Otsuka Y., Nagainis P.A., Shannon J.D., Sheridhar K.S., Muguruma M. 1983. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. *J. Food Biochem.* 7: 137-177.

Guandalini E, Ioppolo A, Mantovani A, Stacchini P, Giovannini C. 1998. 4- Hexylresorcinol as inhibitor of shrimp melanosis: efficacy and residues studies; evaluation of possible toxic effect in human intestinal in vitro model (Caco- 2); preliminary safety assessment. *Food Addit. Contam.* 15: 171–180.

Haard N.F. 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.* 25: 289-307

Hori I., Nihei K., Kubo I. (2004), Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytotherapy Research*,18, pp: 475-479

Hosoda H., Iwahashi Y. (2002) Inhibition of Browning of apple juice by onion juice. *Journal Of The Japanese Society For Horticultural Science*,71(3), pp: 452-454

Hultmann L., Rustad T. 2004. Iced storage of atlantic salmon (*Salmon salar*). effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chem.* 87: 31-41

Jauhiainen A., Vanha-Pettula T. 1985. Acid and neutral α -glucosidase in the reproductive organs and seminal plasma of the bull. *J. Reprod. Fert.* 74: 669-680.

Jiang S.T., Wang Y.T., Gau B.S., Chen C.S. 1990. Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*) muscle myofibrils. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1464-1468.

Khatib S., Nerya O., Musa R., Shmuel M., Tamir S., Vaya J. (2005) Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,13, pp: 433–441

Kim C.Y., Kim M.J., Lee M.Y., Park I. (2007) Inhibition of polyphenol oxidase and peach juice browning by onion extract. *Food Science And Biotechnology*,16(3), pp: 421-425

Koohmaraie M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat. Sci.* 43: 193-201.

Kolodziejska I., Sikorski Z. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates a review. *J. Food Biochem.* 20: 349-364.

Koutsoumanis, Nychas, 1999 - Chemical and Sensory Changes Associated with Microbial Flora of Mediterranean Boque (Boops boops) Stored Aerobically at 0, 3, 7, and 10°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 698-706.

Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noël J., Fleurence J. 2002. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chem.* 81:517-525.

Lambrecht H.S. (1995) Sulfite substitutes for the prevention of enzymatic browning in foods. *Enzymatic Browning and its Prevention*, 24, pp: 313-323

Lakshmanan R., Patterson M.F., Piggot J.R. 2004. Effects of high-pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage. *Food Chem.* 90: 541-548.

Lerch K., Ettlinger L. (1972) Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *European Journal of Biochemistry*, 31, pp: 427-437

Liao M.L., Seib P.A. 1988. A stable form of vitamin C: L-ascorbate 2-triphosphate. Synthesis, isolation, and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38: 355–366.

Lopez-Caballero M.E. Martinez-Alvarez O., Gómez-Guillén M.C., Montero P. 2005 - Quality of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) treated with a 4- hexylresorcinol-based formulation. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 425–431.

Martinez-Alvarez O., Lopez-Caballero M.E. Montero P., Comez-Guillen M.C. 2005 - Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage. *Food-Chem.* 100: 147–155.

Mayer A.M., Harel E. (1991) Food enzymology. Phenoloxidases and their Significance in Fruit and Vegetables, Vol. 1, Fox P. F., (Eds.), *The Universities Press, Belfast*, pp: 373-398

Mayer A.M., Harel E., Ben-Shaul R. (1966) Assay of Catechol Oxidase – A critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, pp: 783-789

Marshall M. R., Kim J.M., Wei C.I. (2000) Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods, FAO, pp: 1-56.

Molnar-Perl W., Friedman M. (1990) Inhibition of browning by sulfur amino acids. Apples and potatoes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, pp: 1652-1656

Montero P., Martinez-Alvarez. O. Gómez-Guillén M.C. 2004. Effectiveness of on board application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapeaues longirostris*). *J. Food Sci.*, 69:643-647.

Montero P., Martinez-Álvarez O., Zamorano J.P., Alique R., Gómez-Guillen M.C. 2006. Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments. *Eur Food Res Technol* (2006) 223: 16–21

Montero P., Avalosb A., Perez-Mateosa M. 2001b - Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chem.* 75: 317-324

McEvily A.J. Iyengar R., Otwell W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.

McEvily A.J., Iyengar R., Otwell S. 1991 - Sulfite alternative prevents shrimpmelanosis. *Food Technol.* 45: 80–86.

Nagai T., Suzuki N. (2001) Partial purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49 (8), pp:3922-3926

Nerya O., Musa R., Khatic S., Tamir S., Vaya J. (2004) Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65, pp: 1389–1395

Nicolas J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, pp: 109- 157

Ogawa M., Perdigao N.B., Santiago M.E., Kozima T.T. 1984. On physiological aspects of black spot appearance in shrimp. *Bull Jap Soc Sci Fish* 50:1763-1769.

Osuga D., Van der Schaaf A., Whitaker J.R. (1994) Control of polyphenol oxidase activity using a catalytic mechanism. Protein structure-Function Relationships in Foods, Yada R.Y., Jackman R.L., Smith J.L. (Eds.). *New York: Blackie Academic & Professional*, pp: 62-88

Otwell W.S., Marshall M.R. 1986. Report of the Florida Sea Grant. Screening alternatives to sulphiting agents to control shrimp melanosis (black spot). *Tech. Paper 46: 1-10*

Rehbein H., Tomie M. 1979. Möglichkeiten der enzymatische differenzierung zwischen frischen und aufgetauten fisch filets. *Lebensmittelchemie. Chemie* 33:122-124.

Rehbein H., Aust M. 1980. Einsatzmöglichkeiten des torrymeters und enzymatischer analysenverfahren zur untersuchung eisgelagerter fische und filets auf auftauware. *Arch. Fisch Wiss.* 30:181.

Richard-Forget F. M., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1992) Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning, II, Kinetic studies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, pp: 2108-2113

Richardson T., Hyslop D.B. 1985. Enzymes. *Food Chem.* 371-476.

Rolle R.S., Guizani N., Chen J.S., Marshall M.R., Yang J.S, Wei C.I. 1991. Purification and characterization of phenoloxidase isoform from Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodom*). *J. Food Biochem.* 15: 17-32.

Sapers G.M., Hicks K.B. 1989. Inhibition of enzymatic browning in fruits and vegetables. *Qual. Factors of Fruit and Veg: Chem. and Tech.* pp 29-43.

Segel I.H. 1976. Biochemical Calculations, pp 273-277.

Schomburg D., Schomburg I. 2003. Handbook of enzymes. Volume 12. Class 3.2. Hydrolases VII. EC 3.2.1.1-3.2.1.47. Springer, pp. 663.

Sciacca AM, Alberio GRA, Belfiore M, Arena E, Fallico B (2012) Guida alla normativa nel settore ittico. Ind. Alimentari .

Simpson B. K., Marshall, M.R., Steven O.W. 1988. Phenoloxidase from pink and white shrimp: kinetic and other properties. *J. Food Biochem.* 12: 205-218.

Suzuki K., Emori E., Onho S., Imahori S., Kawasaki H., Miyake S. 1986. Structure and function of the small (30K) subunit of calcium-activated neutral protease (CANP). *Biomed. Biochim. Acta*, 45, 1487-191.

Tong C.B.S., Hicks K.B. (1991) Sulfated polysaccharides inhibit browning of apple juice and diced apples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 39, pp: 1719-1722

Tipton K.F., Dixon H.B.F. 1983 - Effect of pH on enzymes. *Contemp. Enz. Kinet. and Mech.* pp 97-148.

Tsuji S., Imahori K. 1981. Studies on Ca²⁺-activated neutral proteinase rabbit skeletal muscle. I. The characterization of 80 K and the 30 K subunits. *J. Biochem.* 90: 233-240

Turk V., Bode W. 1991. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS* 285: 213-219.

Tzeng S.S., Wu H.C., Sung W.C., Liu C.A. 2009. Purification and characterization of cysteine proteinase inhibitors from crucian carp *Carassius auratus* eggs. *Fish Sci.* 75:1453-1460.

Walker J.R.L. 1977. Enzymatic browning in foods. Its chemistry and control. *Food Tech. NZ.* 12: 19-25.

Wei C.I., Fernando S.Y., Huang T.S. 1991. Mutagenicity studies of kojic acid. Proceedings of the Fifteenth annual conference tropical and subtropical fisheries. *Technological Conference of the Americas*, pp. 464-470.

Whitaker J.R. 1972. Polyphenol oxidase. *Principle of enzymology for the foodsciences*, pp. 571-582

Wu J., Haard N.F. 2000. Purification and characterization of cystatin from leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. *Comp. Biochem. Phys. C* 127: 209-220.