

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE
ED ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI**

SEZIONE DI ISPEZIONE

TESI DI DOTTORATO IN

PRODUZIONE E SANITA' DEGLI ALIMENTI DI
ORIGINE ANIMALE

XIX CICLO

*Tecniche di decontaminazione dei prodotti ittici e studio
dell'efficacia di batteriocine su ceppi mutanti di Listeria
monocytogenes .*

*Coordinatore
Ch.ma Prof.ssa
Maria Luisa Cortesi*

*Relatore
Ch.ma Prof.ssa
Teresa Antonietta Sarli*

*Candidato
Dott. Nicola Costanzo*

I. RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DEI PRODOTTI DELLA PESCA	- 6 -
I.1. Microflora iniziale	- 9 -
I.2. Flora saprofitaria	- 11 -
I.3. Microrganismi patogeni e tossigeni	- 13 -
<i>I.3.1. Batteri</i>	- 13 -
<i>I.3.2. Virus</i>	- 15 -
<i>I.3.3. Parassiti</i>	- 16 -
<i>I.3.4. Biotossine marine</i>	- 17 -
I.4. Cattura e processi primari	- 19 -
I.5. Istamina	- 23 -
I.6. Acquacoltura	- 25 -
II. DETERIORABILITA' DEL PESCE E DEI MOLLUSCHI	- 27 -
II.1. Deterioramento microbiologico	- 32 -
<i>II.1.1. Microrganismi deterioranti</i>	- 32 -
<i>II.1.2. Chimica del deterioramento microbico</i>	- 35 -
<i>II.2.1. Deterioramento dell'odore</i>	- 38 -
<i>II.2.2. Modificazioni di colore</i>	- 40 -
<i>II.2.3. Cambio nella tessitura</i>	- 41 -
II.3. Deterioramento chimico	- 42 -
II.4. Fattori influenzanti il deterioramento	- 45 -
<i>II.4.1. Manipolazione</i>	- 45 -
<i>II.4.2. Temperatura e pH</i>	- 47 -
III. ESTENSIONE DELLA SHELF-LIFE	- 50 -
III.1. Metodi tradizionali	- 51 -
<i>III.1.1. Conservazione a basse temperature</i>	- 51 -
<i>III.1.2. Trattamenti chimici</i>	- 55 -
III.2. Nuovi trattamenti	- 63 -
<i>III.2.1. Irradiazione a basso dosaggio</i>	- 63 -
<i>III.2.2. Trattamenti con alte pressioni</i>	- 66 -
<i>III.2.3. Conservazione in atmosfera protettiva</i>	- 70 -
<i>III.2.3.1. Sottovuoto</i>	- 71 -
<i>III.2.3.2. Confezionamento con gas</i>	- 72 -
<i>III.2.3.3. Uso di confezionamento con gas per preservare i prodotti ittici</i>	- 73 -
<i>III.2.3.4. Sicurezza alimentare</i>	- 74 -
<i>III.2.3.5. Nuovi metodi di atmosfera modificata</i>	- 75 -
<i>III.2.4. Uso di Ageless per estendere la shelf-life dei prodotti ittici</i>	- 77 -
<i>III.2.5. Generatori di vapore di etanolo</i>	- 79 -
III.3. Sistemi naturali di conservazione	- 80 -
<i>III.3.1. Principali composti antimicrobici presenti nelle spezie</i>	- 84 -
BIBLIOGRAFIA	- 88 -
SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO	- 128 -

IV.FETTE DI XIPHUAS GLADIUS ADDIZZIONATE DI ROSMARINUS OFFICINALIS E CONFEZIONATE SOTTOVUOTO:CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE E MICROBIOLOGICHE..... - 130 -

IV.1.MATERIALI E METODI.....	- 131 -
IV.1.1.Preparazione dei campioni	- 131 -
IV.1.2.Accertamenti.....	- 132 -
IV.2.Risultati.....	- 134 -
IV.2.1.Accertamenti microbiologici.	- 134 -
IV.2.2.Parametri sensoriali.....	- 139 -
IV.3.Conclusioni	- 141 -
BIBLIOGRAFIA	- 143 -

V.EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON OZONO SULLE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE E MICROBIOLOGICHE DI DIFFERENTI SPECIE ITTICHE..... - 145 -

V.1.Generalità sull'ozono.....	- 145 -
V.2.Chimica dell'ozono	- 147 -
V.2.1.Solubilità	- 148 -
V.2.2.Reattività	- 149 -
V.2.3.Sintesi.....	- 149 -
V.3.Effetti antimicrobici	- 151 -
V.3.1.Spettro antimicrobico	- 154 -
V.3.2.Attività antivirale	- 157 -
V.4.Effetti ossidanti sugli alimenti	- 159 -
V.5.Applicazioni.....	- 161 -
V.5.1.Trattamento delle acque	- 161 -
V.5.2.Disinfezione.	- 162 -
V.5.3.Ossidazione	- 162 -
V.5.4.Bio-processing	- 163 -
V.6.Trattamento degli alimenti	- 164 -
V.7.Conservazione e immagazzinamento	- 168 -
V.7.Effetto sugli odori	- 169 -
V.8.Sicurezza e tossicità	- 171 -

VI. TRATTAMENTO CON GHIACCIO OZONIZZATO, ACQUA OZONIZZATA E GHIACCIO OZONIZZATO

VI.1.Scopo della ricerca	- 174 -
VI.2.Materiali e metodi	- 175 -
VI.3.Analisi dei campioni.....	- 178 -
VI.3.1.Analisi sensoriale	- 178 -
VI.3.2.Analisi microbiologiche	- 181 -
VI.3.3.Analisi statistica	- 183 -
VI.4.Risultati.....	- 184 -
VI.4.1.Analisi sensoriale	- 184 -
VI.4.2.Analisi microbiologiche	- 185 -

VI.4.3. <i>Analisi statistica</i>	- 187 -
VII. TRATTAMENTO CON ARIA OZONIZZATA	- 206 -
VII.1. Materiali e metodi	- 206 -
VII.1.1. <i>Analisi sensoriale</i>	- 208 -
VII.1.2. <i>Analisi microbiologiche</i>	- 208 -
VII.2. RISULTATI	- 209 -
VII.2.1. <i>Analisi sensoriale</i>	- 209 -
VII.2.2. <i>Analisi microbiologiche</i>	- 210 -
VIII. TRATTAMENTO CON ARIA OZONIZZATA E STOCCAGGIO CON GHIACCIO	- 223 -
VIII.1. Materiali e metodi	- 223 -
VIII.1.1. <i>Analisi sensoriale</i>	- 224 -
VIII.1.2. <i>Analisi microbiologiche</i>	- 224 -
VIII.2. Risultati	- 225 -
VIII.2.1. <i>Analisi sensoriali</i>	- 225 -
VIII.2.2. <i>Analisi microbiologiche</i>	- 226 -
VIII.3. Conclusioni generali	- 237 -
BIBLIOGRAFIA	- 238 -
IX. RICERCA DI <i>Listeria monocytogenes</i> IN CAMPIONI DI SALMONE AFFUMICATO CONFEZIONATO SOTTOVUOTO	- 242 -
IX.1. <i>Listeria monocytogenes</i> nella lavorazione di prodotti ittici	- 242 -
IX.3. Risultati e Conclusioni	- 245 -
X. CREAZIONE DI CEPPI MUTANTI DI <i>Listeria monocytogenes</i>: ANTIBIOTICORESISTENZA E LORO RISPOSTA ALL'AZIONE DI ANTIMICROBICI NATURALI	- 249 -
X.1. Premessa	- 249 -
X.2. Nisina	- 255 -
X.2.1. <i>Generalità</i>	- 255 -
X.2.2. <i>Meccanismo d'azione</i>	- 256 -
X.2.3. <i>Tipologia di alimenti conservabili</i>	- 258 -
X.2.4. <i>Spettro antimicrobico</i>	- 259 -
X.2.5. <i>Tecnologia della conservazione con nisina</i>	- 259 -
X.2.6. <i>Potenziamento d'azione</i>	- 260 -
X.2.7. <i>Sicurezza d'impiego</i>	- 261 -
X.2.8. <i>Altre applicazioni</i>	- 262 -
X.3. LACTICINA 3147	- 263 -
X.4. Materiali e Metodi	- 265 -
X.4.1. <i>Creazione dei ceppi mutanti</i>	- 265 -
X.4.2. <i>Crescita in presenza di nisina</i>	- 270 -
X.4.3. <i>Valutazione dell'antibioticoresistenza</i>	- 270 -
X.4.4. <i>Spot-on-the-lawn assay</i>	- 271 -
X.5. Risultati	- 272 -
X.5.1. <i>Crescita in presenza di nisina</i>	- 272 -
X.5.2. <i>Antibiotico resistenza</i>	- 276 -

<i>X.5.3.Spot-on-the-lawn assay</i>	- 277 -
X.6.Conclusioni	- 279 -
BIBLIOGRAFIA	- 280 -

I. RISCHI IGIENICO-SANITARI CONNESSI AL CONSUMO DEI PRODOTTI DELLA PESCA

Il pesce e i molluschi rappresentano la seconda fonte di proteine per l'uomo dopo i prodotti carnei; in alcuni Paesi, come il Giappone, essi costituiscono la prima risorsa di proteine. I prodotti della pesca rappresentano una categoria di alimenti molto ampia che include alimenti preparati sia con metodi tradizionali sia secondo moderne tecnologie. Negli ultimi venti anni sono stati fatti grandi progressi nelle modalità di produzione dei pesci e molluschi che hanno visto una grande espansione dell'acquacoltura; ciononostante la domanda di questa tipologia di prodotti, a livello mondiale è in continua crescita e si prevede che presto sarà maggiore di quanto il mercato possa offrire. Contemporaneamente, a causa dell'aumento del prelievo incontrollato, la disponibilità di molte specie sta via via diminuendo con conseguente aumento dei prezzi. Tale fenomeno, a sua volta, stimola il commercio a livello internazionale e incoraggia ulteriormente le innovazioni in acquacoltura.

È importante tener presente che la gran parte del pesce oggetto di commercio a livello internazionale proviene dai Paesi non

industrializzati che, nella maggior parte dei casi, non hanno sistemi di controllo degli alimenti ben sviluppati e spesso hanno un'elevata incidenza di malattie gastroenteriche. A questo bisogna aggiungere che in tali Paesi ma spesso anche in quelli industrializzati, i prodotti della pesca destinati sia al mercato interno che a quello internazionale, vengono prelevati in zone marine non ben definite e trasportati in condizioni igieniche non idonee e a temperature non adeguate. Tutto ciò può influire in modo significativo sulla qualità igienica di un prodotto che di per sé è già molto delicato e facilmente deperibile. Con il termine generico di prodotti ittici si intendono raggruppare pesci, molluschi e crostacei che invece, dal punto di vista zoologico, costituiscono categorie di organismi profondamente diversi quanto a caratteristiche fisiologiche, alimentazione e ambiente di vita. Ai fini della valutazione degli aspetti microbiologici i prodotti della pesca possono anche essere suddivisi in base al loro ambiente di origine: acque dolci o acque salate, acque costiere rispetto al mare aperto, acque calde tropicali rispetto ad acque fredde che rappresentano realtà diverse per quanto riguarda le caratteristiche microbiologiche e quindi i possibili rischi per la salute. Ancora a parte va considerata l'acquacoltura, che, pur essendo una tecnologia che ha radici antiche,

si è andata affermando solo recentemente come fonte significativa di pesci e molluschi anche per il commercio internazionale. Le peculiari caratteristiche associate a questo tipo di allevamento fanno sì che il prodotto che ne deriva debba essere considerato separatamente dallo stesso proveniente dall'ambiente naturale.

Dal punto di vista nutrizionale il tessuto muscolare degli animali acquatici, analogamente alle carni, ha un elevato contenuto in proteine e un basso contenuto in carboidrati. La composizione del pesce può subire delle variazioni anche notevoli a seconda della stagione e del ciclo riproduttivo. In genere il contenuto di acqua e lipidi varia in modo inverso: tali variazioni naturalmente influenzano oltre alla consistenza e il gusto, anche l'evoluzione microbiologica.

La cottura causa una significativa riduzione del contenuto in acqua con conseguente aumento relativo degli altri macronutrienti. I molluschi, rispetto agli altri prodotti ittici, hanno un contenuto significativo in carboidrati. La carne dei pesci costituisce un ottimo substrato per la crescita della maggior parte dei batteri eterotrofi e il basso contenuto in carboidrati limita l'abbassamento del pH associato alla produzione di acido lattico che si produce durante il rigor mortis. Pesci come tonno e

halibut raggiungono valori di pH intorno a 5,4 mentre il pH del merluzzo non scende al di sotto di 6-7.

I molluschi invece, che contengono il 2-5% di glicogeno, raggiungono valori di pH molto più bassi a causa della degradazione degli zuccheri da parte degli enzimi contenuti nei tessuti. Dal punto di vista microbiologico riveste particolare importanza la presenza, nei tessuti muscolari, di composti contenenti azoto libero non proteico che sono subito disponibili per la proliferazione batterica *post mortem*. L'ossido di trimetilamina, presente nei pesci, viene ridotto a trimetilamina dalla flora microbica del deterioramento con produzione del caratteristico "odore di pesce". Negli elasmobranchi, gli alti livelli di urea vengono metabolizzati ad ammoniaca. La composizione in aminoacidi liberi della carne di pesce può influenzare l'andamento del deterioramento e assumere importanza dal punto di vista sanitario per la formazione di ammine biogene.

I.1. Microflora iniziale

Il tipo di popolazione microbica associata con i prodotti ittici vivi riflette la microflora dell'ambiente nel quale il pesce è stato catturato o

allevato ma è subito modificata dalla abilità dei diversi microrganismi, per la maggior parte batteri, a moltiplicarsi nell'ambiente fornito dalla superficie esterna, pelle o conchiglia a seconda del tipo di organismo, dalle branchie e dal canale alimentare. Ad esempio, i molluschi che crescono vicino agli insediamenti umani tenderanno ad avere cariche batteriche più elevate e qualitativamente diverse rispetto a quelli che si trovano in aree isolate. Come si verifica in tutti gli animali, anche i tessuti muscolari e gli organi interni dei prodotti ittici sono normalmente sterili e i batteri sono localizzati sulla pelle, sui gusci di chitina sulle branchie e nel tratto intestinale. In particolare, è stato rilevato che alcuni tipi di crostacei possono veicolare attraverso il loro sistema circolatorio che è "aperto" significativi livelli di microrganismi, soprattutto appartenenti al genere *Vibrio*.

Come è stato accennato in precedenza, i livelli di carica microbica variano a seconda delle condizioni e della temperatura dell'acqua: pesci e crostacei provenienti da acque più fredde, la cui temperatura si aggira intorno ai 10-15 °C, generalmente forniscono conte di 10^2 - 10^4 CFU/g sulla superficie della pelle e delle branchie, mentre animali provenienti da acque calde hanno livelli di 10^3 - 10^6 CFU/g. le conte del contenuto intestinale variano invece in rapporto alla alimentazione

passando da 10^2 CFU/g nel pesce non alimentato a 10^8 CFU/g nelle specie che si alimentano attivamente. Le conte riscontrate nei molluschi risentono maggiormente della temperatura dell'acqua passando da meno di 10^3 CFU/g nelle acque fredde non contaminate a più di 10^6 nelle acque calde e contaminate.

I.2.Flora saprofitaria

Come è stato già accennato, il fattore più importante che condiziona i cambiamenti della microflora è sicuramente la temperatura: Tipicamente le popolazioni batteriche di pesci e molluschi provenienti da acque temperate sono prevalentemente psicrofile in funzione della temperatura dell'acqua che è di solito inferiore a $10\text{ }^\circ\text{C}$. I prodotti ittici provenienti dalle acque tropicali, al contrario, mostrano livelli più alti di batteri mesofili per cui è molto importante che, dopo la cattura e la morte i pesci vengano conservati sotto ghiaccio o comunque a basse temperature in modo da allungare la "shelf-life" del prodotto. Diversamente da quello che comunemente si pensa la microflora dei prodotti ittici non è prevalentemente alofila: nella maggior parte dei casi, infatti non si tratta di alofili obbligati ma di alotolleranti capaci di

crescere in un ampio spettro di concentrazioni saline e con un optimum intorno al 2-3%. L'uso del ghiaccio nella conservazione del pesce comporta un abbassamento della concentrazione salina che favorisce la sopravvivenza e la crescita delle specie alotolleranti. In linea di massima si può dire che nelle specie di origine marina sono dominanti le specie appartenenti al genere *Vibrio*, alotolleranti mentre in quelle di acqua dolce prevalgono le *Aeromonas*.

I batteri che vivono sulla superficie degli organismi marini sfruttano come substrato di crescita gli aminoacidi, i peptidi e altre fonti diverse dai carboidrati; l'utilizzazione di queste sostanze porta alla produzione di condizioni leggermente alcaline del substrato. La flora microbica che si trova sulla pelle e sulle branchie è tipicamente aerobia o aerobia facoltativa come nel caso del genere *Vibrio*. Batteri strettamente anaerobi si possono trovare solo nell'intestino. Da un punto di vista qualitativo prevale la flora gram positiva nelle acque fredde e quella gram negativa nelle acque più calde. I generi maggiormente rappresentati sono *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Corynebacterium*. Il pesce proveniente da acqua dolce presenta una flora analoga tranne che il *Vibrio* è sostituito da

Aeromonas. La microflora dei molluschi è anch'essa simile alle precedenti con una netta prevalenza del genere *Vibrio*. Poiché, come è noto, i molluschi risentono grandemente dell'influenza dell'ambiente la loro microflora è influenzata da microrganismi di provenienza terrestre quali Enterobacteriaceae e Streptococcaceae.

I.3.Microrganismi patogeni e tossigeni

I.3.1.Batteri

Molti sono i microrganismi patogeni che possono essere associati al consumo di prodotti ittici: essi possono derivare dall'ambiente ed essere presenti già nell'animale vivo, o essere veicolati dalla contaminazione delle acque o ancora da una contaminazione *post mortem* dovuta alla manipolazione e trattamenti successivi.

I soli batteri che sono sicuramente patogeni per l'uomo e costituenti naturali della microflora dell'ambiente e degli animali marini sono il *Clostridium botulinum* e le vibrionacee. Tutte le altre specie patogene provengono dalla contaminazione umana delle acque che assume particolare rilievo nel caso dei molluschi lamellibranchi che si nutrono filtrando grandi volumi di acqua.

Il *Clostridium botulinum* deriva prevalentemente dai sedimenti e i sierotipi E e i ceppi non proteolitici di tipo B ed F possono essere isolati possono essere isolati dall'intestino e, più raramente, dalla pelle dei pesci. Il botulino può costituire un patogeno per i pesci stessi quando questi si cibano dei resti di pesci morti. Specialmente le condizioni di acquacoltura possono aumentare notevolmente l'incidenza di *C. botulinum* del quale sono state descritte epidemie in allevamenti di trote e salmoni. Microrganismi mesofili appartenenti al genere *Vibrio* sono stati isolati da vari tipi di pesce, sia di fondo che di superficie: tra le specie potenzialmente patogene il più diffuso sia tra i pesci che tra i molluschi è sicuramente il *Vibrio parahaemolyticus*. Il livello di vibroni mesofili presenti negli organismi marini è influenzato principalmente dalla temperatura dell'acqua; essi infatti si moltiplicano rapidamente a temperature tra i 20 e i 40 °C per cui viene ritrovato anche in numero elevato nei molluschi allevati in acque la cui temperatura si aggira attorno ai 30 °C mentre risulta per lo più assente in quelli allevati in acque fredde. Gli studi finora condotti hanno dimostrato che non esiste una reale correlazione tra la presenza di vibroni e quella dei microrganismi indicatori di contaminazione fecale ma che la presenza di *Vibrio* è maggiormente influenzata da fattori

ambientali quali, oltre la temperatura, la salinità, la profondità e anche l'ora del giorno. I dati epidemiologici evidenziano che nei Paesi occidentali le malattie causate da vibrioni patogeni sono, per la maggior parte ascrivibili al consumo di molluschi e crostacei mentre in Giappone e in altri Paesi asiatici il più comune veicolo di infezione è costituito dal pesce. Oltre al *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* la cui patogenicità è ormai accertata e riconosciuta, anche altre specie, occasionalmente, sono state causa di gastroenteriti o di infezione delle ferite.

Altri batteri, come *Aeromonas* e *Plesiomonas*, sono stati responsabili di infezioni occasionali e possono rappresentare un rischio per le persone immunosopresse. *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Shigella* e *Salmonella* sono stati isolati da pesci e molluschi provenienti da acque contaminate da scarichi umani.

1.3.2. Virus

I virus che hanno rilievo per la salute pubblica: epatite A, calicivirus e Norovirus vengono isolati, nell'ambito dei prodotti ittici, soprattutto

dai molluschi che, filtrando, trattengono e concentrano le particelle virali. Le malattie virali trasmesse dai molluschi hanno sempre avuto e hanno un grosso impatto sulla salute pubblica: basti pensare all'epatite A, di cui i molluschi rappresentano i principali vettori dopo l'acqua e ai Norovirus che, a livello internazionale, rappresentano la causa più frequente di malattia trasmessa dai molluschi.

1.3.3.Parassiti

Pesci e crostacei albergano facilmente elminti parassiti ma fortunatamente pochi di essi sono in grado di infettare l'uomo. Perché avvenga l'infezione, infatti, il pesce deve essere consumato crudo o, comunque, insufficientemente cotto. Uno dei parassiti più frequenti è sicuramente l'*Anisakis* che è stato isolato, in Giappone, nel 10% dei campioni di sushi preparato con salmone o maccarello.

In un altro studio questo nematode è stato isolato nel 40% dei campioni di salmone ad un livello di 2-3 larve ogni 200 g di pesce. Le larve di *Anisakis* possono essere presenti in una grande varietà di pesci; le larve sono resistenti ai normali processi di marinatura cui

viene sottoposto il pesce ma possono essere inattivate o attraverso il congelamento da -17 a -20 °C per 24 ore o con la cottura.

1.3.4. Biotossine marine

Negli ultimi anni le biotossine marine sono state responsabili di più del 60% delle malattie causate dai prodotti ittici negli USA, associate, nella maggior parte dei casi, al consumo di pesce. Come è noto, le principali intossicazioni, associate al consumo di prodotti ittici, aventi un'origine microbiologica sono: *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP), *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP), *ciguatera* e *sgombroic fish poisoning* (ammine biogene). Le due intossicazioni più frequenti a livello internazionale, sono la *ciguatera* e le ammine biogene. Le intossicazioni da PSP, DSP, NSP e ASP sono prodotte dal consumo di molluschi bivalvi che si sono nutriti di alghe tossigene e hanno accumulato la tossina nel loro organismo. Anche i pesci che si cibano di plancton possono ingerire una grande quantità di alghe, particolarmente quelle associate alla PSP e DSP; se tali pesci vengono consumati interi, senza la rimozione degli organi interni, possono

diventare pericolosi e sono stati descritti numerosi casi di morte, soprattutto nelle Filippine. Le tossine algali includono molecole che hanno struttura molto diversa tra di loro e vengono prodotte da alghe tipicamente associate con aree geografiche ben definite ove si verificano i bloom algali. I dati epidemiologici degli ultimi anni mostrano comunque una notevole estensione di tali aree dovuta agli scambi internazionali e ai cambiamenti climatici. È importante tener presente che tutte le biotossine algali sono resistenti al calore e non vengono distrutte con la cottura degli alimenti, non causano variazioni delle caratteristiche organolettiche e non vengono messe in evidenza dalle comuni analisi microbiologiche. Nonostante negli ultimi anni si sia assistito ad un progressivo affinamento dei metodi per la ricerca diretta delle tossine algali, la maggior parte della sorveglianza si basa sulla identificazione del fitoplancton tossico mediante osservazione microscopica delle caratteristiche morfologiche. In caso di positività si procede alla ricerca delle tossine negli organismi indicatori, per lo più molluschi. Nel panorama delle tossine prodotte da microrganismi, un cenno a parte merita la intossicazione da “pesce palla” che è causata dalla presenza di tetradotossina nelle specie ittiche appartenenti agli *Spherooides*: si tratta di un problema sanitario molto rilevante in

Giappone dove questo tipo di pesce è considerato una prelibatezza. La tetratossina, considerata finora una sostanza di origine endogena, può essere prodotta da comuni batteri marini, specialmente appartenenti al genere *Vibrio*. Nonostante questa ipotesi suggerita da alcuni autori, i dati ad ora disponibili sono insufficienti a confermare che la tetratossina sia di origine microbiologica.

I.4. Cattura e processi primari

Il pesce può essere catturato mediante esche, reti, arpioni ecc. il più delle volte in acque che sono lontane dagli impianti di trattamento e trasformazione. Poiché la fase di cattura può durare diverse ore e le condizioni di lavoro sopra i pescherecci sono per lo più difficili, vi è scarso controllo degli animali al momento della morte. Ciò contrasta fortemente con quello che accade nelle industrie delle carni, sia rosse che avicole, dove gli animali vengono portati al macello in buone condizioni fisiologiche e vengono uccisi velocemente e con il minimo stress.

Dopo la pesca, il prodotto deve essere protetto dai processi di deterioramento durante il trasporto fino all'impianto di trasformazione.

La durata di questo periodo è molto variabile e può andare dalle poche ore fino a 3 settimane. La conservazione viene di solito attuata mediante il ghiaccio in modo da mantenere la temperatura intorno ai -2 °C. Naturalmente negli ultimi anni ci sono stati molti progressi per quanto riguarda le attrezzature delle navi da pesca che sono in grado di mantenere temperature al di sotto dello zero che rallentano notevolmente i processi di deterioramento. Ci sono pareri molto controversi sulla pratica di eviscerare il pesce sulla barca o piuttosto dopo l'arrivo a terra. La prima pratica, che è molto utilizzata in Europa, almeno per quanto riguarda il pesce di grandi dimensioni, ha il vantaggio di rimuovere subito la stragrande maggioranza della flora microbica, ma le superfici di taglio espongono i tessuti all'attacco diretto dei batteri. Nel caso in cui i pesci non vengano subito eviscerati, come accade per lo più negli USA, i prodotti della proliferazione batterica a livello intestinale e il materiale fecale possono provocare odori sgradevoli nonché processi digestivi a carico della parete intestinale. Probabilmente la scelta migliore da un punto di vista igienico è quella di sviscerare subito dopo la cattura e lavare accuratamente la carcassa.

I batteri che causano il deterioramento del pesce sono gli stessi che fanno parte della microflora saprofitaria: le specie più comunemente isolate sono *Shewanella* e *Pseudomonas* che predominano a basse temperature di stoccaggio mentre *Aeromonas*, *Vibrio* e coliformi predominano a temperature più elevate che vanno da 10 a 37 °C. La temperatura esercita quindi una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche che si trovano sulla superficie del pesce: alle basse temperature i batteri mesofili smettono di crescere o muoiono lentamente mentre i ceppi psicrotrofi aumentano secondo la classica curva di crescita costituita da una lag fase, una fase logaritmica e una stazionaria. Il tempo necessario dipende ancora una volta dalla temperatura; in genere quando il pesce proviene da regioni temperate ed è mantenuto a 0 °C la lag fase dura da 1 a 5 giorni, quella esponenziale da 6 a 14.

Particolare importanza riveste il tempo che intercorre dal momento della cattura a quello della refrigerazione: esperienze appositamente condotte hanno dimostrato che una refrigerazione immediata porta allo stadio di deterioramento entro 15 giorni, mentre basta un ritardo della refrigerazione di circa 9 ore a 26 °C per anticipare il deterioramento a 5 giorni. Le esperienze raccolte hanno messo in evidenza che, nelle

specie tropicali, la decomposizione procede molto rapidamente a temperature al di sopra dei 25 °C. È stato possibile notare anche che le specie dominanti sono *Alteromonas putrefaciens*, le aeromonadi, i vibrioni e ceppi di enterobatteri. Di particolare interesse è la identificazione di *Aeromonas hydrophila* tra gli organismi dominanti: tale germe infatti è un patogeno opportunista che si riproduce e causa deterioramento ed è anche produttore di istamina. Tale germe e le aeromonadi in genere sono in grado di moltiplicarsi anche a temperature più basse vicine a quelle della refrigerazione: esse probabilmente derivano dal ghiaccio o dall'acqua con cui il pesce viene lavato e diventano significativi quando il pesce è mantenuto al di sopra dei 5 °C.

Un ritardo nella refrigerazione del pesce ha un effetto notevole sui tempi di deterioramento. Tali ritardi si verificano soprattutto sui piccoli pescherecci nelle aree tropicali ove non sempre sono disponibili celle frigorifere e ghiaccio per la refrigerazione.

La microflora dominante all'inizio, costituita soprattutto da Pseudomonadacee, viene largamente sostituita da *Micrococcus* e Enterobatteriacee man mano si allunga l'attesa della refrigerazione. Il fenomeno sembra essere un po' più lento nel caso del pesce di acqua

dolce. Naturalmente, come per altri alimenti, il processo di deterioramento procede tanto più lentamente quanto più è basso il rapporto superficie volume per cui la velocità del deterioramento aumenta man mano si passa dal pesce intero a quello eviscerato ai filetti e bastoncini fino alla polpa macinata.

I.5.Istamina

L'intossicazione da pesci appartenenti alla famiglia degli sgombroidi a causa dell'accumulo di alti livelli di istamina è strettamente correlata a fenomeni di deterioramento. I pesci coinvolti appartengono a specie molto comuni quali tonno, maccarello, sardine, alici, ecc. Tali pesci sono molto ricchi di un aminoacido libero, l'istidina che viene trasformata in istamina dalla flora gram negativa. Quando la temperatura di conservazione è bassa, il livello di istamina formato rimane basso e comunque non tale da causare i sintomi dell'intossicazione, ma quando la temperatura supera i 15 °C i livelli di istamina prodotti superano i 100 mg per 100 g di prodotto e possono causare i sintomi. L'attuale legislazione (DL.vo 531 del 30 dicembre 1992) prevede che per un lotto di pesce debbano essere prelevati 9 campioni per i quali il tenore medio non deve superare i 100 mg/100 g,

due campioni possono avere valori tra 100 e 200 e nessuno deve comunque oltrepassare i 200 mg/100 g.

Tra i germi produttori di istamina alcuni, come le pseudomonadacee e i vibrioni, sono naturalmente presenti nel pesce mentre altri come *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* *Klebsiella pneumoniae* ed *Enterobacter aerogenes* sono invece aggiunti durante le operazioni di manipolazione

Raccomandazioni:

- Conoscenza delle aree di pesca e selezione di quelle meno contaminate, specialmente per quanto concerne le biotossine algali e i patogeni enterici;
- Raffreddamento immediato dopo la cattura in modo da portare rapidamente la temperatura al di sotto dei 5 °C;
- Mantenimento della catena del freddo a temperature < 2 °C.
- Adeguamento delle strutture al GMP (*Good Manufacturing Practise*).
- Prevenzione delle contaminazioni crociate durante le manipolazioni e le operazioni di eviscerazione e filettatura, specialmente se condotte nei mercati all'aperto;
- Utilizzazione di acqua e ghiaccio non contaminati.

I.6.Acquacoltura

Un cenno a parte merita l'acquacoltura i cui prodotti, come è già stato accennato, costituiscono una parte importante della produzione ittica (circa il 12% a livello mondiale). In questa produzione sono compresi sia pesci di largo consumo come il pesce gatto, il salmone e la trota sia gamberi e ostriche. Il pesce gatto viene allevato soprattutto nel sud-est degli Stati Uniti , il salmone nel nord Europa e sulle coste settentrionali del Pacifico, i gamberi in Asia e Sud America. Questa tecnologia è destinata ad espandersi anche a causa della incipiente scarsità del prodotto naturale.

La microflora iniziale è abbastanza simile a quella del prodotto naturale, anche se può essere condizionata da alcuni fattori, tra questi la presenza di sostanze nutritive utilizzate per arricchire le acque e per nutrire gli animali, la densità dei pesci presenti, le modalità di processo e distribuzione del prodotto.

È stato osservato che le trote di allevamento presentano una maggiore incidenza di *Clostridium botulinum*, mentre patogeni enterici quali Salmonella e Shigella diventano comuni in allevamenti che ricevono

acque di scarico. Il livello della contaminazione dipende da fattori chimico-fisici, dalla grandezza del pesce e anche dalla presenza di fonti di contaminazione quali anfibi e uccelli.

I ceppi di salmonella isolati dagli impianti di allevamento mostrano spesso resistenze multiple agli antibiotici. Negli allevamenti di crostacei, come accennato in precedenza, prevalgono invece patogeni appartenenti al genere *Vibrio*.

Per quanto concerne i prodotti di acquacoltura, alle raccomandazioni prima elencate è necessario aggiungere quelle del controllo periodico dei mangimi utilizzati e dei campionamenti periodici delle acque e dei sedimenti.

II.DETERIORABILITA' DEL PESCE E DEI MOLLUSCHI

Il pesce fresco ed i prodotti della pesca sono altamente deperibili in virtù della loro composizione. In normali condizioni di refrigerazione, la shelf-life di questi prodotti è limitata dal deterioramento enzimatico e microbico. Tuttavia, con un incremento di richiesta da parte del consumatore di prodotti freschi con una più ampia shelf-life e con l'aumento dei costi energetici associati ai sistemi di conservazione con l'applicazione del freddo, l'industria di lavorazione del pesce sta attivamente cercando metodi alternativi per la preservazione della shelf-life e la commerciabilità del pesce fresco refrigerato e allo stesso tempo ridurre i costi energetici. Metodi addizionali che potrebbero soddisfare questi obiettivi includono la decontaminazione chimica, basse dosi di irradiazioni, alte pressioni, e confezionamento in atmosfera protettiva.

Nel 1973, la FAO pubblicò il “Codice di pratica del pesce fresco” con particolare attenzione sulla manipolazione del pesce fresco. Una sezione di questa pubblicazione recita: “Il pesce è un prodotto altamente deperibile, e deve essere manipolato con cautela in modo

tale da inibire la crescita dei microrganismi. La qualità di questi prodotti si riduce rapidamente ed il prolungamento della vita commerciale si ha solo se vengono opportunamente manipolati e stoccati”. Il fatto che il pesce si deteriora più velocemente rispetto alla carne è un fenomeno accertato nell’ultima parte del secolo scorso. Durante questo periodo, la maggior parte del pescato era sbarcato in porti lontani rispetto al luogo di raccolta. Questo fatto, associato ad un’errata pratica di manipolazione a bordo delle navi e a terra portava ad un deterioramento di grandi quantità di pesce prima che lo stesso giungesse al consumatore. Con la recente tendenza al consumo di prodotti della pesca freschi e molluschi la sanità pubblica ha cominciato a preoccuparsi non solo di qualità del prodotto ma anche di sicurezza. Per esempio, *Vibrio vulnificus*, un batterio alofilo ubiquitario nelle acque calde estuarie, può trasmettersi all’uomo attraverso il consumo di molluschi crudi, tale organismo può essere collegato a malattie alimentari incluse gastroenterite e setticemia primaria, inoltre, esso può moltiplicare in frutti di mare se tenuti a temperature di circa 10°C. Recentemente il World Health Organization Surveillance Program per il controllo delle malattie alimentari e le tossinfezioni in Europa riporta una intossicazione alimentare a Sydney,

Australia. Tests hanno accertato che alcune delle vittime soffrivano di un'infezione da *Vibrio parahaemolyticus* a seguito del consumo di ostriche contaminate. I potenziali rischi per la salute del consumatore, associati ad un'alta richiesta di pesce lontano dai luoghi di cattura, hanno intensificato l'attenzione verso tecniche di conservazione a lungo termine. Inoltre, la crescita della popolazione mondiale, sottolinea la necessità di prevenire il deterioramento mantenendo l'alta qualità e la sicurezza soddisfacendo così l'alta richiesta del mercato per cibi altamente proteici. L'inadeguatezza della conservazione con ghiaccio nell'immagazzinamento e distribuzione del pesce fresco nel mercato in espansione fu riportato da Holston e Slavin. A causa dell'alta suscettibilità al deterioramento del pesce e dei frutti di mare subito dopo la raccolta, i metodi di preservazione sono destinati a mantenere freschezza e qualità, a cominciare dal punto di raccolta, proseguendo con la refrigerazione, lavorazione e distribuzione fino al consumo. L'efficacia di ogni metodo e lo stabilire le condizioni di immagazzinamento per il controllo e la deteriorabilità di pesce e frutti di mare dipende dai meccanismi di deterioramento implicati. Così, lo studio delle modificazioni biochimiche post-mortem nel pesce e nei molluschi e la loro relazione con i vari meccanismi del deterioramento,

è essenziale per formulare strategie più efficaci per controllare il deterioramento dei prodotti della pesca.

Il deterioramento si riferisce a ogni cambiamento dello stato dell'alimento tale da renderlo meno appetibili o addirittura tossico; questi cambiamenti possono accompagnarsi a alterazioni del sapore, dell'odore, del colore e della consistenza. Il deterioramento del muscolo dei pesci e dei molluschi è il risultato di cambiamenti causati da reazioni biologiche come l'ossidazione dei lipidi, reazioni tali da attivare gli enzimi propri del pesce, e l'attività metabolica dei microrganismi. Il determinarsi dell'uno o dell'altro processo sopramenzionati dipende da fattori specifici quali la composizione chimica del pesce. Chimicamente, pesci e i molluschi hanno quattro elementi essenziali: proteine, lipidi, carboidrati e acqua. La relativa proporzione di tutti questi elementi caratterizza la struttura del pesce e dei molluschi. Accanto a tali componenti, ci sono le vitamine e altri componenti minori, alcuni dei quali sono importanti nei processi deteriorativi. Tra di essi ricordiamo gli "estrattivi" (estraibili nell'acqua o in soluzioni acquose) che comprendono aminoacidi liberi, zuccheri e basi nitrogenose volatili come ammonio, ossido di trimetilamina (TMAO), creatina, taurina, acido urico, anserino,

carnosina e istamina. La composizione chimica non è generalmente costante a causa delle variazioni stagionali e del ciclo riproduttivo dei pesci e dei molluschi. Una volta che l'animale muore le difese del suo corpo cessano di operare, nel caso del pesce, si è visto che i microrganismi presenti nelle branchie, intestino e cute, in associazione con l'attività degli enzimi endogeni, iniziano a metabolizzare gli altri componenti, determinando perdita di fragranza, deterioramento della tessitura, scolorimento e altri cambiamenti caratteristici del pesce deteriorato. In generale, i meccanismi di deterioramento del pesce e dei molluschi possono essere divisi in tre diversi tipi: microbici, enzimatici e chimici.

II.1.Deterioramento microbiologico

Particolare attenzione deve essere posta sul ruolo dei microrganismi nel deterioramento del pesce e sullo studio di strategie per ridurre la proliferazione microbica negli alimenti. Come menzionato prima, i batteri nelle branchie, nell'intestino e sulla cute iniziano a metabolizzare i composti a basso peso molecolare, producendo composti volatili responsabili del deterioramento. In condizioni di refrigerazione, questo è un fenomeno superficiale. Tuttavia, l'uso improprio delle temperature o tagli della cute del pesce per impropria manipolazione favoriscono l'invasione dei microrganismi nei muscoli naturalmente sterili, favorendo un più rapido deterioramento.

II.1.1. Microrganismi deterioranti

Molti studi hanno accertato che i microrganismi associati ai pesci di mare riflettono la popolazione microbica del loro ambiente. Pesci e molluschi appena pescati da acque calde presentano una popolazione microbica composta primariamente da mesofili gram positivi come

Micrococcus, Coryneformi, Bacillus. Dall'altra parte, specie pescate da acque fredde presentano microbi psicrofili gram⁻ come Moraxella/Acinetobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, e Vibrio. Ciò spiega che i prodotti della pesca raccolti in acque temperate si deteriorano più velocemente di quelli pescati in acque tropicali o provenienti da acque fredde perché in essi sono naturalmente presenti batteri deterioranti psicrotrofi gram negativi. I pesci pescati in acque temperate sono risultati organoletticamente accettabili per 14 giorni mentre quelli pescati da acque fredde risultano inaccettabili dopo 11 giorni. I batteri isolati mostrano un notevole aumento degli Pseudomonas psicrofili che costituiscono il 67% della popolazione microbica. Alcuni batteri diminuiscono la lag-fase prima del conseguente deterioramento se refrigerati o conservati sotto ghiaccio. Ciò si può osservare in gamberetti, conservati sotto ghiaccio, della specie Penaeid e Pandalid. Inoltre il valore Q10 per gli enzimi endogeni di pesci provenienti da acque fredde tende ad essere leggermente basso rispetto a quello dei pesci tropicali o comunque pescati in acque calde. Così, gli enzimi di specie provenienti da acque fredde potrebbero aumentare il deterioramento post mortem nella fase di manipolazione e refrigerazione rispetto a quelli provenienti da acque

calde. Ci sono altri microrganismi, non direttamente responsabili di deterioramento dei prodotti della pesca che sono conosciuti dalla sanità pubblica come responsabili di produzione di tossine pericolose. Il 90% delle intossicazioni da consumo di prodotti della pesca sono attribuibili ai frutti di mare e a poche specie di pesci. Tra di esse ricordiamo il botulismo, una malattia neuromuscolare spesso fatale causata da tossine prodotte da *Clostridium botulinum* tipo E; gastroenterite causata da un microrganismo marino quale *Vibrio parahaemolyticus*; varie tossine algali (saxitossina) che si accumulano in particolare nei molluschi bivalvi; e sgombrotossine causate dal consumo di pesce contaminato della famiglia degli Scombridae, che include tonno e bonito (tonno striato). L'intossicazione da sgombrotossine determina un inusuale aumento dei livelli di istamina nei cibi, che altro non è che il risultato della conversione dell'istidina in istamina operata dall'enzima microbico istidina-decarbossilasi. Esempi di batteri coinvolti in tale processo sono *Morganella morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas putrefaciens* e *Clostridium perfringens*. Quando il pesce è conservato sotto ghiaccio l'attività microbica è appena ridotta perché il pesce supporta ancora una porzione di batteri psicrotrofi. L'iniziale popolazione batterica del pesce refrigerato è molto eterogenea. Con il

tempo, i batteri psicotrofi, come *Pseudomonas*, *Moraxella*/*Acinetobacter*, diventano predominanti a seguito di una naturale competizione. Una situazione simile si osserva con i bivalvi, dove la popolazione batterica è inizialmente eterogenea fino a diventare dopo omogenea e selettiva a seguito dell'attività microbica e biochimica nei tessuti. In contrasto con molti altri prodotti della pesca che hanno una trascurabile presenza di carboidrati, i livelli di *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* diminuiscono durante i processi di deterioramento indicando l'importanza della composizione chimica nei processi deteriorativi.

II.1.2. Chimica del deterioramento microbico

Nella fase post mortem, gli enzimi dei microrganismi deterioranti metabolizzano la frazione estrattiva della muscolatura del pesce, producendo una grande varietà di composti volatili. L'ossido di trimetilamina (TMAO), trovato in un gran quantità di pesci marini e molluschi, si ottiene dalla trimetilamina ad opera di enzimi endogeni o enzimi batterici come la trimetilamina-ossidasi. TMAO può anche essere scissa in dimetilamina e formaldeide. TMA reagisce con i lipidi

presenti nella muscolatura del pesce dando origine al caratteristico odore “di pesce di bassa qualità”. Quando l’approvvigionamento di ossigeno è esaurito, molti batteri deterioranti utilizzano il TMAO come un accettore terminale di idrogeno, così possono crescere in condizioni anossiche. Questo potrebbe spiegare perché i prodotti della pesca si deteriorano più rapidamente rispetto ad altri muscoli. Ciò può anche spiegare perché la formaldeide prodotta nella reazione cross-link delle proteine muscolari, contribuisce alla consistenza dura che si presenta nel congelamento. Altri composti prodotti dall’attività microbica sono l’idrogeno solforato, il dimetil solfito, il metil mercaptano, acidi grassi a catena corta ,da zuccheri come glucosio e ribosio, indolo, putrescina e cadaverina dalle proteine. La produzione di indolo può essere correlata al forte odore di decomposizione caratteristico del deterioramento dei gamberetti. Smith e al. stabilirono che la produzione di indolo era differente durante il raffreddamento a temperature non idonee. A 10°C organismi indolo-positivi come *Aeromonas* e *Proteus* attaccano le proteine muscolari, rilasciando triptofano che è successivamente convertito in indolo dall’attività microbica. Piccole quantità di indolo sono prodotte da batteri non proteolitici come *Flavobacterium* solo dopo che il triptofano è

rilasciato dalla microflora psicrotrofa proteolitica come *Pseudomonas*.
Alti livelli di indolo, sono poi indicativi di errate applicazioni di temperature nella catena di produzione.

II.2. Deterioramento enzimatico

Sebbene il deterioramento dei prodotti della pesca è attribuito invariabilmente all'attività di microrganismi contaminanti la perdita di freschezza, che spesso precede il deterioramento, implica inizialmente reazioni autolitiche controllate da enzimi endogeni presenti nei tessuti muscolari e quelli provenienti dall'intestino. L'ATP è la fonte di energia per l'attività metabolica. In sua assenza, tutte le attività di biosintesi si arrestano, in virtù del fatto che si riduce la capacità della cellula a mantenere la sua integrità. Alcune ricerche hanno evidenziato una stretta correlazione tra il catabolismo del nucleotide e la ridotta freschezza. L'inizio del rigor mortis è direttamente correlato alla diminuzione del pH muscolare e ad altri fattori, come la temperatura e condizioni fisiologiche prima e dopo la morte. Lo stress prima della morte riduce il periodo pre-rigor in molte specie ittiche. L'effetto della temperatura di immagazzinamento sull'inizio del rigor è più difficile

da accertare. In aggiunta all'attività della nucleotidasi e degli enzimi microbici, una moltitudine di altri enzimi endogeni possono cambiare nei prodotti della pesca caratteri quali odore, colore e consistenza. Anche se questi cambiamenti qualitativi non necessariamente condizionano la qualità dell'alimento, spesso riducono l'appetibilità dei prodotti.

II.2.1. Deterioramento dell'odore

Nel pesce pescato, l'iniziale catabolismo dell'ATP è il risultato dell'accumulo di inosin monofosfato (IMP) che contribuisce al caratteristico odore della carne. Mentre l'influenza dell'IMP sull'odore del pesce fresco deve essere apprezzata, la modificazione dei lipidi durante la lavorazione e l'immagazzinamento del pesce e dei molluschi deve essere controllata in quanto responsabile di perdita dell'odore e del deterioramento chimico e sensoriale del prodotto. Queste specie contengono grandi quantità di lipidi con alte proporzioni di acidi grassi poliinsaturi che provocano il deterioramento per mezzo dell'ossidazione durante la lavorazione e l'immagazzinamento. Alcuni autori attribuiscono tali cambiamenti all'idrolisi dei fosfolipidi altri

ancora all'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi o all'idrolisi dei lipidi. Inizialmente si pensava che l'ossidazione dei lipidi nella muscolatura del pesce fosse di natura non enzimatica, ora sta prendendo piede l'importanza dell'ossidazione enzimatica. Enzimi come la lipossigenasi, la perossidasi e gli enzimi microsomiali dei tessuti animali possono, potenzialmente, iniziare la perossidazione dei lipidi con produzione di idroperossidi. I prodotti di scarto di questi idroperossidi, per esempio, aldeidi e chetoni, poi possono essere responsabili della perdita di odore in vari alimenti. Generalmente aldeidi con 3 doppi legami possiedono una bassa soglia di odore e sono componenti critici responsabili di perdita di odore. I tessuti dei pesci sono ricchi in acidi grassi ω -3 poliinsaturi, e sono molto suscettibili all'ossidazione lipidica con conseguente rilascio di aldeidi, con 3 doppi legami responsabili della caratteristica ossidazione con perdita di odore. Altri prodotti di scarto associati con la caratteristica perdita di odore del pesce sono 1,5-octadien-3-ol, 1-octan-3-ol e exanale. A basse concentrazioni questi trasmettono l'odore di pesce fresco. Tuttavia, come l'ossidazione lipidica procede durante il trattamento e l'immagazzinamento del pesce pescato, la loro concentrazione aumenta e la perdita di odore cresce.

II.2.2 Modificazioni di colore

Il problema dello scolorimento è uno dei più seri per quanto riguarda l'industria dei prodotti ittici, dove gamberi, astici, rapidamente si deteriorano in virtù delle loro caratteristiche biologiche e biochimiche. Il decoloramento si riconosce per il punto nero e può chiamarsi anche melanosi o imbrunimento enzimatico. Inizialmente questo fenomeno era attribuito all'attività microbica. Tuttavia ora si sa che è dovuto all'attività ossidativa delle fenolasi presenti nei tessuti dei crostacei, ed ancora nei gamberetti rosa e bianchi. Similmente, la lipossigenasi associata con la cute del pesce ha mostrato di favorire un imbrunimento post-raccolta di pigmenti carotenoidi nella pelle del pesce e/o nella parte muscolare. Nei crostacei vivi, la fenolasi è conosciuta come polifenolo-ossidasi ed è coinvolta nella formazione di N-acetildopamina e dei suoi derivati, che sono considerati agenti cuticolari sclerotizzanti. Nella fase post-mortem, la fenolasi enzimatica ossidativa della tirosina e altri fenoli come la melanina, portano alla comparsa del "punto nero". Alcune fenolasi esistono anche in forma latente che richiede l'attivazione di enzimi proteolitici come la tripsina. Nel caso di tali forme latenti bisogna dire che quando essi

sono attivati, aumenta l'attività per il substrato. Così l'attivazione di PPO può controllare il processo sclerotizzante nei crostacei vivi. Poiché tale controllo è inattivato nella fase post-mortem, c'è una graduale attivazione degli enzimi che eventualmente portano a comparsa del punto nero. Altre forme di scolorimento sono l'inverdimento delle specie di tonno o l'ingiallimento della polpa. L'inverdimento, associato alla mioglobina, è attribuibile all'esposizione ad opera dell'ossido di trimetilamina (TMAO). L'ingiallimento è legato alla migrazione di pigmenti carotenoidi dai cromatofori e carotenoproteine complesse della pelle e dello strato sottocutaneo adiposo. L'ossidazione dei pigmenti carotenoidi può anche derivare dall'affievolimento del colore rosa o rosso della parte carnosa del pesce o della pelle quando è conservato con ghiaccio o a temperature fredde.

II.2.3. Cambio nella tessitura

L'interazione dei lipidi con proteine ed altri costituenti muscolari genera implicazioni con i contenuti nutritivi e le caratteristiche del muscolo inteso come alimento. Livelli di acidi grassi liberi, che si

innalzano durante lo stoccaggio del pesce, possono causare denaturazione delle proteine e minare così la tessitura e capacità di tenuta dell'acqua, ovvero causare il "drip-loss". Questo incremento di acidi grassi liberi è attribuibile a fosfolipasi A e lipasi lisosomiale. Implicate, inoltre, nel deterioramento della tessitura sono le proteasi alcaline, il cui ruolo può non essere significativo se la loro attività post mortem è trascurabile. L'idrolisi dei carboidrati può contribuire alla degradazione glicogenica nel muscolo del pesce pescato. I lisosomi muscolari contengono enzimi proteoglicano-degradanti come beta-glucuronidasi e beta-N-acetilesosaminidasi che possono contribuire all'intenerimento post mortem. Infine, la conversione nel muscolo da glucosio a lattato contribuisce alla diminuzione del pH, che può influire negativamente sulla tessitura e consistenza del muscolo.

II.3. Deterioramento chimico

L'effetto degli enzimi autolitici sul deterioramento dei prodotti ittici è il risultato della formazione di idroperossidi. Tuttavia, ci sono altri tipi di deterioramento legati alla formazione di perossidi come quelli non

enzimatici, vale a dire, la rancidità ossidativa e l'imbrunimento non enzimatico. Questi sono dovuti a cambiamenti chimici nel tessuto muscolare legati a vari fattori, tra cui la natura dei lipidi. La rancidità ossidativa è conosciuta come una delle maggiori cause di deterioramento dei prodotti della pesca. Il processo comporta l'ossidazione di acidi grassi insaturi o trigliceridi nei prodotti ittici con successivo meccanismo del radicale libero. Una volta iniziata la reazione, i perossidi instabili che si sono formati sono convertiti in radicali liberi, che a turno possono accelerare la percentuale di autossidazione. È la susseguente attivazione di queste reazioni secondarie che contribuisce all'odore ossidato del prodotto della pesca. Varie sostanze biochimiche come gli aminoacidi, acidi organici e pigmenti dimostrano di utilizzare la reazione di ossidazione da sole o in associazione con certi ioni metallo. I più importanti ioni metallo implicati nell'ossidazione lipidica sono Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} . Altri fattori che possono iniziare l'ossidazione lipidica ed indurre il deterioramento sono la temperatura, attività dell'acqua e il pH. L'altro tipo di deterioramento chimico è l'imbrunimento non enzimatico. Questo fenomeno, che spesso comporta scolorimento della muscolatura del pesce, è parzialmente causato dalla reazione di Maillard, coinvolgente

ribosio e amino gruppi. Tuttavia, le reazioni d'imbrunimento sono legate a reazioni autossidative di prodotti lipidici interagenti con le proteine. Questa reazione, diversa dal meccanismo dei radicali liberi sopra citata, è dovuta alla condensazione ionica di amino gruppi primari di proteine con aldeidi insature coniugate o l'ossidazione di prodotti lipidici attivi, risultanti dalla spaccatura di idroperossidi insaturi. Khayat e Schwall postularono che tale imbrunimento prevedeva tre tappe

1. formazione di perossidi di lipidi;
2. formazione di sbiadimento o di precursori leggermente colorati di pigmenti bruni a seguito dell'interazione dei perossidi con gruppi di proteine attive e dall'interazione di prodotti di decomposizione perossidi carbonilici con gruppi di proteine attivi, e
3. trasformazione dello sbiadimento o precursori debolmente colorati in pigmenti bruni.

II.4. Fattori influenzanti il deterioramento

Fattori influenzanti il deterioramento quali l'iniziale manipolazione, la temperatura ed il pH sono molto importanti.

II.4.1. Manipolazione

Per garantire l'ottima qualità e la shelf-life, è essenziale che i pesci appena pescati siano trattati in maniera opportuna appena vengono scaricati dai pescherecci. Alcuni di questi trattamenti post raccolta includono la desquamazione, il lavaggio, l'eviscerazione, la decapitazione e il dissanguamento. Cattive pratiche di manipolazione possono, tuttavia, accrescere la soglia di deterioramento. Il dissanguamento non migliora la qualità di tutte le specie di pesce e spesso può incrementare il deterioramento. I pesci appena catturati sono spesso spruzzati o lavati con acqua potabile per ridurre la contaminazione superficiale. Ciò contribuisce al miglioramento della qualità del prodotto, ma il flusso di acqua deve essere regolato in modo

tale da evitare di illividire o danneggiare fisicamente il pescato e in modo tale da rimuovere la fanghiglia superficiale che potrebbe contenere elementi microbici. L'eviscerazione e la decapitazione di alcune specie potrebbe contribuire all'estensione della shelf-life. L'eviscerazione di merluzzo ed eglefino comporta una riduzione della carica psicrotrofica rispetto a quella degli stessi pesci non eviscerati, tuttavia, tali differenze non sono statisticamente significative. Queste estensioni minime della shelf-life, tuttavia, non si possono osservare in tutte le specie ittiche trattate. Questi trattamenti preliminari apportano benefici perchè :

- 1) presentano il prodotto in uno stato appropriato per il successivo processo,
- 2) estendono la shelf-life tramite rimozione di parti facilmente deperibili,
- 3) riducono le quantità di materiale non utilizzabile, con risparmio economico nel trasporto del prodotto.

1.4.2. Temperatura e pH

L'influenza della temperatura può essere associata ad una miriade di microrganismi deterioranti che a loro volta dipendono dall'habitat dei pesci, che può essere temperato o tropicale. Le temperature influenzano i processi deterioranti, in modo tale che le attività biochimiche sono ridotte a basse temperature, ed aumentate ad alte temperature. Per esempio, Olley e Lovern dimostrarono che il range di proteine denaturate e l'idrolisi dei fosfolipidi nei merluzzi erano ridotti a basse temperature di conservazione, inoltre notarono che l'idrolisi a -14°C era 10 volte maggiore rispetto a -22°C , mentre l'attività era 3 volte maggiore a 20°C rispetto a 0°C . Questi cambiamenti biochimici a basse temperature possono essere attribuiti a denaturazione delle proteine/enzimi legati a aumento del congelamento in concentrazioni di soluto che a turno determinano cambi della concentrazione ionica e del pH. Il progressivo abbassamento dell'attività biochimica e microbica a basse temperature ha contribuito ad adottare ridotte temperature per la conservazione del pescato. Il coefficiente temperatura per la qualità deteriorativa del pesce è 5 tra $0^{\circ}\text{-}6^{\circ}\text{C}$ e la

shelf-life con appropriate manipolazione è di 8-12 giorni. Con un caratteristico pH piuttosto basso e un ridotto catabolismo nucleotidico che si ha nel pre-rigor, storione e tonno non seguono tale regola. Il prolungato pre-rigor in molte specie è attribuito alla loro riserva di glicogeno muscolare. Ci sono, tuttavia, altri processi deteriorativi che possono realizzarsi a basse temperature di refrigerazione o a condizioni di basse temperature di stoccaggio. Per esempio, la degradazione dell'ATP nel muscolo di platessa era più bassa a 5°-15°C che a 0°C, risultando in ritardo il rigor mortis ad alte temperature. Ancora, alcuni batteri psicotrofi deterioranti sono abili a proseguire il processo deteriorativo a temperature di refrigerazione così come a quelle ridotte. La temperatura esercita una certa influenza sulla rottura della tensione e della rigidità delle fibre muscolari, con conseguente spaccatura. A basse temperature, i fattori riducenti la percentuale di deplezione di riserva energetica tendono a prolungare il periodo pre-rigor. Come però le temperature aumentano, un buon numero di fibre muscolari guadagna energia sufficiente a superare la resistenza dei tessuti, che poi va incontro a rottura, perdendo tensione. La temperatura inoltre incide sulla decolorazione del pesce influenzando la sensibilità della mioglobina del pesce all'autossidazione. Il pH

influenza il deterioramento in virtù degli effetti sui microrganismi e sull'attività enzimatica. Con la fase post-mortem il pH scende, generalmente, a 5,5-6,5 a causa dell'acido lattico derivante dalla glicogenolisi sotto condizioni anossiche. La percentuale e l'ampiezza del declino del pH influenzano la qualità della carne in vari modi. Ad esempio, quando un tonno di grossa taglia viene catturato perde una certa quantità di O₂, a seguito di una strenua lotta prima di morire con conseguente acidosi muscolare. La diminuzione del pH può favorire la flora microbica contaminante come dimostrato da batteri acido lattico resistenti che diventano dunque le specie dominanti in carni contaminate di ostriche. La diminuzione iniziale del pH è imputabile alla decomposizione di composti nitrosi. Queste variazioni del pH sono influenzate da temperature errate. Tuttavia, quando il pH tende ad aumentare a seguito di una riduzione erronea della T°, che consente accumulo di ammoniaca, il deterioramento è incrementato. Per esempio, CDP/CAF hanno minore attività a pH fisiologico di 7 e potrebbero poi giocare un ruolo minore nella rottura miofibrillare a pH post mortem se comparato con catepsina D, che è attiva a pH post mortem.

III. ESTENSIONE DELLA SHELF-LIFE

A causa della natura deperibile dei prodotti ittici, la scoperta di metodi soddisfacenti per l'estensione della shelf-life che nel contempo assicurino il mantenimento e la stabilità delle qualità, hanno occupato l'attenzione di tecnologi alimentari per molti anni. L'affumicamento, il lavaggio e la salatura mirano a ridurre l' a_w per inibire la proliferazione di germi deterioranti e inattivare gli enzimi autolitici. Nei tropici, l'affumicamento richiede temperature elevate eccessive che riducono il numero di batteri vegetativi presenti nel pesce crudo. Questo comporta l'estensione della shelf-life per diversi giorni, purché le temperature durante la distribuzione e l'esposizione al dettaglio siano inferiori a 4°C. L'effetto dell'affumicamento è potenziato dalla salatura e susseguente refrigerazione, che contribuisce alla formazione di una pellicola di soluzione di proteine saline solubili. Questo rivestimento umido assorbe gli antiossidanti e gli effetti batteriostatici del fumo creando una barriera contro l'invasione batterica e la ricorrente rancidità. Una volta disgregata, tuttavia, la carne del pesce diviene un pabulum ideale per la crescita di microrganismi deterioranti. Diversamente dai tropici, in altri paesi si fa riferimento ad

un “affumicamento a freddo” con temperature più basse. Questo approccio tuttavia non è né efficiente a distruggere i microrganismi profondi, né comporta riduzioni dell' a_w tali ad inibirne la crescita. Spesso con la salatura del salmone antecedente l'affumicamento, l' a_w rimane superiore a 0,96, tale valore è troppo alto per prevenire la crescita di molti organismi deterioranti e patogeni. Se da un lato tali trattamenti favoriscono il prolungamento della shelf-life, dall'altro cambiano drasticamente le caratteristiche del pesce. Ci sono però altri metodi che garantiscono entrambe le cose. Tra questi distinguiamo sia metodi tradizionali come la conservazione a basse temperature sia nuove tecniche come irradiazione a basso dosaggio, trattamenti di alta pressione, confezionamento in atmosfera protettiva.

III.1. Metodi tradizionali

III.1.1. Conservazione a basse temperature

Le basse temperature sono usate per ritardare il deterioramento microbico di una grande varietà di prodotti ittici già dalla metà del diciannovesimo secolo . Il freddo previene il deterioramento e la

contaminazione microbica senza necessariamente uccidere i microrganismi. La refrigerazione ha il vantaggio di mantenere la freschezza e le qualità organolettiche dei prodotti ittici, tuttavia non distruggere né elimina completamente i microrganismi potenzialmente patogeni. Esistono infatti patogeni psicotropi come *Aeromonas hydrophila* ed in particolare *C.botulinum* tipo E che riescono a crescere e produrre tossine anche a temperature di refrigerazione. A causa della rapidità di deterioramento dei prodotti ittici e poiché, spesso, una volta catturati sono trasportati per lunghe distanze, essi vengono conservati sulle navi sotto ghiaccio. Il rapporto FAO raccomanda il raffreddamento a temperature di 0°C il più rapidamente possibile in quanto la shelf-life può essere ridotta di un giorno per ogni ora di ritardo nel metterli sotto ghiaccio o a seguito di esposizione a temperature ambientali di 28°-30°C. Inoltre l'incremento di 1° o 2°C al di sopra della temperatura raccomandata può marcatamente incrementare la percentuale di crescita dei microrganismi. Altri interessanti studi non hanno rilevato effetti dannosi derivanti da ritardo nella deposizione di ghiaccio sulla qualità del pesce, ma d'altro canto se si deve avere un buon tempo di commercializzazione la conservazione sotto ghiaccio è essenziale. Se da un lato si hanno effetti

benefici sulla protezione della qualità dei prodotti ittici con tale metodo, dall'altro è svantaggioso come metodo per il ridotto tempo di conservazione. Holston e Slavin hanno notato che alcuni degli svantaggi dell'utilizzo del ghiaccio sono la tendenza a danneggiare la carne e a dissolvere componenti aromatiche e minerali nutrizionalmente desiderabili, come le proteine solubili in H₂O. La conservazione sotto ghiaccio del pesce può essere un'operazione laboriosa e dispendiosa a causa della taglia del pescato. Così sistemi che usano alcune forme di refrigerazione meccanica con acqua marina (RSW) stanno soppiantando il ghiaccio su diverse navi. L'esame di salmone trattato con sistema RSW ed il confronto con quello posto sotto ghiaccio ha evidenziato una rapida crescita microbica nel secondo sistema (ICE) rispetto al primo. Questo fatto è dipendente da condizioni aerobiche presenti durante la conservazione con ghiaccio che favoriscono una più rapida crescita microbica. Un inconveniente del sistema RSW soprattutto quando sono usati contenitori lavati, è che, mentre solo una parte del pesce totale sotto ghiaccio potrebbe deteriorarsi, nel caso del RSW tutto o quasi tutto il pesce potrebbe essere buttato via se si ha deterioramento. L'associazione di RSW con refrigerazione ma con atmosfera modificata (MRSW) ha evidenziato

un maggiore ritardo nel deterioramento dei gamberetti e nel pesce rispetto ad una conservazione sotto ghiaccio. L'aggiunta di CO₂ al sistema MRSW consente il controllo della crescita batterica attraverso la riduzione del pH della soluzione salina, ed è dunque più efficace del sistema RSW e della conservazione sotto ghiaccio nel rallentare il deterioramento. Tuttavia, tale sistema è risultato dannoso per certe caratteristiche sensoriali del pesce conservato in quanto promuove un innalzamento del sapore sale, incrementa la possibilità di rancidità nel congelamento e può portare a scolorimento. L'applicazione del sistema RSW è ristretta in virtù degli alti costi a seguito dell'uso di apparecchiature resistenti alla corrosione molto dispendiose. Il "super-raffreddamento" o "parziale congelamento" con temperature a -3°C o -4°C, è un'altra forma di trattamento a bassa temperatura per il prolungamento della shelf-life dei prodotti ittici. Con il giusto controllo della temperatura, questa tecnica minimizza i microrganismi e le reazioni autolitiche che si hanno a parità o al di sotto del punto di congelamento. L'inconveniente di tale sistema è che si ha un incremento dell'idrolisi dei fosfolipidi e la denaturazione delle proteine al di sotto dei -5°C.

III.1.2. Trattamenti chimici

Non si sa quanto possa essere efficace una tecnica di conservazione, e né se un prodotto contaminato o di bassa qualità possa aver ridotta shelf-life sotto queste condizioni di conservazione. Buone manipolazioni iniziali non sono sufficienti a ridurre cariche microbiche. A completamento di ciò le alte temperature di lavaggio del pesce intero devono essere applicate per rimuovere l'insudiciamento superficiale e la sua microflora associata. Questo trattamento, quando applicato a filetti di pesce, ha dimostrato di ridurre conte psicrotrofiche fino al 99% con conseguente estensione della shelf-life del prodotto di 11-12 giorni rispetto ai 7-8 giorni per filetti trattati con metodi tradizionali. La tecnica di decontaminazione usata nell'industria ittica è intesa come "depurazione", ovvero come processo dinamico grazie al quale i prodotti ittici possono liberarsi dai microrganismi con H₂O marina pulita. In aggiunta alla riduzione o rimozione di contaminanti microbici, si realizza lo spurgo di sabbia e granelli di sabbia dagli intestini, in modo da renderli più appetibili per il consumatore. Recenti studi hanno però evidenziato che tale tecnica favorisce una riduzione della conta batterica totale, ma può rimanere una quantità di *Vibrio*

contro la quale la depurazione appare inefficace. Sia con la depurazione che con la spruzzazione ad alta pressione o lavaggio dei contenitori, l'acqua di mare spesso richiede una disinfezione e ciò ha portato alla scoperta di reagenti chimici correntemente usati per estendere la shelf-life dei prodotti. Il sorbato di potassio è generalmente ricordato come un preservativo della sicurezza alimentare (GRAS) e risulta efficace quando usato su pesce raffreddato per inibire la spoliazione batterica. La sua attività antimicrobica è da associarsi a acidi indissolubili, essendo il pH un importante fattore per la sua efficacia. Tuttavia, non sembra avere alcun effetto su alcuni batteri deterioranti. Studi di Statham hanno mostrato che l'uso combinato di sorbato e polifosfati prima dello stoccaggio incrementano la shelf-life. I polifosfati svolgono un ruolo di preservazione attraverso: 1) azione come chelanti di ioni metallo; 2) azione come innalzatori di pH; 3) interazione con proteine per promuovere idratazione e capacità legante dell'acqua e 4) prevenendo l'ossidazione lipidica e inibendo la crescita microbica. Quando gli ioni metallo sono chelati, l'integrità strutturale della parete cellulare è compromessa, con conseguente permeabilità della parete a composti capaci di interferire con la crescita. Esempi di polifosfati usati sono tripolifosfato di sodio,

ortofosfato di disodio, pirofosfato di tetrasodio e esametafosfato. L'EDTA è usata solo come agente chelante nella lavorazione del pesce in combinazione con altri trattamenti. Gli acidi sono sterilizzanti non tossici fatti infatti l'acido lattico o altri acidi organici e il diossido di cloro possono agire attraverso la rottura della permeabilità della membrana. Acido lattico, un metabolita naturale, passa facilmente, attraverso la parete cellulare microbica, trasportando CO₂ e poi accelerando gli effetti battericidi degli acidi. Gli acidi non sono attualmente consentiti negli alimenti. L'acido ascorbico e i suoi isomeri, l'acido eritorbico, sono usati indifferentemente nell'industria alimentare come antiossidanti. Essi sono, però instabili e non specifici e non penetrano sufficientemente la matrice cellulare degli alimenti. Una miscela di acido ascorbico e acido kojic(5-hydroxyl-2-hydroxymethyl-gamma-pyrone) è stata brevettata come agente anti-imbrunimento negli alimenti. L'acido kojic è un metabolita prodotto da specie di *Aspergillus* e *Penicillium* e si ritrova in molti alimenti in Giappone. Recentemente, Chen e al. dimostrarono che la sua applicazione per prevenire la melanosisi dei gamberetti prevedeva due meccanismi: inibizione diretta di PPO e riduzione chimica di pigmenti o precursori dei pigmenti per composti colorati. L'uso di tale acido

deve però essere ridotto in virtù della sua tossicità e degli alti costi. Recentemente nelle industrie di pesce e crostacei si stanno utilizzando solfiti e SO₂ poiché sono efficaci come agenti antimicrobici, inibitori di imbrunimenti enzimatici e non enzimatici e agiscono come antiossidanti. Come i sorbati, gli acidi indissociati sono più efficaci a basso pH in quanto capaci di penetrare nella parete cellulare microbica. Dentro la cellula, reagisce con l'acetaldeide e riduce negli enzimi il legame disolfito con formazione di prodotti bisolfito che interferiscono con la reazione respiratoria coinvolgendo il NAD. Il meccanismo chimico attraverso il quale SO₂ inibisce l'imbrunimento non enzimatico consiste in un'interazione reversibile di bisolfito con gruppi carbonilici attivi con riduzione di zuccheri. Se da un lato SO₂ e bisolfiti sono efficaci come agenti preservanti, dall'altro la comparsa di reazioni allergiche in alcuni consumatori asmatici di prodotti ittici trattati con bisolfiti e la potenziale mutagenicità hanno fatto sì che gli stessi fossero usati solo in piccola parte o anche vietati in USA. Similmente, composti fenolici come idrossianisolo butilato (BHA) e idrossitoluene butilato (BHT) usati come antiossidanti in cibi contenenti oli di pesce sono stati usati con cautela finché il BHA non è risultato cancerogeno negli animali da laboratorio. In contrasto il 4-

sostituto resorcinolico si è dimostrato un nuovo potente agente antiimbrunimento nell'industria alimentare. Di particolare interesse è il 4-esilresorcinolo che ha un basso IC_{50} (la concentrazione richiesta per ottenere il 50% di inibizione dell'attività enzimatica). Risultati preliminari su alimenti di tale resorcinolo sono incoraggianti e esso ha già una lunga storia di utilizzo in prodotti non alimentari. Esso è solubile all'acqua, stabile, non tossico, non mutageno, non cancerogeno e utilizzato come agente di prevenzione della melanosì nei gamberetti. Tali sostituti resorcinolici sono svantaggiosi sui solfiti perché 1) hanno una più alta specificità verso PPO, 2) sono chimicamente più stabili, e 3) sono abbastanza efficaci a bassissime concentrazioni (50 ppm). La glucosio ossidasi si è dimostrata un potenziale agente preservante che non comporta rischi come i bisolfiti. Gli enzimi catalizzano la scissione di glucosio in gluconolattone ed eventualmente acido gluconico. La produzione di ac.gluconico, riducendo il pH, può inibire un certo numero di microrganismi deterioranti. Inoltre è possibile che la riduzione del pH favorisca la selezione di microbi come i batteri acido-lattici sui tradizionali microbi psicotropi deterioranti. In più Silliker e Wolfe, notarono che i cambi delle caratteristiche sensoriali nella carne di pesce erano meno evidenti

con la crescita dei germi acido lattici che con forme di gram⁻. Il perossido di idrogeno prodotto dall'attività ossidativa del glucosio può inibire la crescita di microrganismi deterioranti, in particolare *Pseudomonas*, che sono estremamente sensibili a questo composto chimico. L'acido gluconico prodotto può anche agire come chelante mentre il gluconolattone è utile come agente veicolante per l'acqua e ioni metallo. Ancora, l'O₂ è un reagente nella reazione catalizzata dalla glucosio ossidasi. Di contro, Shaw e al. hanno evidenziato che il sistema glucosio ossidasi-catalasi ha un piccolo impatto positivo sul deterioramento microbico di filetti di merluzzo ghiacciati. Etossiquin è un altro potenziale reagente antiossidante utilizzabile nell'industria ittica. Funziona attraverso la conversione a dimero o altri prodotti ossidativi. Alcuni di essi agiscono sui lipidi del pesce, privandoli dell'O₂ necessario. Inoltre, la sua applicazione causa un temporaneo incremento dell'ossidazione lipidica, che tende a decrescere con il formarsi di prodotti antiossidanti. Similarmente, il potere antimicrobico della chitosan (chitina deacilata) è sotto osservazione. Lavori di Chang e al. indicano che "chitosan" ha una forte attività antimicrobica con concentrazione di 50 ppm inibendo la crescita di alcuni gram⁺ come *Staphylococcus* e *Bacillus*. Alte concentrazioni

(100 ppm) sono richieste per inibire *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Salmonella*. Poiché i chitosani sono ampiamente distribuiti in natura ed economici, una conoscenza dei loro meccanismi preservativi, potrebbe essere utile per il suo eventuale utilizzo nell'industria alimentare in generale. L'ozono è un forte agente antimicrobico con numerose potenziali applicazioni nell'industria alimentare. Alta reattività, penetrabilità, e spontanea decomposizione in un prodotto non tossico rendono l'ozono un disinfettante utilizzabile sul piano microbiologico per la sicurezza dei prodotti alimentari. L'ozono è stato usato per decenni in molti paesi e recentemente, riconosciuto generalmente come sicuro (GRAS) la condizione del gas è stata riaffermata negli Stati Uniti. L'ozono in fase gassosa o acquosa, è stato testato contro i maggiori microrganismi da numerosi gruppi di ricercatori. Concentrazioni relativamente basse di ozono e tempi di contatto brevi sono sufficienti ad inattivare batteri, muffe, lieviti, parassiti e virus. Tuttavia i livelli di inattivazione sono maggiori nel sistema a richiesta libera dell'ozono. La suscettibilità dei microrganismi all'ozono varia anche con lo stato fisiologico delle colture, pH del mezzo, temperatura, umidità e presenza di additivi (acidi, surfattanti, e zuccheri). Le applicazioni dell'ozono nell'industria alimentare sono principalmente

collegati alla decontaminazione della superficie dei prodotti e al trattamento dell'acqua. L'ozono è stato usato con successo in una miscela per inattivare la microflora contaminante nella carne, pollame, uova, pesce, frutta, vegetali e cibo essiccato. I gas sono anche utili nella detossificazione ed eliminazione delle micotossine e dei residui di pesticidi da molti prodotti agricoli. Tuttavia un eccessivo uso dell'ozono potrebbe causare l'ossidazione di molti ingredienti presenti sulla superficie dell'alimento. Solitamente questo si traduce in decolorazione e deterioramento dell'aspetto dell'alimento.

III.2. Nuovi trattamenti

III.2.1. Irradiazione a basso dosaggio

L'irradiazione degli alimenti prevede l'esposizione dei prodotti alimentari a radiazioni ionizzanti per aumentare la shelf-life o per migliorare la salubrità del prodotto a seguito dell'effetto antimicrobico delle radiazioni ionizzanti. L'effetto antimicrobico si esplica con il danneggiamento del DNA microbico a seguito di una interferenza con i normali processi biochimici. Fino alla metà del 1950, la tecnica ha mostrato di mantenere la freschezza e la qualità dei prodotti ittici con una maggiore sensibilità a basse dosi di irradiazione da parte dei batteri gram⁻ rispetto ai gram⁺. L'irradiazione è efficace nel controllo dei livelli della microflora patogena, riducendo i rischi di tossinfezione. Per esempio, *Aeromonas hydrophila* è risultata sensibile a radiazioni basse di 1,5 kGy sul pesce azzurro. *C.botulinum* tipo E è responsabile della produzione di tossina botulina, spore di *C.botulinum* inoculate in gamberi ed irradiati ad una dose di 1,5 kGy non producevano tossine fino ad un periodo di 31 giorni a temperatura di 0°-3°C durante lo stoccaggio di pesci lavorati. Importante

nell'applicazione dell'irradiazione per il controllo dei microrganismi nei prodotti ittici è il tempo di esposizione e la dose irradiante, e come i microrganismi rispondono diversamente a seconda della loro specifica caratteristica cellulare. Di conseguenza tre livelli di controllo devono essere considerati: radappertizzazione, radurizzazione e raducidazione. La “radappertizzazione” prevede l'uso di alte dosi di circa 50 kGy per eliminare completamente tutti i microrganismi nei prodotti ittici, che potrebbero così conservarsi per un tempo indeterminato, a tali alte dosi, tuttavia, odore e consistenza sono alterati. Inoltre, il fatto che il WHO fissa il limite accettabile di 10 kGy, fa sì che tale procedura sia sconsigliata. La “radurizzazione” inattiva solo una quota di microrganismi deterioranti (circa il 90%-95%), per cui se il prodotto è conservato più a lungo, sotto ghiaccio, il deterioramento può realizzarsi, le dosi usate per la radurizzazione sono comprese tra 1 e 5 kGy. La “raducidazione” prevede trattamenti con dosi tra 5 e 8 kGy che risultano idonee per l'eliminazione di microrganismi patogeni non formanti spore. Spesso a dosi di 5 kGy, si hanno cambi indesiderati di colore, odore e sapore, specialmente in presenza di O₂. Quindi, la radurizzazione è l'applicazione preferita dei trattamenti ionizzanti per l'estensione della shelf-life, in quanto la perdita di valori nutrizionali a

basse dosi è insignificante, con assenza di effetti tossicologici deleteri a breve e lungo termine, è tecnologicamente efficace per estendere la shelf-life di molti pesci e prodotti di pesce con una dose ottimale oscillante tra 0,75 a 2,5 kGy. In generale, le specie magre sono più indicate per radurizzazione rispetto alle specie grasse. Ciò è da attribuirsi alla rancidità, che si può accompagnare allo scolorimento. Incide sull'efficienza dell'irradiazione la temperatura. Bruns e Maxcy evidenziarono che alcuni batteri diventavano resistenti all'irradiazione a temperature di congelamento. Mentre una dose di 50 kGy era richiesta per uccidere livelli simili di specie di *Moraxella*/*Acinetobacter* resistenti alle radiazioni su carne a -30°C, una dose di soli 20 kGy era richiesta per ottenere un simile calo a 35°C. Le alte temperature, non consentono di classificare come accettabile i prodotti sulla base dei caratteri organolettici. A dispetto dell'ovvio vantaggio che si potrebbe avere dall'uso di basse dosi irradianti, la sua applicazione sugli alimenti è ancora osteggiata da scienziati, governi e consumatori che sono scettici nei confronti di cibi irradiati. Nella Comunità Europea, per esempio, la legislazione varia da una totale proibizione (Germania) a una sostanziale lista di prodotti per i quali l'irradiazione è consentito (Olanda). In USA, la

legislazione ora consente l'irradiazione, in particolare dosi fino a 3 kGy per il pollame. Sulla base di tali legislazioni, si è avuta la necessità di scoprire tecniche che indagassero sui vari cambi apportati in cibi irradiati. Le tecniche vagliate sono state tre: termoluminescenza, spettroscopio per risonanza di elettroni rotanti, e studi sulla formazione di lunghe catene idrocarburi e 2-alchilciclobutanone. Questi metodi aiutano a controllare il potenziale abuso della tecnologia irradiante, per garantire la sicurezza del consumatore.

III.2.2. Trattamenti con alte pressioni

Gli effetti delle Alte Pressioni, in particolare di pressione idrostatica, sulla vitalità dei microrganismi e sulla denaturazione delle proteine sono conosciuti da decenni. Tuttavia, questa procedura è ancora limitata e sotto osservazione, in particolare in Giappone, dove l'apparecchiatura dell'alta pressione idrostatica è stata inventata. La compressione liquida che risulta è un piccolo cambio nel volume se comparato con gas, e poi non presenta operazioni rischiose come nel caso di macchine usanti gas compressi. Inoltre il trattamento a

pressione idrostatica altro non è che un'istantanea ed uniforme trasmissione di pressione sul prodotto, indipendente dal volume del sistema. Una volta raggiunta la pressione, essa può essere mantenuta senza bisogno di input di energia. La pressione influenza le reazioni biochimiche. La pressione idrostatica può inibire la disponibilità di energia per i microrganismi attraverso reazioni enzimatiche producenti energia, con riduzione della vitalità cellulare. Questi effetti a livello molecolare sono dovuti alla riduzione dello spazio molecolare disponibile e all'incremento di reazioni intercatena. La denaturazione delle proteine può aversi con tali trattamenti ed è attribuita alla pressione inducente una distensione della catena proteica. In particolare la denaturazione colpisce la struttura secondaria a seguito di un riarrangiamento e distruzione di legami non covalenti come il legame idrogeno, interazioni idrofobiche, e catene ioniche della struttura terziaria mentre i legami covalenti rimangono intatti. La distensione comporta un largo numero di residui non polari accessibili ai dipolo di H₂O, con conseguente riduzione delle distanze intermolecolari, che provocano una riduzione del volume. La denaturazione è anche il risultato di alterazioni delle interazioni substrato-enzima con cambi conformazionali. Tuttavia, essi variano

con la natura della reazione enzimatica. Per esempio, a 1200 e 600 atm, l'attività deidrogenasi formica e malica non è apprezzabile, ma la succinica cala drasticamente a valori di pressione atmosferica e 200 atm. La denaturazione è spesso reversibile a moderate pressioni ed è proporzionale ai cambi conformazionali e ai processi dissociativi. Tale fenomeno può essere sfruttato per controllare reazioni enzimatiche. Gli effetti della pressione sulla morfologia cellulare in maniera reversibile o irreversibile dipendono dalla pressione applicata. Per esempio, si è notato che con pressione superiore a 4000 kg/cm^2 , la struttura del nucleo e degli organuli citoplasmatici in *Saccaromyces cerevisiae* era grossolanamente deformata e non poteva essere più osservata a 5000 kg/cm^2 . Tali cambi sono da attribuire alla permeabilizzazione della membrana cellulare: in quanto a pressioni > di 4000 kg/cm^2 , grandi quantità di materiale intracellulare fuoriesce dalle cellule, mentre a 4000 kg/cm^2 la perdita è completa. Le alte pressioni idrostatiche uccidono cellule vegetative, mentre le spore batteriche appaiono più resistenti. Altre variabili che influenzano gli effetti della pressione sui microrganismi sono la durata, la forza di compressione, lo stadio di crescita dei microrganismi, la composizione media, e parametri come temperatura e pH durante la compressione.

Nell'industria alimentare, le Alte Pressioni sono usate per: 1) preservare frutta e vegetali, 2) ridurre la popolazione microbica nel latte, 3) intenerimento pre-rigor della carne. Nell'industria ittica, è stata usata per la gelificazione di surimi giapponese da sardine, tonni e merlano nero. Questi gels pressione-indotti hanno una qualità superiore rispetto ai gels caldo-indotti. La sua applicazione nell'industria ittica è ancora sotto osservazione. L'applicazione di moderate pressioni combinate con temperature sotto lo zero potrebbero consentirne l'uso sia nell'industria ittica che in altri alimenti senza formare ghiaccio intracellulare, ovviando così al danneggiamento durante il congelamento e al deterioramento microbico. In più i cibi trattati con alte pressioni trattengono le loro naturali qualità come sapore e tessitura più di quelli trattati con metodi tradizionali, inoltre possono servire per il controllo delle tossine. Applicazioni di pressioni >di 1000 atm hanno inattivato tossine tetaniche e difteriche. Così, essi giocano un ruolo significativo nel controllo dei problemi legati alla presenza di tossine microbiche nei prodotti della pesca.

III.2.3. Conservazione in atmosfera protettiva

Negli ultimi anni, la conservazione in atmosfera protettiva (MAP) è diventata una metodica molto conosciuta per la preservazione alimentare, che va incontro alle richieste del consumatore per quel che riguarda la freschezza di pesce fresco refrigerato con shelf-life prolungata. Hintlian e Hotchkiss hanno definito il MAP come “il confezionamento di un prodotto deteriorabile in un’atmosfera che è stata modificata in modo che la sua composizione fosse diversa da quella dell’aria”. Young e al. definirono MAP come “chiusura del prodotto alimentare in un film impenetrabile ai gas nel quale l’atmosfera gassosa è stata cambiata o modificata per ridurre la quota respiratoria, la carica batterica e per ritardare il deterioramento enzimatico con l’intento di prolungare la shelf-life”. L’uso di MAP nell’industria ittica è aumentato grazie a: 1) scoperta di nuovi polimeri per la barriera dell’imballaggio; 2) estensione della richiesta per prodotti con caratteristiche di freschezza; 3) incremento costi energetici associati ai metodi tradizionali di preservazione; 4) favorevole percezione della tecnologia da parte del consumatore. Vari metodi possono essere usati per modificare l’atmosfera in prodotti

confezionati. Ricordiamo: confezionamento sotto vuoto, con gas, l'uso di generatori o inibenti O₂, e generatori di vapore di etanolo.

III.2.3.1. Sottovuoto

Usato per estendere la shelf-life e trattenere la qualità del pesce fresco e lavorato. Il prodotto è in un film a bassa permeabilità di ossigeno, l'aria è rimossa e la confezione sigillata. In buone condizioni di sottovuoto l'O₂ è ridotto a meno dell'1% mentre CO₂ prodotto da tessuti nella respirazione microbica sale da 10% al 20%. Tale rapporto, ovvero <O₂ e >CO₂, estende la shelf-life inibendo la crescita di microrganismi aerobi deterioranti del pesce, quali Pseudomonas e Aeromonas. Per il pesce trattato, affumicato e conservato, le condizioni di confezionamento prevengono problemi di scolorimento e rancidità.

III.2.3.2. Confezionamento con gas

È semplicemente un'estensione della tecnologia sottovuoto e prevede l'evacuazione di aria seguita da un'appropriata miscela di gas. Gas comunemente usati sono: N_2 , O_2 , CO_2 . Ogni gas gioca un diverso e specifico ruolo nel MAP del pesce. N_2 è un gas inerte che non ha effetti sul pesce e non ha proprietà antimicrobiche. È usato per prevenire lo sgonfiamento della confezione in prodotti che possono assorbire CO_2 . Può anche essere usato per sostituire O_2 in prodotti ittici grassi per prevenire la rancidità ossidativa ed il deterioramento chimico. L' O_2 è generalmente sottratto dalla confezione in pesci grassi. Tuttavia, può essere usato a basse dosi in pesci poco grassi e molto grassi per prevenire le condizioni di anaerobiosi e limitare la crescita di anaerobi come *C.botulinum*. Il diossido di carbonio (CO_2) è il gas più importante della miscela. È batteriostatico e fungistatico. È molto solubile in acqua e grassi dove forma acido carbonico. La sua alta solubilità abbassa il pH, determinando trascurabili cambiamenti nell'odore del pesce, e il suo assorbimento da parte del prodotto può causare collassamento dell'imballaggio. Sono stati fatti molti studi sull'effetto antimicrobico della CO_2 ed ecco cosa si è evidenziato: 1)

l'esclusione di O₂ attraverso sostituzione con CO₂ può contribuire debolmente al suo effetto antimicrobico attraverso riduzione di microrganismi aerobi deterioranti; 2) la CO₂/ione bicarbonato ha un effetto sulla permeabilità delle membrane cellulari; 3) CO₂ è abile a produrre rapida acidificazione del pH interno delle cellule microbiche con possibile ramificazione delle attività metaboliche; 4) CO₂ esercita un certo effetto su alcuni enzimi. A conclusione di ciò si può dire che CO₂ estende la shelf-life dei prodotti ittici. L'effetto della CO₂, combinato con la refrigerazione, incrementa la lag-fase e il tempo di moltiplicazione dei microrganismi deterioranti.

III.2.3.3. Uso di confezionamento con gas per preservare i prodotti ittici

La shelf-life dei prodotti ittici freschi è limitata in presenza di O₂ atmosferico dalla crescita e dall'attività biochimica dei gram⁻, psicotropi come Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium e specie di Moraxella. Questi microrganismi deterioranti possono essere inibiti dal confezionamento dei prodotti in un film impermeabile in atmosfera ricca di CO₂. A tali condizioni inoltre gruppi microaerofili

di batteri acido lattici diventano i microrganismi predominanti. A seguito di inibizione di microrganismi deterioranti, livelli di composti chimici, per esempio, trimetilamina (TMA), azoto volatile totale (TVN), che sono indicatori di deterioramento microbico dell'alimento sono ridotti. La shelf-life delle trote, per esempio, era duplicata con 80% di CO₂ e 20% di N₂. Tutti i tipi di confezionamento in atmosfera modificata portano ad una estensione della shelf-life relativa al tipo di aria immessa, ed un potenziamento della shelf-life può aversi quando tale metodica è associata ad altre tecniche come ad esempio l'irradiazione. Generalmente, se un prodotto di qualità refrigerato è igienicamente manipolato durante la raccolta ed è tenuto a temperature idonee, il prolungamento della shelf-life sarà proporzionale all'iniziale livello di CO₂ sotto atmosfera CO₂-modificata.

III.2.3.4. Sicurezza alimentare

Il confezionamento in atmosfera protettiva ha avuto largo impiego in Europa. Tuttavia, la tecnica è sotto osservazione in Nord America a causa del potenziale alto rischio associato al C.botulinum tipo E. È uno stretto anaerobio che trova condizioni buone per la crescita e

produzione di tossine in prodotti confezionati “MAP”, purché le temperature siano $<3,3^{\circ}\text{C}$. Inoltre, la ristretta crescita di microrganismi deterioranti in confezionamento “MAP” può però favorire la crescita di *C.botulinum*. Ancora MAP e sottovuoto hanno un effetto mascherante sui normali indicatori di deterioramento che potrebbero risultare a seguito del rifiuto del prodotto da parte del consumatore. Importante è il controllo delle temperature, soprattutto quelle critiche ($<0^{\circ}\text{C}$) per garantire la sicurezza del prodotto ittico confezionato in atmosfera modificata. Le misure di gas consigliate per pesce bianco, scampi, gamberetti comprendono 40% CO_2 30% N_2 e 30% O_2 mentre per i pesci grassi come trote e salmone 60% CO_2 e 40% N_2 . L’inclusione di O_2 come barriera addizionale deve essere valutata con attenzione. Ad esempio aggiunta addizionale di O_2 in carne di maiale MAP-irradiata non hanno garantito nessuna protezione aggiuntiva contro spore di *C.botulinum* tipo A e B.

III.2.3.5. Nuovi metodi di atmosfera modificata

Essi consistono nell’uso di generatori-assorbenti CO_2 e generatori di vapore di etanolo. Consistono nell’introduzione nell’imballaggio di

sacchetti come i disseccanti che modificano la composizione gassosa. Tale nuova metodica è usata per il confezionamento di prodotti ittici in Giappone. Gli assorbenti O₂ contengono sostanze ossidabili in sacchetti fatti di materiale permeabile all'aria. Hanno una capacità di assorbimento che varia da 20 a 2000 ml di O₂ circostante. Quando sono inseriti nella confezione, attivamente modificano l'ambiente e riducono l'ossigeno a livelli <0,01% in 1-4 giorni a T° ambiente. L'O₂ libero circostante protegge il cibo dal deterioramento microbiologico e chimico. "Ageless" (senza età, eterno), prodotto dalla Mitsubishi Gas Chemical Co., consiste in un tipo basato sull'acido ascorbico e un tipo basato su polvere ferrosa quest'ultimo molto usato in Giappone. La base del sistema è fatta di fini particelle ferrose che, sotto appropriate condizioni di umidità, usano l'ossigeno residuo con formazione di ossido di ferro non tossico. Per prevenire un cambiamento di colore del cibo, la polverina è contenuta in un sacchetto. Il materiale di tale sacchetto è molto permeabile all'ossigeno e, in alcuni casi, al vapore acqueo. Poiché interviene sulle reazioni chimiche piuttosto che sul rimpiazzo di O₂ nel prodotto confezionato con gas, esso rimuove completamente tutte le tracce di O₂ residuale e protegge l'alimento dal deterioramento aerobio e preserva le sue caratteristiche qualitative.

Diversi tipi di sacchetti “Ageless” si trovano in commercio e possono essere usati per cibi diversi tra cui cibi contenenti o trattati con olio e prodotti umidi. I diversi tipi di assorbenti sono Z, FX, S, E e G. L’Ageless tipo SS ha l’abilità di eliminare O_2 nella fase di refrigerazione e congelamento. Tali assorbenti sono usati per estendere la shelf-life di alimenti come carne fresca, pesce e pollo. Il tipo e la dimensione degli Ageless per estendere la shelf-life dipendono da una serie di fattori, quali: 1) la natura del prodotto come dimensione, peso e forma; 2) $L'a_w$ dell’alimento; 3) la quota di O_2 dissolto nel cibo; 4) il livello iniziale di O_2 nella confezione; 5) la shelf-life desiderata; 6) la permeabilità all’ O_2 da parte del materiale della confezione.

III.2.4. Uso di Ageless per estendere la shelf-life dei prodotti ittici

L’Ageless è usata in Giappone per estendere la shelf-life, preservare la qualità del pesce fresco e proteggere i prodotti di mare dal deterioramento fisico, chimico e microbico. Tuttavia, esistono

vantaggi per i produttori dal punto di vista di marketing e della qualità del prodotto quali:

- 1) Economici e facili da usare.
- 2) Non tossici e sicuri.
- 3) Prevengono la crescita di microrganismi aerobi e estendono la shelf-life.
- 4) Arrestano la comparsa di rancidità in grassi ed oli.
- 5) Mantengono la qualità aromatica, prevenendo l'ossidazione di composti aromatici.
- 6) Mantengono la qualità del prodotto senza additivi.
- 7) Sostituiscono i pesticidi per la prevenzione del danneggiamento da insetti.

Mentre tra gli svantaggi ricordiamo:

- 1) Possono provocare collassamento della confezione.
- 2) Necessitano di un flusso di aria libera che circonda nel sacchetto per ridurre O_2 se tale assorbente è usato da solo.
- 3) Possono promuovere la crescita di batteri anaerobi potenzialmente dannosi.

- 4) Possono causare cambi di odore in alimenti molto umidi o molto grassi a seguito di dissoluzione di CO₂ nella fase acquosa/grassa del prodotto.
- 5) Scetticismo del consumatore all'introduzione di tali sacchetti nella confezione.

III.2.5. Generatori di vapore di etanolo

Modificano l'atmosfera gassosa con introduzione di vapore di etanolo nello spazio della confezione. Sono conosciuti come Ethicarp o Antimold 102 e sono prodotti in Giappone. Ethicarp è dato da un grado alcolico (58% del peso) assorbito in particelle diossido di silicone, e poste in sacchetti fatti di copolimeri di EVA (carta-etilvinilacetato). Per mascherare l'odore di alcol, alcuni sacchetti contengono tracce di vaniglia o altri composti aromatici. Un nuovo tipo di generatore di etanolo è chiamato Negamold. Sacchetti di Ethicarp contengono da 0,1g a 1g o 0,3g a 3g di etanolo che può essere evaporato. Il tipo di sacchetto adoperato dipende da:

- 1) peso dell'alimento.
- 2) a_w .

3) la shelf-life desiderata.

Quando l'alimento è confezionato con un'appropriata taglia di Ethicarp, l'umido è assorbito dall'alimento e il vapore di etanolo è rilasciato dall'incapsulamento e permea la confezione. Il livello iniziale e quello finale di vapore di etanolo è legato alla dimensione del sacchetto e all' a_w . È efficace contro muffe come *Aspergillus* e *Penicillium*, batteri come Stafilococchi, Salmonella e E.coli e tre specie di lieviti deterioranti. Uno svantaggio di tale procedura è dato dall'assorbimento dello spazio della confezione da parte del prodotto, che può variare da 0,5 a 1,25% w/w.

III.3.Sistemi naturali di conservazione

In aggiunta ai più tradizionali ed innovativi sistemi impiegati per ottenere un prolungamento sicuro della shelf life, è da considerare la particolare richiesta del consumatore di metodi naturali per la conservazione degli alimenti e ciò ha posto le premesse per l'adozione di sistemi di conservazione naturali indicati con il termine di “bioconservazione”. Si tratta di sistemi conservativi dapprima usati nell'industria cosmetica e farmaceutica, e la cui applicazione, oggi, ha

riscosso un notevole interesse negli alimenti. Ciò soprattutto in funzione di diversi vantaggi:

- aumento della sicurezza degli alimenti;
- sostituzione o riduzione al minimo dei conservanti chimici;
- diminuzione dei microrganismi, senza la necessità di ricorrere alla tecnologia dei processi termici ;
- ottimizzazione della qualità alimentare con l'aumento della shelf life ed il miglioramento di colore, consistenza e gusto.

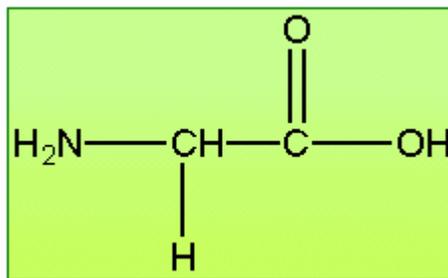
Il seguente schema illustra alcuni principi per la bioconservazione degli alimenti.

<i>Uso di microrganismi</i>	Culture starter, produzione di acidi, batteriocine, ecc...
<i>Uso di enzimi</i>	Ossidasi, enzimi litici, enzimi killer ecc...
<i>Uso di speciali probiotici</i>	Monogliceridi, composti fenolici, amminoacidi, ecc...

Per quanto riguarda i microrganismi usati nella bioconservazione, particolarmente interessante è l'utilizzo delle batteriocine che sono proteine antibatteriche prodotte da batteri che uccidono o inibiscono la crescita di altri batteri . Molti batteri dell'acido lattico, quali *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecalis*, producono diversi tipi di batteriocine di cui la nisina è attualmente l'unica usata come conservante alimentare. Sebbene le batteriocine siano inibitorie contro patogeni alimentari quali *L. monocytogenes*, esse non sono antibiotici. La loro sintesi ed il modo d'azione li distingue dagli antibiotici clinici. È inoltre stata dimostrata non solo la loro efficacia, ma anche la sicurezza per l'utilizzo negli alimenti. A proposito dell'utilizzo degli enzimi allo scopo di aumentare la shelf life degli alimenti, impedendo la crescita di microrganismi contaminanti, va detto che essi possono agire in vari modi cioè: a) privando i microrganismi dei nutrienti necessari; b) producendo prodotti innocui per l'uomo e per gli animali e che sono invece batteriostatici e battericidi per i microrganismi; c) attaccando i componenti della parete cellulare, rompendo fisicamente la cellula e mutandone la permeabilità; d) oppure producendo enzimi "killer", cioè enzimi che inattivano altri enzimi necessari per la crescita microbica.

Esempi di tali enzimi possono essere: lisozima, lattoperossidasi, gluconasi.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei probiotici, notevole interesse hanno dimostrato l'uso di amminoacidi e dei composti fenolici. Si è potuto dimostrare che gli amminoacidi sono degli efficienti antiossidanti. Questa attività antiossidante è il risultato del loro potere sequestrante nei confronti dei metalli. Questo potere è particolarmente spiccato per la glicina, l'amminoacido a basso peso molecolare.



La glicina ha anche attività antibatterica e, infatti, in percentuale del 2-5%, la maggior parte dei batteri viene inibita. Circa i composti fenolici sono diversi e numerosi gli studi riportati nella letteratura. Le comuni erbe alimentari, le spezie e le piante aromatiche con attività antimicrobica possono rappresentare valide alternative naturali all'uso di prodotti chimici di sintesi nella conservazione degli alimenti. Le sostanze fitochimiche bioattive di queste piante, sono spesso recuperate come oli essenziali con l'idrodistillazione dei loro interi

tessuti o dei semi.

La composizione chimica e le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali, estratti da differenti specie di piante, sono state individuate con differenti metodi sperimentali. Sia gli effetti microbici che microstatici sono stati riportati in letteratura, sebbene ci siano delle discrepanze sullo spettro di attività e potenza di tali sostanze prese singolarmente, in quanto miscele di frazioni di più composti hanno avuto effetti antagonisti, sinergici o additivi contro i microrganismi. La maggior parte dell'attività antimicrobica delle diverse erbe culinarie sembra derivi da composti fenolici; tali composti agiscono alterando la permeabilità di membrana dei batteri ed interferendo con i sistemi di trasporto ionico degli elettroni e con i meccanismi di produzione di energia.

III.3.1.Principali composti antimicrobici presenti nelle spezie

Data la crescente tendenza da parte dei produttori di alimenti ad usare gli oli essenziali, preferendoli alle erbe intere, diversi studi sono stati effettuati con lo scopo di valutare l'efficacia antimicrobica degli estratti di piante rispetto alle piante usate come tali.

Composti antimicrobici	Spezie
Allicina	Aglio
Allile isotiocinato	Senape
Anetolo	Anice
Capsicidina	Paprica
Capsaicina	Peperoncino di caienna
Carnosolo,acido ursolico	Rosmarino
Curvarolo, timolo	Origano,timo
Cuminolo	Cannella, semi di cumino
Eugenolo	Chiodi di garofano
Geraniolo	Zenzero,timo
Composti derivati dal p-mentano	Menta

Infatti non si può ritenere che gli oli essenziali di una determinata spezia, posseggano le stesse proprietà antimicrobiche, della pianta. Shele et al. (1984) dimostrarono che l'intera salvia, utilizzata nei brodi di carne, era più efficace contro la crescita microbica rispetto all'olio di salvia. Un problema, nell'uso di erbe e spezie, potrebbe sorgere dalla contaminazione microbica alla quale queste sostanze, come tutti i prodotti naturali, sono soggette. È stato dimostrato che le spezie che si sviluppano nelle vicinanze o a contatto del suolo (basilico, timo, pepe nero ...), presentano una carica microbica maggiore rispetto a quelle che si sviluppano più lontano dal suolo (garofano, fiore di miristica, rosmarino ...). L'utilizzo di tali ingredienti nei prodotti cotti non pone nessun problema dato che la quasi totalità della loro carica microbica è distrutta dal calore della cottura. Invece, le spezie usate nei prodotti

conservati senza alcun trattamento termico, devono essere trattate, per eliminare la loro carica microbica, onde evitare l'alterazione prematura del prodotto. Data la sensibilità al calore di tali sostanze, i processi di decontaminazione atermici quali fumigazione, irradiazione, pressioni idrostatiche e gli UV sembrano essere più appropriati dei procedimenti di decontaminazione con calore umido o sottopressione poiché permettono di preservare le loro qualità e proprietà nutrizionali. Comunque è generalmente ritenuto che per il futuro l'applicazione dei sistemi di conservazione naturale sarà sostanziale, in particolare considerando la notevole efficacia che ne deriva dall'associazione con le già note tecniche di confezionamento (sottovuoto, atmosfera modificata) per la conservazione degli alimenti. A tale proposito uno studio sperimentale sull'uso di una miscela antiossidante di rosmarino e vitamina C, su carne fresca confezionata in atmosfera modificata con 70 % di O₂ , 20% di CO₂ e 10% di N₂ , conservata a 1+ / - 1° C ed esposta ad una illuminazione priva di UV, ha dimostrato una riduzione significativa della formazione di metaemoglobina, dell'ossidazione lipidica, nonché della crescita batterica e ha permesso una durata di conservazione di venti giorni.

In ogni caso, affinché tutte le tecniche utilizzate allo scopo di prolungare la shelf- life dei prodotti alimentari, abbiano efficacia, è necessario sempre partire da una materia prima con livelli bassi di contaminazione iniziale.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, C. E. and Foegeding, E. A., Some lipid characteristics and interactions in muscle foods - a review, *Food Technol.*, 35(5), 253, 1981.
2. Anderson, M. L. and Ravesi, E. M., Reaction of free fatty acids with protein in cod muscle frozen and stored at -29°C after aging in ice, *J. Fish Res. Board Can.*, 26, 2727, 1969.
3. Ang, J. F. and Haard, N. F., Chemical composition and postmortem changes in soft textured muscle from intensely feeding Atlantic cod, *J. Food Biochem.*, 9(1). 49, 1985.
4. Anon., New Products - Gluconofin A and Gluconofin B. *Food Technol.*, 34, 87, 1980.
5. Audley, M. A., Shetty, K. J., and Kinsella, J. E., Isolation and properties of phospholipase A from pollock muscle, *J. Food Sci.*, 43, 1771, 1978.
6. Avery, J. J. W. and Lamprecht, A., The shelf-life extension of fresh hake through gamma irradiation, *Food Rev.*, 15(Suppl.), 28, 1988.

7. Baldrati, G., Pirazzoli, P., Gola, S., and Ambroggi, F., Use of ionizing radiation for the preservation of fresh fish. Radiopasteurization of saurels, *Indust. Cons.*, 53, 8, 1978.
8. Baranowski, J. D., Brust, P. A., and Frank, H. A., Growth of *Kiebsiella pneumoniae* UH-2 and properties of its histidine decarboxylase system, *J. Food Biochem.*, 9, 349. 1985.
9. Barile, L. E., Milla, A. D., Reilly, A., and Villadsen, A., Spoilage patterns of mackerel. 1. Delays in icing, *ASEAN Food J.*, 1, 70, 1985.
10. Barnett, H. J., Conrad, J. W., and Nelson, R. W., Use of laminated high and low density polyethylene flexible packaging to store trout in a modified atmosphere, *J. Food Prot.*, 50, 645, 1987.
11. Basset, J. and Macheboeuf, M. A., Biological effects of ultra-pressures, *C. R. Acad. Sci.*, 195, 1431, 1932.
12. Bhattacharyya, S. K., Chaudhuri, D. R., and Bose, A. N., Preservation of Indian mackerel by gamma irradiation, *J. Food Sci. Technol. India*, 16, 61, 1979.

13. Bilinski, E., Jonas, R. E. E., and Peters, M. D., Factors controlling the deterioration of the spiny dogfish during iced storage, *J. Food Sci.*, 48, 808, 1983.
14. Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G., and Heublein, P. C., Disease caused by marine vibrio, *N. Engl. J. Med.*, 300, 1, 1979.
15. Box, G. E. P., Hunter, W. G., and Hunter, J. S., *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design Data Analysis and Model Building*, John Wiley & Sons, New York. 1978.
16. Bremner, H. A., Fish flesh structure and the role of collagen - its postmortem aspects and implications for fish processing, in *Quality Assurance in the Fish Industry*, Huss, H. H., Jakobsen, M., and Liston, J., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1992, 39.
17. Bronstein, M. N., Price, R. J., Strange, E. M., Melvin, E. F., Dewees, C. M., and Wyatt, B. B., Storage of dressed chinook salmon in refrigerated freshwater, diluted seawater. seawater and in ice, *Mar. Fish. Rev.*, 47, 68, 1985.
18. Bruns, M. A. and Maxey, R. B., Effect of irradiation temperature and drying on survival of highly radiation-resistant bacteria in complex menstrua, *J. Food Sci.*, 44, 1743, 1979.

19. Buege, D. R. and Marsh, B. B., Mitochondrial calcium and postmortem muscle shortening, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 65, 478, 1975.
20. Bullard, F. A. and Collins, J., Physical and chemical changes of pink shrimp held in CO₂ modified refrigerated seawater compared to pink shrimp held in ice, *Fish. Bull.*, 76, 73, 1978.
21. Burt, J. R., Jones, N. R., McGill, A. S., and Stroud, G. D., Rigor tension and gaping in cod muscle, *J. Food Technol.*, 5, 339, 1970.
22. Cann, D. C., Bacteriology of shellfish with reference to international trade, in *Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*, Tropical Products Inst., London, 1977, 377.
23. Cann, D. C., Smith, G. L., and Houston, N. G., Further studies on marine fish stored under modified atmosphere packaging, Torry Research Station, Aberdeen, U.K., 1983
24. Cann, D. C., Packaging fish in a modified atmosphere, Torry Advisory Note #88, Torry Research Station, Aberdeen, U.K., 1984.

25. Castell, C. H. and Bishop, D., Effect of hematin compounds on the development of rancidity in muscle of cod, founder, scallop, and lobster, *J. Fish Res. Board Can.*, 26(9), 2299, 1969.
26. Cawston, T. E. and Murphy, G., Mammalian collagenases, *Methods Enzymol.*, 80, 711, 1981.
27. Chang, D.-S., Cho, H.-R., Good, H.-Y., and Choe, W.-K., A development of food preservative with the waste of crab processing, *Bull. Korean Fish. Soc.*, 22(2), 70, 1989.
28. Cheenivasagam, H. N. and Vidanapathirana, G. S., Quality changes and bacterial flora associated with trench sardines under delayed icing conditions, *FAO Fisheries Report.*, 317, 1986.
29. Chen, C. M., Marshall, M. R., Koburger, J. A., Otwell, W. S., and Wei, C. I., Determination of minimal temperatures for histamine production by free bacteria, in *Proc. First Joint Conf. with Atlantic Fisheries Technol. Soc.*, Otwell, W. T., compiler, 1987, 365.
30. Chen, J. S., Wei, C.-I., and Marshall, M. R., Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1897, 1991.

31. Cheuk, W. L., Finne, G., and Nickelson, R., Stability of adenosine deaminase during ice storage of pink and brown shrimp from the Gulf of Mexico, *J. Food Sci.*, 44, 1625, 1979.
32. Chichester, D. F. and Tanner, F. W., Antimicrobial food additives, in *Handbook of Food Additives*, Furia, T. E., Ed., CRC Press, Cleveland, OH, 1972, 115.
33. Chuaqui-Offermanns, N., Preservation of fish and fish products by the use of ionizing radiation, a review, in *Atomic Energy of Canada Limited Report. AECL-9062*, 1986.
34. Cobb, B. F., Biochemistry and physiology of shrimp-effect on use as food, in *Proc. Conf. on Handling, Processing, Marketing Tropical Fish*, Tropical Products Inst., London, 1977, 405.
35. Cobb, B. F., Vanderzant, C., Hanna, M. O., and Yeh, C: P. S., Effect of ice storage on microbiological and chemical changes in shrimp and melting ice in a model system, *J. Food Sci.*, 41, 29, 1976.
36. Cook, D. W. and Rupple, A., Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in postharvest shellstock oysters. *J. Food Prot.*, 52, 343, 1989.

37. Coyne, F. P., The effect of CO₂ on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. I, J. Soc. Chem. Indust., 52, 119T, 1932.
38. Coyne, F. P., The effect of CO₂ on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. II, J. Soc. Chem. Indust., 52, 19T, 1933.
39. Crueger, A. and Crueger, W., Glucose transforming enzymes, in Microbial Enzymes and Biotechnology, Fogarty, W. M. and Kelly, C. T., Eds., 1990, 180.
40. Curl, L. A. and Jansen, E. F., Effect of high pressures on trypsin and chymotrypsin, J. Biol. Chem. 184, 45, 1950(a).
41. Curl, L. A. and Jansen, E. F., Effect of high pressures on trypsin and chymotrypsin, J. Biol. Chem., 185, 713, 1950(b).
42. Daniels, J. A., Krishnamurthi, R., and Rizvi, S. S. H., A review of the effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality, J. Food Prot., 48, 532, 1985.
43. Davie, P. S. and Sparksman, R. I., Burnt tuna: an ultrastructural study of postmortem changes in muscle of yellowfin tuna caught on handline or longline, J. Food Sci., 51, 1122, 1986.

- 44.deKoning, A. J. and Mol, T. H., Rates of free fatty acid formation from phospholipids and neutral lipids in frozen cape hake mince at various temperatures, *J. Sci. Food Agric.* 50, 391, 1990.
- 45.Deng, J. C., Effect of iced storage on free fatty acid production and lipid oxidation in mullet muscle, *J Food Sci.*, 43, 337, 1978.
- 46.Dixon, N. M. and Kell, D. B., The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms, *J. Appl. Bacteriol.*, 67, 109, 1989.
- 47.Dondero, M., Egana, W., Tarky, Y., Cifuentes, A., and Torres, J. A., Effectiveness of glucose oxidase/catalase in the preservation of shrimp, paper #362 presented at the 51st Annual Meeting of Inst. of Food Technologists, Anaheim, CA, June 1990.
- 48.Dring, G. J., Some aspects of the effects of hydrostatic pressure on microorganisms, in *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes*, Skinner. S. A. and Hugo, V., Eds., Academic Press, San Diego, 1976, 257.
- 49.Ehlermann, D. A. E., Current status of food irradiation in Europe, in *Food Irradiation*, Thorne, S., Ed., 1991, 87.

50. Eklund, M. W., Effect of MAP and vacuum packaging on *C. botulinum* and spoilage organisms of fishery products, in Proc. First Natl. Conf. Seafood Packaging and Shipping, Washington, D.C., 1982, 298.
51. Ellinger, R. H., Phosphates in food processing, in Handbook of Food Additives, Furia, T. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1972, 617.
52. El-Zeany, B. A., Janicek, G., and Pokorny, J., Effect of antioxidant on the discoloration of lipid protein mixtures, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 158. 93, 1975
53. El-Zeany, B. A., Pokorny, J. A., and Janicek, G., Autoxidation of fish oil fatty acid esters in mixture with protein in presence of copper and iron salts, *Inst. of Chem. Tech. Prague E.*, 42, 5, 1975.
54. Eskin, N. A. M., *Biochemistry of Foods*, 2nd ed., Academic Press. San Diego, 1992, 24.
55. Eyles, M. J. and Davey, G. R., Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *J. Food Prot.*, 47, 703. 1984.

- 56.Fain, A. R., C.botulinum in fresh fish, incidence and packaging studies, in Proc. First Natl. Conf. on Seafood Packaging and Shipping. Washington, D.C., 1982, 350.
- 57.FAO., Code of Practice for Fresh Fish, FAO Fisheries Circ., Rome, 1973, C318.
- 58.Farber, J. M., Microbiological aspects of MAP technology - a review, J. Food Prot., 54(1), 58, 1991.
- 59.Farr, D., High pressure technology in the food industry, Trends Food Sci. Technol., 1(1), 14, 1990.
- 60.Fatima, R., Farooqui, B., and Quadri, R. B., Inosine monophosphate and hypoxanthine as indices of shrimp quality, J. Food Sci., 46, 1125, 1981.
- 61.Fennema, O. R., Powrie, W. D., and Marth, E. H., Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter, Marcel Dekker, New York, 1973.
- 62.Fey, M. S. and Regenstrin, J. M., Extending shelf-life of fresh red hake and salmon using MAP and potassium sorbate at 1°C. J. Food Sci., 47, 1048, 1982.
- 63.Fieger, E. A., Cause and prevention of black spot in shrimp, Ice Refrigeration, 120, 49, 1951.

64. Fieger, E. A. and Novak, A., Microbiology of shell-fish deterioration, in Fish as Food, Vol. 1, Borgstrom, G., Ed., Academic Press, San Diego, 1961.
65. Field, C. E., Pivarnik, L. F., Barnett, S. M., and Rand, Jr., A. G., Utilization of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish, J. Food Sci., 51(1), 66, 1986.
66. Fioretto, F., Cruz, C., Largeteau, A., Sarli, T. A., Demazeau, G., El Moueffak A., Stabilization of caviar by high pressure. International Congress, Technological Innovation and Enhancement of Marginal Products, Faculty of Agricultural Science, 5-7th April 2005.
67. Fioretto, F., Cruz, C., Largeteau, A., Sarli, T. A., Demazeau, G., El Moueffak A., Inactivation of staphylococcus aureus and Salmonella enteritidis in TSB and caviar samples by High pressure processing. Atti 3rd International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Rio de Janeiro, Brasil 2004
68. Fletcher, G. C. and Statham, J. A., Deterioration of sterile chill-stored and frozen trumpeter fish, J. Food Sci., 53(5), 1336. 1988.

69. Flick, G. J. and Lovell, R. T., Postmortem degradation of nucleotides and glycogen in Gulf shrimp, *Food Technol.*, 30, 1743, 1970.
70. Fox, D. L., Presumed carbaminoprotein equilibria and free energy exchanges in reversible CO₂ narcosis of protoplasm, *J. Theoret. Biol.*, 90, 441, 1981.
71. Frankel, E. N., Volatile lipid oxidation products, *Prog. Lipid Res.*, 22, 1, 1984.
72. Frankos, V. H., Schmitt, D. F., Haws, L. C., McEvily, A. J., Iyengar, R., Miller, S. A., Munro, I. C., Clydesdale, F. M., Foebes, A. L., and Sauer, R. M., GRAS evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 14, 202, 1991.
73. Fujii, T., Hirayama, M., Okuzumi, M., Nishino, H., and Yokoyama, M., The effect of storage in CO₂-N₂ gas mixture on the microbial flora of sardines, *Nippon Suisan Gakkaishi.*, 56, 837, 1990.
74. Fujii, T., Hirayama, M., Okuzumi, M., Yasuda, NI., Nishino, H., and Yokoyama, M., Shelf-life studies on fresh sardine packaged with CO₂ gas mixture, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 55, 1971, 1989.

75. Fukusawa, R., Wakabayashi, H., and Natori, T., Inhibitor of Tyrosinases in Foods, Japanese Patent 57 40875, 1982.
76. Furuta, M., Dohmaru, T., Katayama, T., Toratani, H., and Takeda, A., Detection of irradiated frozen meat and poultry using carbon monoxide as a probe, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1099, 1992.
77. Garrett, E. S., Microbiological standards, guidelines, specifications, and inspection of seafood products, *Food Technol.*, 42, 90, 1988.
78. Genske, R. P. and Branen, A. L., Properties of antimicrobial substances with *S. diacetylactis* and *L. citrovorum*, *Modern Dairy*, 52, 12, 1973.
79. German, J. B., Bruckner, G., and Kinsella, J. E., Lipoxygenases in trout gill tissue affecting arachidonic, eicosapentanoic, and docosahexaenoic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, 875, 12, 1987.
80. German, J. B. and Kinsella, J. E., Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoxygenase, *J. Agric. Food Chem.*, 33, 681, 1985.

81. Geromel, E. J. and Montgomery, M. W., Lipase release from lysosomes of rainbow trout muscle subjected to low temperatures, *J. Food Sci.*, 45, 412, 1980.
82. Ghadi, S. V., Alur, M. D., Venugopal, V., Doke, S. N., Ghosh, S. K., Lewis, N. F., and Nadkarni, G. B., Studies on the storage stability and feasibility of radurization of Indian mackerel. Food preservation by irradiation, *IAEA Proc. Ser.*, 1, 305, 1978.
83. Gram, L., Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* species in fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling, *J. Food Prot.*, 54(6), 436, 1991.
84. Gray, J. I., Measurement of lipid oxidation: a review, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 539, 1978.
85. Haard, N. F., Technological aspects of extending prime quality of seafood: a review, *J. Aquatic Food Prod. Technol.*, 1, (3/4), 9, 1992.
86. Haard, N. F., Biochemistry and chemistry of color and color change in seafoods, in *Seafood Biochemistry, Composition and Quality*, Martin. R., Ory, R., and Flick. G., Eds., Technomic, Lancaster, PA, 1992a, 305.

87. Haard, N. F. and Lee, Y. Z., Hypobaric storage of Atlantic salmon in a carbon dioxide atmosphere, *Can. inst. Food Sci. Technol. J.*, 15(1), 68, 1982.
88. Harima, Y., Free oxygen scavenging packaging, in *Food Packaging*, Academic Press, New York, 1990, 229.
89. Harper, E., Collagenases, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 1063, 1980.
90. Hatori, A., Aging of meat, *Kagaku to Seibutsu (Chemistry and Biology)*, 24, 789, 1986.
91. Hayakawa, I., Kajihara, J., Morikawa, K., Oda, M., and Fujio, Y., Denaturation of ovine serum albumin and ovalbumin by high pressure, heat, and chemicals, *J. Food Sci.*, 57(2), 288, 1992.
92. Heden, C. G., Effects of hydrostatic pressure on microbial systems, *Bacteriol. Rev.*, 28(1), 14, 1964.
93. Henika, R. G., Use of response surface methodology in sensory evaluation, *Food Technol.*, 36, 96, 1982.
94. Herbert, A. and Shewan, J. M., Roles played by bacteria and autolytic enzymes in the production of volatile sulfides in spoiling North Sea cod, *J. Sci. Food Agric.*, 27, 89, 1976.

- 95.Hills, G., The physics and chemistry of high pressure, in The Effects of Pressure on Living Organisms, Sleight, M. A. and MacDonald, A. G., Eds., Academic Press, New York, 1972, 1.
- 96.Hiltz, D. F., Lall, B. S., Lemon, D. W., and Dyer, W. J., Deteriorative changes during frozen storage, J. Fish Res. Board Can., 33, 2560, 1976.
- 97.Hintlian, C. B. and Hotchkiss, J. H., The safety of MAP - a review, Food Technol., 40(12), 70, 1986.
- 98.Hjelmeland, K. and Raa, J., Fish tissue degradation by trypsin type enzymes, in Advances in Fish Science and Technology. Connel, J. J., Ed., Fishing News Books, London, 1980, 456.
- 99.Hobbs, G., Fish: microbiological spoilage and safety, Food Sci. Technol. Today, 5(3), 166, 1992.
100. Hobbs, G., C. botulinum and its importance in fishery products, Adv. Food Res., 22, 135, 1976.
101. Holland, B., Welch, A. A., Unwin, I. D., Buss, D. H., Paul, A. A., and Southgate, D. A. T., in McCance and Widdowson, The Composition of Foods, 2nd ed., 1991, 188.

102. Holston, J. and Slavin, J. W., Technological problems in the preservation of fresh, iced fish, in *Technology of Fish Utilization*, Kreuzer, R., Ed., Fish News Books, London, 1969.
103. Holston, J. and Slavin, J. W., Technological problems in the preservation of fish, iced fish requiring more knowledge from fundamental research, in *Technology of Fish Utilization*, Kreuzer, R., Ed., Fish News Books, London, 1965, 41.
104. Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D., and Knorr, D., Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms, *Food Sci. Technol.*, 43(3), 99, 1989.
105. Horner, B., Fish smoking: ancient and modern, *Food Sci. Technol. Today*, 6(3), 166, 1992.
106. Hsieh, R. J. and Kinsella, J. E., Lipoxygenase-catalyzed oxidation of N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids: relevance to and activity in fish tissue, *J. Food Sci.*, 51(4), 940, 1986.
107. Huang, F. L. and Tappel, A. L., Action of cathepsins C and D in protein hydrolysis, *Biochim. Biophys. Acta*, 236, 739, 1971.
108. Hussain, A. M., Ehlermann, D., and Diehl, J., Comparison of toxin production by *Clostridium botulinum* type E in irradiated

- and unirradiated vacuum-packed trout, Arch. Lebensmittelhygiene, 28, 23, 1977.
109. ICMSF, Microbial Ecology of Foods, Vol. I, Academic Press, San Diego. 1980.
110. Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S., and Hashimoto, K., Effect of storage temperature on rigor mortis and ATP degradation in Plaice *Paralichthys olivaceous* muscle, J. Food Sci., 52(6), 1514, 1987.
111. Izquierdo-Pulido, M. L., Hatae, K., and Haard, N. F., Nucleotide catabolism and changes in texture indices during iced storage of cultured sturgeon, J. Food Biochem., 16(3), 173, 1992.
112. Jay, J. M., Modern Food Microbiology, Van Nostrand Reinhold, New York, 1986.
113. Jiang, S.-T., Wang, Y.-T., and Chen, C.-S., Lysosomal enzyme effects on the postmortem changes in Tilapia muscle myofibrils, J. Food Sci., 57(2), 277, 1992.
114. Jiang, S.-T., Wang, Y.-T., Gan, B.-S., and Chen, C.-S., Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of

- Tilapia muscle myofibrils, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1464, 1990.
115. Jones, N. R., Burt, J. R., Murray, J., and Stroud, G. D., Nucleotides and the analytical approach to the rigor mortis problem, in *The Technology of Fish Utilization*, Kreuzer, R., Ed., Fishing News Books, London, 1965.
116. Josephson, D. B., Lindsay, R. C., and Stuibler, D. A., Biogenesis of lipid derived volatile aroma compounds in the Emerald Shiner, *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1347, 1984.
117. Jurewicz, I. and Salmonowicz, J., *Probl. Postepow. Nauk. Roln*, 136, 119, 1973.
118. Kaitaranta, J. K., Control of lipid oxidation in fish oil with various anti-oxidative compounds, *J. Am Oil Chem. Soc.*, 69(8), 810. 1992.
119. Kantt, C. A., Bouzas, J., Dondero, M., and Torres, J. A., Glucose oxidase/catalase solution for on-board control of shrimp microbial spoilage: model studies, *J. Food Sci.*, 58(1), 104, 1993.

120. Kanner, J. and Kinsella, J. E., Lipid deterioration initiated by phagocytic cells in muscle foods, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 370, 1983.
121. Kauzmann, W., *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C. B., Jr., Anson, M. L., Bailey, K., and Edsall, J. T., Eds., Academic Press, New York, 1959, 14.
122. Kelleher, S. D., Silva, L. A., Hultin, H. O., and Wilhelm, K. A., Inhibition of lipid oxidation during processing of washed, minced Atlantic mackerel, *J. Food Sci.*, 57(5), 1103, 1992.
123. Kennish, J. M. and Kramer, D. E., Review of high pressure liquid chromatographic methods for measuring nucleotide degradation in fish muscle, in *Seafood Quality Determination*, Kramer, D. E. and Liston, J., Eds., 1987, 209.
124. Khayat, A. and Schwall, D., Lipid oxidation in seafood, *Food Technol.*, 37, 130, 1983.
125. Khuri, A. I. and Cornell, J. A., *Response Surfaces: Designs and Analyses*, Marcel Dekker, New York, 1987.
126. Kim and Haard, Degradation of proteoglycans in the skeletal muscle of Pacific rockfish during storage, *J. Muscle Foods*, 3, 103, 1992.

127. Kimito, W. I. and Gaddis, A. M., Catalytic decomposition of autoxidized unsaturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48, 331 A, 1971.
128. Klontz, K. C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H. T., Baddy, L. M., and Gunn, R. A., Syndromes of *V. vulnificus* infections, *Ann. Intern. Med.*, 109, 318, 1988.
129. Konagaya, S. and Konagaya, T., Acid denaturation of myofibrillar protein as the main cause of formation of "yake-niku," a spontaneously done meat, in red meat fish, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 45(2), 245, 1979.
130. Koohmarie, M., Babiker, A. S., Merkel, R. A., and Dutson, T. R., Role of Ca^{2+} -dependent proteases and lysosomal enzymes in postmortem changes in bovine skeletal muscle, *J. Food Sci.*, 53, 1253, 1988.
131. Koohmarie, M., Schollmeyer, J. E., and Dutson, T. R., Effect of low calcium-requiring calcium-activated factor on myofibrils under varying pH and temperature conditions. *J. Food Sci.*, 51, 28, 1986.

132. Kosak, P. H. and Toledo, R. T., Effects of microbial decontamination on the storage stability of fresh fish, *J. Food Sci.*, 46, 1012, 1981.
133. Kushmerick, M. J. and Davies, R. E., The role of phosphate compounds in thaw contraction and the mechanism of thaw rigor, *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 279, 1968.
134. Lambert, A. D., Smith, J. P., and Dodds, K. L., Effect of initial O₂ and CO₂ and low dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP fresh pork, *J. Food Prot.*, 54, 939, 1991.
135. Lee, J. S. and Kolbe, E., Microbiological profile of Pacific shrimp stored under refrigerated seawater spray, *Marine Fish Rev.*, 44, 12, 1982.
136. Leistner, L. and Rodel, W., The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms, in *Intermediate Moisture Foods*, Davis, R., Birch, G. G., and Parker, K. J., Eds., Elsevier, London, 1976, 120.
137. Leu, S. S., Jhaveri, S. N., Karakoltsidis, P. A., and Constantinides, S. M., Atlantic mackerel: seasonal variations in

- proximate composition and distribution of chemical nutrients, *J. Food Sci.*, 46, 1635, 1981.
138. Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., Tuhkunen, B. E., and Racicot, L. D., Effect of some potentially synergistic treatments in combination with 100 Krad irradiation on the iced shelf-life of cod fillets, *J. Food Sci.*, 49, 1341, 1984.
139. Lima dos Santos, C. A. M., The storage of tropical fish in ice, a review, *Trop. Sci.*, 23, 97, 1981.
140. Lindner, P., Angel, S., Weinberg, Z. G., and Granit, R., Factors inducing mushiness in stored prawns, *Food Chem.*, 29, 119, 1988.
141. Liston, J., Recent advances in the chemistry of iced fish spoilage, in *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, Martin, R., Flick, G., Hebard, C. E., and Ward, D. E., Eds., 1982, 27.
142. Liston, J., Microbiology in fishery science, in *Advances in Fish Science and Technology*, Connel, J. J. and staff of Torry Research Station. Eds., Fishing News Books, London, 1980. 138.

143. Livingston, D. J. and Brown, W. D., The chemistry of myoglobin and its reactions, *Food Technol.*, 35(5), 244, 1981.
144. Lorier, M. A. and Aitken, B. L., Method for Treating Fish with Alpha-2-Macroglobulin, U.S. Patent #5,013,568, 1991.
145. Love, R. M., *The Chemical Biology of Fishes*, Vol. 2. Advances 1968-1977, Academic Press, London, 1980.
146. Love, R. M. and Elerian, M. K., Protein denaturation in frozen fish, *J. Sci. Food Agric.*, 15, 805, 1964.
147. 145 MacFarlane, J. J., High-pressure technology and meat quality, in *Developments in Meat Science-3*, Ralston, L., Ed., Elsevier, New York, 1985, 155.
148. Marquis, R. E., High pressure microbial physiology, *Adv. Microbial Physiol.*, 14(1), 159, 1976.
149. Marquis, R. E., The physiological basis for microbial barotolerance. Tech. Rep. #1. Office of Naval Research Contract N00014-67-A-0398-0013. Work Unit #NR 136-924, School of Medicine & Dentistry, University of Rochester, NY, 1973.
150. Matches, J. R., Effects of temperature on the decomposition of Pacific coast shrimp, *J. Food Sci.*, 47, 1044, 1982.

151. McDonald, R. E. and Hultin, H. O., Some characteristics of the enzymic lipid peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle, *J. Food Sci.*, 52(1), 15, 1987.
152. McDonald, R. E., Kelleher, S. D., and Hultin, H. O., Membrane lipid oxidation in a microsomal fraction of red hake muscle, *J. Food Biochem.*, 3, 125, 1979.
153. McEvily, A. J., Method of Preventing Browning in Foods Utilizing Protease Free Latex Extracts Particularly from Figs, U.S. Patent #4,981.708, 1991.
154. McEvily, A. J., Iyengar, R., and Gross, A. T., U.S. Patent 5 059 438, 1991.
155. McEvily, A. J., Iyengar, R., and Otwell, W. S., Sulfite alternative prevents shrimp melanosis, *Food Technol.*, 45, 80, 1991.
156. Middlebrooks, B. L., Toom, P. M., Douglas, W. L., Harrison, R. E., and McDowell, S., Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel, *J. Food Sci.*, 53, 1024, 1988.
157. Miller, S. A. and Brown, W. D., Effectiveness of chlortetracycline in combination with potassium sorbate or

- tetrasodium EDTA for preservation of vacuum packed rockfish fillets, *J. Food Sci.*, 49, 188, 1984.
158. Moberg, L., Good manufacturing practices for refrigerated foods, *J. Food Prot.*, 52(5), 363, 1989.
159. Molin, G., Stenstrom, I., and Ternstrom, A., The microbial flora of herring fillets after storage in CO₂, N₂, or air at 2°C, *J. Appl. Bacteriol.*, 55, 49, 1983.
160. Montfort, I. and Perez-Tamayo, R., The distribution of collagenase in normal rat tissues, *J. Histochem. Cytochem.*, 23, 910, 1975.
161. Morild, E., The theory of pressure effects on enzymes, *Adv. Protein Chem.*, 34, 93, 1981.
162. Morita, R. Y., Effect of hydrostatic pressure on succinic, formic, and malic dehydrogenase in *E. coli*, *J. Bacteriol.*, 74(2), 251, 1957.
163. Morton, H. E. and Kocholaty, W., Toxicity and antibiotic activity of Kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*, *J. Bacteriol.*, 50, 579, 1945.
164. Mossel, D. A. A., Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods, in *Food Microbiology: Advances and*

Prospects, Roberts, T. A. and Skinner, F. A., Eds., Academic Press, San Diego, 1983, 1.

165. Murata, M. and Sakaguchi, M., Storage of yellowtail white and dark muscle in ice: changes in content of adenine nucleotides and related compounds, *J. Food Sci.*, 51, 321. 1986.
166. Noguchi, E., A study of the freshness of meat, *Bull. Jpn. Sea. Reg. Fish Res., Lab #5*, 61, 1957.
167. Oberlender, V., Hanna, M. O., Miget, R., Vanderzant, C., and Finne, G., Storage characteristics of fresh swordfish steaks stored in CO₂-enriched controlled atmospheres, *J. Food Prot.*, 46, 434, 1983.
168. Olley, J. and Lovern, J. A., Phospholipid hydrolysis in cod flesh stored at various temperatures, *J. Sci. Food Agric.*, 11, 644, 1960.
169. Olley, J. and Ratkowsky, D. A., Temperature function integration and its importance in the storage and distribution of flesh foods above the freezing point, *Food Technol. Australia*, 25(2), 66, 1973.

170. Opoku-Gyamfua, A., Simpson, B. K., and Squires, E. J., Comparative studies on the polyphenoloxidase from lobster and tyrosinase, *J. Agric. Food Chem.*, 40, 772, 1992.
171. Palumbo, S., Jenkins, R K., Buchanan, R. L., and Thayer, D. W., Determination of irradiation D-values for *Aeromonas hydrophilia*, *J. Food Prot.*, 49, 189, 1986.
172. Pardo, A. and Perez-Tamayo, R., The presence of collagenases in collagen preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, 392, 121, 1975.
173. Pedrosa-Menabrito, A. and Regenstein, J. M., Shelf-life extension of fresh fish - a review, *J. Food Quality*, 13, 129, 1990.
174. Phillippy, B. Q., Characterization of the in situ TMAOse System of Red Hake Muscle, Ph.D. thesis, University of Massachusetts, Amherst, 1984.
175. Post, L. S., Lee, D. A., Solberg, M. M., Furgang, D., Specchio, J., and Graham, C., Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vacuum packaged and MAP fish fillets, *J. Food Sci.*, 50, 990, 1985.

176. Price, R. J. and Lee, J. S., Inhibition of *Pseudomonas* spp by hydrogen peroxide Lactobacilli, *J. Milk Food Technol.*, 33, 13, 1970.
177. Price, R. J., Melvin, E. F., and Bell, J. W., Postmortem changes in chilled round, bled and dressed albacore, *J. Food Sci.*, 56(2), 318, 1991.
178. Przybylski, L. A., Finerty, L. W., Grodner, R. M., and Gerdes, D. L., Extension of shelf-life of iced fresh channel catfish fillets using MAP and low dose irradiation, *J. Food Sci.*, 54(2), 269, 1989.
179. Ravesi, E. M., Licciardello, J. J., Tuhkunen, B. E., and Lundstrom, R. C., The effects of handling or processing treatments on storage characteristics of fresh spiny dogfish, *Marine Fish Rev.*, 47, 48, 1985.
180. Regenstein, J. M., The shelf-life extension of haddock in CO₂-O₂ atmosphere with and without potassium sorbate, *J. Food Qual.*, 5, 285, 1982.
181. Reppond, K. D., Collins, J., and Markey, D., Walleye pollock: changes in quality when held in ice, slush-ice, refrigerated

- seawater then stored as block of fillets at -18°C , J. Food Sci., 50, 985, 1935.
182. Reppond, K. D. and Collins, J., Pacific cod: change in sensory and chemical properties when held on ice and modified refrigerated seawater, J. Food Sci., 48, 1552, 1983.
183. Rhee, K. S., Dutson, T. R., and Smith, G. C., Enzymatic lipid peroxidation in microsomal fractions from beef skeletal muscle, J. Food Sci., 49, 675, 1984.
184. Roach, S. W., Tarr, H. L. A., and Tomlinson, N., Chilling and freezing salmon and tuna in refrigerated seawater, Fish. Res. Bull. Can., 160, 1967.
185. Robach, M. C., Influence of potassium sorbate on growth of *Pseudomonas putrefaciens*, J. Food Prot, 42, 312. 1979.
186. Roberts, A. C. and McWeeny, D. J., The uses of sulfur dioxide in the food industry, J. Food Technol., 7(3), 221, 1972.
187. Robbins, F. M., Walker, J. E., Cohen, S. H., and Charterjee, S., Action of proteolytic enzymes on bovine myofibrils, J. Food Sci., 44, 1672, 1979.

188. Ross, D. A. and Love, R. M., Decrease in the cold store flavor developed by frozen fillets of starved cod, *J. Food Tech.*, 14, 115, 1979.
189. Sakata, K., Matsumiya, M., Mochizuki, A., and Otake, S., Thiol protease in the ordinary muscle of Pacific mackerel, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51, 1865, 1985.
190. Samuels, R. D., DeFeo, A., Flick, G. J., Ward, D. R., Rippen, T., Riggens, J. K., Coale, C., and Smith, C., Demonstration of a quality maintenance program for fresh fish products. Report submitted to Mid-Atlantic Fisheries Development Foundation, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1984.
191. Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., and Kawabata, M., Type V collagen in trout muscle and its solubility change during chilled storage of muscle, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1222, 1991.
192. Savagaon, K. A. and Sreenivasan, A., Activation mechanism of pre-phenoloxidase in lobster and shrimp. *Fish. Technol.*, 15, 49, 1978.
193. Schwartz, W. N. and Bird, J. W. C., Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D, *Biochem. J.*, 167, 811, 1977.

194. Scott, D. N., Fletcher, G. C., Hogg, M. G., and Ryder, J. M.,
Comparison of whole and headed and gutted orange roughy
stored in ice: sensory, microbiology and chemical assessment, *J.*
Food Sci., 51(1), 79, 1986.
195. Scott, D. N., Fletcher, G. C., and Summers, G., MAP and
vacuum packaging of snapper fillets, *Food Technol. Australia*,
36. 330, 1984.
196. Seib, P. A. and Liao, M. L., Ascorbate-2-Phosphate Esters and
Method of Making the Same, U.S. Patent 4 647 672, 1987.
197. Seib, P. A., Oxidation, monosubstitution, and industrial
synthesis of ascorbic acid: a review, *Int. J. Vitam. Nutri. Res.*,
27(Suppl.), 259, 1985.
198. Seidmann, S. C., Smith, G. C., Carpenter, Z. L., Dutson, T. R.,
and Dill, C. W., Modified atmospheres and changes in beef
during storage, *J. Food Sci.*, 44, 1036, 1979.
199. Shaw, S. J., Bligh, E. G., and Woyewoda, A. D., Spoilage
pattern of Atlantic cod fillets treated with glucose
oxidase/gluconic acid, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 19,
3, 1986.

200. Sherekar, S. V., Doke, S. N., Gore, M. S., and Ninjoor, V.,
Proteinases of tropical fish and their role in autolysis, *Ind. J. Exptal. Biol.*, 24, 440, 1986.
201. Sherwood, H., Natural Toxins, in *Microbiology of Marine Food Products*, Ward, D. R. and Hackney, C., Eds., Van Nostrand Reinhold, New York, 1991, 301.
202. Shiflett, M. A., Lee, J. S., and Sinnhuber, R. O., Microbial flora of irradiated dungeness crabmeat and Pacific oysters, *Appl. Microbiol.*, 14, 411, 1966.
203. Siebert, G., Proteolytic enzyme activity in fish, *Experientia.* 14, 65, 1958.
204. Sikorski, Z., Olley, J., and Kostuch, S., Protein changes in frozen fish, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 8(1), 97, 1976.
205. Silliker, H. H. and Wolfe, S. K., Microbiological safety considerations in controlled atmosphere storage of meats, *Food Technol.*, 34, 59, 1980.
206. Simpson, B. K. and Haard, N. F., Cold adapted enzymes from fish, in *Food Biotechnology*, Knorr, D., Ed, Marcel Dekker, New York. 1987, 495.

207. Simpson, B. K., Marshall, M. R., and Otwell, W. S., Phenoloxidases from pink and white shrimp: kinetic and other properties, *J. Food Biochem.*, 12, 205, 1988.
208. Simpson, B. K., Marshall, M. R., and Otwell, W. S., Phenoloxidases from shrimp: purification and some properties, *J. Agric. Food Chem.*, 35, 918, 1987.
209. Simpson, M. V. and Haard, N. F., Temperature acclimation of Atlantic cod and its influence on freezing point and biochemical damage of postmortem muscle during storage at 0°C and -3°C, *J. Food Biochem.*, 11(1), 69, 1987.
210. Singleton, P. and Sainsbury, D., *Dictionary of Microbiology*, John Wiley & Sons, New York, 1978.
211. Smith, J. P., Khanizadeh, S., van de Voort, F. R., Hardin, R., Ooraikul, B., and Jackson, E. D., Use of response surface methodology in shelf-life extension studies of a bakery product, *Food Microbial.*, 5, 163, 1988.
212. Smith, J. P., Ramaswamy, H., and Simpson, B. K., Developments in food packaging technology. II. Storage aspects, *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 111, 1990.

213. Smith, J. P., Simpson, B. K., Khanizadeh, S., Ooraikul, B., and Jackson, E. D., Control of fermentation problems in a gas packaged bakery product using a response surface methodology approach. *Food Microbiol.*, 7, 147, 1990.
214. Smith, J. P., Ooraikul, B., Koersen, W. J., van der Voort, F. R., Jackson, E. D., and Lawrence, R. A., Shelf-life extension of a bakery product using ethanol vapor, *Food Microbiol.*, 4, 329, 1987.
215. Smith, J. P., Simpson, B. K., and Ramaswamy, H., in *Modified Atmosphere Packaging — Principles and Applications*, 1992.
216. Smith, R., Nickelson, R., Martin, R., and Finne, G., Bacteriology of indole production in shrimp homogenates held at different temperatures, *J. Food Prot.*, 47, 861, 1984.
217. Srikar, L. N., Seshadari, H. S., and Fazal, A. A., Changes in lipids and proteins of marine catfish during storage, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 24, 653, 1989.
218. Starkey, P. M. and Barrett, A. J., α 2-Macroglobulin: a physiological regulator of proteinase activity, in *Proteins in Mammalian Cells and Tissues*, Barrett, A. J., Ed., North Holland, Amsterdam, 1977, 663.

219. Statham, J. A. and Bremner, H. A., Effects of potassium sorbate on spoilage of blue grenadier as assessed by microbiology and sensory profiles, *J. Food Prot.*, 45, 1030, 1983.
220. Statham, J. A., Bremner, H. A., and Quarmby, A. R., Storage of morwong in combinations of polyphosphate, potassium sorbate, and CO₂ at 4°C, *J. Food Sci.*, 50, 1580, 1985.
221. Stevenson, M. H., Progress in the identification of irradiated foods, *Trends Food Sci. Technol.*, 3, 257, 1992.
222. Sullivan, D. M. and Smith, R. L., Determination of sulfite, in foods by ion chromatography, *Food Technol.*, 39, 45, 1985.
223. Suyama, M. and Konosu, A., Postmortem changes of fish and shellfish, in *Marine Food Science (Suisan Shokuhin-Gaku)*, Koseisha, Koseikaku, Tokyo, 1987, 95.
224. Suzuki, H., Wada, S., Hayakawa, S., and Tamura, S., Effects of oxygen absorber and temperature on polyunsaturated fatty acids of sardine oil during storage, *J. Food Sci.*, 50(2), 358, 1985.
225. Tarrant, P. V., Review: muscle biology and biochemistry, *Proc. Eur. Meeting Meat Research Workers*, 1, 1987.

226. Taylor, S. L., Higley, N. A., and Bush, R. K., Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypertension, *Adv. Food Res.*, 30, 1, 1986.
227. Thorisson, S., Gunston, F., and Hardy, R., The antioxidant properties of ethoxyquin and of some of its oxidation products in fish oil and meal, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(8), 806, 1992.
228. Tomlinson, N., Geiger, S. E., Boyd, J. W., Southcott, B. A., Gibbard, G. A., and Roach, S. W., Comparison between refrigerated seawater (with or without CO₂) and ice as storage media for fish to be subsequently frozen. I.I.F.I.I.R-Commission B2, D3, Tokyo, 1974, 63.
229. Tomlinson, N., Geiger, S. E., and Dollinger, E., Chalkiness in halibut in relation to muscle pH and protein denaturation, *J. Fish Res. Board Can.*, 22, 653, 1965.
230. Toyohara, H. and Shimizu, Y., Relation of the rigor mortis of fish body and the texture of the muscle, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 54(10), 1795, 1988.
231. Toyomizu, M., Hanaoka, K., and Yamaguchi, K., Effect of release of free fatty acids by enzymatic hydrolysis of

- phospholipids on lipid oxidation during storage of fish at -5°C ,
Nippon Suisan Gakkaishi, 47(5). 615, 1981.
232. Tsukuda, N., Studies on the discoloration of red fishes. VI,
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 36, 725, 1970.
233. Ueno, R., Ikeda, S., and Horiguchi, Y., Characterization of
pepstatin-insensitive protease in mackerel white muscle, Nippon
Suisan Gakkaishi, 54, 699, 1988.
234. Ueno, R., Liston, J., and Horiguchi, Y., Intracellular
distinction of enzymes and particle properties of lysosomes in
mackerel muscle tissue, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 52, 895, 1986.
235. Urbain, W. M., Food Irradiation, Academic Press, Orlando,
FL, 1986.
236. Van Garde, S. J. and Woodburn, M. J., J. Amer. Diet. Assoc.,
87, 322, 1987.
237. Villemure, G., Simard, R. E., and Picard, G., Bulk storage of
cod fillets and gutted cod under CO_2 atmosphere, J. Food Sci.,
51, 317, 1986.
238. Ward, D. R. and Baj, N. J., Factors affecting microbiological
quality of seafoods, Food Technol., 42, 85, 1988.

239. Watts, D. A. and Brown, W. D., Histamine formation in abusively stored Pacific mackerel: effect of CO₂-modified atmosphere, *J. Food Sci.*, 47, 1386, 1982.
240. Wolfe, S. K., Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce, *Food Technol.*, 34(3), 55, 1980.
241. WHO, Australian Food Poisoning Outbreak, Newsletter #26, 1990.
242. Yamada, K., Harada, K., Kawahara, T., Itoh, R., and Tsukamoto, S., Comparative rates of ATP degradation in rested and exhausted young yellowtail *Seriola quinqueradiata*-II, *Rep. Fukui Pref. Fish Exp. Sta. #5*: 1, 1983.
243. Yamanaka, H., Shimakura, K., Shiomi, K., Kikuchi, T., and Okuzumi, M., Occurrence of allergy-like food poisoning caused by "mirin"-seasoned meat of dorado, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 28, 354, 1987.
244. Yan, X., Taylor, K. D. A., and Hanson, S. W., Studies on the mechanism of blackspot development in Norway lobster, *Food Chem.*, 34, 273, 1989.

245. Yan, X., Taylor, K. D. A., and Hanson, S. W., Phenolase in Norway lobster: activation and purification, *Food Chem.*, 36, 19, 1990.
246. Young, L. L., Revere, R. D., and Cole, A. B., Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres, *Food Technol.*, 42(9), 65, 1988.
247. Yu, M. H., Wu, M. T., Wang, D. J., and Salunkhe, D. K., Non-enzymic browning in synthetic systems containing ascorbic acid, amino acids, and inorganic salts, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 7, 279, 1974.
248. Zobell, C. E., Pressure effects on morphology and life processes of bacteria, in *High Pressure Effects on Cellular Processes*. Zimmermann, A. M., Ed., Academic Press, San Diego, 1970.

SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO

Nell'ambito dello svolgimento del dottorato ho inteso approfondire in un primo momento, aspetti inerenti alcune tecniche di decontaminazione dei prodotti ittici e precisamente:

1. Fette di *Xiphias gladius* addizionate di *rosmarinus officinalis* e confezionate sottovuoto: caratteristiche organolettiche e microbiologiche
2. Effetti del trattamento con ozono sulle caratteristiche organolettiche e microbiologiche di differenti specie ittiche:
 - a. Trattamento con ghiaccio ozonizzato, acqua ozonizzata e ghiaccio ozonizzato
 - b. Trattamento con aria ozonizzata
 - c. Trattamento con aria ozonizzata e stoccaggio con ghiaccio.

In successione l'attenzione è stata focalizzata su *Listeria monocytogenes* e nella fattispecie l'articolazione è stata la seguente:

3. Ricerca di *Listeria monocytogenes* in salmone affumicato confezionato sottovuoto;

4. Creazione di ceppi mutanti di *Listeria monocytogenes*:
antibioticoresistenza e loro risposta all'azione di antimicrobici
naturali

**IV.FETTE DI XIPHUAS GLADIUS ADDIZZIONATE
DI ROSMARINUS OFFICINALIS E CONFEZIONATE
SOTTOVUOTO:CARATTERISTICHE
ORGANOLETTICHE E MICROBIOLOGICHE**

L'alta suscettibilità al deterioramento dei prodotti ittici ha rappresentato da sempre uno stimolo a studiare metodi atti a prolungarne la shelf-life. Le spezie e le erbe sono oggi usate negli alimenti soprattutto per le loro componenti aromatiche, che consistono di alcoli, aldeidi, esteri, terpeni, fenoli, acidi organici e altre sostanze, alcune delle quali non ancora ben identificate.

Le componenti aromatiche di determinate erbe e oli essenziali, possono prolungare la shelf-life degli alimenti per la loro azione battericida o batteriostatica(4,5,6). Del rosmarino(Rosmarinus officinalis L), frequentemente impiegato per il suo aroma, è nota l'attività antiossidante, mentre la sua azione sul controllo e la riduzione del numero di batteri negli alimenti è un aspetto poco studiato.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la shelf-life di trance di pesce spada additivate di rosmarino, confezionate sottovuoto e stoccate a 4°C.

IV.1.MATERIALI E METODI

IV.1.1.Preparazione dei campioni

Sono stati utilizzati due esemplari di *Xiphias gladius* (pesce spada) del peso di circa 50 kg, il primo pescato nel mese di dicembre, il secondo nel mese di luglio. Nel primo caso l'esemplare è stato mantenuto sotto ghiaccio per 72 ore, nel secondo esperimento è stato recapitato in laboratorio lo stesso giorno della cattura.

In entrambi i casi gli esemplari sono stati lavati con acqua corrente, asciugati con carta bibula, sezionati in fette (costituite dalla sola zona dorsale) dello spessore di 2 cm e del peso di circa 150 grammi. Le fette di ciascun esemplare sono state suddivise a caso in 2 gruppi, uno dei quali è stato cosparso di rosmarino in ragione dello 0,02%. Le fette sono state quindi imbustate singolarmente in sacchetti di Polietilene con permeabilità 5-7g m⁽⁻²⁾ 24h⁽⁻¹⁾ e permeabilità di ossigeno 40-50ml m⁽⁻²⁾ 24h⁽⁻¹⁾ atm⁽⁻¹⁾ a 23°C, e dopo ottenimento di un vuoto

spinto (99,9%) sono state mantenute a temperatura di refrigerazione a +4°C per tutta la durata della sperimentazione.

IV.1.2.Accertamenti

Per ogni lotto sono stati effettuati esami microbiologici e si è proceduto alla valutazione dei parametri sensoriali su 2 u.c. ad ogni scadenza programmata, e precisamente al 4°, 6°, 9°, 11°, 14°, 17°, 20°, 23° giorno dalla pesca per il primo lotto e al 2°, 4°, 6°, 8°, 10°, 12°, 14°, 16° giorno dalla pesca per il secondo lotto.

I microrganismi ricercati e le metodiche utilizzate sono di seguito elencate:

- ✓ **Flora aerobia totale a 32°C, 20°C e 5°C** (Plate count agar a 32°C per 2 giorni, 20°C per 5 giorni e 5°C per 10 giorni)
- ✓ **Coliformi totali, fecali ed E.coli** (Chromogenic E.coli/Coliform medium 24h a 37°C)
- ✓ **Stafilococchi potenzialmente patogeni:** (Baird Parker a 37°C per 48 h)
- ✓ **Clostridi solfito-riduttori** (SPS Agar a 43°C per 24 h)

- ✓ **Salmonella spp:** (acqua peptonata a 37°C per 16-18 ore, Brodo Selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth modificato a 43°C per 24-48 ore, Hektoen Enteric Agar e Rambach Agar a 37°C per 24 ore)
- ✓ **Listeria monocytogenes:** (LEBB+UVM 1 a 37°C per 24 ore, semina della brodo cultura 1 in LEBB+UVM 2 a 37°C per 24 ore, isolamento della brodo cultura 2, previa diluizione e non in KOH, su Palcam MEDIUM incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizione di microaerofilia).

Per il secondo lotto sono stati inoltre ricercati:

- ✓ **Pseudomonas** (Pseudomonas agar base + Pseudomonas C-F-C supplement 24h a 20°C);
- ✓ **Streptococchi fecali:** (Kanamycin aesculin azide agar a 37°C per 24-48 ore)
- ✓ **Enterobatteri totali** (VRBG agar a 37°C per 24 h);
- ✓ **Lattobacilli** (MRS agar a 37°C per 48 h);

- ✓ **Bacillus cereus** (Bacillus Cereus Selective Agar + Egg Yalk Emulsion + B.Cereus Selective Supplement a 37°C per 24 h e a 25°C per altre 24 h);
- ✓ **Yersinia enterocolitica**(CIN medium+Yersinia selective supplement a 32°C per 24h).

Effettuati i prelievi per gli esami batteriologici, sono stati esaminati l'aspetto generale, il colore, l'odore e la consistenza del prodotto.

IV.2.Risultati

IV.2.1.Accertamenti microbiologici.

I risultati (medie delle 2 u.c.), riguardanti la FAT a 5°,20°, 30°C, i micrococchi ed i coliformi per i due lotti e, per il secondo lotto, i valori rinvenuti per lattobacilli , enterobatteri e pseudomonas sono riportati nei grafici.

Nel primo lotto la F.A.T. a 5°C, nei campioni con e senza rosmarino non ha subito incrementi evidenti per tutta la durata della sperimentazione; nel secondo lotto, invece, ha presentato valori

inferiori a $\log_{10} 6$ ufc/g al dodicesimo dalla pesca nei campioni con rosmarino e livelli in costante aumento nei campioni senza rosmarino .

La F.A.T. a 20°C, nel primo lotto, si è mantenuta al di sotto di $\log_{10} 6$ ufc/g fino all' undicesimo giorno dalla pesca nei campioni additivati mentre nei campioni di controllo tale valore è stato raggiunto al nono giorno.

Nel secondo lotto, la F.A.T. a 20°C ha presentato valori < a $\log_{10} 6$ ufc/g in entrambe le tipologie fino dodicesimo giorno. Comunque, fino al sesto dalla pesca, i valori dei campioni additivati sono risultati inferiori a $\log_{10} 1$ o 1,5 ufc/g rispetto ai campioni controllo.

La F.A.T. a 32°C si è mantenuta a valori inferiori a $\log_{10} 6$ ufc/g fino al quattordicesimo giorno dalla pesca nei campioni con rosmarino e fino al ventesimo dalla pesca nei campioni di controllo del primo lotto.

Nel secondo lotto ha presentato valori costantemente inferiori a $\log_{10} 6$ ufc/g fino dodicesimo dalla pesca sia nei campioni trattati che in quelli di controllo. Inoltre i campioni additivati hanno mostrato valori costantemente più contenuti rispetto ai campioni di controllo fino all'ottavo giorno dalla pesca.

Per i coliformi totali, nel primo lotto è stato osservato un incremento da $\log_{10} 3$ a 5 ufc/g fino al nono dalla pesca nei campioni con

rosmarino. È seguito quindi un decremento, fino a stabilizzazione per tutta la durata della sperimentazione. Nei campioni di controllo, col procedere della conservazione si è registrato un incremento costante fino all'11° giorno dalla pesca dove il valore si è attestato a livelli di $\log_{10} 5$ ufc/g e successivamente si è stabilizzato.

Nel secondo lotto i coliformi totali, hanno oscillato da $\log_{10} 1$ a 7,9 ufc/g mostrando incremento graduale nel corso della sperimentazione, risultando inferiori a $\log_{10} 4$ ufc /g ed accettabili per tutti i campioni fino all'ottavo giorno dalla pesca.

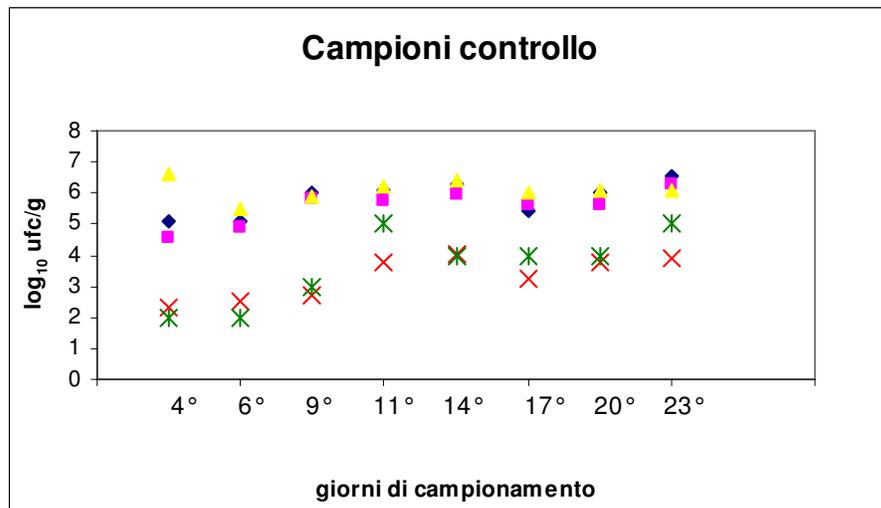
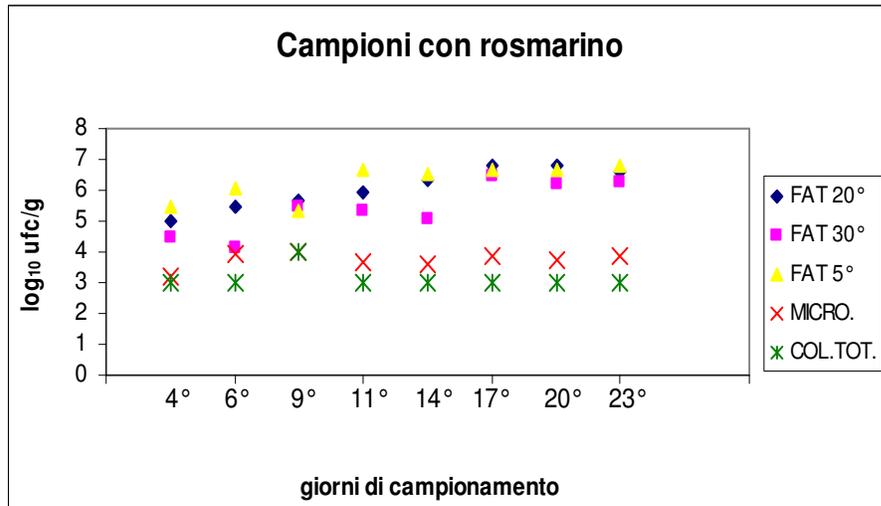
I micrococchi, in tutti i campioni, si sono mantenuti a valori prossimi a $\log_{10} 4$ ufc/g nel primo lotto e a $\log_{10} 6,8$ ufc/g nel secondo lotto alla fine della sperimentazione, non mostrando differenze significative tra i campioni additivati e non.

I lattobacilli, ricercati solo nel secondo lotto, hanno presentato livelli sovrapponibili nelle due tipologie sino al decimo dalla pesca. Successivamente si è osservato un incremento nei campioni additivati e un decremento in quelli di controllo.

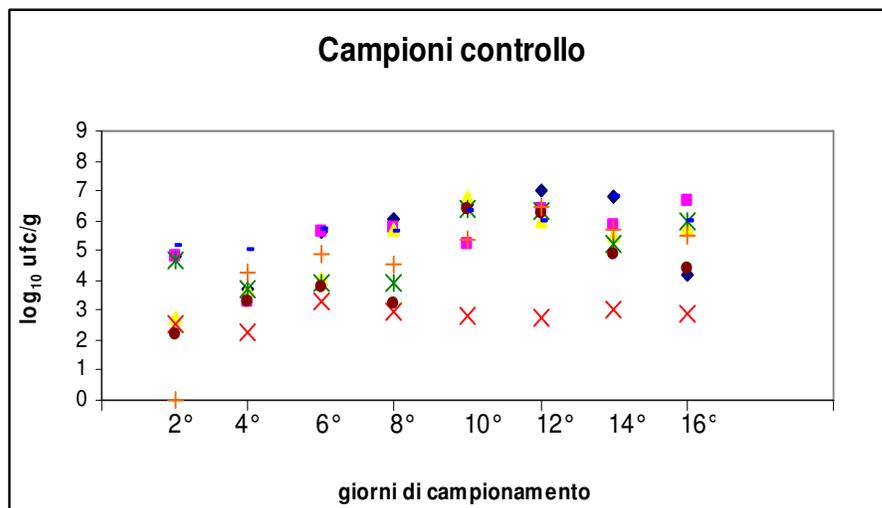
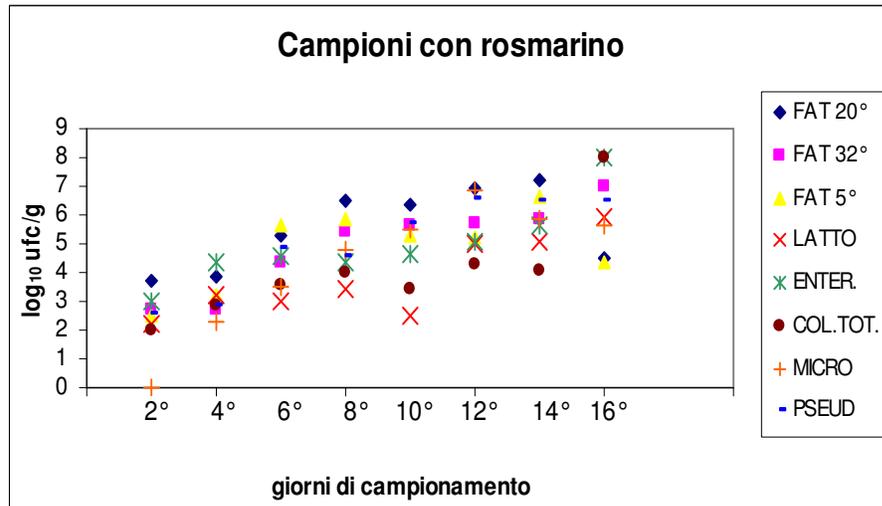
Pseudomonas ha presentato valori di $\log_{10} 6$ fino al decimo dalla pesca con differenze sostanziali, anche di 2 \log_{10} in meno, nei campioni additivati, fino al sesto giorno dalla pesca.

Le enterobatteriaceae hanno mostrato livelli costantemente più alti nei campioni con rosmarino.

I lotto



II lotto



E. coli, clostridi solfito riduttori., *Salmonella* spp., stafilococchi potenzialmente patogeni, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* sono risultati assenti in entrambi i lotti sia nei campioni con che in quelli senza rosmarino.

IV.2.2. Parametri sensoriali

Primo lotto

I caratteri sensoriali dei campioni con rosmarino sono risultati buoni fino al nono giorno e accettabili all'undicesimo giorno dalla pesca, in quanto i prodotti presentavano colore ancora abbastanza vivace e brillante, buona consistenza, odore e aroma gradevoli e assenza di liquido nella confezione.

Al tredicesimo giorno sono stati osservati colore grigiastro e opaco, odore ammoniacale, consistenza diminuita e presenza relativamente abbondante di liquido opaco nella busta.

Per i campioni senza rosmarino i parametri sensoriali sono apparsi buoni fino al nono giorno. All'undicesimo erano apprezzabili colore meno vivace, odore lievemente ammoniacale, presenza di liquido nella busta e consistenza nella norma.

Secondo lotto

I caratteri organolettici dei campioni con rosmarino sono risultati buoni fino al decimo giorno. Presentavano colore brillante, odore e aroma gradevoli, buona consistenza e assenza di liquido nella confezione.

Al dodicesimo erano accettabili poiché l'odore, il colore e la consistenza erano nella norma e modesta era la presenza di liquido trasparente.

Al quattordicesimo giorno si è notato aumento di liquido opalescente nelle buste, odore ammoniacale, colore grigio opaco e consistenza diminuita.

Dal sedicesimo giorno si è verificato un ulteriore peggioramento di tutti i caratteri.

I campioni senza rosmarino hanno presentato caratteristiche sensoriali buone fino al decimo giorno. Dal dodicesimo sono stati evidenziati odore ammoniacale, colore grigio, consistenza diminuita e presenza di liquido opalescente nelle confezioni.

Al sedicesimo giorno per i campioni non additivati si è notato un ulteriore peggioramento di tutti i caratteri organolettici osservati.

IV.3.Conclusioni

Dall'analisi dei risultati è possibile trarre le seguenti considerazioni.

Non sono emersi rischi sanitari in quanto sono risultati assenti Salmonella spp., clostridi solfito riduttori, stafilococchi potenzialmente patogeni, Bacillus cereus, Yersinia enterocolitica e Listeria monocytogenes.

I campioni con rosmarino del secondo lotto hanno mostrato livelli contenuti di F.A.T. a 5° e 20°C fino al dodicesimo giorno e inoltre i valori di F.A.T. a 20°C e Pseudomonas hanno evidenziato, rispetto ai campioni senza rosmarino, rispettivamente livelli inferiori di $\log_{10}1\text{ufc/g}$ e $\log_{10}1-2\text{ufc/g}$ fino al sesto giorno dalla pesca.

La flora psicrofila alterante, limitatamente alle scadenze alle quali le confezioni di ciascun lotto sono state considerate buone o ancora accettabili, si è sviluppata in maniera direttamente proporzionale al decadimento dei parametri sensoriali.

Complessivamente le analisi effettuate hanno permesso di verificare che, nelle condizioni in cui si è operato, le fette di pesce spada, addizionate di rosmarino e non, confezionate sottovuoto, mantenute a temperatura di +4°C, si sono conservate in maniera ottimale

rispettivamente per undici e nove dalla pesca per il primo lotto, mentre per il secondo lotto il periodo di conservazione ipotizzato può essere indicato in dodici giorni dalla pesca per i campioni additivati e in dieci dalla pesca per i campioni di controllo. In tale periodo infatti, la flora alterante è rimasta entro limiti accettabili.

I risultati migliori ottenuti nel secondo lotto sono da collegare all'impiego di pesce freschissimo. Emerge quindi che la selezione della materia prima rappresenta un momento basilare sia per la qualità microbiologica che per quella organolettica.

BIBLIOGRAFIA

- 1. I.N.A.Ashie, J.P.Smith and B.K.Simpson1996-** Spoilage and shel-lif extension of fresh fish and shellfish- Critical Reviews in Food Scioence and Nutrition, 36:87-121;
- 2. Lone Gram, Hans Henrik Huss, 1996:** Microbiological Spoilage of fish and fish products. Food Microbiology 33, 121 – 137;
- 3. G. Boskon and Debevere, 2000:** Shelf- life extension of cod fillets with an acetate buffer spray prior to packaging under modified atmospheres. Food Additives and Contaminants 17, 17- 25;
- 4. Arora D. S., Kaur J.:** Antimicrobial activity of spices. Int. J. Antimicrob. Agent 1999; 12: 257-62;
- 5. Shelf L. A. (1993):** Antimicrobial effects of spice. J. Food Saf., 6, 29-44;
- 6. P.J. Dehaquis, Kareen Stanich, B. Girard, G. Mazza, 2002:** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. I. J of food Microb. 74, 101- 109.

- 7. T. Sarli, A.M.Santoro, A.Anastasio, ML. Cortesi-**
Conservabilità di spigole ed orate sottoposte a cottura sottovuoto
a basse temperature- Industria Alimentari XXXII Giugno, 1993.

V.EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON OZONO SULLE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE E MICROBIOLOGICHE DI DIFFERENTI SPECIE ITTICHE

V.1.Generalità sull'ozono

L'ozono si forma nell'atmosfera terrestre in seguito all'azione di fulmini o radiazioni ultraviolette ad alta energia. Le molecole di ossigeno si rompono producendo dei frammenti i quali, combinandosi con altre molecole di ossigeno, producono ozono (O_3). Il caratteristico odore fresco e chiaro nell'aria dopo un temporale rappresenta l'ozono appena generato in natura.

L'ozono è anche un sottoprodotto di diversi processi fotochimici ossidativi che coinvolgono idrocarburi, ossigeno e idrogeno.

La storia dell'ozono e delle sue applicazioni è stata ampiamente rivisitata. Negli Stati Uniti nel 1888, Fewson inventò un generatore di ozono per deodorare gas mefitici. In Germania, nel 1902, Siemens e Halske costruirono il primo impianto produttore di ozono a grandezza naturale per il trattamento delle acque. Più tardi, nel 1904, De la Coux riferì dell'ampio uso dell'ozono negli impianti di produzione di

gelatina, caseina e albumina. Durante lo stesso anno a Nizza fu, per la prima volta, utilizzato l'ozono su scala commerciale per la potabilizzazione delle acque. Molti paesi europei seguirono questo esempio e adottarono l'ozonizzazione come pratica standard per il trattamento e la disinfezione delle acque. Negli U.S.A. l'ozonizzazione dell'acqua potabile fu installata per la prima volta a Whiting, Indiana, nel 1940 e dal 1987 oltre 200 impianti adottano tale pratica. Tra il 1953 e il 1956 si riconobbe l'efficacia dell'uso di aria sotto pressione contenente ozono per la sterilizzazione di contenitori per alimenti vuoti e la tecnica fu adottata in Svizzera su bottiglie di vetro.

L'ozonizzazione è inoltre un metodo relativamente recente per il trattamento degli alimenti. Per lungo tempo, esso è stato usato con sicurezza ed efficacia nel trattamento delle acque da bere. Negli U.S.A. è stato riconosciuto come valido metodo GRAS (Generally Recognized As Safe) per il trattamento dell'acqua imbottigliata oltre che per gli impianti di imbottigliamento. Fu solo nel Giugno del 1997 quando un gruppo indipendente di esperti stabilì che l'ozono poteva essere impiegato come disinfettante per alimenti, che si spianò la strada per il suo utilizzo nell'industria alimentare.

Nel 2001 la FDA (Food and Drug Administration) modificando le norme riguardanti gli additivi ha reso possibile l'uso dell'ozono, quale agente antimicrobico sia in fase acquosa che gassosa, nel trattamento, conservazione e trasformazione degli alimenti, comprese carni bovine e avicole.

V.2.Chimica dell'ozono

L'ozono è un gas instabile a temperatura e pressione ambiente, ha un odore pungente caratteristico, e un colore blu, difficile da notare alle basse concentrazioni. L'ozono fonde a $-192,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, bolle a $111,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e condensa a $-112\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino a formare un liquido blu scuro altamente esplosivo, condizione per cui non può essere conservato ad elevate concentrazioni. In forma gassosa e a basse concentrazioni non comporta rischi di manipolazione e deve essere, preferibilmente, prodotto sul luogo dell'impiego. Per eliminare ogni possibilità di rischio l'ozono è comunemente adoperato alla concentrazione del 10%.

In natura, come sopra detto, l'ozono è prodotto spontaneamente nella stratosfera grazie alle radiazioni ultraviolette, nell'atmosfera in seguito

alle scariche elettriche generate dai fulmini e in basse concentrazioni al suolo in seguito alla decomposizione fotochimica di inquinanti atmosferici; la produzione artificiale di ozono è condotta sottoponendo atmosfere secche contenenti l'ossigeno gassoso, molecolare, a scariche elettriche o ad effluvio.

L'ozono è relativamente stabile alle normali temperature e la sua emivita è di circa 12 ore, ma in soluzione acquosa questa dipende dalla purezza o da altri costituenti dell'acqua. Per esempio l'emivita dell'ozono nell'acqua distillata è circa 22 minuti, nell'acqua di rubinetto circa 20 minuti.

V.2.1.Solubilità

E' un gas parzialmente solubile in acqua e la solubilità aumenta quando la temperatura dell'acqua diminuisce. Ha la singolare proprietà dell'autodecomposizione per cui produce numerosi radicali liberi, tra cui quello maggiormente rappresentato è il radicale idrossido (OH⁻). Benché l'ozono nell'acqua, sia più solubile dell'ossigeno (13 volte di più) la sua applicazione in sistemi acquosi richiede tecniche che vincano l'interfaccia gas/liquido. Per questa ragione molti dei metodi che prevedono il contatto dell'ozono con l'acqua implicano il

passaggio di gas (contenente ozono) nel liquido. Questa forma delle bolle le cui dimensioni aumenteranno in presenza di un diffusore.

V.2.2.Reattività

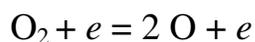
L'ozono reagisce con l'olefina (olefins) per produrre ozonoidi primari, che si decompongono in ossido di carbonio e composti carboniosi. Nei solventi organici questi due composti si ricombinano per dare Criegee ozono. Se è presente acqua, i composti carboniosi possono reagire per dare idrossiidroperossido che si scompone in perossido di idrogeno e in composti aldeidici. L'ozono reagisce facilmente con le ammine, i solfati e gli eteri (reazioni elettrolitiche) e formano per ossidazione prodotti della catena laterale alchilica.

Questa reazione contribuisce all'ossidazione della maggior parte dei contaminanti nelle applicazioni dell'ozono.

V.2.3.Sintesi

L'ozono sottoforma di gas può essere generato con diversi metodi. I metodi più comuni sono l'effetto corona, fotochimico, elettrolitico e radiochimico .

L'effetto corona usato su gas secco contenente ossigeno è oggi il metodo più usato per produrre ozono: esso prevede il passaggio di aria attraverso un campo elettrico ad alto voltaggio. La formazione di ozono attraverso scariche elettriche in un gas è basata sulla mancanza di omogeneità della scarica a corona nell'aria o nell'ossigeno. Esistono numerose microscariche distribuite nello spazio attraverso le quali l'ozono è generato. L'aria passando attraverso una scarica elettrica, o corona, produce ozono. Per creare la corona è necessaria una elettricità di minimo 5000 volts. Il range tipico entro cui si svolgono le operazioni oscilla da un voltaggio di 5000 volts con una frequenza di 1000 Hz fino ad un voltaggio di 16000 volts con una frequenza di 50 Hz (frequenza principale). Aria o ossigeno concentrato opportunamente deumidificati, ad una temperatura minima di -60°C vengono fatti passare attraverso la corona. Elettroni liberi (e) in essa contenuti causano la rottura del legame presente nella molecola di ossigeno (O_2), ciò permette la liberazione di atomi di ossigeno singoletto, i quali a loro volta collidono con altre molecole di ossigeno creando ozono.



L'ozono prodotto dal generatore di scarica Corona normalmente contiene dall'1% al 3% di ozono quando viene usata aria deumidificata, e dal 3% al 6% usando ossigeno puro come gas principale.

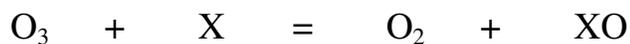


V.3.Effetti antimicrobici

L'ozono è una molecola altamente instabile composta da tre atomi di ossigeno. Il terzo atomo non è legato stabilmente e può staccarsi senza difficoltà dalla molecola, reagendo facilmente con altre molecole. Questo genera un sistema ossidante altamente reattivo che si ripercuote sulla integrità strutturale dei reagenti. Il potere ossidante dell'ozono è inferiore solo a quello del fluoro. E' in grado di reagire direttamente sulla superficie dei metalli nobili e non, quali argento, piombo, rame, e

dei metalloidi quali lo zolfo. Nei confronti delle sostanze organiche agisce rapidamente dando luogo a numerose reazioni chimiche. Particolare è la reattività rispetto al doppio legame C=C delle sostanze organiche insature, reazione che è comunemente definita ozonolisi.

Ciò accade anche quando l'ozono viene a contatto con i microrganismi cosicché questi vengono lisati o inattivati attraverso l'ossidazione della molecola di DNA.



La membrana cellulare è il bersaglio principale dell'azione antimicrobica.

Nei microrganismi l'azione dell'ozono si manifesta anche tramite l'attivazione della produzione di disinfettanti endogeni, quali acqua ossigenata, perossidi e ossigeno singoletto, attivazione della fagocitosi, attivazione delle citochine.

Il tempo di contatto e il dosaggio per la disinfezione con ozono sono molto più bassi ed efficaci se comparati a molti altri disinfettanti.

L'emivita dell'ozono nell'aria è di circa 12 ore. La sua naturale degradazione è dovuta al legame molto debole del terzo atomo di ossigeno. Infatti, in condizioni normali un doppio legame unisce i due atomi di ossigeno elementare e un legame semplice tiene unito il terzo

atomo; al momento della reazione il legame debole si rompe e la molecola di ozono è degradata in un atomo di ossigeno elementare ed uno di ossigeno.

La stabilità dell'ozono nell'acqua dipende dalla temperatura di quest'ultima, dalla concentrazione iniziale di ozono e dal tempo di contatto. Gli effetti germicidi sono influenzati dal tempo di contatto, dalla temperatura, dal pH, e dalla presenza di materiale organico e inorganico nella soluzione. Una durata maggiore del tempo di contatto, un pH e una temperatura più bassi migliorano l'effetto battericida.

L'efficacia dell'attività antimicrobica dell'acqua ozonizzata, su sospensioni di batteri e materiali contaminati è strettamente dipendente dalla concentrazione e dal tempo di esposizione. L'acqua ozonizzata posta in un contenitore aperto mantiene l'attività antimicrobica per i primi 20 minuti, ma dopo 30 minuti questa attività è considerevolmente diminuita.

V.3.1. Spettro antimicrobico

L'ozono è un potente antimicrobico ad ampio spettro in grado di agire su batteri , virus e funghi. Grazie alle sue proprietà ha trovato applicazione in una vasta gamma di processi di sanitizzazione.

Korol mise a confronto l'efficacia dell'ozono e del cloro nel trattamento delle acque nonché il loro spettro antimicrobico su una varietà di batteri patogeni.

E' stato osservato che l'ozono già in dose di 0.35 mg/L determina una riduzione di almeno 5 log in una popolazione di 10^6 cellule/ml di *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Con una dose di 0.50 mg/L di cloro, la riduzione risulta minore per i microrganismi testati (eccetto *Vibrio cholerae*). Per avere un effetto assimilabile al trattamento con ozono è necessario utilizzare concentrazioni di 2 mg /L di cloro. Per le spore di *Bacillus subtilis* la riduzione osservata con una concentrazione di 0.35 mg/L è stata al massimo di 3 log, mentre non si sono ottenuti effetti notevoli con il cloro nelle condizioni testate. Questi risultati hanno indicato che entrambi i disinfettanti sono

consumati durante il trattamento probabilmente a causa della richiesta dell'acqua e della massa batterica aggiunta. E' dimostrata inoltre l'efficacia dell'ozono nell'inattivare spore di *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.*

Gli effetti antimicrobici dell'acqua ozonizzata sono stati valutati nei confronti di quattro specie di batteri gram positivi e quattro gram negativi. L'acqua ozonizzata determina un abbassamento di oltre 5 unità logaritmiche di cellule di *Salmonella typhimurium* e di *Escherichia coli* con o senza l'aggiunta di 20 ppm di amido solubile. In tale acqua la durata della sopravvivenza tra i vari batteri gram negativi (*S. typhimurium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Yersinia enterocolitica*) è simile. Tra i batteri gram positivi *Listeria monocytogenes* è risultata più sensibile dello *Staphylococcus aureus* o dell' *Enterococcus faecalis*.

L'acqua ozonizzata causa un abbattimento di oltre 4.5 unità logaritmiche di cellule di *Candida albicans* e di *Zygosaccharomyces bailii*, ma meno di 1 unità logaritmica di spore di *Aspergillus Niger* dopo un'esposizione di 5 minuti. L'efficacia dell'ozono è stata valutata anche nei confronti di *Staphylococcus Aureus* meticillina-resistente (MRSA) batterio che è diventato un importante problema durante la

chemioterapia nel decennio passato, a causa della sua resistenza ai comuni disinfettanti. L'ozono ossida in maniera efficace le pareti cellulari e le membrane citoplasmatiche dei batteri. L'effetto microbicide dell'ozono avviene nei primi cinque secondi del trattamento.

L'attività battericide dell'ozono gassoso è stata inoltre esaminata anche nei prodotti ittici in particolare su cinque specie di batteri (*Pseudomonas putrida*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter sp.*, e *Lactobacillus plantarum*) presenti nei pesci. Diverse specie ittiche test sono state inoculate ed esposte ad ozonizzazione di diversa durata in camere contenenti gas. Concentrazioni relativamente basse (<0.27 mg/L) di ozono hanno dimostrato una potente attività battericide verso cellule in fase vegetativa di tutte le cinque specie di batteri. L'età delle colture cellulari può influenzare la risposta cellulare alla esposizione al gas. La sopravvivenza non è direttamente correlata al tempo di esposizione all'ozono, ma si ottiene una curva bifasica, se il periodo di esposizione aumenta. Effetti battericide simili sono stati osservati sulla superficie di pesce trattato con ozono, con una diminuzione di 1 log di CFU/cm².

Sono stati infine comparati i valori di riduzione ed eliminazione di batteri patogeni quali l'*E. coli* enterotossigeno O157:H7 dopo irradiazione con raggi gamma e trattamento con ozono. Cellule in fase logaritmica sono risultate più sensibili ai raggi gamma delle cellule in fase stazionaria. L'*E. coli* O157:H7 è risultato più resistente alle radiazioni a -18°C che a 20°C. I valori D, per questo microrganismo, esposto all'azione dell'ozono, in agar soia sono superiori a quelli ottenuti nelle stesse condizioni in una soluzione tampone a base di fosfato.

In definitiva si è appurato che sono necessari una dose di radiazioni gamma di 1.5 kGy o un trattamento da 3 a 18 ppm di ozono, per una durata di 20 - 50 minuti, per assicurare l'eliminazione dell'*E.Coli* O157:H7.

V.3.2. Attività antivirale

L'ozonizzazione è stata usata con successo per l'inattivazione di virus patogeni degli animali da laboratorio. L'ozono (>100 ppm), in presenza di acqua, in condizioni, quindi, di elevata umidità risulta

fortemente letale contro quattro virus ad RNA tra cui HVJ, virus dell'encefalomielite murina di Theiler (TMEV), Reovirus tipo 3 (RV), ed epatite virale murina (MHV). Test per valutare l'effetto antivirale dell'ozono sono stati svolti utilizzando 1 ml di sospensione di virus in acqua deionizzata o in soluzione salina.

Un titolo di 10^6 unità formanti placca di TMEV in una soluzione altamente stabile nei riguardi dei trattamenti fisici, si azzerava in 1 ora se sottoposto a 300 ppm di ozono con una umidità dell'80% e temperatura di 22-25°C. HVJ e MHV sono risultati più suscettibili del TMEV al trattamento con ozono. RV si è dimostrato il più resistente dei quattro virus testati.

Katzenelson et al. riferiscono di un processo di ozonizzazione in due fasi per l'inattivazione dei virus, la cui maggiore resistenza ai disinfettanti rispetto ai batteri è nota. La prima fase dura meno di 10 secondi con una inattivazione del 99% e la seconda fase dura alcuni minuti per completare l'eliminazione dei microrganismi. L'ozono è stato applicato a diverse concentrazioni comprese tra 0.07 e 2.5 mg ma l'efficacia è risultata indipendente dalla concentrazione.

L'elevata resistenza dei virus è causata dalla formazione di aggregati. La possibilità di sottoporre gli aggregati di poliovirus ad ultrasuoni di

100W per 2 minuti a 20 mhz causa la rottura degli aggregati e li rende altamente suscettibili all'ozono.

V.4.Effetti ossidanti sugli alimenti

Le varie forme di ossigeno attivato come l'ozono e altri, incluso l'ossigeno singoletto, i radicali idrossido, gli anioni superossido e il perossido di idrogeno, non solo esercitano una potente attività antibatterica contro un ampio spettro di microrganismi ma causano anche numerosi fenomeni ossidativi negli alimenti.

Nei materiali biologici avvengono reazioni enzimatiche e chimiche conosciute che possono generare ossigeno singoletto, radicali idrossido, anioni superossido e perossido di idrogeno che insieme a costituenti alimentari, potrebbero in definitiva produrre perossido che si decompone iniziando una reazione a catena. Anioni superossido e perossido di idrogeno sono relativamente inerti nei confronti delle molecole organiche ma possono scomporsi per produrre i più reattivi ossigeno singoletto e radicali idrossido.

La perossidazione lipidica, ad esempio, può realizzarsi mediante una serie di meccanismi. Le due fasi iniziali includono la scissione dei

perossidi catalizzata da ioni metallici e proteine e la reazione delle forme dell'ossigeno attivo con il substrato lipidico per produrre perossidi e radicali liberi. Rame e citocromi nelle membrane dei globuli di grasso possono fungere da punto di partenza della perossidazione lipidica poiché catalizzano la scissione dei perossidi.

Sono stati condotti studi sullo stress prodotto dall'ozono sul metabolismo delle poliamine e sulla perossidazione delle membrane lipidiche nelle piantine di lenticchie attraverso l'attività delle aminossidasi e delle lipossigenasi. L'ozono controlla l'espressione di questi enzimi a livello trascrizionale, effettua una down-regulation sul gene delle aminossidasi e una up-regulation sul gene delle lipossigenasi. La diminuzione dell'attività delle aminossidasi è stata correlata con l'incremento della concentrazione della putrescina nelle piantine trattate con ozono, mentre l'aumento dell'attività lipossigenasica è stata correlata all'aumento della perossidazione delle membrane lipidiche.

V.5.Applicazioni

Negli ultimi anni, le tecnologie riguardanti l'ozono sono state usate anche nelle industrie agro-alimentari. L'applicazione industriale dell'ozono è stata scelta per la sua capacità di ossidare e sterilizzare, senza lasciare residui. Appare molto promettente l'uso dell'ozono nelle acque di scarico e di lavorazione degli alimenti. Tra gli effetti dell'ozono in questi settori si annovera la preservazione dei prodotti agricoli durante l'immagazzinamento e il trasporto, il controllo degli odori, il ritardo dei processi metabolici associati alla maturazione e la sanificazione delle acque utilizzate per il lavaggio di attrezzature, alimenti e materiali di imballaggio.

V.5.1.Trattamento delle acque

Dai primi anni del 1900, quando venne usato come disinfettante per la potabilizzazione dell'acqua a tutt'oggi l'ozono è utilizzato in molti paesi d'Europa per la disinfezione delle riserve d'acqua.

L'ozono agisce con efficacia anche a basse concentrazioni, in condizioni controllate e pochi sono gli effetti collaterali conosciuti,

come gusto, odore e sottoprodotti tossici. Le applicazioni dell'ozono nel trattamento dell'acqua possono essere classificate in tre tipi:

V.5.2 Disinfezione.

L'ozonizzazione generalmente è compiuta alla fine del processo di trattamento delle acque, prima dell'additivazione chimica. Tale acqua trattata è pulita e libera da alte concentrazioni di materiali organici ossidabili, oltre che da cellule batteriche morte o da virus inattivati

V.5.3. Ossidazione

Impurità come ferro, manganese, contaminanti organici, fenoli, solfuro di cianuro e nitriti reagiscono istantaneamente con l'ozono. Risulta quindi difficile stabilire tempi di contatto e concentrazioni standard a causa della grande varietà di contaminanti e dei differenti livelli di contaminazione.

I prodotti delle reazioni di ossidazione si combinano con cationi polivalenti, si formano legami ad idrogeno e si vengono a formare

composti ad alto peso molecolare che essendo insolubili possono andare incontro a sedimentazione ed essere rimossi dall'acqua.

V.5.4.Bio-processing

Lo scopo del trattamento delle acque in questo caso è di aumentare l'ossigeno disciolto e di ossidare contaminanti organici complessi per ottenerne una più agevole degradazione. La concentrazione ottimale di ozono per questo trattamento è di 1 mg/L per ogni mg/L di contaminanti organici.

L'ozono è stato inoltre impiegato con successo negli impianti di trattamento delle acque di scolo per diversi decenni e in molti paesi.

Al fine di valutare il possibile utilizzo di acqua di mare per impianti di acquacoltura è stata inoltre determinata la sopravvivenza dei batteri patogeni dei prodotti ittici, compresi *Enterococcus seriolicida*, *Vibrio anguillarum*, e *Pasteurella piscicida*, in acqua di mare ozonizzata.

Il numero dei batteri patogeni si è maggiormente ridotto.

V.6.Trattamento degli alimenti

La possibile formazione di composti cancerogeni nelle acque ha sollevato non pochi dubbi circa l'uso di determinati composti del cloro nella lavorazione degli alimenti. L'industria alimentare è alla ricerca di composti alternativi. Numerose indagini riguardanti la disinfezione degli alimenti con ozono (in forma gassosa o disciolto nell'acqua per la sanitizzazione di frutta, verdura ed altri prodotti agricoli) rafforzano la convinzione che esso è un buon disinfettante.

Le applicazioni dell'ozono nell'industria alimentare sono estremamente varie. Sono stati ipotizzati diversi impieghi dell'ozono nell'industria alimentare, tutti basati sulla sua attività ossidante e disinfettante. Sono diverse le applicazioni dell'ozono oggetto di studio da parte di veterinari, per esempio, trattamento di depurazione dei molluschi, riduzione delle aflatossine in arachidi e semi di cotone, sterilizzazione di bacon, banane, burro, uova, funghi, formaggio, frutta, e carne di manzo, disinfezione di carcasse di volatili e acqua fredda. Sheldon and Brown hanno studiato l'efficacia dell'ozono quale disinfettante per il trattamento di carcasse di volatili. La carica microbica delle carcasse trattate con ozono e conservate a 4°C è

risultata marcatamente inferiore rispetto a quella riscontrata in carcasse refrigerate in assenza di ozono.

Uno studio degli effetti dell'uso dell'ozono sulla qualità delle carcasse di broiler e dell'acqua usata nella macellazione, ha rivelato un abbassamento delle cariche microbiche più basse e una distruzione di tutti i microrganismi (>99%) ottenuti con il lavaggio delle carcasse in acqua fredda. Secondo gli autori l'ozonizzazione non ha effetti negativi (indesiderati) sul colore della carcassa o sulla perossidazione lipidica e non determina la perdita del sapore delle carni.

Whistler and Sheldon hanno valutato ozono e formaldeide come disinfettanti utilizzati contro microrganismi naturalmente presenti su uova embrionate di pollo fresche. La carica microbica è stata ridotta di 2.5 log₁₀ nelle uova trattate con ozono o con formaldeide rispetto ad uova controllo o trattate con acqua vaporizzata. Tuttavia la schiudibilità è risultata significativamente ridotta (dal 37.5 al 26.5%) dopo ozonizzazione (acqua al 3.03% di ozono per 2 ore) rispetto ad uova trattate con acqua vaporizzata o non trattate. Le conclusioni hanno indicato che l'ozono è un buon disinfettante anche se potrebbe avere un'azione avversa sullo sviluppo embrionale quando utilizzato in forma gassosa.

Bailey e coll. hanno condotto diverse prove al fine di valutare l'efficacia di sistemi di disinfezione per camere di incubazione utilizzando raggi ultravioletti (UV), ozono e perossido d'idrogeno considerando: la carica microbica, la diffusione della Salmonella e la schiudibilità delle uova da cova. I trattamenti con raggi UV (254 nm, 146 μ) e ozono (0.2 o 0.4 ppm) sono stati applicati durante le ultime tre settimane di incubazione, il perossido di idrogeno ogni 10 minuti per 1 o 2 minuti in dose di 100 o 500 ml/h. La schiudibilità non è risultata significativamente ridotta dai trattamenti in confronto con il controllo (94 contro 95.6%). Tutti i trattamenti di disinfezione hanno eliminato dal 75 al 99% dei batteri, Enterobatteriacee e Salmonella, presenti nei campioni di aria prelevata nelle camere di incubazione. Queste prove hanno dimostrato che la contaminazione batterica può essere effettivamente ridotta nelle camere di incubazione tramite la sanitizzazione dell'aria utilizzando raggi ultravioletta (UV), ozono e perossido d'idrogeno senza compromettere la schiudibilità.

Menna e collaboratori applicando l'ozono come disinfettante del guscio delle uova da cova hanno dimostrato che l'ozonizzazione non ha provocato mutamenti genetici, l'indice di schiusa non risultava modificato.

Chen e i suoi collaboratori hanno esaminato la solubilità e la stabilità dell'ozono in estratto di polpa di gamberetti, gli effetti battericidi sui microrganismi presenti nella polpa di gamberetti, la sua mutagenicità e gli effetti sul DNA. Per 25 minuti dopo l'ozonizzazione, l'ozono ha mostrato lo stesso ritmo di decomposizione (2.7%/min) in estratto di polpa di gamberetti a due diverse temperature (5 e 25°C). Tra nove diversi generi di batteri testati, *Salmonella typhimurium* è risultata la più resistente all'ozono nella polpa di gamberetti. Non è stata rilevata la presenza di agenti mutageni dopo ozonizzazione in soluzione salina. L'ozono (concentrazione 0,5%) è stato confrontato con altri agenti disinfettanti (perossido d'idrogeno al 5%; fosfato trisodico al 12%; acido acetico al 2%; un disinfettante commerciale allo 0,3%), e con acqua a vari intervalli di temperatura (dai 16 ai 74°C) per valutare la loro capacità di ridurre la contaminazione batterica su campioni di carne di manzo. In tali condizioni sperimentali, il perossido d'idrogeno e l'acqua ozonizzata sono risultati più efficaci rispetto agli altri disinfettanti.

V.7.Conservazione e immagazzinamento

E' stato dimostrato che l'ozono può allungare i tempi di conservazione di svariati alimenti in primo luogo attraverso la riduzione della carica microbica superficiale. La tecnologia maggiormente utilizzata prevede l'uso di ozono in forma gassosa. In pratica tale tipo di conservazione prevede la sterilizzazione dell'aria immessa nei locali di immagazzinamento con una quantità di ozono sufficiente alla eliminazione dei microrganismi. Billion (1975) ha condotto una dettagliata indagine sulla durata di immagazzinamento, in atmosfera contenente ozono, di carne di manzo, di vitello, agnello, maiale, pollo, e coniglio. L'atmosfera ozonizzata accresce la durata dell'immagazzinamento di tutti gli alimenti studiati di sette giorni rispetto alla normale atmosfera. Generalmente lo sviluppo della microflora superficiale (*Pseudomonas* sp., sporigeni, salmonelle, e stafilococchi) è risultata ritardata con la refrigerazione e in presenza di ozono.

Per quanto riguarda i prodotti di origine vegetale, gli effetti dell'ozono sul metabolismo sono anche una conseguenza della sua grande attività ossidante. Non si osserva alcun deterioramento della frutta quando

l'ozono agisce sulla sua superficie. Durante la conservazione, la respirazione e il processo di maturazione della frutta si intensifica. L'etilene prodotto durante la conservazione agisce sugli altri frutti e promuove la maturazione. I segni esteriori di questo processo sono rappresentati dall'imbrunimento della buccia, rammollimento della polpa, e infine dalla putrefazione del frutto. Questo processo può essere controllato dall'ozono grazie all'ossidazione dei metaboliti, in tal modo viene ridotta l'azione sugli altri frutti.

Il valore nutritivo di patate, cavolo e carote è stato studiato dopo trattamento con ozono al fine di prolungarne la conservabilità nel tempo. Il trattamento con ozono non ha alterato significativamente proteine ed amido nelle patate; zuccheri e caroteni in cavolo e carote. La valutazione organolettica non ha indicato nessuna variazione rispetto a patate e verdure non trattate. Tuttavia l'ozonizzazione ha determinato una diminuzione dell'acido ascorbico dal 16 al 25%

V.7.Effetto sugli odori

L'ozono ha un odore caratteristico e finora non è stato completamente dimostrato che la sua applicazione possa mascherare gli odori, ma

l'ossigeno atomico che si forma dalla decomposizione dell'ozono, ossida immediatamente diversi materiali che emanano odori sgradevoli.

In genere, più basse sono le temperature e più grandi le molecole, più debole risulta l'azione ossidante. L'umidità presente nell'aria non ha effetto sul processo. A concentrazioni molto basse (da 0.01 a 0.04 ppm di ozono), l'aria che si trova nei locali di immagazzinamento presenta un odore fresco e piacevole e mai soffocante. Vari studi mostrano che l'odore di alcuni frutti profumati, come le fragole, è esaltato in presenza di ozono. Anche la formazione di fragranze e odori che impartiscono un caratteristico sapore sembrano essere modificati dall'ozono.

Il trattamento dell'aria con ozono nella conservazione della frutta previene il trasferimento di odori dai materiali di confezionamento alle derrate, un fenomeno che si manifesta piuttosto frequentemente, in particolare quando vengono utilizzate cassette di legno durante la conservazione in ambiente refrigerato con una umidità relativa dall'85 al 90%.

Depositi, magazzini e celle frigorifere possono essere trattati nella maggior parte dei casi tramite la diffusione di aria ozonizzata. Oltre ad

avere un'azione disinfettante tale processo potrebbe avere la funzione di rimuovere gli odori sgradevoli dei materiali di confezionamento e conservare l'aroma del prodotto.

V.8.Sicurezza e tossicità

L'ozono è un gas tossico, e come il cloro può causare malattie e morte se inalato in grandi quantità.

L'ozono è un agente ossidante altamente reattivo con una forte tossicità per animali, piante e altri organismi viventi. Molti ossidanti fotochimici, dovuti all'inquinamento e presenti nell'aria provengono dall'ozono. La tossicità dell'ozono dipende dai suoi livelli nell'ambiente e dalle condizioni d'azione come la durata dell'esposizione. I sintomi dell'intossicazione come irritazione acuta delle prime vie aeree e della trachea compaiono istantaneamente ad una dose di 0.1 ppm. Perdita della vista può insorgere dopo una esposizione di 3-6 ore in dose di 0.1-0.5 ppm. Una dose di 1-2 ppm può causare irritazione alla parte superiore della trachea, mal di testa, dolore al torace, tosse e secchezza delle fauci. Livelli di ozono più elevati (5-10 ppm) causano aumento dei battiti cardiaci, edema

polmonare. Una concentrazione di ozono di 50 ppm o maggiore è potenzialmente fatale.

Gli effetti tossici più gravi si presentano quando il gas giunge ai polmoni e attraversa la barriera alveolare e a causa dei prodotti della reazione. L'alta reattività dell'ozono previene la sua penetrazione nel tessuto prima che esso causi reazioni tossiche. Per questa ragione, il bersaglio principale dell'ozono è lo strato di liquido che ricopre la superficie alveolare. Il fluido alveolare è un materiale non uniforme e altamente dinamico con spessore variabile (0.1-0.2 μm) formato da lipidi (ca. 90%), proteine (ca. 10%) e antiossidanti come ascorbato, glutatione e acido urico. L'ozono è altamente tossico e reattivo verso acidi grassi insaturi, alcuni residui aminoacidici delle proteine e antiossidanti. Studi sull'attività dell'ozono sui lipidi e sulle proteine hanno dimostrato che alcuni sottoprodotti della reazione danno effetti tossici sui tessuti profondi.

Diversi studi hanno dimostrato i cosiddetti Criegee ozonoidi si formano in membrane a due strati e hanno una lunga emivita (3-6 settimane) che potrebbe promuovere la perossidazione lipidica. Studi recenti mostrano che l'esposizione all'ozono aumenta la quantità di aldeidi nel liquido interstiziale dei polmoni umani e che i prodotti

dell'ozonizzazione attivano le fosfolipasi che potrebbero giocare un ruolo nello sviluppo della flogosi polmonare durante l'esposizione all'ozono.

VI. TRATTAMENTO CON GHIACCIO OZONIZZATO, ACQUA OZONIZZATA E GHIACCIO OZONIZZATO

VI.1.Scopo della ricerca

L'ampio spettro antibatterico e la facilità d'impiego dell'ozono hanno generato un rinnovato interesse per il suo uso come agente battericida. In relazione al fatto che negli USA il riconoscimento del GRAS status ha incoraggiato il suo utilizzo, considerati gli innegabili vantaggi derivanti dal suo utilizzo nell'industria alimentare e agricola e i limitati dati disponibili sull'effetto di riduzione della contaminazione batterica di differenti alimenti e sugli eventuali cambiamenti delle caratteristiche organolettiche abbiamo ritenuto interessante studiare le modificazioni dei più rilevanti parametri sensoriali e microbiologici che occorrono in *Pagellus erithrynus* (pagello), *Merluccius merluccius* (merluzzo o nasello), *Arnoglossus laterna* (zanchetta) e *Engraulis encrasicolus* (alici) pescati nel golfo di Pozzuoli. Inoltre visto che tra le tecniche sviluppate per ottenere una stima dei microrganismi il metodo distruttivo e quello del tampone hanno trovato la più ampia approvazione sia perché sono facili da utilizzare sia perché i dati sono

generalmente attendibili , tenuto conto che la maggioranza degli studi indicano che il primo metodo è più efficace perché fornisce dati più reali e meno variabili permettendo il recupero quasi completo dei batteri e in virtù della constatazione che queste affermazioni riguardano le carni e nulla vi è in letteratura in merito ai prodotti ittici ho ritenuto interessante confrontare il numero dei batteri recuperati utilizzando sia il metodo distruttivo che quello non distruttivo.

VI.2.Materiali e metodi

La prova è stata condotta su esemplari di : *Pagellus erithrynus*(pagello), *Merlucciu merluccius* (merluzzo o nasello) , *Arnoglossus laterna* (zanchetta) e *Engraulis encrasicolus* (alici) prelevati nel mercato ittico di Pozzuoli a 3-4 h dalla pesca. Gli esemplari sono stati suddivisi in tre lotti, uno dei quali (Lotto C) è stato conservato secondo le usuali modalità di stoccaggio ossia ricoperti con un sottile film plastico sul quale è depositato ghiaccio tritato. I restanti due lotti denominati A e B sono stati sottoposti a due diverse modalità di stoccaggio che prevedono, nel 1° caso l'utilizzo per lo stoccaggio di ghiaccio ozonizzato (lotto A) e nel 2° caso un preventivo lavaggio in acqua ozonizzata e stoccaggio con ghiaccio

ozonizzato. La concentrazione di ozono nell'acqua di lavaggio è stata di 3,0 mg/l e la durata del trattamento è stata di 2 minuti. . L'acqua e il ghiaccio ozonizzato sono stati prodotti con l'utilizzo di un generatore AGW della OXITECH S.r.l. Pianezze (VI) Italia.



CARATTERISTICHE TECNICHE

	AGW 300
Produzione O3	2,5 gr/hr
Potenza assorbita alimentazione	230 V, 7 A, 50/60 HZ.
Portata Acqua	25 litri/minuto
Pressione	2 bar (della linea).
Peso	Kg.100 (130 con imb.)
Dimensioni	125 x 92 x 55 h

I campioni sono quindi stati stoccati in cella frigorifera dotata di teletermografo settata a +2°C localizzata all'interno del mercato ittico di Pozzuoli (NA).

I prelievi sono stati effettuati nei seguenti giorni: 0,3,5,7,10,12,14,16 .

I campioni prelevati in buste sterili sono stati trasportati in contenitore isotermico refrigerato al laboratorio della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche dove erano immediatamente sottoposti ad un giudizio sensoriale ed analisi microbiologiche.



VI.3. Analisi dei campioni

VI.3.1. Analisi sensoriale

Per i test sensoriali sono stati costantemente valutati la pelle (pigmentazione e muco), gli occhi (colore e curvatura), le branchie (colore, odore e lamina) e la consistenza dei muscoli e della parete addominale.

Tutti i test sensoriali sono stati effettuati da un panel di 5 persone, che hanno seguito costantemente l'esperimento e che, mediante l'utilizzo di una tabella di valutazione (tab.1), hanno giudicato i campioni attribuendo ad ogni carattere valutato un punteggio corrispondente (o indice di qualità sensoriale) compreso tra 1 e 5.

L'indice finale è uguale alla media aritmetica delle note attribuite ai differenti caratteri osservati sul pesce.

Paragonando la nostra tabella, in cui i parametri organolettici sono valutati in indici numerici, con la classificazione dei prodotti ittici in categorie di freschezza suggerita dalla CE (REG. 2406/96), risulta così che il valore 1 corrisponde alla categoria E (extra, eccellente, ottimo), il valore 2 alla categoria A (buono), il valore 3 è un intermedio tra

categoria A e B (giudizio sufficiente), il valore 4 alla categoria B (mediocre) infine, il valore 5 alla categoria C (inaccettabile).

TABELLA 1: Scala utilizzata nella valutazione della qualità sensoriale

Esame esterno		Indici di alterazione e descrizione dei caratteri				
Organi osservati	Caratteri osservati	1	2	3	4	5
Pelle	Pigmentazione	Viva, intensa, brillante	Blanda perdita di intensità	Riflessi attenuati	Perdita di lucentezza, medio sbiadimento	Forte sbiadimento
	Muco	trasparente	Leggermente traslucido	Traslucido, latteo	Opaco, grigiastro	Fortemente opaco, giallastro
Occhi	Colore	Pupilla nera, brillante e trasparente	Perdita di trasparenza	Tendente al bianco	Bianco matto	Bianco
	Curvatura	Convessa (bombata)	Assente	Leggermente concava	Mediamente concava	Molto concava
Branchie	Colore	Rosso brillante	Rosa	Decolorazione media	Decolorazione marcata	Grigiastro
	Odore	Assenza di odori particolari	Odore di alghe	Leggermente agre	Agre, di decomposizione	Putrido
	Lamina	Perfettamente separabile	Aderente in piccole parti	Aderente in parti più ampie	Aderente per la maggior parte	Totalmente aderente
Muscolo	Consistenza	Soda ed elastica, scomparsa immediata e completa dei segni pressori	Elasticità leggermente ridotta	Molle, permanenza dell'impronta pressoria	Flaccida	Flaccida
Parete addominale	Consistenza	Intatta	Allentata	Molle	Fragile	Fragile

VI.3.2. Analisi microbiologiche

Metodo di campionamento

Per ciascun lotto il campionamento è stato condotto, agli intervalli precedentemente riportati, su 3 esemplari ad eccezione delle alici dove sono stati campionati 9 esemplari. In tutte le sperimentazioni per la determinazione della contaminazione superficiale è stato utilizzato un metodo non distruttivo che prevede l'utilizzo di tamponi sterili inumiditi, prima dell'uso, in una soluzione acquosa sterile contenente lo 0,1% di peptone e lo 0,85% di NaCl.

Il tampone, inumidito per almeno 5 secondi nel diluente, è stato strofinato, esercitando la maggiore pressione possibile, dapprima in senso verticale, poi orizzontale e quindi in diagonale, per non meno di 20 secondi, sull'intera superficie delineata da uno stampo sterile. Successivamente all'operazione con tampone inumidito, la procedura è stata ripetuta con tampone asciutto al fine di recuperare la maggior parte dei microrganismi.

E' stato altresì utilizzato un metodo distruttivo mediante l'utilizzo di un bisturi sterile che ha permesso di prelevare una fetta di cute e tessuto sottostante di 2 millimetri di spessore. Entrambe le metodiche sono state eseguite su entrambi i lati di ogni esemplare.

Gli stampi utilizzati delimitavano un'area di 6,5 cm² per il Pagello e la zanchetta e di 4 cm² per il merluzzo. La superficie campionata risultava quindi

pari a 37,5 cm² per il pagello e la zanchetta e di 24 cm² per il merluzzo e per le alici. I tamponi e la cute posti in acqua peptonata tamponata sono stati, dopo opportuna agitazione, utilizzati per l'allestimento delle diluizioni decimali

I microrganismi ricercati sono stati:

- ✓ **Flora aerobia totale a 32°C, 20°C e 5°C** (Plate count agar a 32°C per 2 giorni, 20°C per 5 giorni e 5°C per 10 giorni)
- ✓ **Pseudomonas** (Pseudomonas agar base + Pseudomonas C-F-C supplement 24h a 20°C)
- ✓ **Coliformi totali, fecali ed E.coli** (Chromogenic E.coli/Coliform medium 24h a 37°C)
- ✓ **Stafilococchi potenzialmente patogeni:** (Baird Parker a 37°C per 48 h)
- ✓ **Streptococchi fecali:** (Kanamycin aesculin azide agar a 37°C per 24-48 ore)
- ✓ **Clostridi solfito-riduttori** (SPS Agar a 43°C per 24 h)
- ✓ **Bacillus cereus :** (Bacillus Cereus Selective Agar addizionato di Egg Yolk Emulsion e B.Cereus Selective Supplement a 37°C per 24 h e a 25°C per altre 24 h)
- ✓ **Vibrio spp:** Pre-arricchimento in Alkaline pepton water a 42°C per 24h e semina su TCB cholera agar per 24 h a 37°C .

- ✓ **Salmonella spp:** (acqua peptonata a 37°C per 16-18 ore, Brodo Selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth modificato a 43°C per 24-48 ore, Hektoen Enteric Agar e Rambach Agar a 37°C per 24 ore)
- ✓ **Listeria monocytogenes:** (LEBB+UVM 1 a 37°C per 24 ore, semina della brodo cultura 1 in LEBB+UVM 2 a 37°C per 24 ore, isolamento della brodo cultura 2, previa diluizione e non in KOH, su Palcam MEDIUM incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizione di microaerofilia).

VI.3.3. Analisi statistica

Al fine di valutare le differenze esistenti tra i diversi sistemi di stoccaggio è stata utilizzata l'analisi della varianza (ANOVA). È stato considerato un intervallo di confidenza del 95% ($P < 0,05$). Tutti i test sono stati condotti utilizzando il software GraphPad InStat version 3.00 GraphPad Software, San Diego California USA.

VI.4.Risultati

VI.4.1.Analisi sensoriale

Indipendentemente dalle specie considerate i pesci trattati con ozono si sono conservati per un periodo maggiore. Il grado di inaccettabilità delle specie analizzate è stato raggiunto progressivamente, con segni di scadimento che sono comparsi con ordine e intensità diversi. Nelle alici risultate inaccettabili, infatti, prevalevano sugli altri l'odore ammoniacale e la facile lacerabilità della parete addominale; nei merluzzi la perdita della consistenza delle carni, nelle zanchette le alterazioni a livello cutaneo. Nei pagelli, invece nessuna caratteristica ha prevalso sulle altre.

Nome lotto	Giorni di conservazione							
	0°	3°	5°	7°	10°	12°	14°	17°
Pagello C	1	3	3	4	5	5	5	5
Pagello A	1	2	3	3	3	4	4	5
Pagello B	1	2	2	3	4	4	4	5
Zanchetta C	1	2	4	5	5	5	5	5
Zanchetta A	1	3	3	4	5	5	5	5
Zanchetta B	1	2	3	3	4	5	5	5
Merluzzo C	1	3	4	5	5	5	5	5
Merluzzo A	1	3	3	4	5	5	5	5
Merluzzo B	1	3	4	4	5	5	5	5
Alici C	1	4	5	5	5	5	-	-
Alici B	1	3	4	5	5	5	-	-
Alici A	1	2	4	5	5	5	-	-

Legenda: 1, ottimo ; 2, buono; 3, sufficiente; 4, mediocre, 5, inaccettabile

VI.4.2. Analisi microbiologiche

I risultati delle analisi microbiologiche per quanto riguarda i parametri di F.A.T. a 32°C, 20°C, 5°C e Pseudomonas sono riportati nei grafici e nelle tabelle seguenti. Dai dati della F.A.T. a 32°C, 20°C e 5°C e di Pseudomonas si evince che costantemente più contenuti sono stati i risultati riscontrati nei campioni trattati con ghiaccio ozonizzato; i campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato hanno mostrato livelli sovrapponibili e in alcuni casi più elevati rispetto ai campioni di controllo. Tale stato è riferibile alle seguenti specie: pagello e merluzzo.

Situazione diversa sempre per la F.A.T. a 32°C, 20°C e 5°C e Pseudomonas si è osservata per i campioni di zanchetta trattati con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato dove la contaminazione è risultata più contenuta nei campioni trattati con ghiaccio ozonizzato e nei campioni di controllo. Nelle alici alle prime scadenze i campioni trattati hanno mostrato livelli di F.A.T. a 32°C, 20°C e 5°C contenuti rispetto ai campioni di controllo, alle scadenze successive i valori dei campioni trattati e non sono stati sovrapponibili. La presenza di Coliformi totali è stata evidenziata raramente e a livelli contenuti sia nei campioni trattati che nei campioni di controllo. Tutti gli altri microrganismi ricercati non sono stati evidenziati.

Il metodo distruttivo e il metodo non distruttivo hanno permesso di recuperare lo stesso numero di microrganismi. Nelle carni il meccanismo di attacco dei batteri è stato ampiamente studiato e si realizza in due fasi.

La prima fase è caratterizzata dalla formazione di un film liquido sulla superficie della pelle o della carne che trattiene i batteri. L'adesione, che a questo stadio è reversibile, si associa ad un'interazione tra le cariche elettriche e l'idrofobicità della superficie del supporto o delle cellule.

Quando i batteri sono ≥ 50 nm sulla superficie, solo le forze di Van Der Waals sono coinvolte e le interazioni specifiche sono di fatto escluse, mentre nell'intervallo tra 10 e 20 nm, intervengono le interazioni elettrostatiche.

L'adesione è dovuta anche alle interazioni di appendici esterne (flagelli, frangiati, polisaccaridi extracellulari) delle cellule microbiche con recettori specifici di superficie.

La seconda fase, invece, si caratterizza per la formazione da parte dei batteri di esopolimeri (glicocalice) ed è irreversibile.

I polimeri extracellulari forniscono un ambiente favorevole per la crescita e il successivo attaccamento di più batteri favorendo così la proliferazione di biofilms sotto condizioni sicure.

L'attaccamento irreversibile delle cellule alla superficie si realizza tra i 30 minuti e poche ore. Diversi fattori come il pH, il tempo, la temperatura, l'ambiente, la specie batterica, la natura della superficie di contatto, la densità

cellulare e l'osmolarità potrebbero influenzare l'attaccamento dei batteri alla superficie della carne .

In quest'ottica riteniamo che nei prodotti ittici i fattori dinanzi elencati fanno sì che non si stabilisca l'attaccamento irreversibile nei prodotti ittici quindi ai fini della valutazione della contaminazione superficiale è possibile utilizzare il metodo non distruttivo.

VI.4.3. Analisi statistica

Pagello

Differenze significative ($P < 0.05$), sia per il metodo distruttivo che non distruttivo per la F.A.T. a 32°C , 20°C e 5°C e *Pseudomonas* sono state evidenziate tra i campioni trattati con ghiaccio ozonizzato e i campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato e tra i campioni trattati con ghiaccio ozonizzato e i campioni di controllo .

Zanchetta

Nei campioni trattati con ghiaccio ozonizzato e prelevati con metodo distruttivo i valori della F.A.T. a 32°C sono risultati significativamente più contenuti dei campioni di controllo ($P < 0.05$). I campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato prelevati con metodo distruttivo hanno evidenziato valori di F.A.T. a 20°C più contenuti rispetto ai

campioni di controllo. Sia nei campioni trattati con ghiaccio ozonizzato che nei campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato ,prelevati con metodo non distruttivo, i valori della F.A.T. a 32°C , 20°C e 5°C si sono attestati a livelli significativamente più contenuti rispetto ai campioni di controllo(P<0.05).

Merluzzo

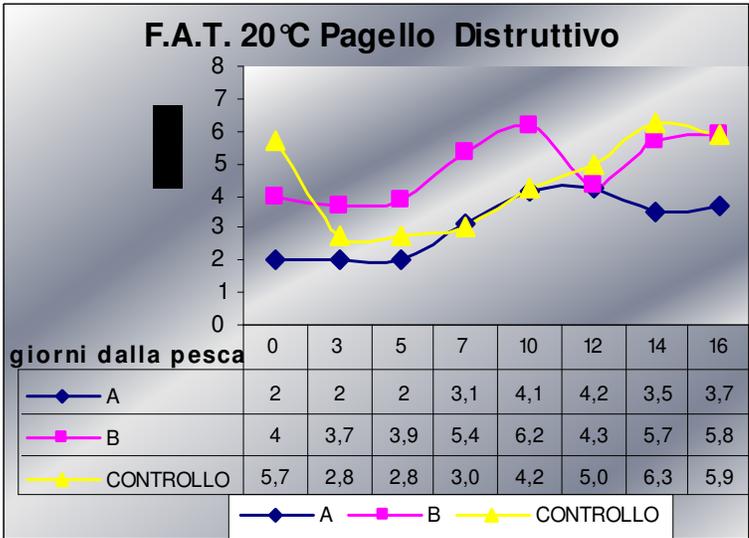
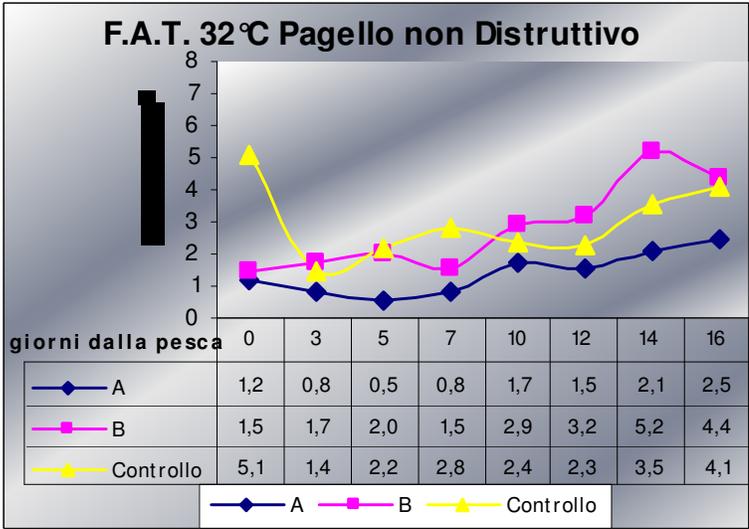
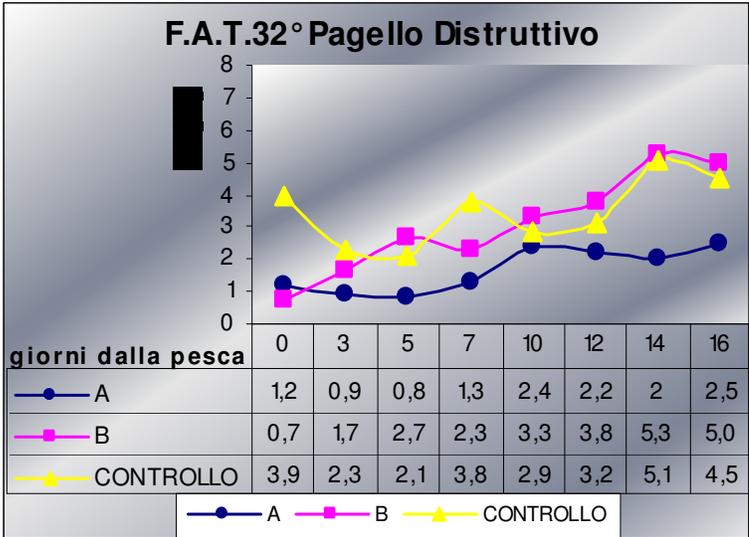
Utilizzando il metodo distruttivo i campioni trattati con ghiaccio ozonizzato hanno mostrato livelli significativamente più contenuti(P<0,05) di F.A.T. a 32°C , 20°C e 5°C sia nei confronti dei campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato sia nei confronti dei campioni di controllo . Con metodo non distruttivo i valori della F.A.T. a 32°C , 20°C e 5°C e *Pseudomonas* sono risultati significativamente più contenuti nei campioni trattati con ghiaccio ozonizzato rispetto ai campioni di controllo(P<0.05).I campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e stoccati con ghiaccio ozonizzato hanno mostrato ,per entrambe le metodiche di campionamento, andamenti sovrapponibili ai campioni di controllo.

Alici

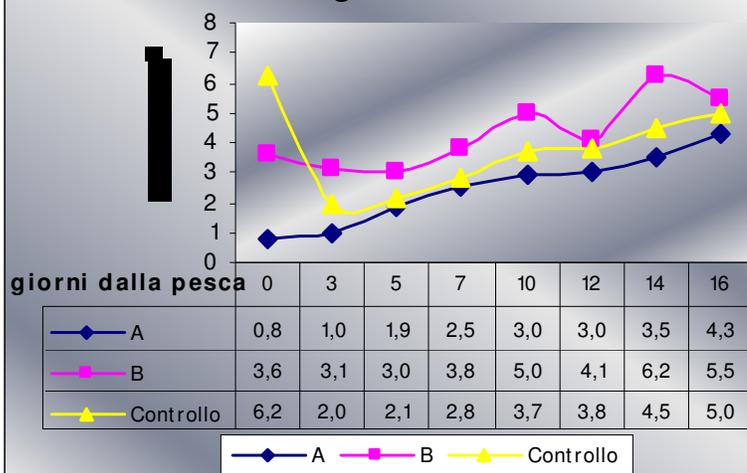
Non sono state evidenziate differenze significative tra i campioni trattati con ghiaccio ozonizzato, i campioni sottoposti a lavaggio con acqua ozonizzata e

stoccati con ghiaccio ozonizzato e i campioni di controllo indipendentemente dal metodo di campionamento evidenziato.

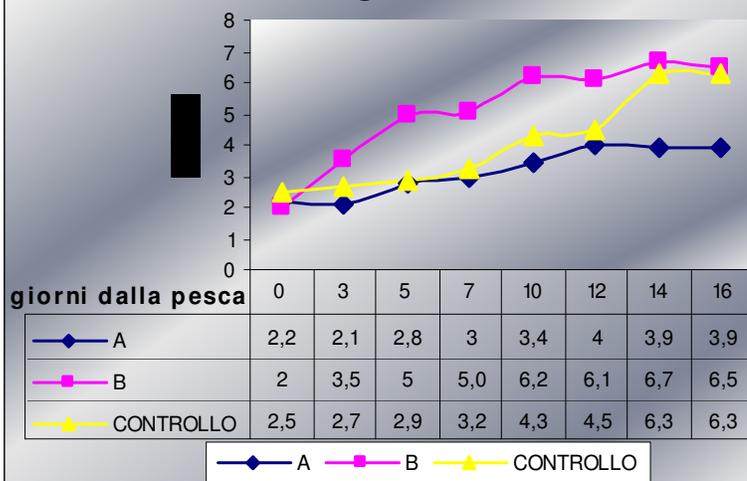
In tutte le specie non sono state evidenziate differenze significative per la quantità di batteri recuperati con il metodo distruttivo e non.



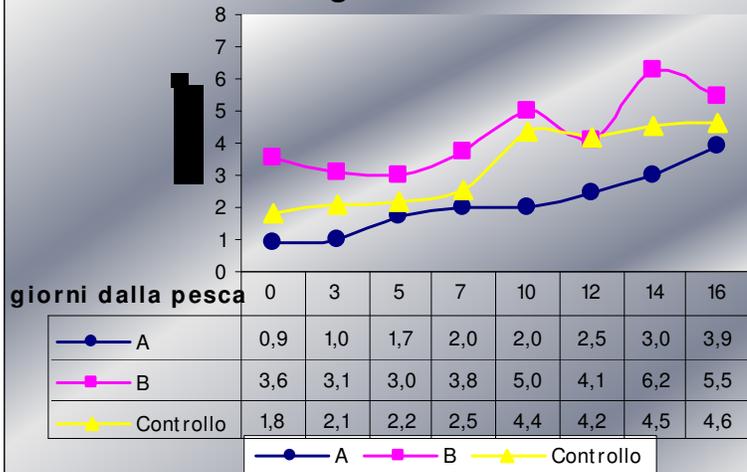
F.A.T. 20°C Pagello non Distruttivo



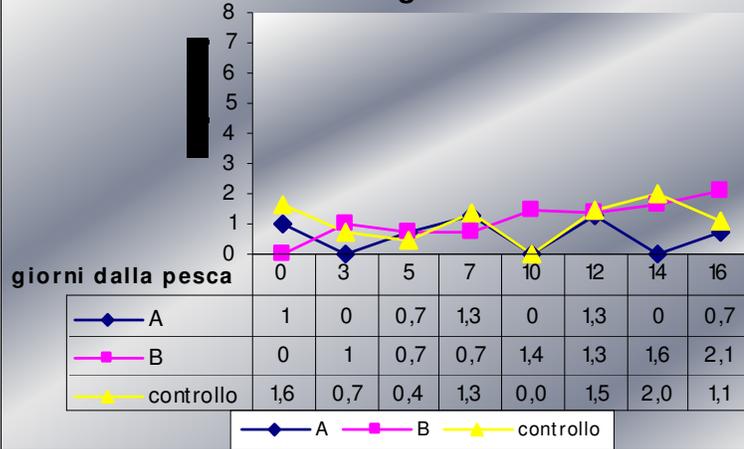
F.A.T.5°C Pagello Distruttivo



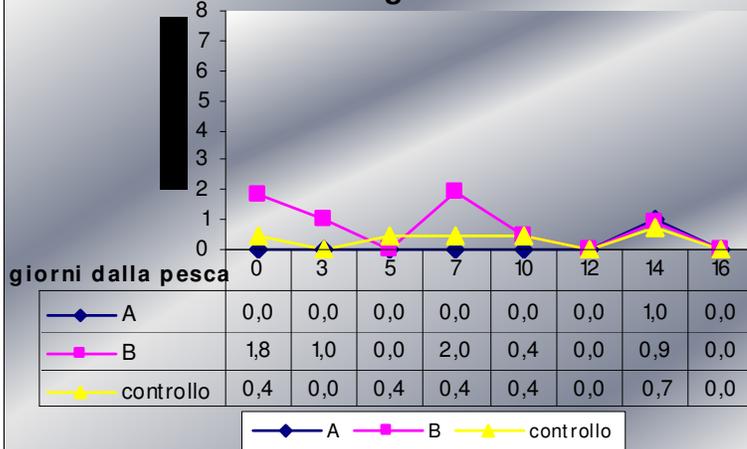
F.A.T.5°C Pagello non Distruttivo



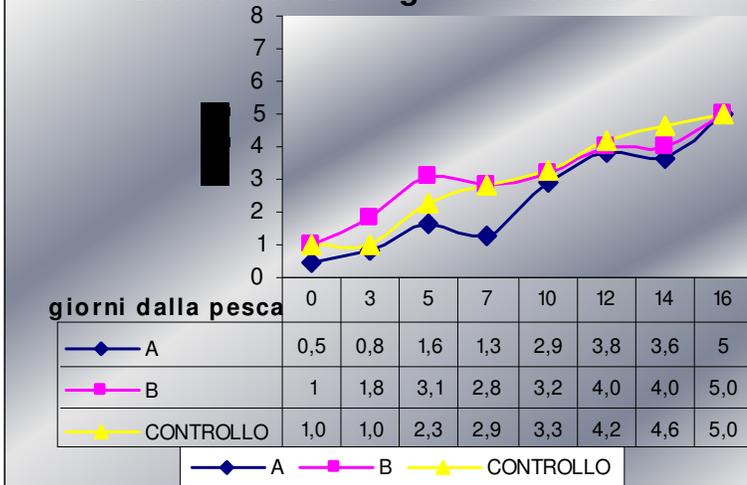
Coliformi Totali Pagello Distruttivo

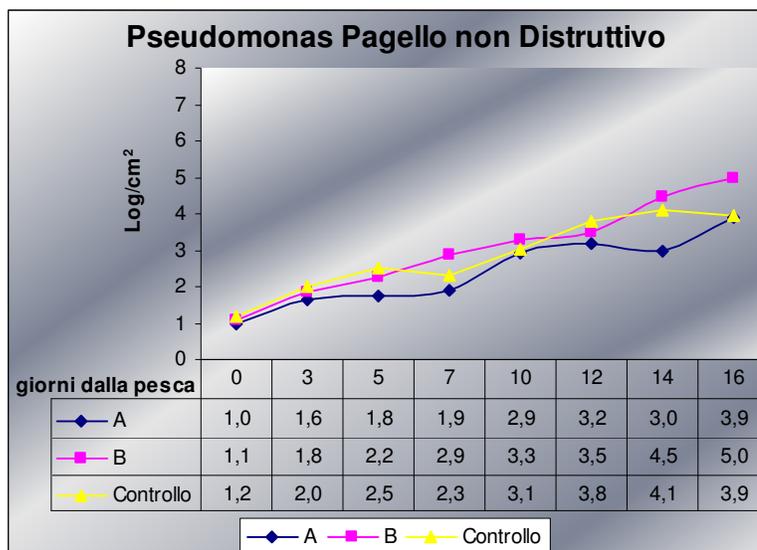


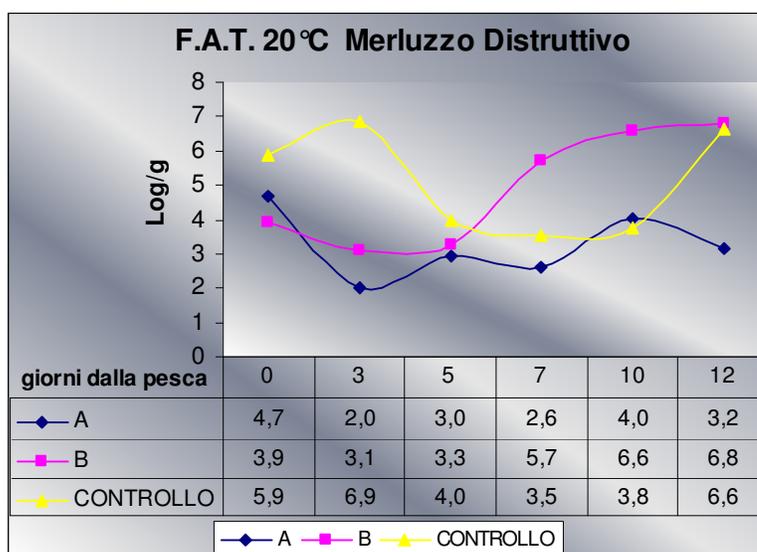
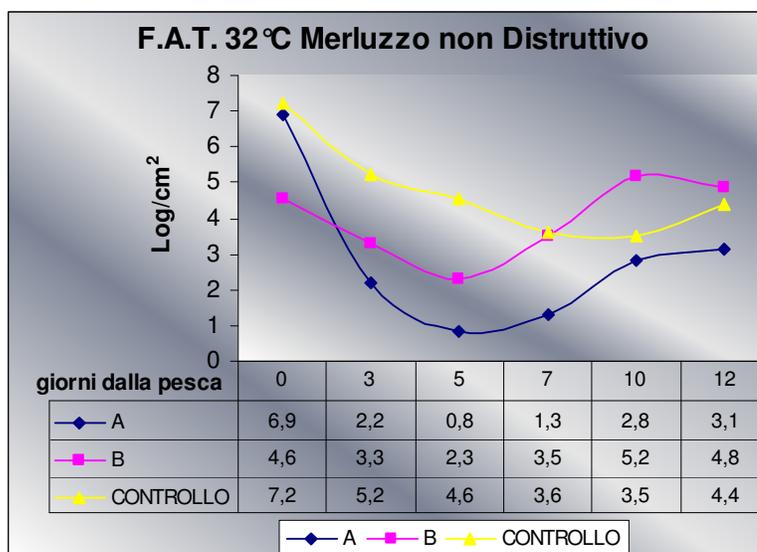
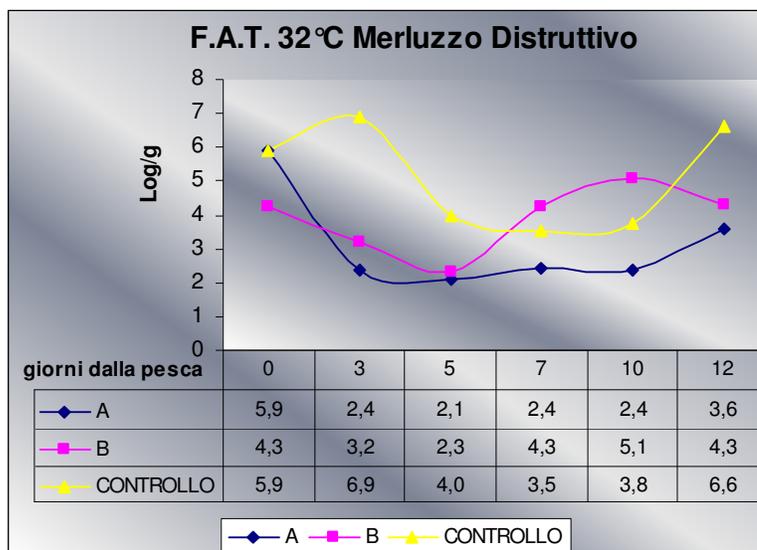
Coliformi Totali Pagello non Distruttivo

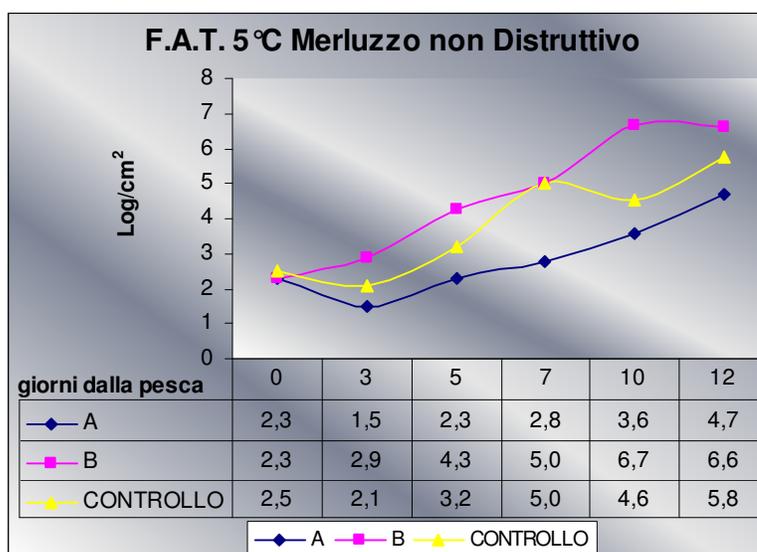
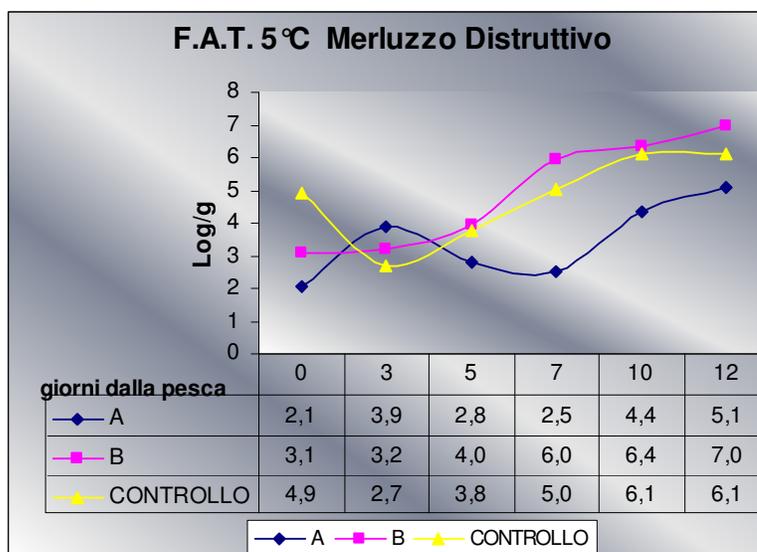
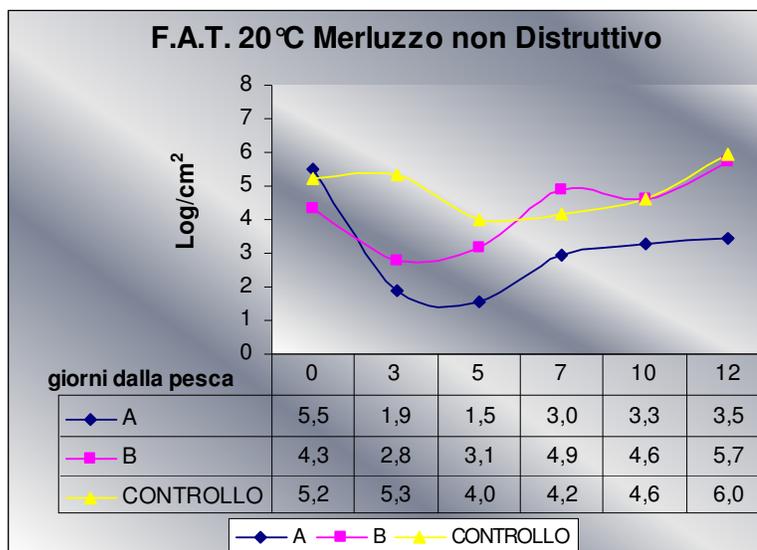


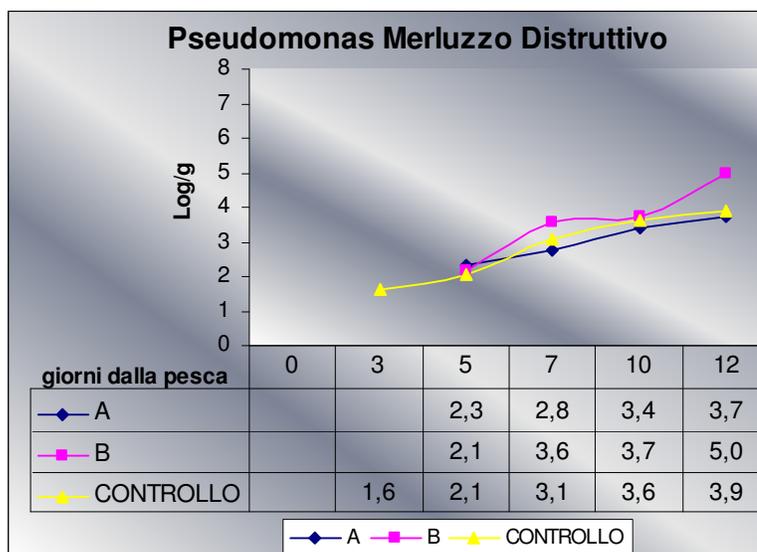
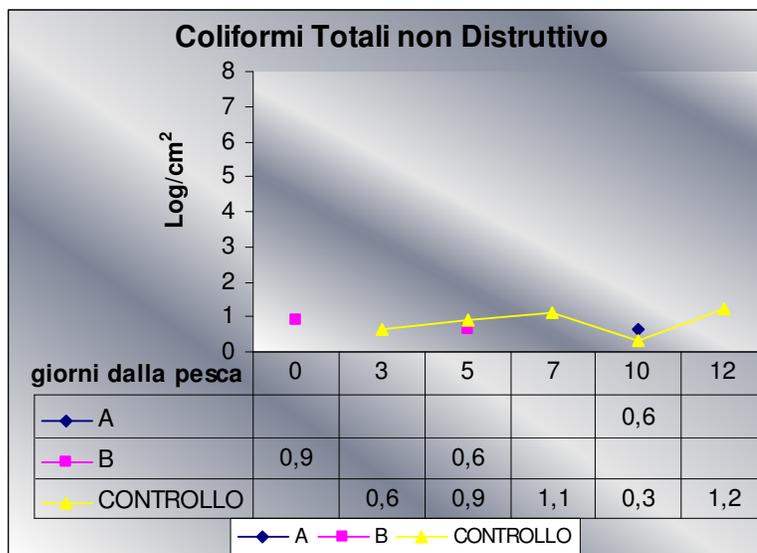
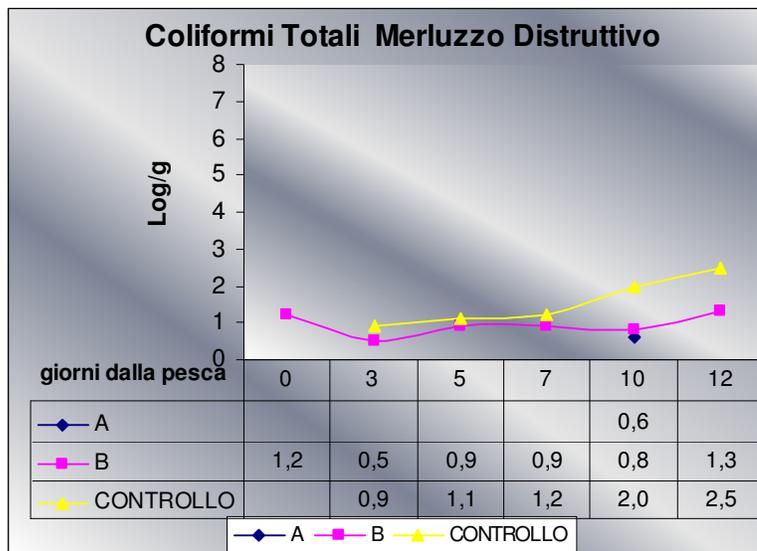
Pseudomonas Pagello Distruttivo

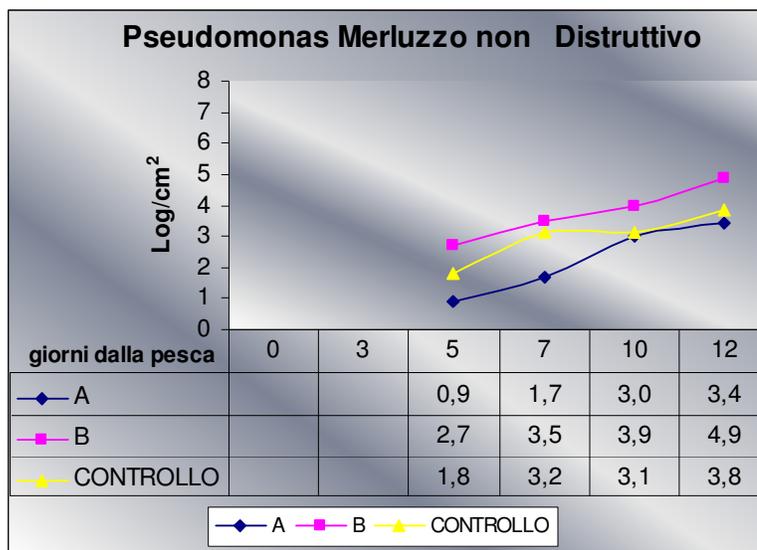


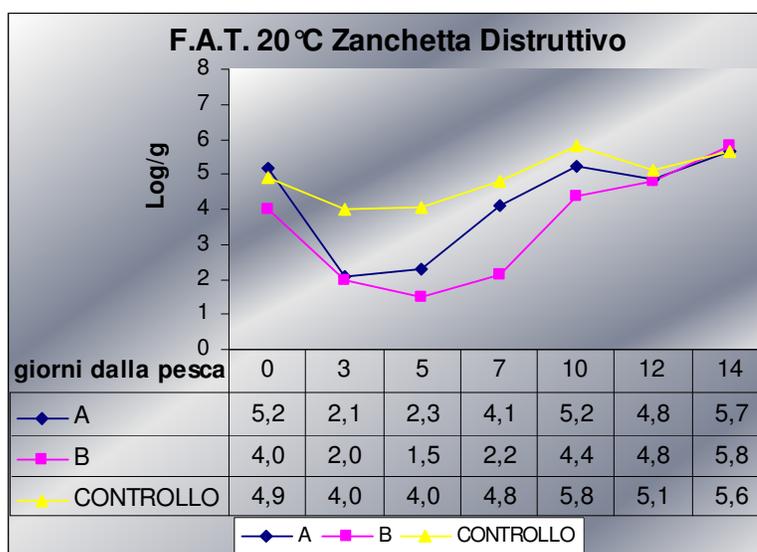
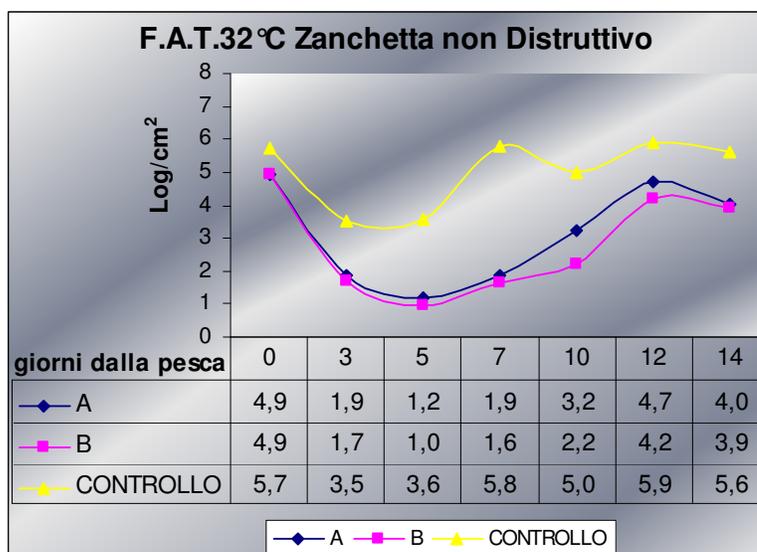
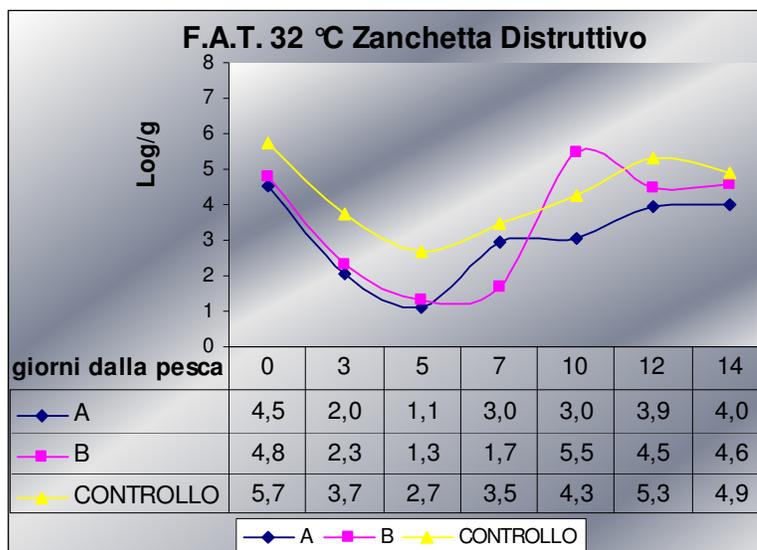


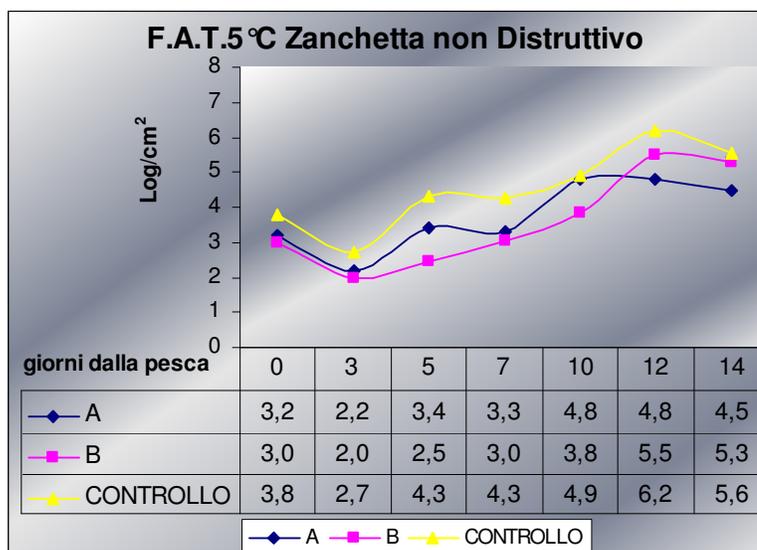
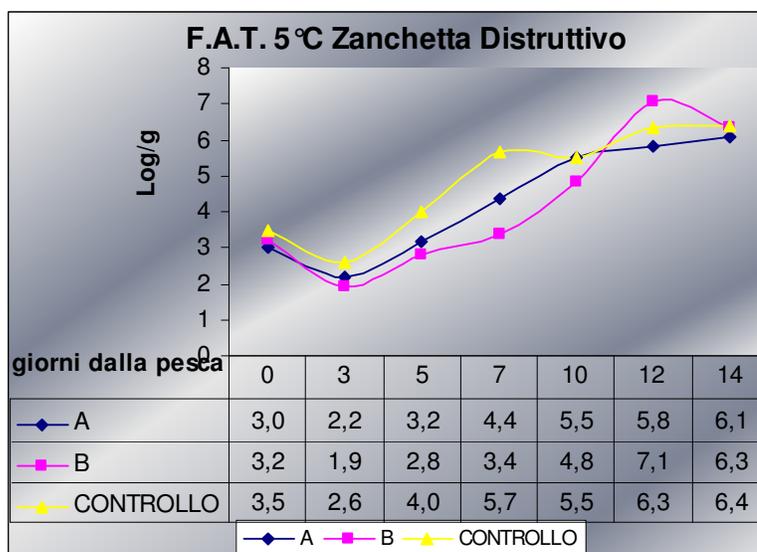
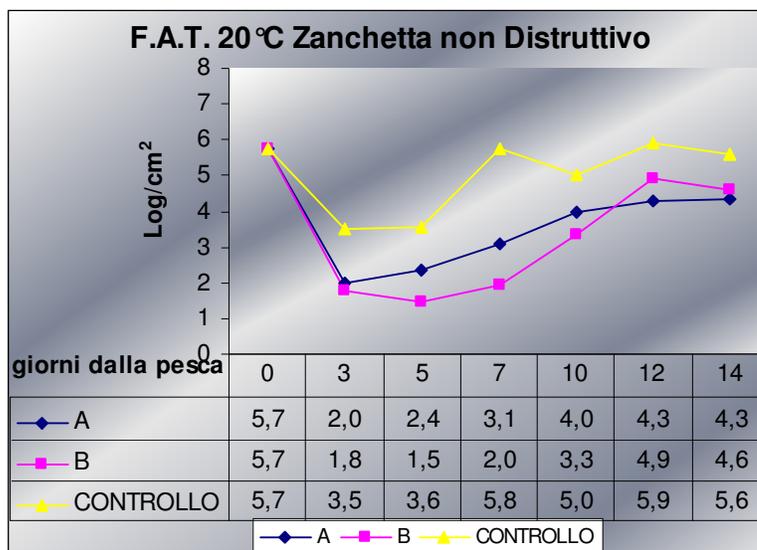


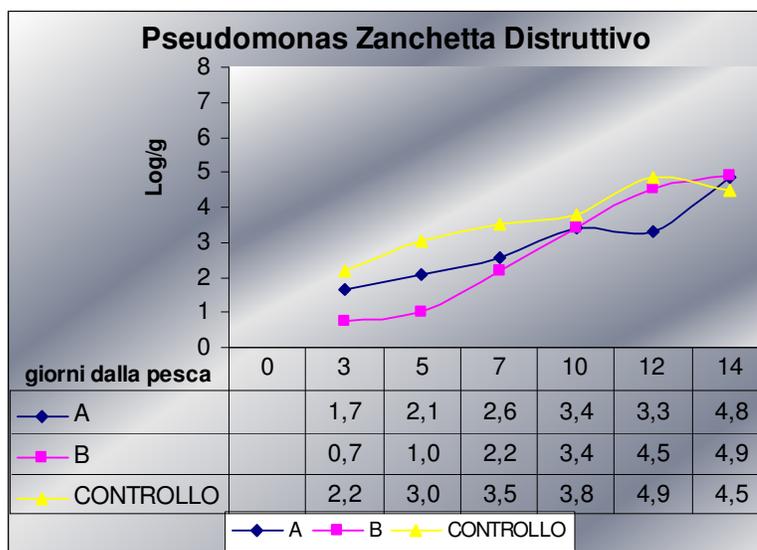
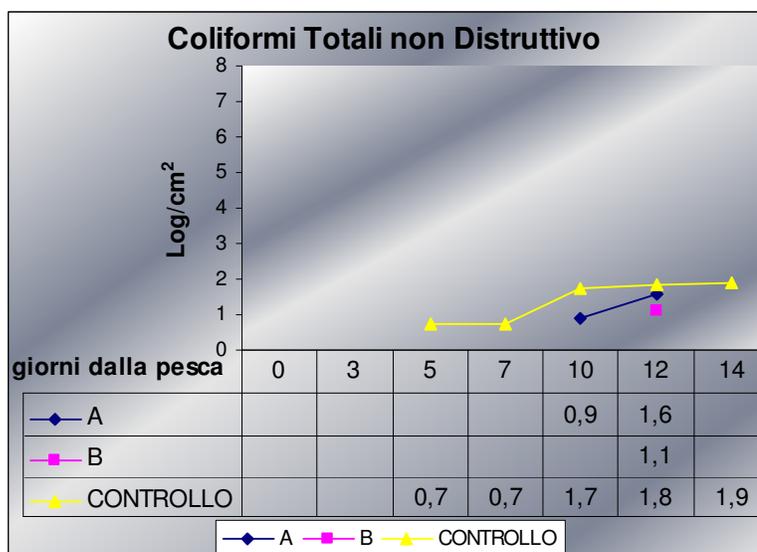
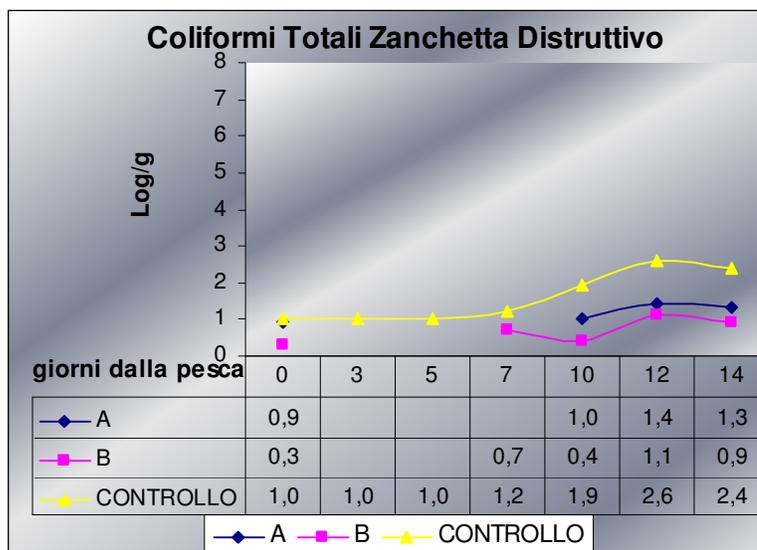




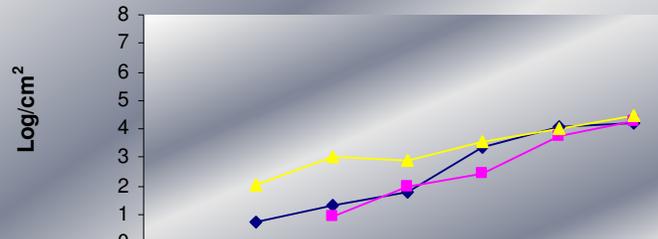






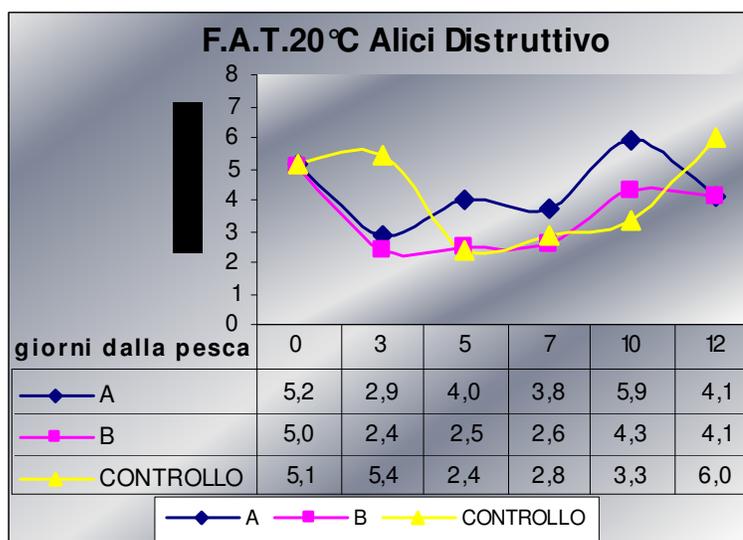
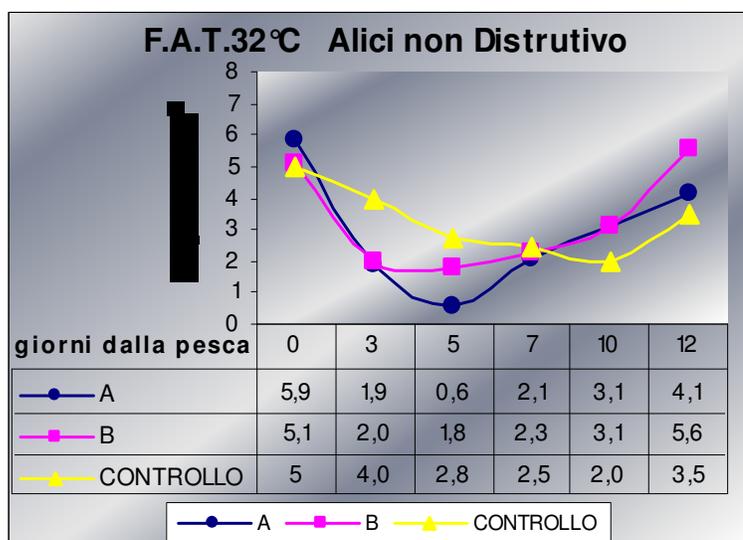
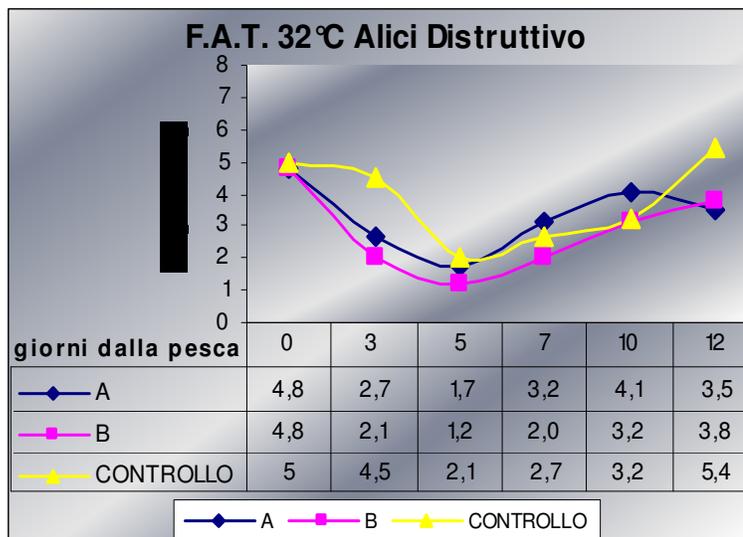


Pseudomonas Zanchetta non Distruttivo

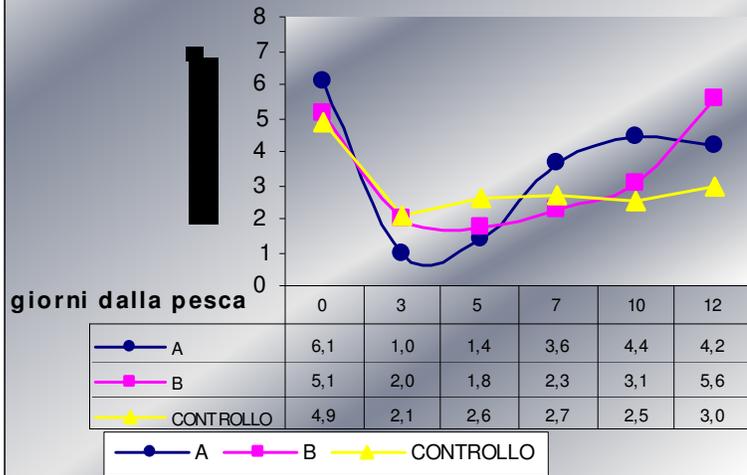


giorni dalla pesca	0	3	5	7	10	12	14
◆ A		0,7	1,3	1,8	3,3	4,1	4,2
■ B			0,9	2,0	2,5	3,7	4,3
▲ CONTROLLO		2,0	3,0	2,9	3,5	4,0	4,5

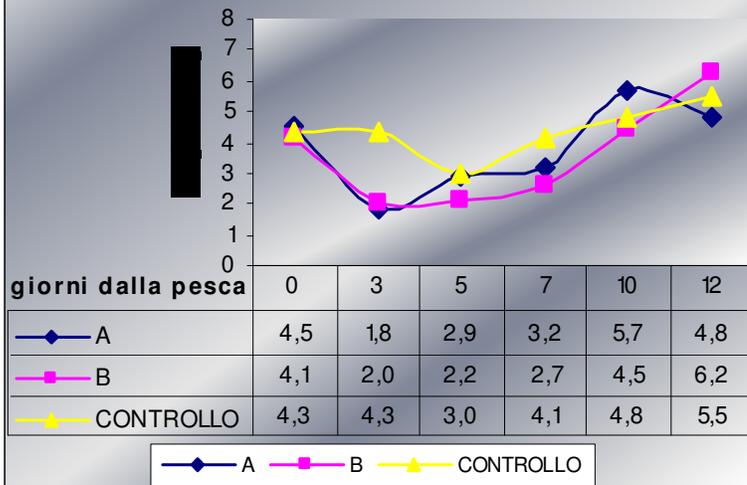
◆ A ■ B ▲ CONTROLLO



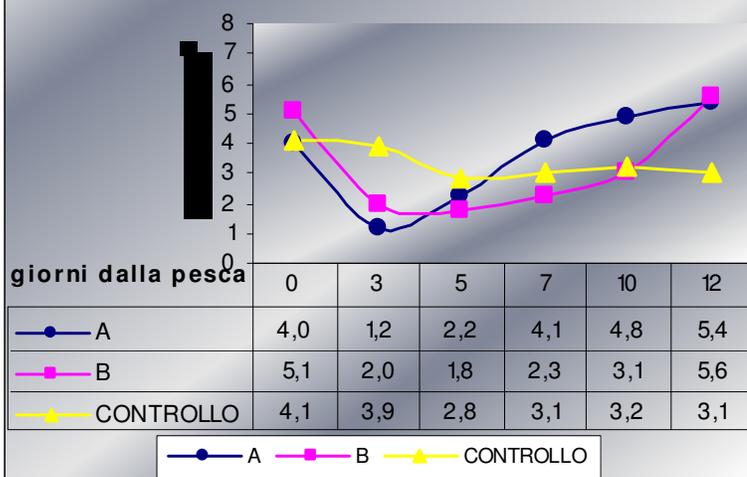
F.A.T. 20°C Alici non Distruttivo



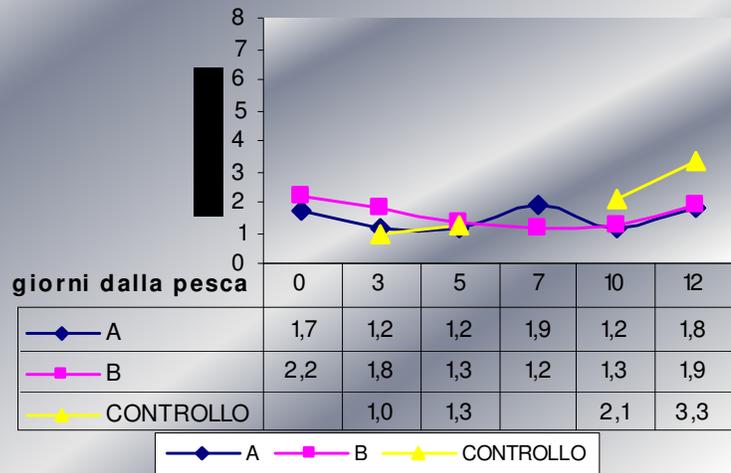
F.A.T. 5°C Alici Distruttivo



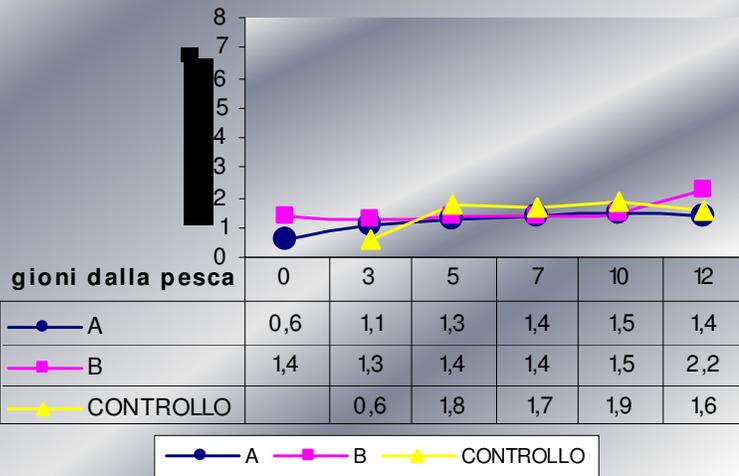
F.A.T. 5°C Alici non Distruttivo



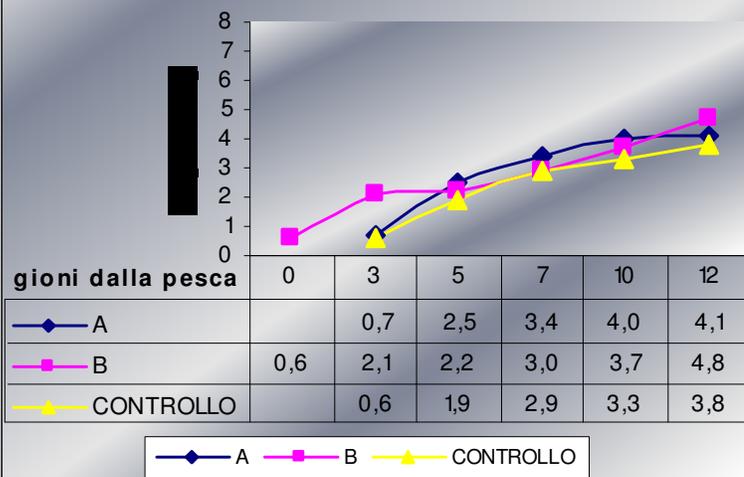
Coliformi Totali Alici Distruttivo



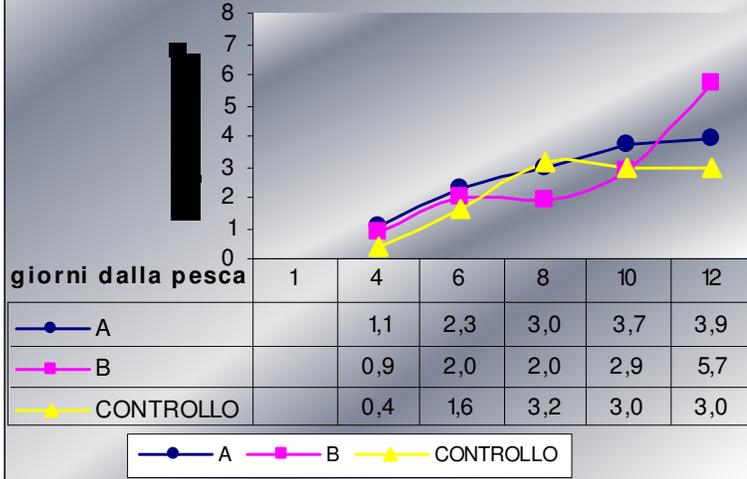
Coliformi Totali Alici non Distruttivo



Pseudomonas Alici Distruttivo



Pseudomonas Alici non Distruttivo



VII.TRATTAMENTO CON ARIA OZONIZZATA

VII.1.Materiali e metodi

La prova è stata condotta su esemplari di: *Pagellus erithrynus*(pagello), *Merluccius merluccius* (merluzzo o nasello) , *Arnoglossus laterna* (zanchetta) prelevati al mercato ittico di Pozzuoli 3-4 h dopo la cattura. Gli esemplari sono stati suddivisi in 2 lotti, uno dei quali (lotto *controllo*) è stato conservato secondo le usuali modalità di stoccaggio ossia ricoperti con un sottile film plastico sul quale è stato depositato ghiaccio tritato mentre l'altro lotto (lotto *ozono*) è stato sottoposto ad uno stoccaggio in una cella frigorifera in cui l'aria è stata ozonizzata per 12 ore il giorno in cui è iniziata la sperimentazione e successivamente per 3 ore al giorno per tutta la durata della sperimentazione.

L' ozonizzazione dell'aria è stata ottenuta mediante un generatore Steril 150 OXITECH S.r.l. Pianezze (VI) Italia .La concentrazione di ozono nell'aria è stata di 3.0 mg/L.

Steril 150 è dotato di: generatore di ozono a lampade ultraviolette, sistema di dissoluzione dell'ozono in ossigeno, ventilatore aria, Timer di programmazione, Interruttore di sicurezza.



Dimensioni Scocca	400x300x150 mm.
Materiale	ABS /INOX
Peso	5,6/ 8.0 Kg
Potenza assorbita alimentazione	220 v / 50 Hz - 20 W
Ambiente max m3	150 m3
Rumorosità	28 Db
Classe/Certificazioni	IP 45 - CE
Produzione O3	0,1 gr/h
Programmazione macchina	Timer digitale

I campioni dei due lotti sono stati stoccati in due celle frigorifere , dotate di teletermografo settata a +2°C, localizzata all'interno del mercato ittico di Pozzuoli (NA).

I prelievi sono stati effettuati nei seguenti giorni:1, 5, 7, 9, 12, 14, 16.

I campioni prelevati in buste sterili sono stati trasportati in contenitore isotermico refrigerato al laboratorio della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche dove erano immediatamente sottoposti ad un giudizio sensoriale ed analisi microbiologiche.

VII.1.1. Analisi sensoriale

Vedi capitolo VI.

VII.1.2. Analisi microbiologiche

Metodo di campionamento

Per le analisi microbiologiche sono state effettuate modifiche al metodo di campionamento che è stato effettuato ad ogni scadenza sempre su 3 esemplari. In relazione ai risultati della sperimentazione 2a che, ci ha permesso di constatare che non c'era differenza significativa tra metodo distruttivo e non nella quantità di microrganismi recuperati, ho ritenuto utile utilizzare per la presente sperimentazione solo il metodo non distruttivo per la determinazione della contaminazione superficiale e nel contempo effettuare un esame batteriologico profondo al fine di evidenziare l'eventuale azione di penetrazione dell'ozono in profondità del muscolo. A tal fine ho prelevato dalla porzione dorsale 5g di muscolo per ogni esemplare, previa asportazione della cute e dei primi strati muscolari, per l'effettuazione dell'esame batteriologico profondo. I microrganismi ricercati e le metodiche utilizzate sono riportate nella sperimentazione 2a.

VII.2.RISULTATI

VII.2.1.Analisi sensoriale

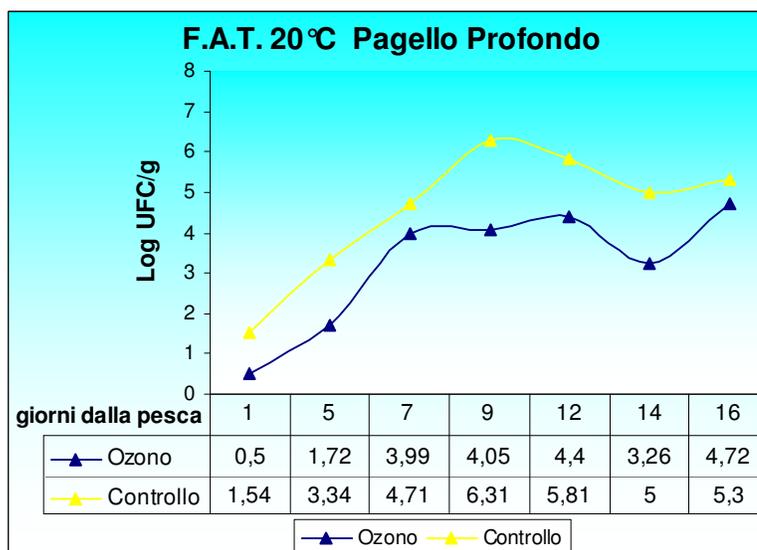
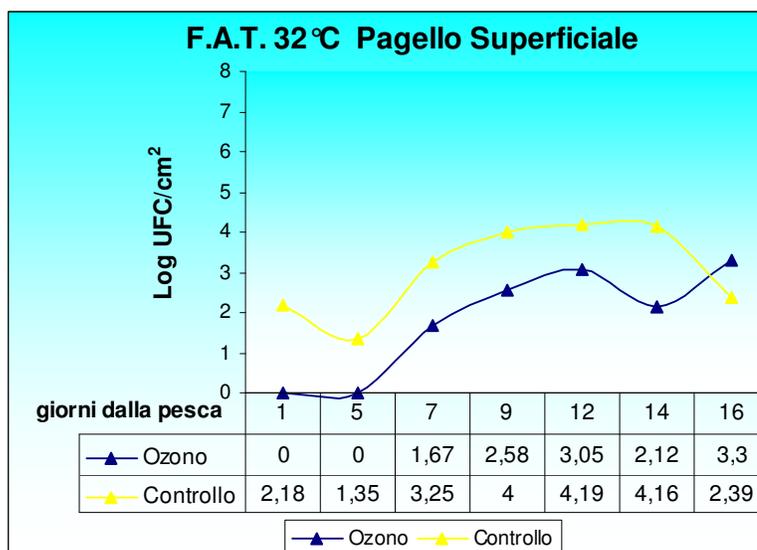
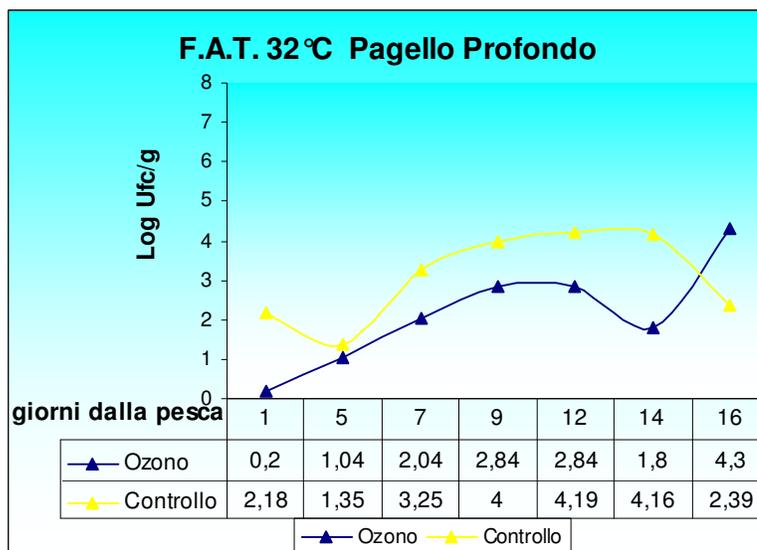
I risultati dei test sensoriali sono riportati nella tabella sottostante. I pagelli hanno conservato caratteristiche organolettiche accettabili per tempi più lunghi. Le caratteristiche sensoriali che hanno condizionato il giudizio ispettivo non sono state della stessa intensità e nello stesso ordine di comparsa nelle diverse specie. Nel merluzzo i segni di deterioramento principali sono stati la consistenza delle carni, data la tessitura lassa propria dei merlucidi; nella zanchetta le caratteristiche organolettiche che più precocemente si sono modificate sono state l'igrigimento e la facile fratturabilità. Nei pagelli non sono stati evidenziati segni di scadimento prevalenti sugli altri.

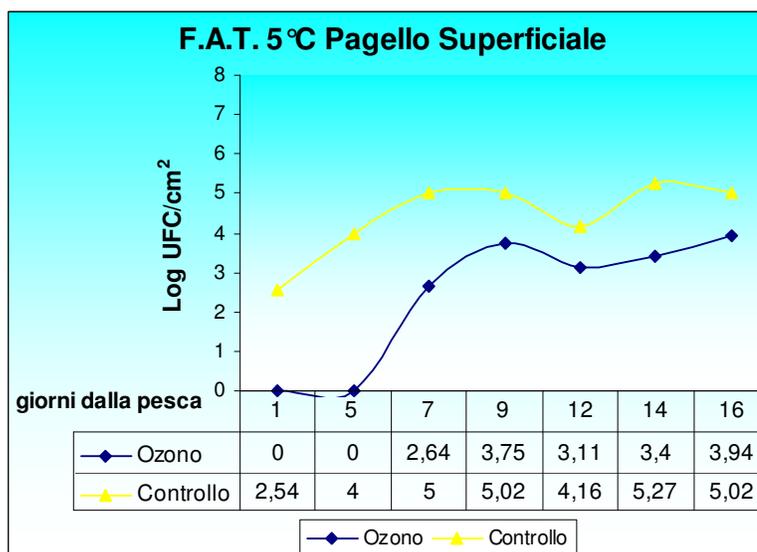
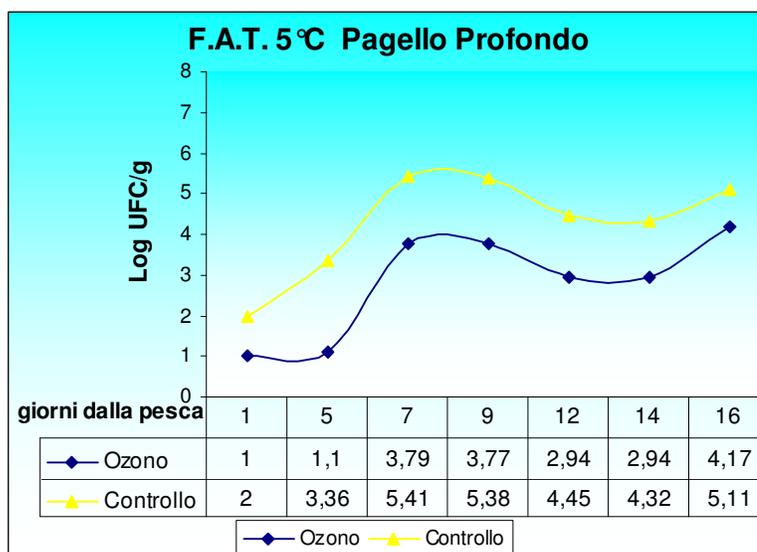
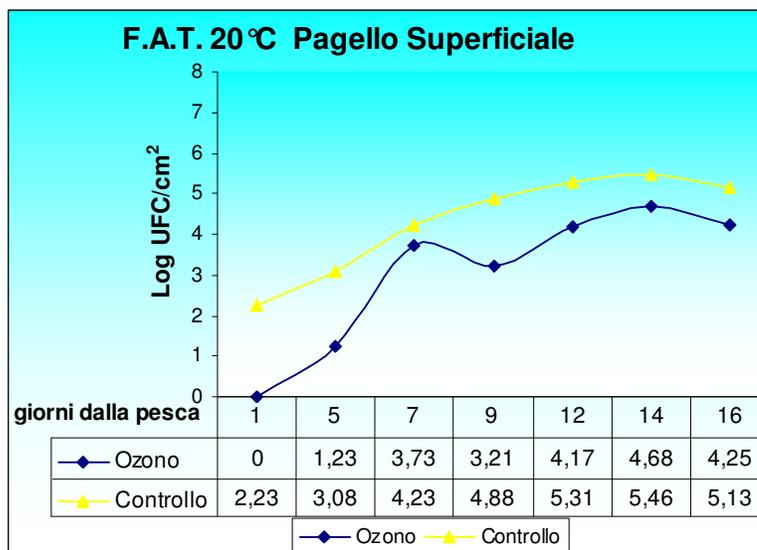
In tutti gli esemplari trattati ha prevalso la disidratazione superficiale.

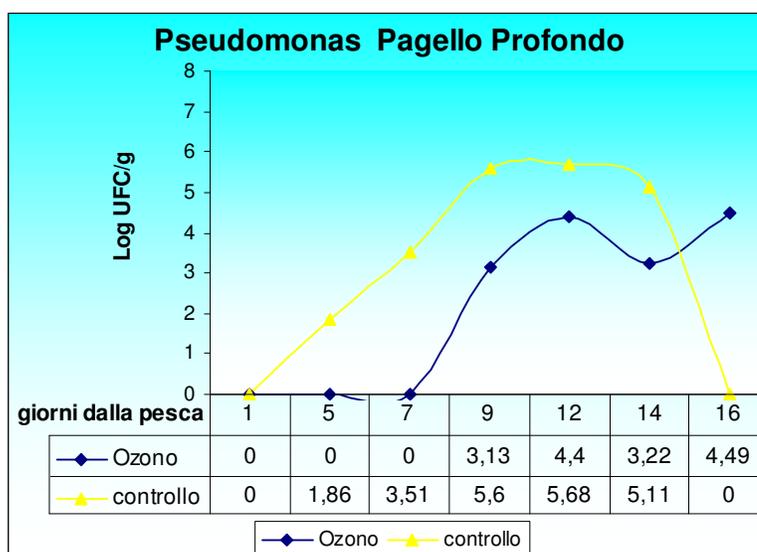
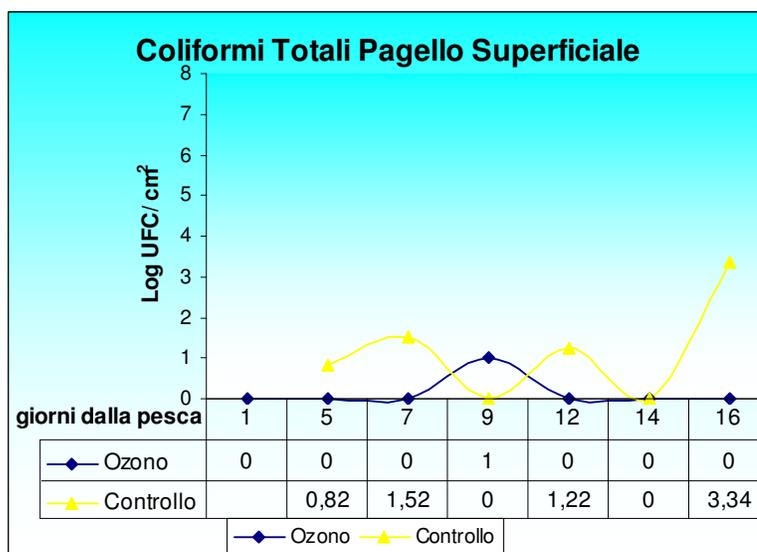
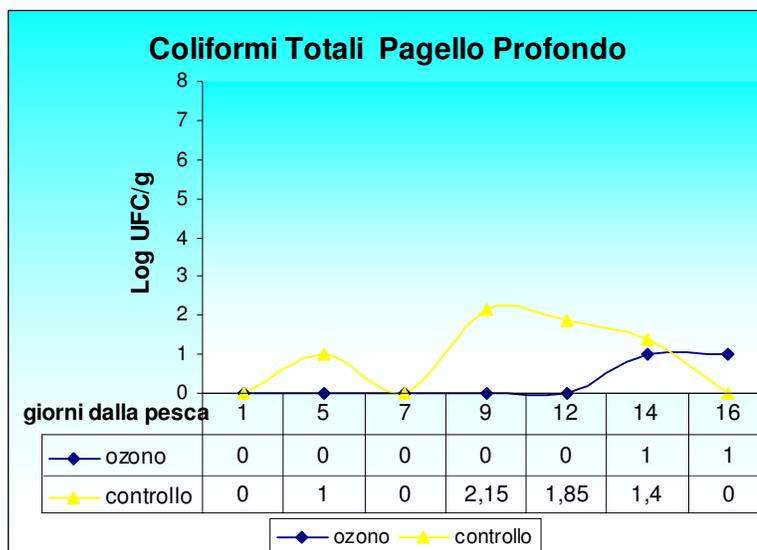
Nome lotto	Giorni di conservazione						
	1°	5°	7°	9°	12°	14°	16°
Pagello controllo	1	3	4	4	5	5	5
Pagello ozono	1	2	3	3	3	4	5
Zanchetta controllo	1	3	4	4	5	5	5
Zanchetta ozono	1	2	3	4	5	5	5
Merluzzo controllo	1	3	4	5	5	5	5
Merluzzo ozono	1	2	3	4	5	5	5

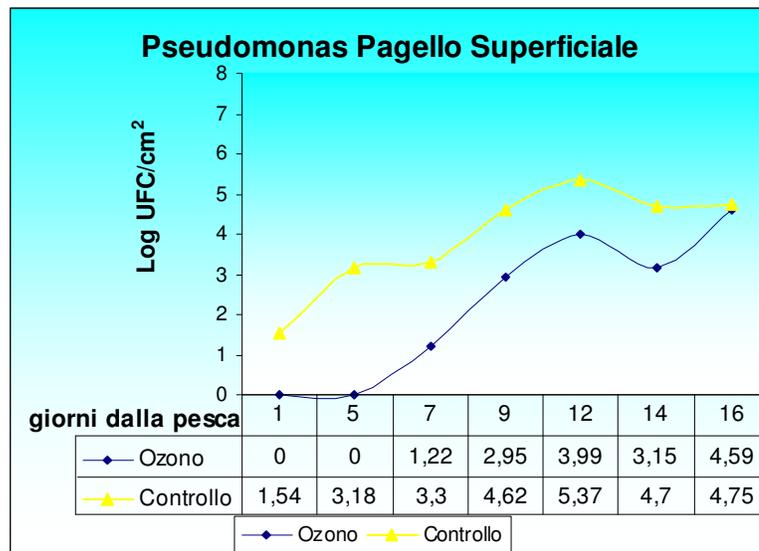
VII.2.2Analisi microbiologiche

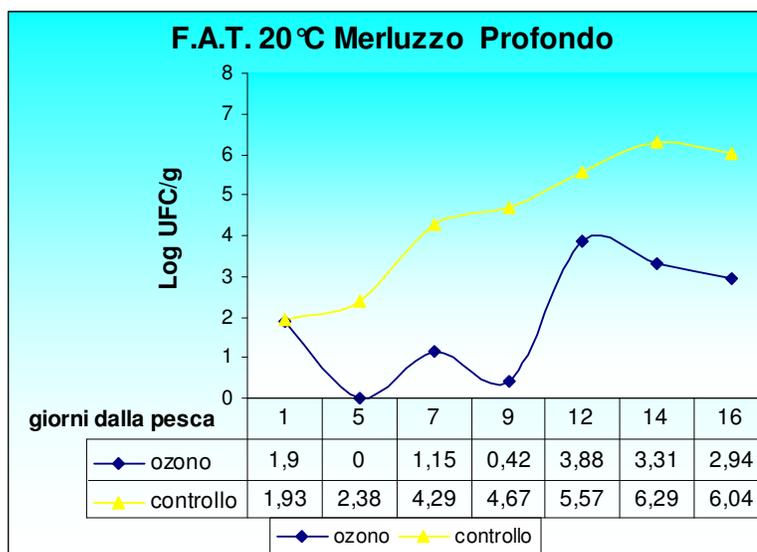
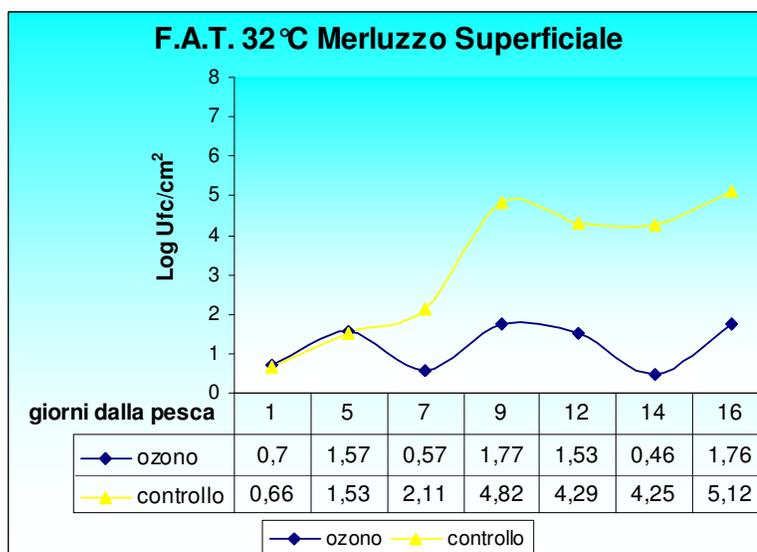
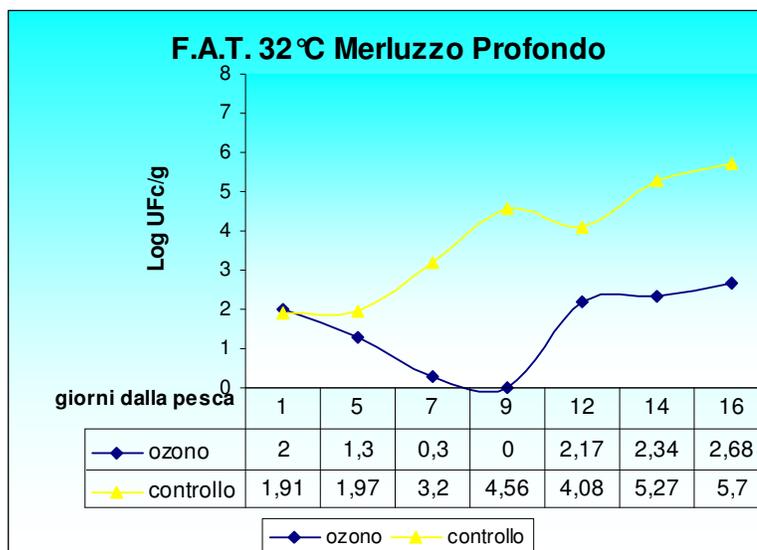
I risultati della F.A.T. 32°C , 20°C, 5°C, Pseudomonas e Coliformi totali sono riportati nei grafici e nelle tabelle seguenti ed evidenziano livelli contenuti sia della contaminazione superficiale che profonda nei campioni trattati rispetto al controllo nelle specie considerate. Tutti gli altri microrganismi ricercati non sono stati evidenziati. Per tutte le specie oggetto della sperimentazione è possibile trarre le seguenti considerazioni: per tutti i microrganismi rinvenuti sono stati evidenziati valori più contenuti nei campioni trattati rispetto ai valori dei campioni di controllo. Ciò risulta vero sia per il campionamento effettuato in superficie che in profondità ($P < 0.05$). Non sono state evidenziate differenze significative tra il campionamento superficiale e profondo. Tale dato conferma che la sterilità o paucimicrobicità delle carni dei prodotti ittici è presente solo nel periodo di rigor mortis.

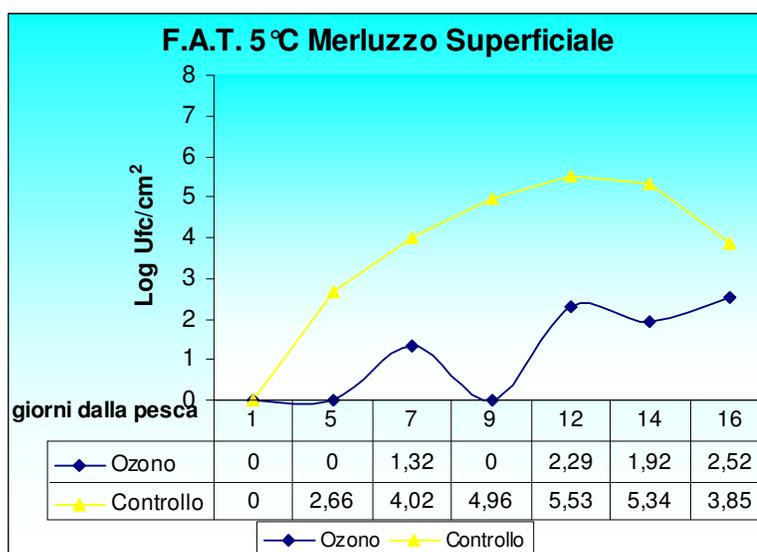
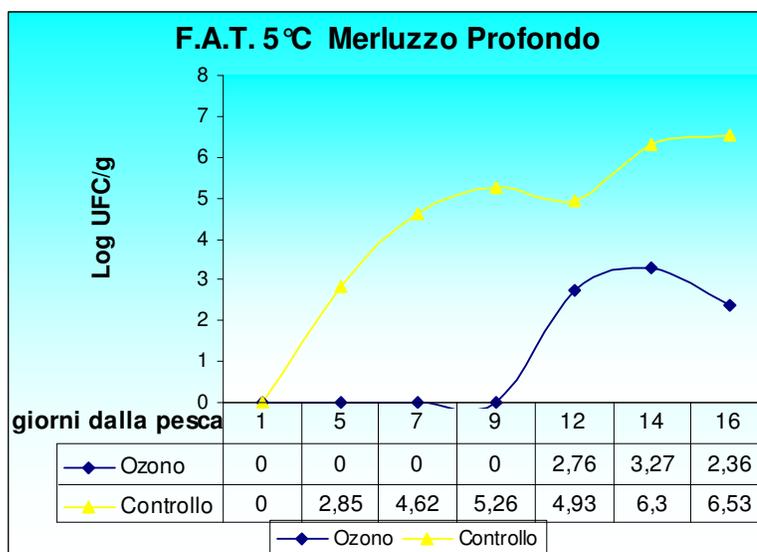
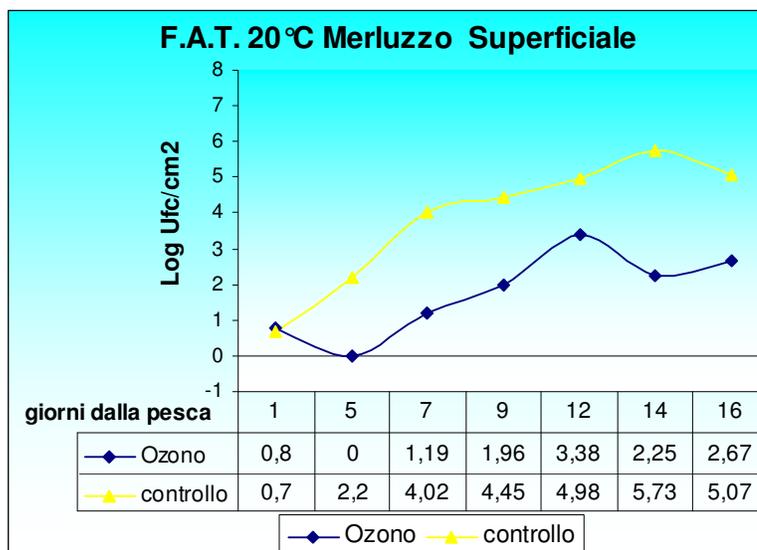


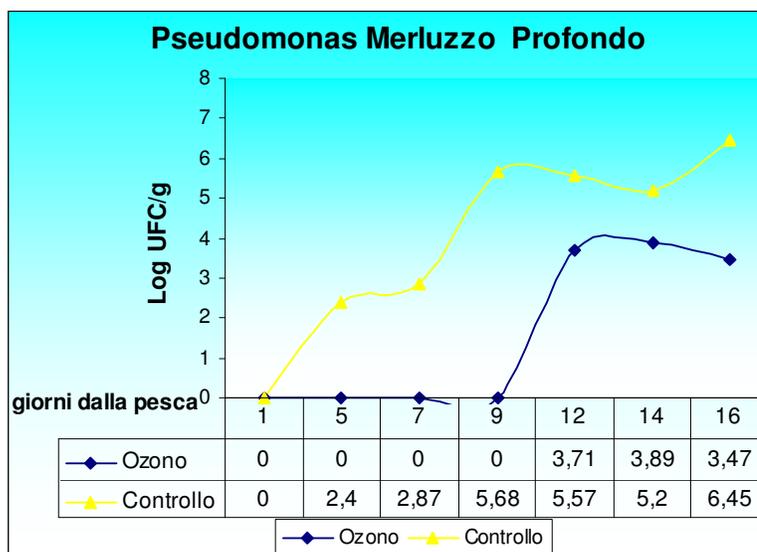
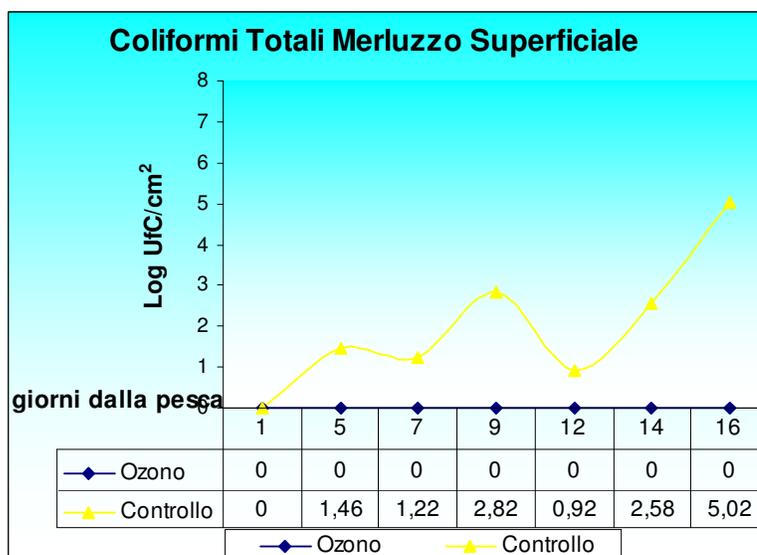
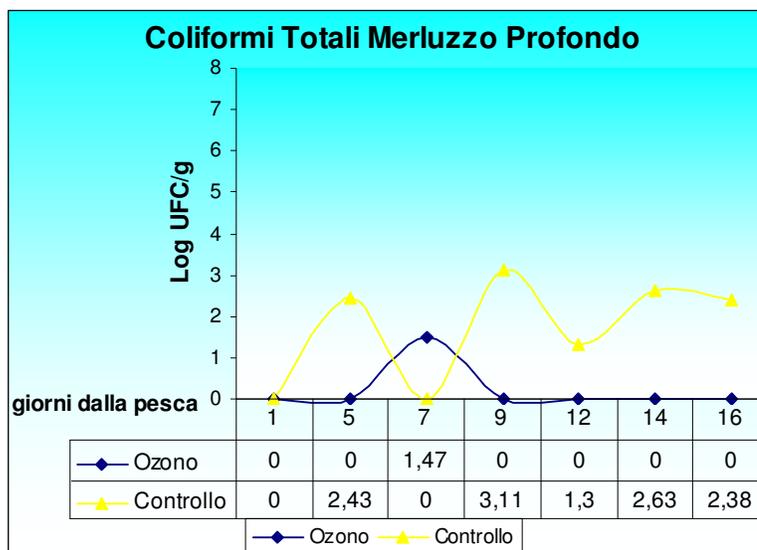


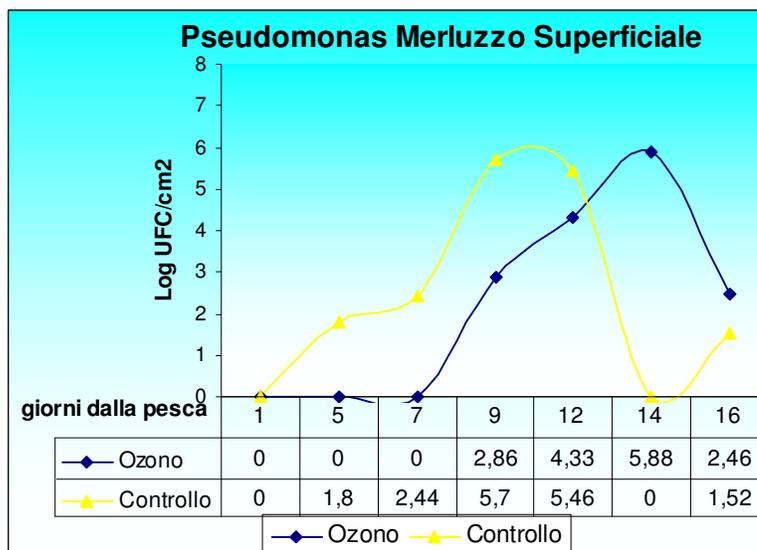


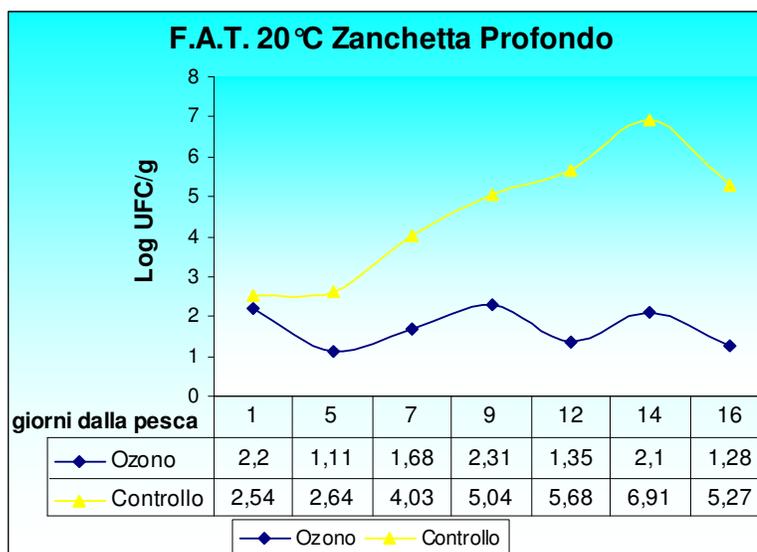
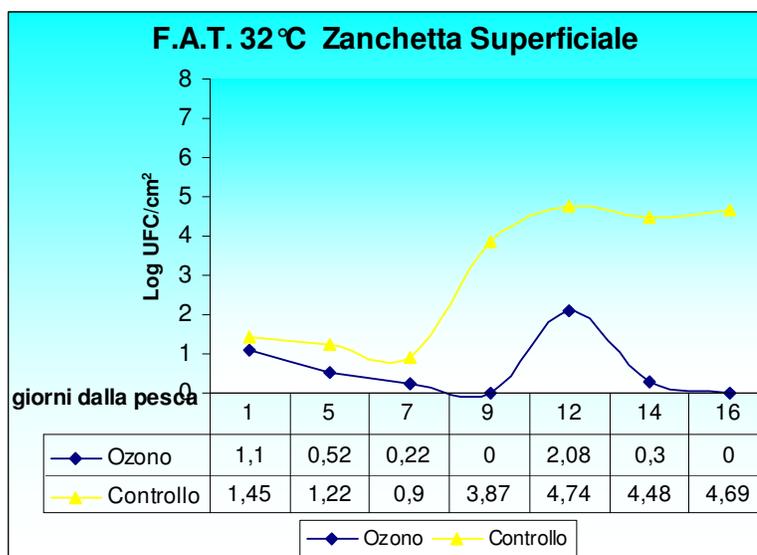
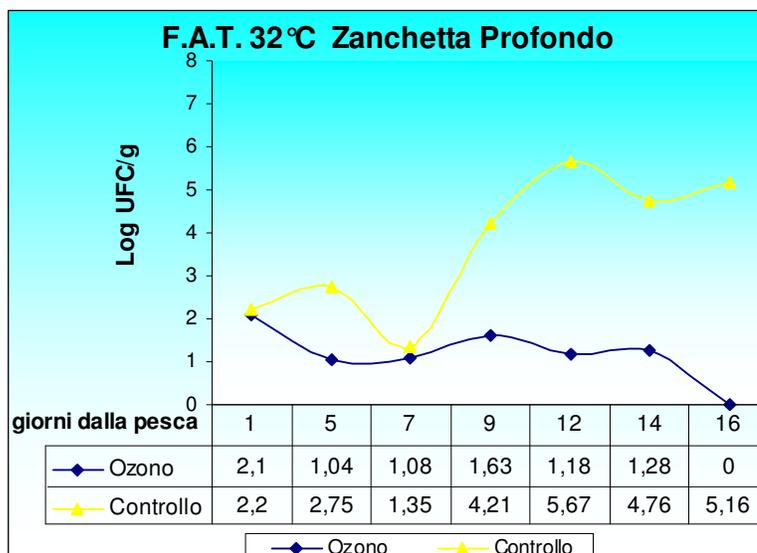


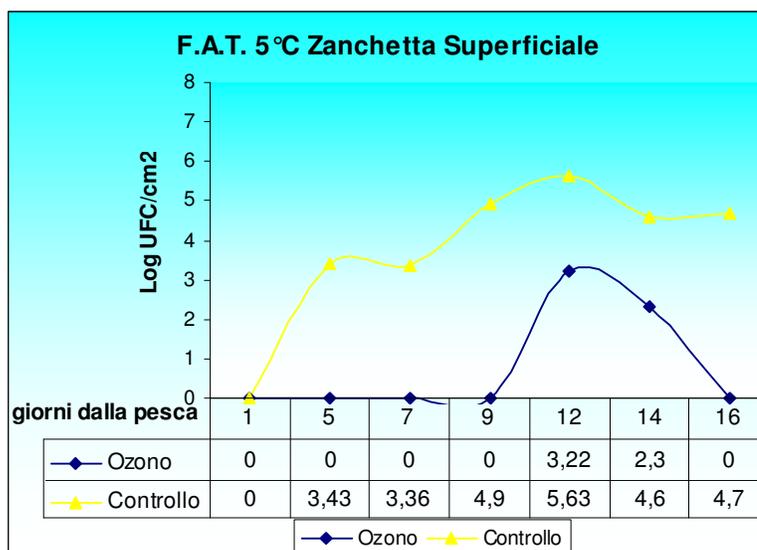
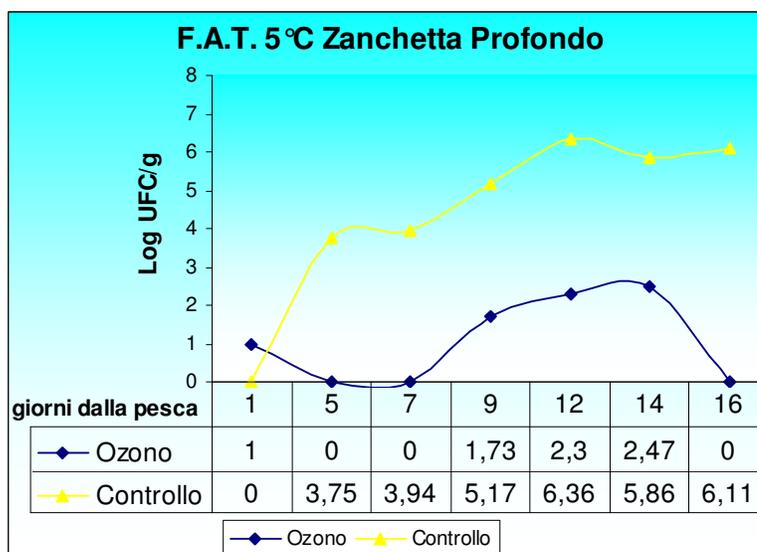
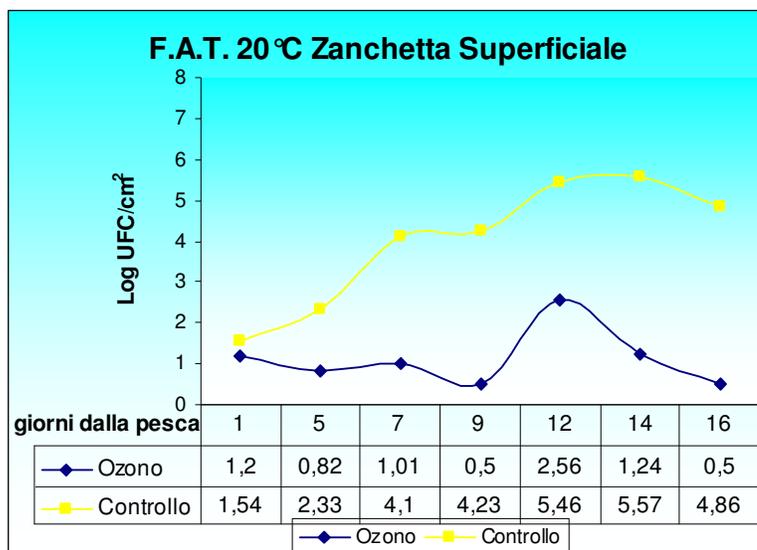


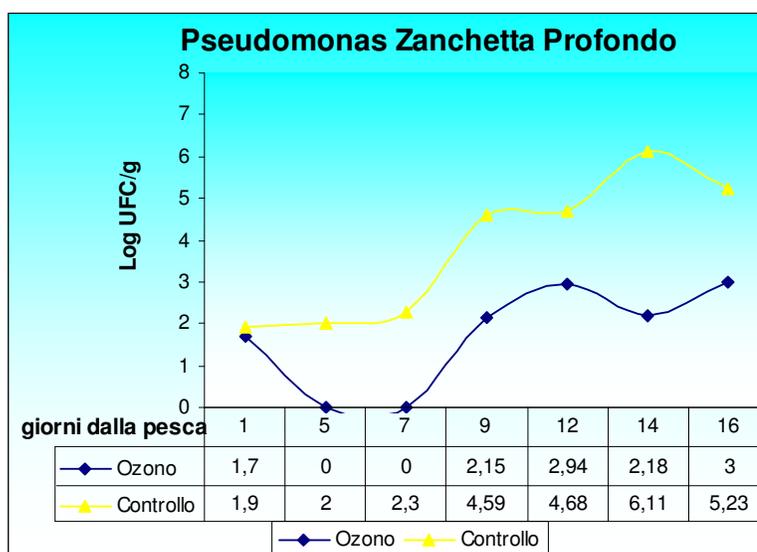
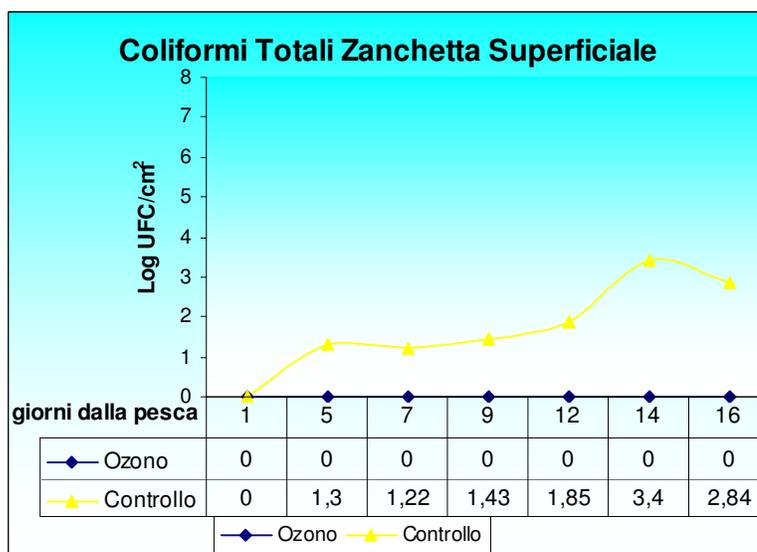
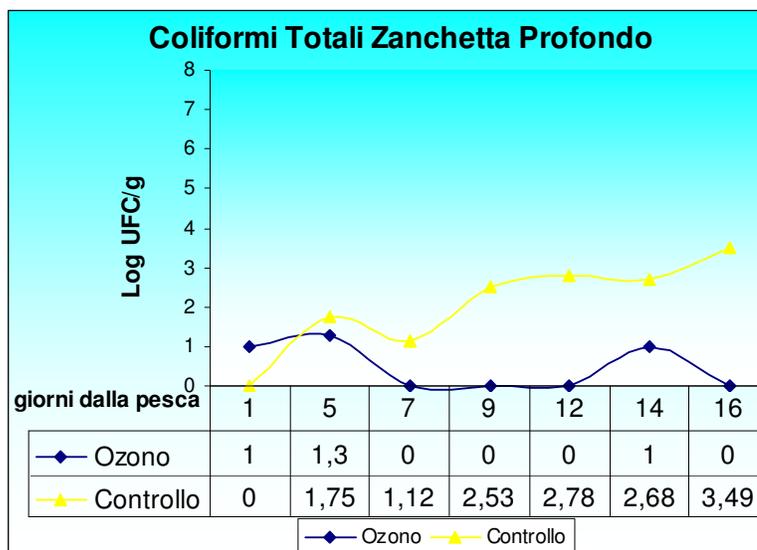


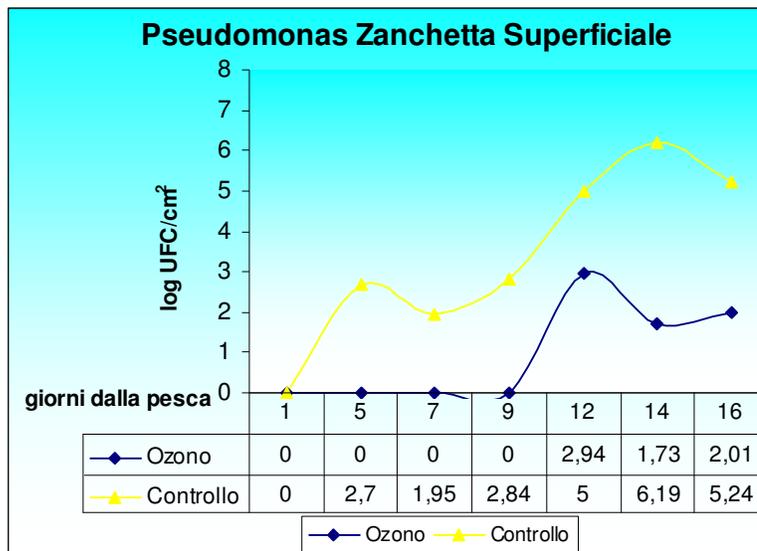












VIII. TRATTAMENTO CON ARIA OZONIZZATA E STOCCAGGIO CON GHIACCIO.

VIII.1. Materiali e metodi

La prova è stata condotta su esemplari di: *Pagellus erithrynus* (pagello) e *Merluccius merluccius* (merluzzo o nasello) prelevati direttamente dal peschereccio 3-4 ore dopo la cattura. Gli esemplari sono stati suddivisi in 2 lotti, uno dei quali (lotto *controllo*) è stato conservato secondo le usuali modalità di stoccaggio ossia ricoprendo gli esemplari con un sottile film plastico sul quale è stato depositato ghiaccio tritato mentre per il secondo (lotto *ozono*) è stato sottoposto ad uno stoccaggio ricoprendo i campioni con un sottile film plastico sul quale è stato depositato ghiaccio tritato in una cella frigorifera in cui l'aria è stata ozonizzata per: 12 ore il giorno in cui è iniziata la sperimentazione e successivamente per 3 ore al giorno per tutta la durata della sperimentazione.

La produzione di ozono è stata ottenuta con l'utilizzo di un generatore Steril 150 OXITECH le cui caratteristiche tecniche sono riportate nella sperimentazione 2b.

I campioni dei due lotti sono stati stoccati in due celle frigorifere, dotate di teletermografo settata a +2°C, localizzata all'interno del mercato ittico di Pozzuoli (NA).

I prelievi sono stati eseguiti nei seguenti giorni: 1,4,6,8,11,12,14.

I campioni prelevati in buste sterili sono stati trasportati in contenitore isotermico refrigerato al laboratorio della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche dove erano immediatamente sottoposti ad un giudizio sensoriale ed analisi microbiologiche.

VIII.1.1. Analisi sensoriale

Vedi capitolo V.

VIII.1.2 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state effettuate secondo quanto riportato nel capitolo V ,le differenze hanno riguardato il campionamento che è stato effettuato su 3 esemplari che non hanno costituito il pool ma sono stati analizzati singolarmente e inoltre sono stati ricercati :

- ✓ **Aereomonas:** Aereomonas agar base +Ampicillin Supplement a 32°C per 48 h;
- ✓ **Brochotrix Thermosfacta** (Staa agar base a 20°C per 48h);

VIII.2.Risultati

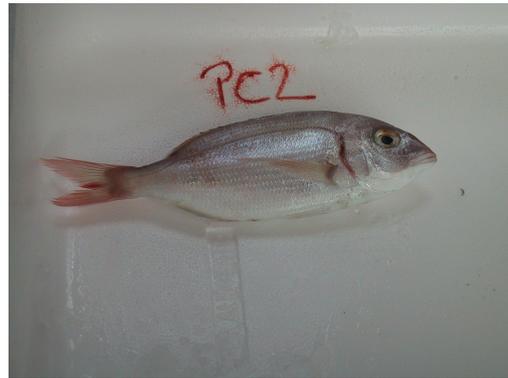
VIII.2.1.Analisi sensoriali

Non esistono differenze significative tra i campioni trattati e non. I risultati dell'analisi sensoriale sono riportati nella tabella seguente.

Nome lotto	Giorni di conservazione						
	0°	4°	6°	8°	11°	12°	14°
Pagello controllo	1	2	3	4	5	5	5
Pagello ozono	1	2	3	4	5	5	5
Merluzzo controllo	1	3	4	5	5	5	5
Merluzzo ozono	1	2	4	5	5	5	5



Pagello trattato



Pagello controllo



Merluzzo trattato

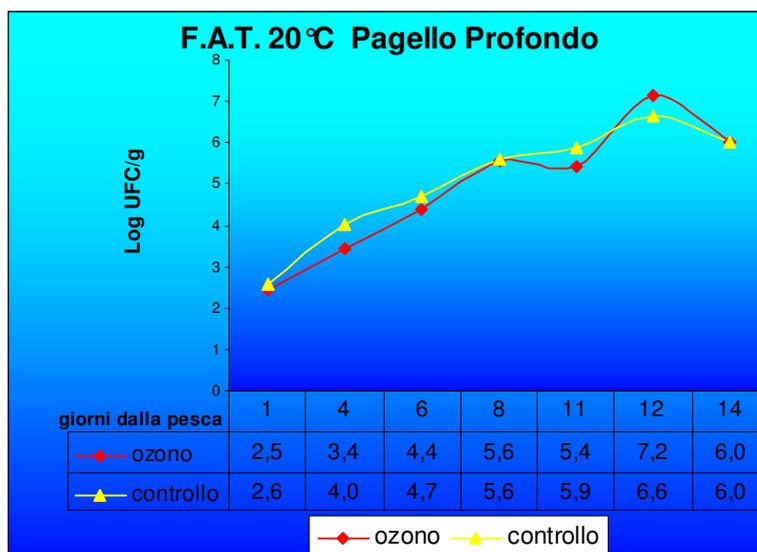
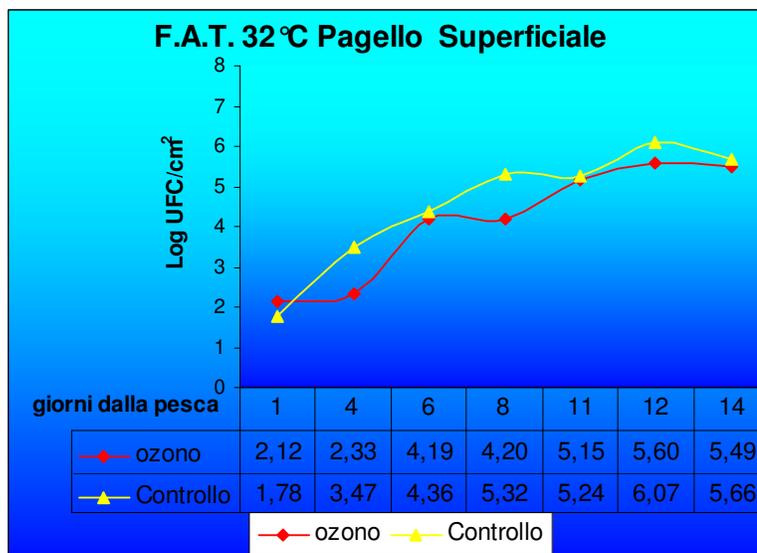
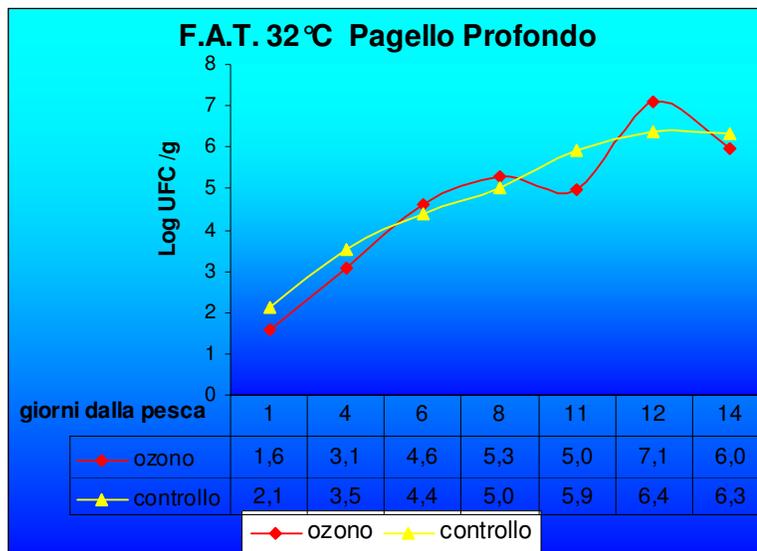


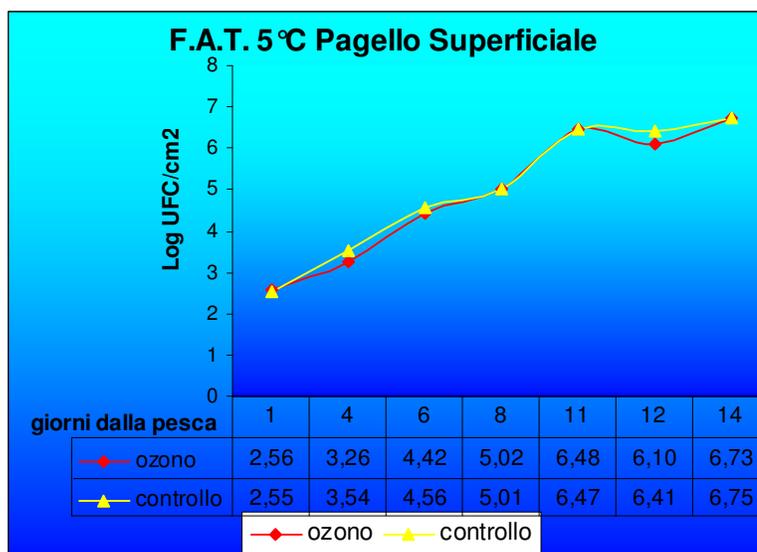
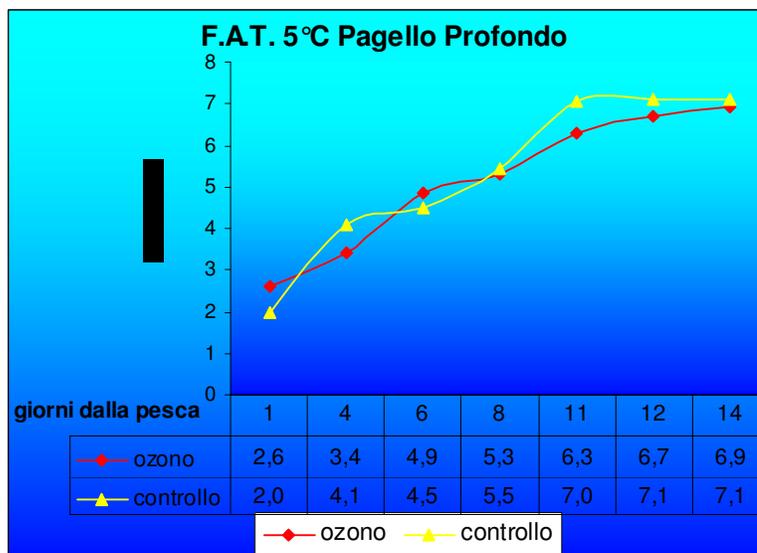
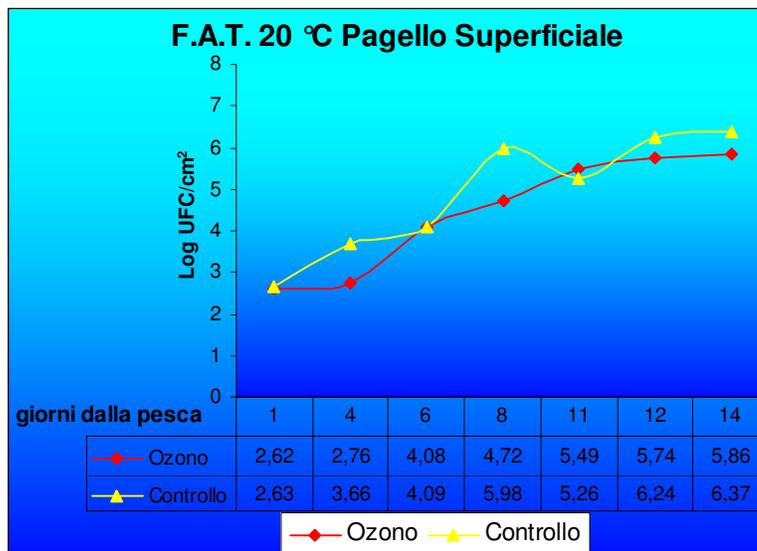
Merluzzo controllo

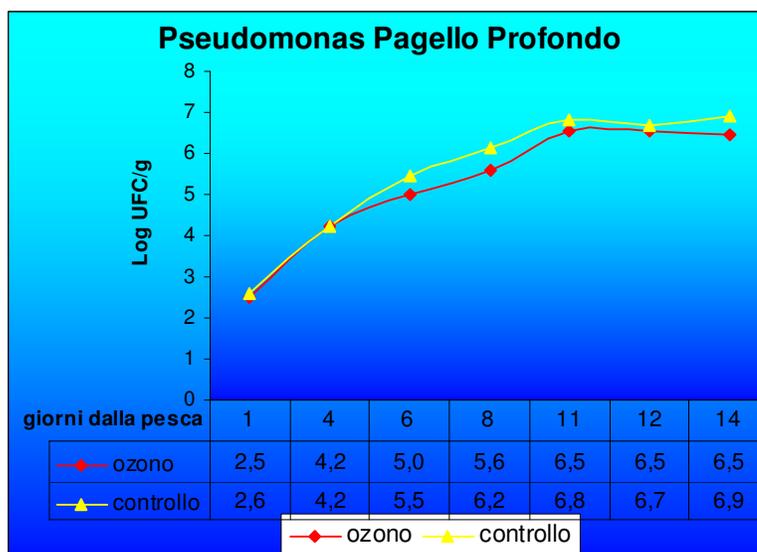
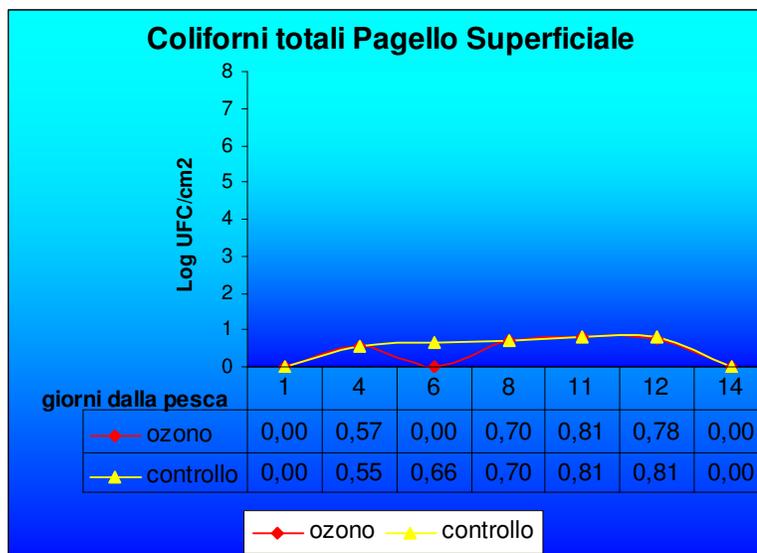
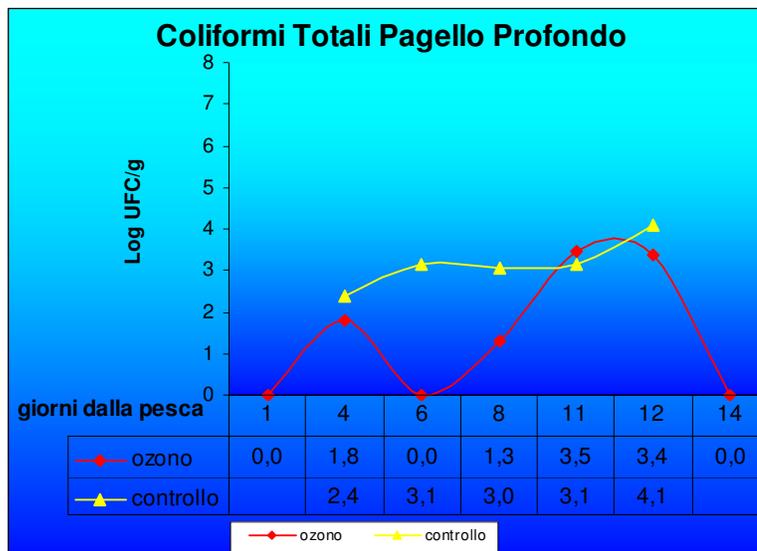
VIII.2.2. Analisi microbiologiche

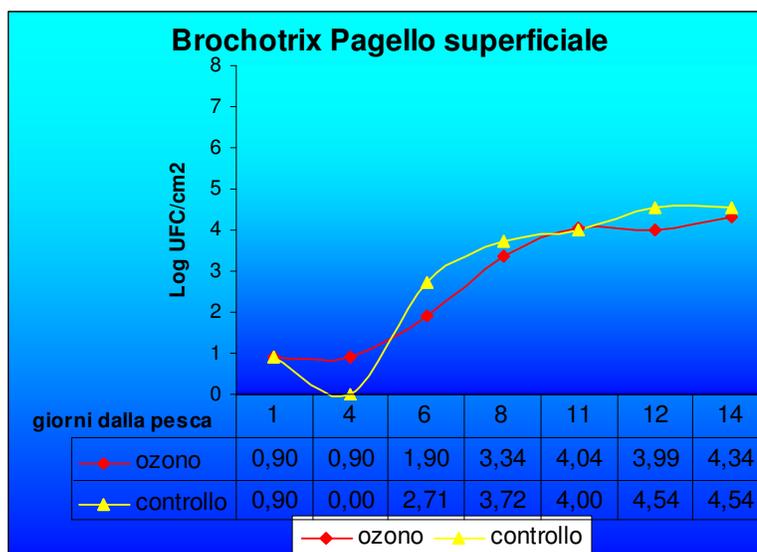
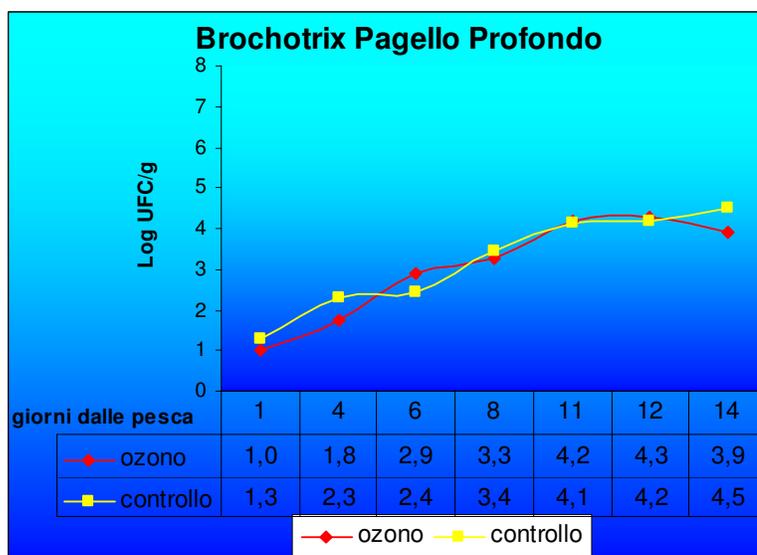
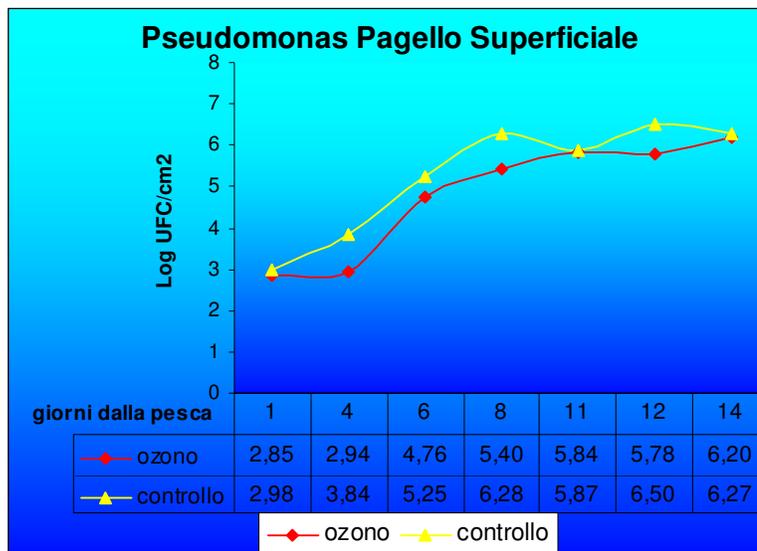
I risultati delle analisi microbiologiche per la F.A.T. a 32°, 20, 5°C, Coliformi totali Pseudomonas, Brochotrix e Aeromonas sono riportati nei grafici e nelle tabelle seguenti. Tutti gli altri microrganismi ricercati non sono stati rinvenuti.

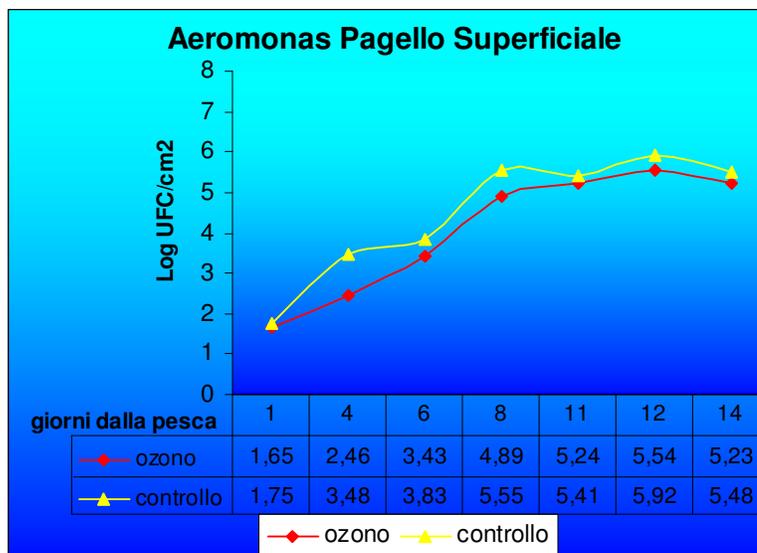
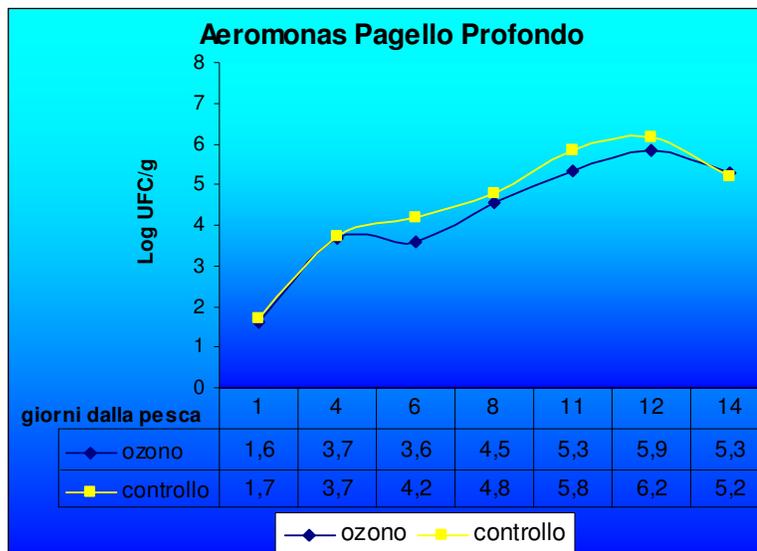
Non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni di controllo e i campioni trattati con ozono sia per quanto riguarda la zanchetta sia per il pagello. La spiegazione di ciò è probabilmente da imputare alla impossibilità di penetrazione dell'ozono attraverso lo strato di ghiaccio di copertura.

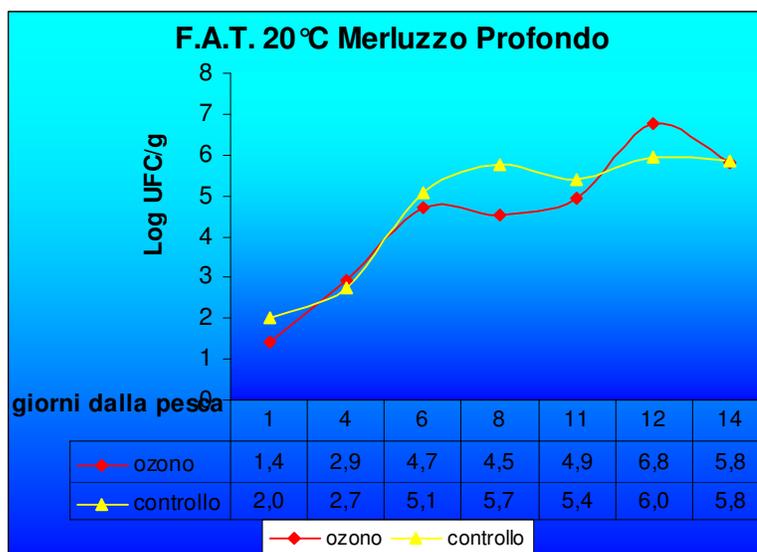
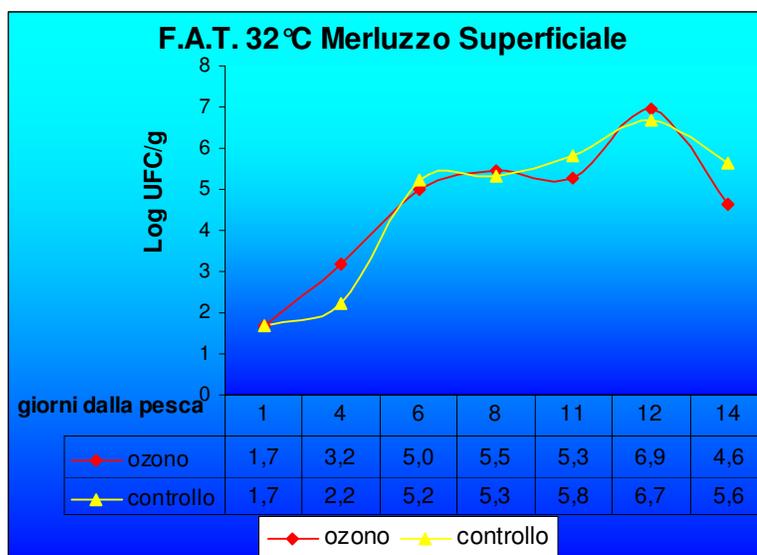
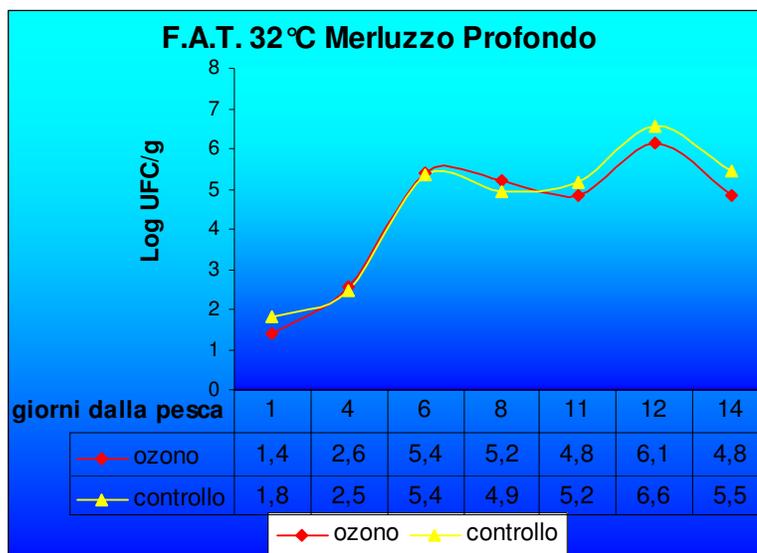


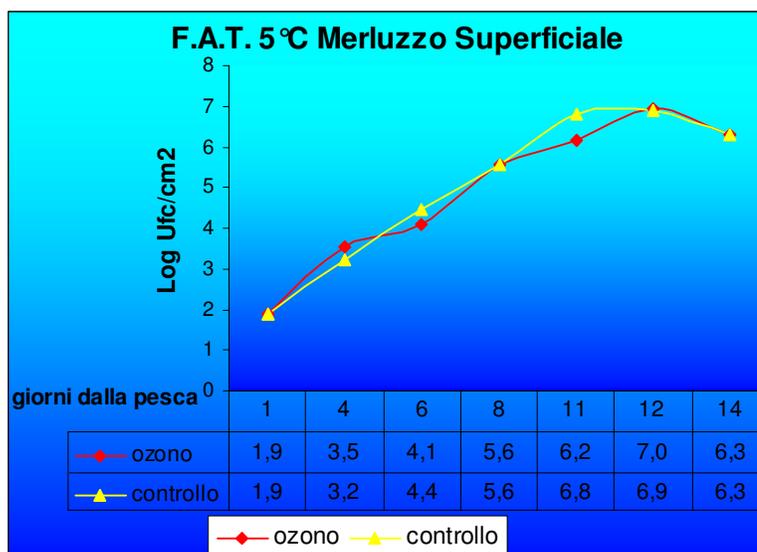
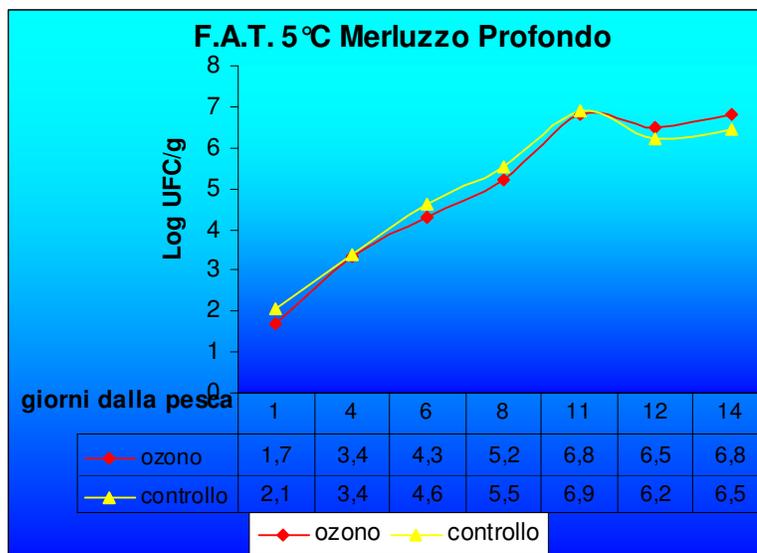
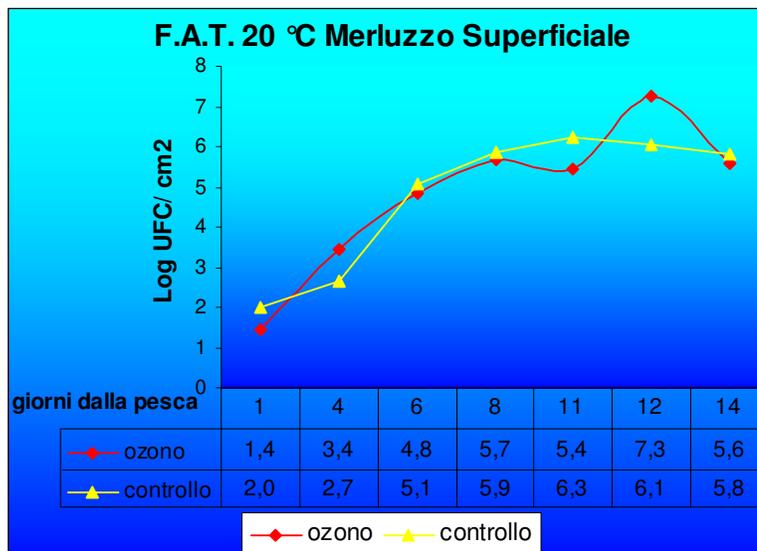


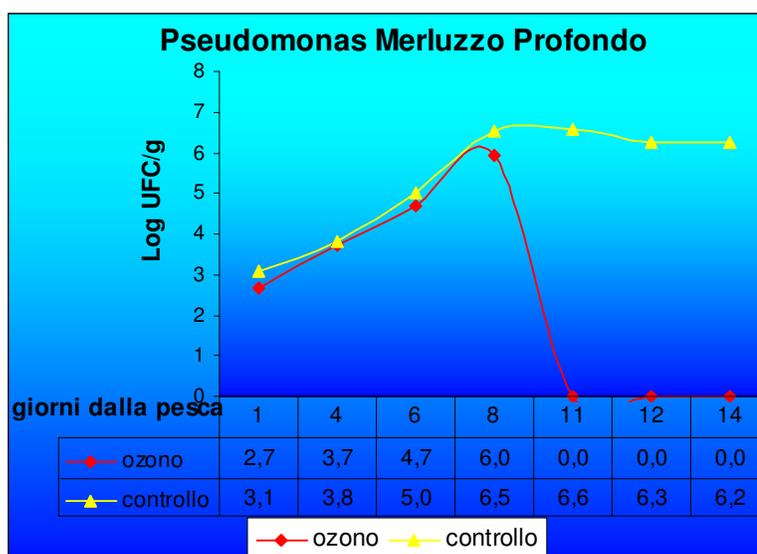
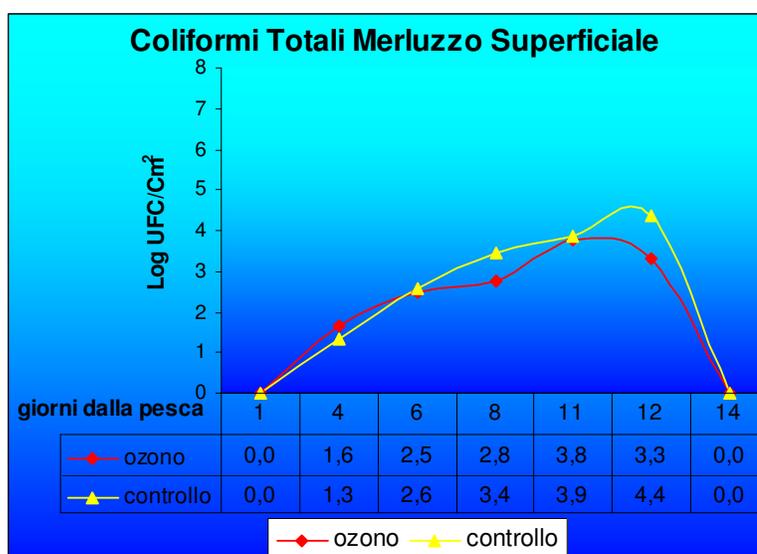
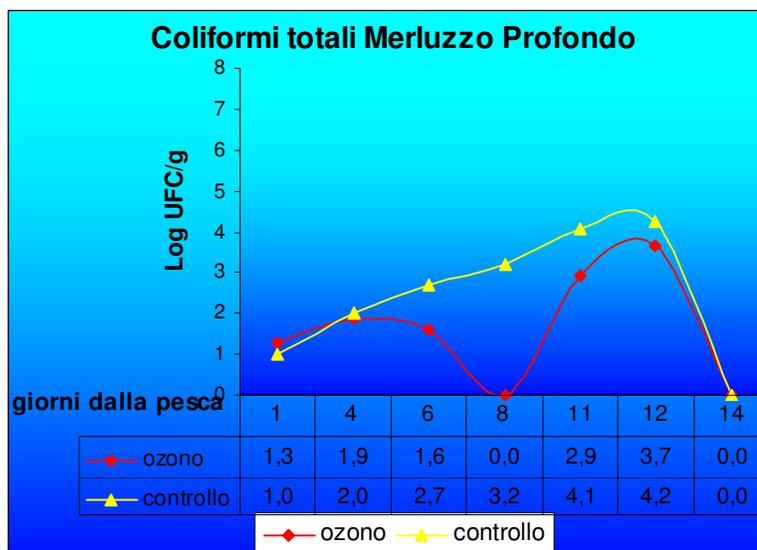


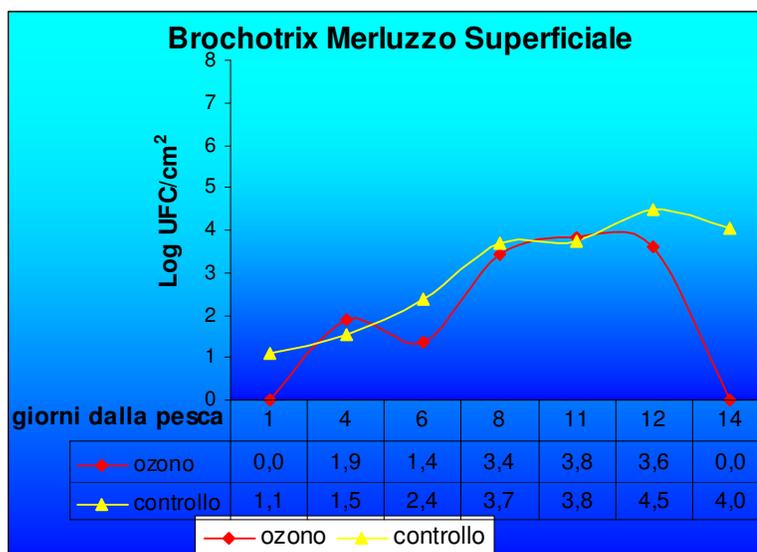
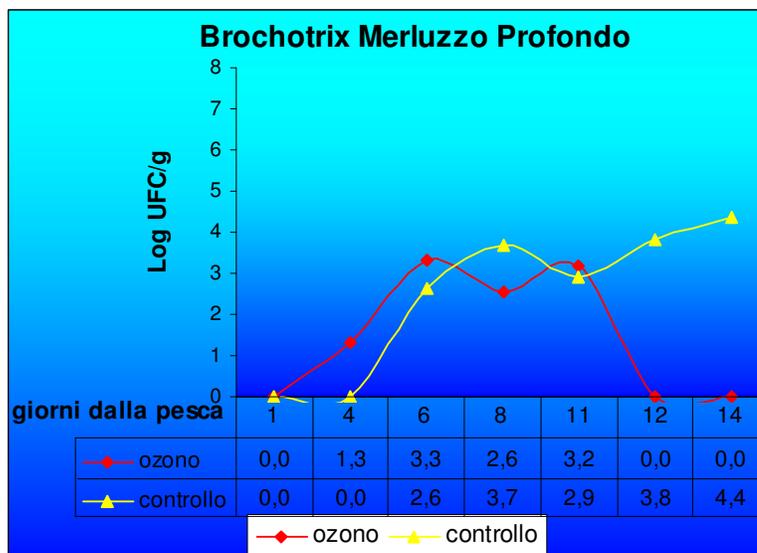
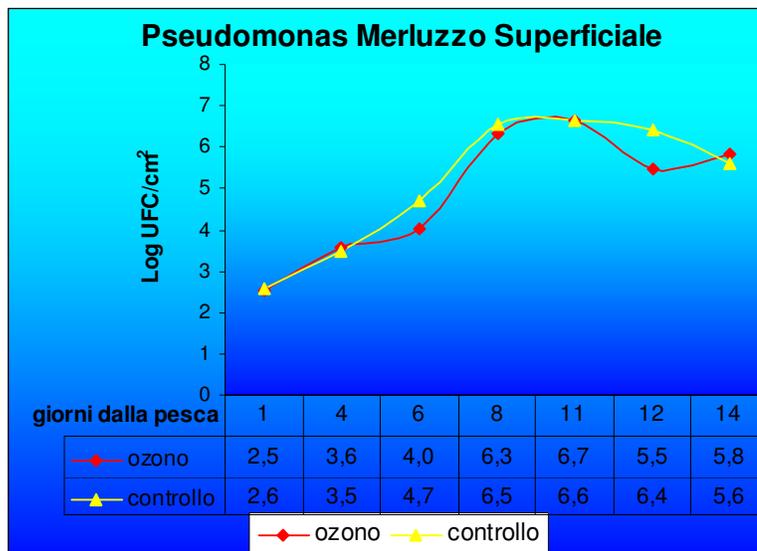


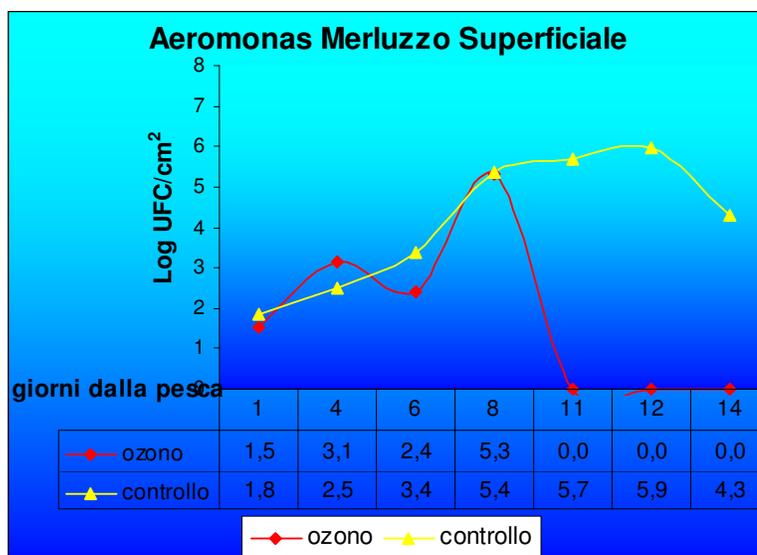
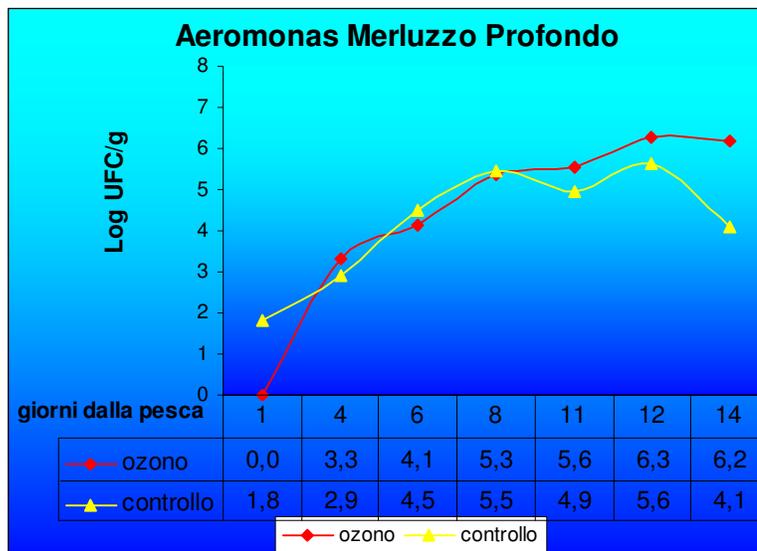












VIII.3. Conclusioni generali

I risultati ottenuti con le sperimentazioni 2a e 2b permettono di trarre considerazioni di ordine generale:

- Le analisi sensoriali sono state positivamente influenzate negli esemplari trattati con ozono;
- I dati microbiologici hanno mostrato costante significatività se paragonati ai livelli di microrganismi rinvenuti nei rispettivi esami di controllo.

Sia le analisi sensoriali che le analisi microbiologiche permettono di affermare che i migliori risultati sono stati ottenuti rispettivamente mediante l'utilizzo di aria ozonizzata e di ghiaccio ozonizzato seguiti dal trattamento con acqua ozonizzata e ghiaccio ozonizzato. I risultati implicano un'estensione significativa della vita commerciale dei prodotti ittici ottenibile sia con la selezione della materia prima ineccepibile sia mediante il potenziale ruolo dell'ozono nel contenimento della popolazione microbica deteriorante .

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey, J.S., Buhr, R.J., Cox, N.A., and Berrang, M.E. 1996. Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. *Poult. Sci.* 75:191-196
2. Byun, M.W., Kwon, O.J., Yook, H.S., and Kim, K.S. 1998. Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 in culture medi& *J. Food Prot.* 61 :728-730
3. Chen, H.C., Huang, S.H., Moody, M.W., and Jiang, S.T. 1992. Bacteriocidal and mutagenic effects of ozone on shrimp (*Penaeus mondon*) meat. *J. Food Sci.* 57:923-927
4. Civera T. , 1995 Accertamenti dei requisiti di freschezza in alcune famiglie ittiche. Suggestimenti pratici ed operativi. Il progresso veterinario n. 21 pago 714-715
5. Foegeding, P.M. 1985. Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiol.* 2:123-134

6. Horvath, M., Bilitzky, L., and Huttner, J. 1985. Ozone. In *Topics in Inorganic and General Chemistry monograph 20*, Amsterdam: Elsevier
7. Katzenelson, E., Kletter, B., and Shuval, H. I. 1974. Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone. *J. A WWA* 66:725-729.
8. Korol, S., Fortunato, M.S., Paz, M., Sanahuja, M.C., Lazaro, E., Santini, P., and D'Aquino, M. 1995. Water disinfection: comparative activities of ozone and chlorine on a wide spectrum of bacteria. *Rev. Argent. Microbiol.* 27:175-183.
9. Maccarrone, M., Veldink, G.A., Vliegthart, F.G., and Finazzi Agro, A. 1997. Ozone stress modulates amine oxidase and lipoxygenase expression in lentil (*Lens culinaris*) seedlings. *FEBS Lett.* 408:241-244
10. Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., and Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3471-3475.
11. Rice, R. G. 1986. Applications of ozone in water and wastewater treatment. In *Analytical Aspects of Ozone Treatment of Water and*

Wastewater. Eds. R.G. Rice, L.J. Bollyky and W.I Lacy, pp 7-26, Lewis Publishers.

12.Sato, H., Wananabe, Y., and Miyata, H. 1990. Virucidal effect of ozone treatment of laboratory animal viruses. *Jikken Dobutsu* 39:223-229.

13.Sheldon, B.W. and Brown, A. L. 1986. Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. *J. Food Sci.* 51 :305-309.

14. Menna, L. F., Piccirillo, A., Calabria, M., Conzo, G., Fioretti, A., Papparella, V., 1997. uso dell'ozono come disinfettante del guscio delle uova da cova. Atti SISVET, 483-484.

15.Sugita, H., Asai, T., Hayashi, K., Mitsuya, T., Amanuma, K., Maruyama, C., and Deguchi, Y. 1992. Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, and *Vibrio anguillarum* from seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*58:4072-4075.

16. Yamayoshi, T., and Tatsumi, N. 1993. Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp. Clin. Res.* 19:59-64.

Riferimenti Legislativi

1) DECRETO LEGISLATIVO 30 DICEMBRE 1992 N 531

Attuazione della direttiva 91/493/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca, tenuto conto delle modifiche apportate dalla direttiva 92/48/CEE che stabilisce le norme igieniche minime applicabili ai prodotti della pesca ottenuti a bordo di talune navi.

2) Regolamento (CE) n. 2406/96 del Consiglio del 26

novembre 1996 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca.

IX. RICERCA DI *Listeria monocytogenes* IN CAMPIONI DI SALMONE AFFUMICATO CONFEZIONATO SOTTOVUOTO

IX.1. *Listeria monocytogenes* nella lavorazione di prodotti ittici

Listeria monocytogenes è un microrganismo capace di grande adattabilità e resistenza e quindi in grado di sopravvivere in ambienti ostili ed in matrici alimentari di origine animale e vegetale. Essendo largamente diffuso ed essendo un microrganismo resistente, riesce facilmente a contaminare carni, preparazioni di carne, prodotti della pesca, pollame, prodotti carnei del salumificio. prodotti di gastronomia, piatti pronti. La sua tenacità è dovuta a diversi fattori; uno di questi è la capacità di formare biofilm su varie superfici, acquisendo resistenza ai detergenti e ad altri agenti biocidi; un secondo fattore è la sua capacità di vita intracellulare; un terzo fattore è la sua capacità di condurre vita quasi parassitaria più che simbiotica, con altre cellule microbiche, sfruttando il loro metabolismo usandole come scudi protettivi, legandosi ad esse tenacemente fino a formare “colonie miste”, difficili a separarsi: fenomeni che sono stati descritti sia per matrici alimentari che per terreni colturali. Possiede buona resistenza ai trattamenti termici più blandi e pertanto si può ritrovare su prodotti di origine animale insufficientemente bonificati col calore nei quali era presente a livelli elevati.

Vi è una diffusa propensione, fra i tecnologi alimentari, a ritenere conclusa una linea di produzione col processo termico di stabilizzazione e bonifica, trascurando le fasi successive che avvengono su superfici esposte ed in ambienti a volte mal sanificati e quindi inquinanti.

Le operazioni post-processo nell'industria degli alimenti di origine animale sono in molti casi responsabili dell'inquinamento da *Listeria* nei prodotti finiti. *Listeria monocytogenes* rappresenta un pericolo per la salute pubblica per la gravità della sintomatologia clinica ivi compresa la morte , in particolar modo di soggetti immunodepressi. Dai dati riportati dalla Commissione della UE dal 2003 ad oggi si rileva che i casi di listeriosi segnalati sono in aumento. La prevalenza di contaminazione da *Listeria monocytogenes* è accentuata negli alimenti pronti per il consumo (ready to eat foods-RTZ). Gli alimenti a maggior rischio che devono essere presi in considerazione sono quelli in grado di favorire la crescita della listeria durante la shelf-life e che vengono consumati senza essere sottoposti a trattamento idoneo a distruggere la *Listeria*. Pertanto voluto valutare abbiamo la presenza di *Listeria monocytogenes* in campioni di salmone affumicato confezionato sottovuoto .

IX.2.Materiali e metodi

Sono stati esaminati 15 lotti di salmone affumicato confezionato sottovuoto prodotti da ditte Italiane e del nord Europa. Ogni lotto era costituito da 5 unità campionaria (u.c.) di salmone affumicato affettato sottovuoto di 100 g cad. per un totale di 75 u.c.

Tutte le u.c. dei differenti lotti, come riportato in etichetta erano costituiti da salmone affumicato allevato (*Salmo salar*), sale e fumo.

Le confezioni sono stoccate in frigorifero munito di termoregistratore a temperatura compresa tra 0 e + 4°C come indicato in etichetta (un solo produttore indicava la temperatura di + 5°C) e analizzati ad una settimana dalla data indicata di durata minima.

Su ogni u.c. sono state valutate le caratteristiche organolettiche ed è stata eseguita la ricerca di :

- ***Listeria monocytogenes***: LEBB+UVM 1 a 37°C per 24 ore, semina della brodo cultura 1 in LEBB+UVM 2 a 37°C per 24 ore, isolamento della brodo cultura 2, previa diluizione e non in KOH, su Palcam MEDIUM incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizione di microaerofilia e successiva identificazione mediante l'utilizzo del kit Api Listeria (Biomerieux).

IX.3. Risultati e Conclusioni

Listeria monocytogenes è stata isolata in 4 u.c., di cui 3 u.c. risultavano appartenenti allo stesso lotto. In altre 3 u.c. è stata isolata rispettivamente *L. innocua*, *L. gray* e *L. seeligeri*. I dati confermano che l'affumicatura blanda del salmone è in grado di ridurre le flore microbiche di superficie, selezionando la *Listeria* che alla fine si ritrova in colture pressoché pure e capaci di crescita a temperatura di refrigerazione ed in assenza di ossigeno. *Listeria* si rivela essere un microrganismo molto autoctono: ossia nelle fabbriche ove si è instaurato viene costantemente reperito nell'ambiente, dal quale passa ai prodotti alimentari; in altre fabbriche, analoghe per tipologie produttive, non viene mai o quasi mai ritrovato. Sono due situazioni opposte ma molto stabili e durevoli; spesso la differenza è dovuta al fatto che nelle prime si lava male e non si fa la detersione, nelle seconde, lavaggio e detersione sono scrupolose. La persistenza e la riemersione di *Listeria* negli ambienti e impianti alimentari osservata più volte, è dovuta spesso ad impianti ed attrezzature che ostacolano le operazioni di detersione, alla mancata esecuzione della detersione, all'uso di prodotti "misti" detergenti e disinfettanti insieme, così come li ha definiti Ottaviani. Scrive Cantoni che la detersione in alcuni ambienti dell'industria alimentare può essere fatta così bene da rendere inutile la fase di disinfezione. Nelle industrie del salmone

affumicato abbondano grassi che danno origine a film che proteggono i batteri. In queste industrie, prima dei disinfettanti devono operare e infierire vapore saturo ed aria compressa, presidi che sono sempre largamente disponibili. Skovgaard, studiando l'ecologia di *Listeria* nella catena alimentare, concludeva una sua ricerca affermando che un programma di sanificazione con efficacia inferiore al 100% e non mirato contro *Listeria*, semplicemente favorisce *Listeria*; affermava inoltre che l'eliminazione dei microrganismi saprofiti che bilanciano o sono antagonisti di *Listeria*, dà luogo a "fioriture" di *Listeria*. Questo fenomeno è stato ripetutamente confermato da vari ricercatori.

Poiché a tutt'oggi, igienisti e tecnologi riuniti, non si è in grado di prevenire la contaminazione degli alimenti, è forse più produttivo indirizzare gli sforzi sulla prevenzione della moltiplicazione negli alimenti e nel contenimento a livelli minimi di *Listeria* sui prodotti alimentari. Questo, secondo Giolitti è il vero problema concernente le listeriosi. Bassi livelli di *Listeria monocytogenes* sono sempre stati presenti, seppur non individuati né identificati, su materie prime e prodotti finiti. Per il passato sono stati tollerati dalle legislazioni di vari Paesi tra cui Germania, Olanda e Francia livelli tollerabili di 100/1000 *Listeria monocytogenes*/g al momento del consumo, mentre Italia e Stati Uniti richiedevano assenza in 25 g di prodotto al momento del consumo (tolleranza zero); Canada e Danimarca tolleravano meno di 100 unità/g di *Listeria monocytogenes* per alcuni prodotti e

tolleranza zero per altri, in particolare per quelli che consentono la moltiplicazione ed hanno vita commerciale prolungata. Attualmente il *Regolamento CE n.2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari* nei criteri di sicurezza alimentare prevede:

Categoria alimentare	Piano di campionamento		Fase a cui si applica il criterio
	n	Limiti	
Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L.monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti o a fini medici speciali	5	100 ufc/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	5	Assente in 25g	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L.monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti o a fini medici speciali	5	100 ufc/g	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

È pertanto necessario conoscere i substrati sui quali *Listeria* può crescere e tener d'occhio le scadenze dei prodotti. Il mantenimento di livelli bassi di *Listeria monocytogenes* deve protrarsi fino al termine della vita commerciale

indicata in etichetta nei prodotti confezionati. I test di shelf-life effettuati per valutare la capacità o l'incapacità di *Listeria monocytogenes*, sono più reali se condotti a 8°C e non a 4°C, perché quest'ultima temperatura esiste solo in una catena del freddo virtuale. Dalla valutazione dei dati ottenuti emerge l'opportunità di fissare per il salmone affumicato un periodo di conservazione non superiore a quaranta giorni qualora la temperatura di stoccaggio sia di +2°C. Questo attualmente potrebbe rappresentare un margine di sicurezza.

**X. CREAZIONE DI CEPPI MUTANTI DI *Listeria*
monocytogenes:ANTIBIOTICORESISTENZA E LORO RISPOSTA
ALL’AZIONE DI ANTIMICROBICI NATURALI**

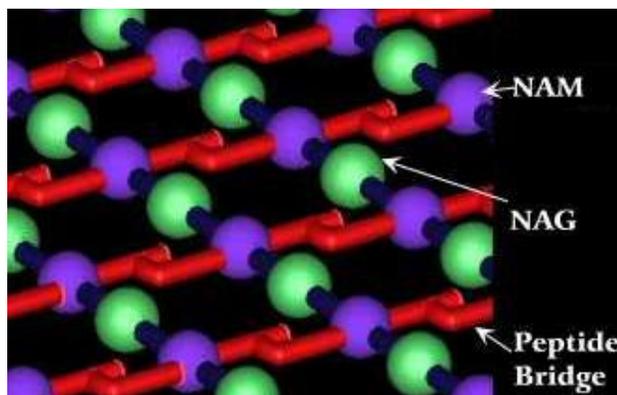
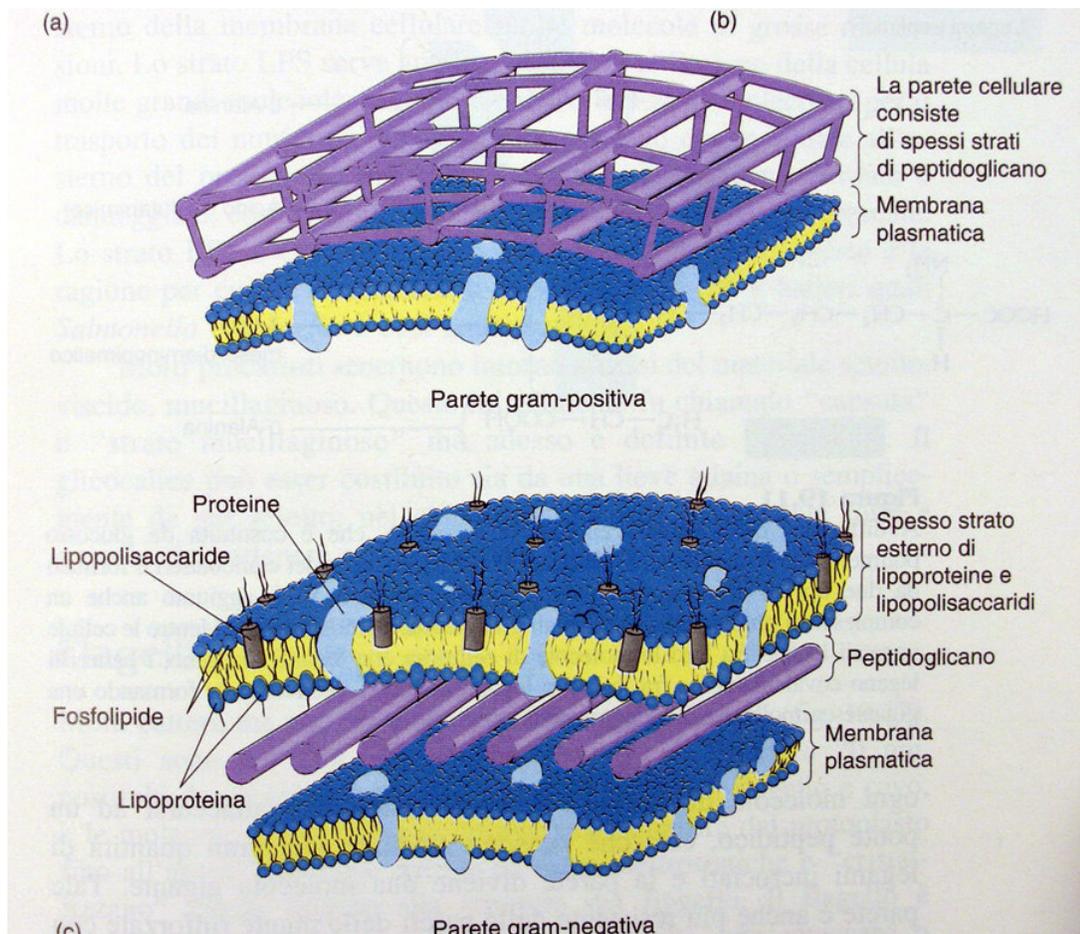
X.1.Premessa

I batteri possono essere suddivisi in due gruppi principali:**Gram-positivi** e **Gram-negativi**. La distinzione si basa su una particolare tecnica di colorazione; alla base della diversità di risposta alla colorazione di Gram vi sono differenze di struttura della parete cellulare. La parete cellulare delle cellule Gram-negative è una struttura pluristratificata piuttosto complessa, mentre la parete cellulare dei Gram-positivi è costituita essenzialmente da un unico tipo di molecola ed è in genere più spessa. Lo strato rigido dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi ha una composizione chimica molto simile. Questo strato, detto peptidoglicano (o mureina) è una sottile lamina costituita da due derivati polisaccaridici, l'**N-acetilglucosamina(NAG)** e l'**acido N-acetilmuramico(NAM)**, e da un piccolo gruppo di amminoacidi rappresentato da: **D-alanina, acido D-glutammico , o in alternativa acido diaminopimelico, L-alanina e lisina.**

Le catene di glicano costituite da zuccheri sono tenute insieme da legami crociati peptidici tra aminoacidi. La robustezza propria della struttura peptidoglicanica si ottiene soltanto quando queste catene vengono unite tra loro da aminoacidi mediante questi legami crociati.

·Nei batteri Gram-negativi i legami sono rappresentati generalmente da un legame peptidico diretto tra il gruppo amminico dell'acido diaminopimelico e il gruppo carbossilico della D-alanina terminale.

·Nei batteri Gram-positivi i legami crociati sono costituiti da un ponte peptidico ed il tipo e il numero di legami crociati varia in modo caratteristico da un organismo all'altro. Ad esempio nello *Staphylococcus aureus*, l'organismo Gram-positivo maggiormente studiato, ogni ponte peptidico è costituito da cinque molecole dell'aminoacido glicina, collegate tra di loro da legami peptidici. Si ritiene che la **forma** della cellula sia determinata dalla lunghezza delle catene di peptidoglicano e dal tipo e dalla quantità di legami crociati tra le diverse catene.



I Batteri Gram-positivi non hanno lo strato polisaccaridico esterno, ma sono generalmente dotati di polisaccaridi acidi associati alla parete cellulare, detti **acidi teicoici** (dal greco teichos, “parete”). A causa della loro carica negativa, gli acidi teicoici sono in genere responsabili della carica complessivamente negativa della superficie cellulare e possono contribuire al passaggio di ioni

attraverso la parete cellulare. Esistono 2 classi di acidi teicoici. L'acido lipoteico si trova sulla superficie, incluso nello strato ed unito alla membrana citoplasmatica. L'acido teicoico si trova sulla superficie ed è attaccato solo allo strato di peptidoglicano. L'acido teicoico è anche responsabile delle proprietà antigeniche del microrganismo.

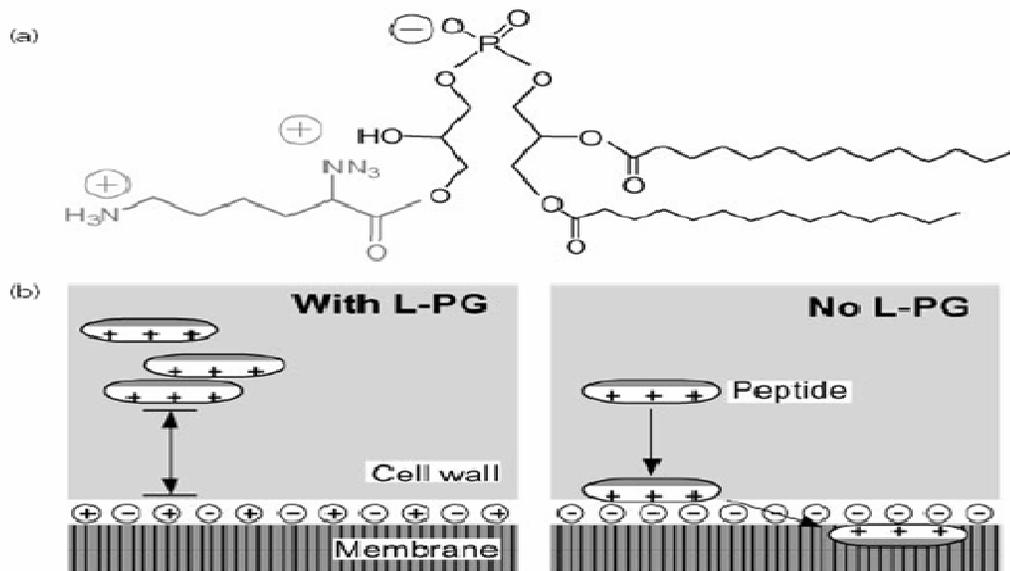
Una strategia comune per gli organismi viventi di inibire la crescita di batteri è la produzione di peptidi ad azione antibatterica che danneggiano la membrana cellulare. Tali peptidi, dotati normalmente di carica positiva, interagiscono molto bene con le membrane esterne dei batteri dotate di cariche anioniche. Tra queste molecole possiamo ricordare i Peptidi antimicrobici cationici (CAMPs) prodotti come primo mezzo di difesa dagli organismi superiori (animali, uomo, piante), ma anche alcune batteriocine prodotte da taluni batteri appartengono alla stessa classe di molecole. I meccanismi di difesa dei batteri nei confronti di tali agenti cationici sono da ascrivere alla modulazione della carica elettrica dell'envelope cellulare determinando una diminuzione dell'accumulo di questi antibatterici. Tra questo tipo di risposte annoveriamo la modificazione degli acidi teicoici e del Lipide A rispettivamente nei Gram positivi e negativi, con l'introduzione di residui di D-alanina. La D-alanina, carica positivamente determina una modificazione della carica netta totale.

Inoltre sia i Gram+ che Gram- modificano, in risposta ai CAMps ,la carica negativa dei fosfolipidi della membrana citoplasmatica con l'introduzione della L-lisina.

L'incorporazione dei residui di D-alanina è dovuta in *Listeria monocytogenes* all'azione di 4 proteine DltA,B,C,D codificate dall'operon dlt:

1. DltA provvede alla D-alaninizzazione del carrier DltC ;
2. DltB provvede all'efflusso dell'D-alanina;
3. DltD invece è una proteina transmembranaria che potrebbe avere funzioni diverse.

Il gene *mprf* è invece responsabile in *Listeria monocytogenes* della sintesi di lisilfosfatidilglicerolo (L-PG).La sua presenza, scoperta in *Staphylococcus aureus*, è stata identificata anche in altre specie batteriche tra cui *Listeria*. La proteina prodotta da *mprf* determina la lisinazione dei fosfolipidi di membrana ad opera della L-PG modificando la carica degli stessi determinando l'inserimento di cariche positive che respingono i CAMPs. (fig).



Il gene *VirR* è un regolatore di risposta critico per la virulenza di *Listeria monocytogenes*. In sua assenza si riduce di molto la capacità di *Listeria* ad invadere le cellule. Il gene *virr* regola anche l'attività di altri geni tra cui l'operon *dlt* e *mprf*. Questi ultimi due sono dotati di siti di consenso per *virr* costituiti da una sequenza poliandromica di 16 pb posto 21 pb a monte del gene stesso.

X.2.Nisina

X.2.1.Generalità

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente sforzo finalizzato alla ricerca di nuovi prodotti deputati alla protezione gli alimenti dalla contaminazione microbica. Attualmente esiste una grande varietà di prodotti chimici che si utilizzano nell'industria per la conservazione degli alimenti, ma nonostante la conservazione con sostanze chimiche di sintesi fornisca molti vantaggi, i consumatori sono sempre più attenti agli eventuali effetti tossici. Per queste ragioni, i produttori si indirizzano sempre più, verso la ricerca di sostanze additive alternative, possibilmente di origine naturale, per ridurre o evitare i conservanti chimici tradizionali. Anche se l'ingrediente di origine naturale è generalmente meglio accettato, perché ritenuto binomio di innocuità e sicurezza, tuttavia non è però semplice coniugare, l'origine e la sicurezza, con l'efficacia ed applicabilità nella industrializzazione dei processi di produzione. I sorbati, ad esempio, sono usati normalmente per combattere funghi e lieviti ma non sono battericidi, e per ampliare lo spettro di attività devono essere associati ad altre sostanze. Come è noto, gli antibiotici vengono prodotti dai microrganismi, batteri, muffe, ecc., allo scopo di contrastare lo sviluppo di altri microrganismi loro competitori. A questo proposito, un'interessante

classe di sostanze é rappresentata dalle batteriocine, piccole proteine con spiccate capacità antimicrobiche prodotte da determinati ceppi di batteri. L'impiego di batteriocine come biopreservanti è stata ampiamente valutato, e si é dimostrato una strategia efficace nel controllo dei microorganismi patogenici. A questo gruppo appartiene la Nisina, un lantibiotico, costituito da peptidi antimicrobici, caratterizzati dalla presenza dell'amminoacido lantionina, derivante da modificazioni posttraduzionali. La Nisina è una batteriocina prodotta dal ceppo *Lactococcus Lactis* (microorganismo probiotico) o da *Streptococcus Lactis*. Isolata nel 1928, è stata introdotta come antimicrobico in alcuni alimenti negli anni '50 e da allora si utilizza per il controllo del deterioramento batterico degli alimenti termolaborati che si conservano a pH acido. E' un agente antimicrobico efficace contro un'ampia gamma di batteri Gram ⁺, cellule vegetative e spore.

X.2.2.Meccanismo d'azione

La Nisina è un peptide amfifilico e idrofilo e sono almeno due i meccanismi d'azione ipotizzati :

1. nel primo caso si ipotizza che, similmente ai macrolidi polienici, le batteriocine formino nella parete batterica un "poro" nel quale i monomeri delle medesime si uniscono e polimerizzano con effetto sulla pressione osmotica cellulare;

2. Nel secondo caso si ipotizza che le batteriocine destabilizzino la membrana agendo da tensioattivi

. Nel primo meccanismo si spiega l'influenza del pH sull'azione della Nisina in quanto il legame Nisina-batteri avviene per interazione elettrostatica con la carica negativa dei fosfolipidi di membrana, seguita da un ri-orientazione che dipende dal potenziale di membrana del microrganismo. Studi con marcatori fluorescenti hanno dimostrato come il grado di interazione della Nisina con il bilayer lipidico dipenda dalla concentrazione della stessa batteriocina. Il grado di tale binding determina l'efflusso di ATP intracellulare che porta a morte cellulare. Si è potuto inoltre riscontrare che, a pH neutro, si hanno meno molecole di Nisina legate sulla superficie. Recenti studi hanno rivisto però il meccanismo della formazione del poro, che non sembra descrivere adeguatamente il meccanismo delle batteriocine: è stato osservato il binding della Nisina con il lipide II di membrana che controlla la sintesi della parete cellulare.

X.2.3. Stabilità e condizioni di utilizzo

La stabilità della molecola, la solubilità e la relativa attività antibatterica sono pH dipendenti, esse diminuiscono all'aumentare del pH. La Nisina ha un punto isoelettrico nel range alcalino, quindi la carica netta sulla superficie della molecola dovrebbe essere più alta a valori di pH acidi che neutri. Il

massimo di adsorbimento della Nisina sulle cellule batteriche è stato osservato a pH 6.5, e meno della metà è assorbito a pH 4.4. Queste considerazioni confermano che la Nisina presenta l'attività antimicrobica più alta a pH acido. Infatti in condizioni basiche l'attività si perde rapidamente a causa della vicinanza al punto isoelettrico della proteina (30', 63°C a pH 11) e questo può rappresentare un limite alle sue possibilità formulative. Per quanto riguarda la termostabilità della Nisina, le soluzioni al 2% sono stabili entro range di temperature che vanno da 2 a 121°C senza perdita di attività. La quantità di Nisina normalmente utilizzata nella conservazione degli alimenti è totalmente solubile in acqua, ma insolubile nei solventi non polari. Si utilizzano normalmente da 50 a 100 g per tonnellata di prodotto.

X.2.3. Tipologia di alimenti conservabili

Studi recenti hanno dimostrato la capacità conservante della Nisina su un'ampia gamma di prodotti alimentari tra i quali: condimenti a pH acido (maionese, ketch-up, salse) e prodotti come succhi di frutta e sughi. E' stata utilizzata per la conservazione del tofu, latte fermentato, ricotta e yogurt, carne e soprattutto in oriente per il pesce (salmone affumicato e altre tipologie ittiche associandola ad atmosfera controllata) e pure di patate, dove è indicata rispetto ad altri conservanti vista la resistenza alla pastorizzazione.

X.2.4. Spettro antimicrobico

La Nisina è risultata efficace come conservante del deterioramento microbico dato da microrganismi quali la *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus fructivorans* un microrganismo normalmente presente nelle salse e condimenti, dalle spore di *Bacillus Subtilis* e *Clostridium* nella purea di patate, *Staphylococcus aureus* meticillino resistenti e *Enterococchi* Vancomicina resistenti, *B. thermosphacta*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*. L'azione sui Gram⁻ (*Salmonella Typhimurium*) si ottiene con l'associazione ad agenti in grado di allargare il suo spettro come gli agenti sequestranti i metalli (EDTA). Si è dimostrata una delle più efficaci batteriocine nei confronti del *Bacillus cereus* (Batterio enterotossigeno) che è un noto contaminante dei prodotti per l'infanzia.

X.2.5. Tecnologia della conservazione con nisina

Applicazioni particolari sono state effettuate nella filmatura, coating per alimenti. Si è dimostrata attiva contro la *Salmonella Typhimurium* per la conservazione del pollo, rinforzata dall'uso di chelanti quali l'EDTA (5 mM) e con concentrazioni di Nisina 100, 300 e 500 mg/ml (coating con acido citrico 3%, 0.5% Tween 80 0.5% calcio arginato)¹⁵. In associazione con lisozima è stata utilizzata in via sperimentale nel coating del prosciutto¹⁹. Sono stati realizzati coating con Nisina e acido laurico valutandone l'azione

verso la specie microbica *Listeria monocytogenes*. I film con idrossimetilpropilcellulosa servono per ridurre l'umidità che favorisce la crescita batterica. L'aggiunta di acidi grassi alla Nisina ne migliora le proprietà antimicrobiche¹⁹. Ovviamente tale prodotto non può essere utilizzato, in quanto “ostacolo” alla crescita microbica, in tutti quei prodotti alimentari che necessitano di elaborazione da parte di microrganismi: maturazione del prosciutto, fermentazione del latte, ecc.

X.2.6.Potenziamiento d'azione

La Nisina è in grado di inattivare la flora microbica Gram⁺ in quanto capace di ridurre la permeabilità della membrana citoplasmatica. Al contrario, i batteri Gram⁻, possedendo una membrana esterna impermeabile alla Nisina, non ne vengono influenzati. Pertanto, la Nisina, di per sé, non inibisce importanti patogeni quali *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Yersinia enterocolitica*, mentre è letale per *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. e *Listeria monocytogenes*. Al fine di incrementarne l'efficacia, sono state valutate associazioni con altre sostanze naturali che hanno mostrato esplicare un'azione sinergica con la Nisina.

Sono stati individuati i seguenti effetti:

- Aumento dell'azione inibitoria della nisina nei confronti dei batteri Gram⁺ in seguito a trattamenti combinati con oli essenziali (carvacrolo, timolo e

carvone estratti rispettivamente da origano, timo e semi di cumino).

- Incremento dell'effetto della nisina e del carvone (estratto da cumino e aneto) nei confronti di *Listeria monocytogenes*, utilizzati in combinazione con lisozima.

- Aumento dell'effetto della nisina nei confronti dei batteri Gram⁺ in seguito all'aggiunta di esteri del saccarosio (emulsionanti).

- Aumento dell'azione della nisina utilizzata in combinazione con una batteriocina simile alla pediocina

- Prolungamento della shelf life di carne di manzo e pesce fresco mediante combinazione del trattamento con nisina con il confezionamento in atmosfera protetta.

- Aumento dell'azione della nisina utilizzata in combinazione con altri microrganismi protettivi in tofu e succhi di frutta

- Effetto sinergico di inattivazione di *Bacillus cereus* derivante dall'impiego combinato di nisina e di trattamenti con campi elettrici pulsati

- Permeabilizzazione della membrana esterna dei batteri Gram⁻ in associazione con EDTA e con esametafosfato di sodio (NaHMP)

X.2.7.Sicurezza d'impiego

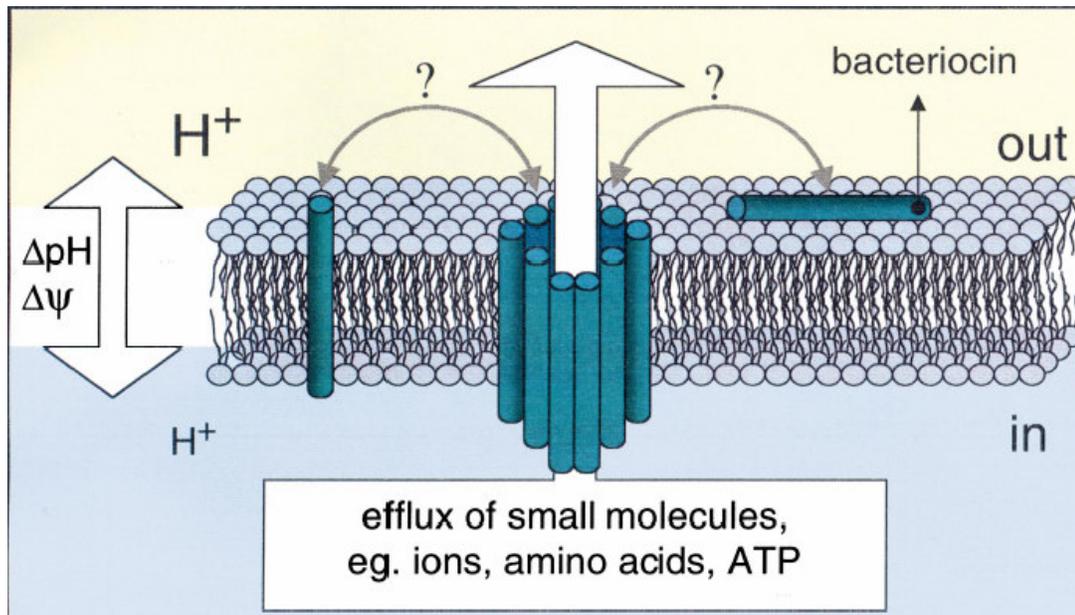
La Nisina è stata valutata e approvata come conservante alimentare per il controllo batterico (FAO/OMS 1969a), ed è identificato con il numero E234. Attualmente la Nisina è inserita nella categoria dei GRAS (Generally Recognized As Safe = generalmente riconosciuto come sicuro) da parte della FDA (Food and Drug Administration, USA). Solo alcuni tipi di batteriocine mostrano lieve tossicità, ma anche in questi casi l'ingestione a lungo termine viene considerata priva di conseguenze sulla salute .

X.2.8. Altre applicazioni

La Nisina per le sue caratteristiche amfifiliche e proprietà adsorbenti, unitamente alla non tossicità e attività antimicrobica si configura come un candidato interessante per essere impiegato come emulsionante per la preparazione di emulsioni O/A, nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica. Una valutazione sperimentale delle capacità emulsionanti e stabilizzanti della Nisina ha evidenziato una significativa capacità emulsionante, ma che si presenta fortemente dipendente dal pH e dalla concentrazione.

X.3.LACTICINA 3147

Lacticin 3147 è una batteriocina composta da due componenti prodotta da *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147 (Ryan *et al.*, 1996; McAuliãe *et al.*, 1998). Entrambi i componenti, due peptidi contenente lantionina, LtnA1 and LtnA2, la cui massa è di 3,306 Da and 2,847 Da, rispettivamente sono necessari per l'attività della batteriocina che agisce formando dei pori ioni specifici nella membrana dei batteri Gram+ (McAuliãe *et al.*, 1998). La Lacticin 3147 appartiene alla classe degli antimicrobici nota come lantibiotici (Ryan *et al.*, 1999), un gruppo di peptidi modificati dopo la trascrizione caratterizzati dalla presenza di una grossa quantità di amminoacidi atipici tra cui lantionina e b-metillantionina (Schnell *et al.*, 1988; Sahl *et al.*, 1995). I geni per la produzione e l'immunità della lactacina 3147 sono codificati su un plasmide di 60.2kb pMRC01. E' stato proposto che tutti i 10 ORFs identificati in pMRC01 sono coinvolti nella sintesi della lactacina 3147 sulla base delle analisi condotte su altri lantibiotici. La lactacina 3147 mostra un'attività battericida nei confronti di un'ampia varietà di batteri Gram+. I pori che vengono formati all'interno della membrana sembrano essere abbastanza grandi da permettere la fuoriuscita di ioni ma non di molecole più grosse quali l'ATP. La perdita di ioni determina una immediata dissipazione del potenziale di membrana e l'idrolisi dell'ATP determinando anche una diminuzione notevole del potenziale pH e in fine la morte della cellula.



E' attiva a pH neutro ed è stato dimostrata la sua azione battericida in vitro nei confronti di streptococchi e stafilococchi.. La presenza di questi residui amminoacidici è stata identificata per la prima volta nella nisina e successive analisi hanno dimostrato che la lantionina e la β -metillantionina derivano dalla deidratazione dell'amminoacido serina e treonina. Questi amminoacidi deidratati posseggono un centro elettrofilico che gli permette di reagire con l'attiguo residuo di cisteina. La lacticina 3147 è stata utilizzata sperimentalmente per controllare le qualità microbiologica nella produzione di formaggio riducendo la flora non starter durante la stagionatura. La produzione di formaggio ,utilizzando coltura starter anche il *L. lactis* Dpc 3147 , consente un'abbassamento della flora di ben 2 Log. In formaggi

stagionati, l'utilizzo di ceppi produttori di lacticina 3147 ha consentito un abbassamento di 3 Log di *L. monocytogenes*.

Considerata la pericolosità di *Listeria monocytogenes* presso la BIOTRANSFERT UNIT dell'University College Cork (UCC), ho focalizzato l'attenzione sui sistemi di difesa di *Listeria monocytogenes* nei confronti determinati agenti antimicrobici.

A tal fine dapprima sono stati creati 3 mutanti del ceppo EGDe di *Listeria monocytogenes* e precisamente *L. monocytogenes*, Δ MprF, Δ DltA, e Δ VirR ognuno dei quali difetta di un determinato gene. E' stato quindi studiato il comportamento di tali ceppi mutati in presenza di diverse concentrazioni di nisina e di lacticina 3147 prodotta da ceppi di *Lactococcus lactis*.

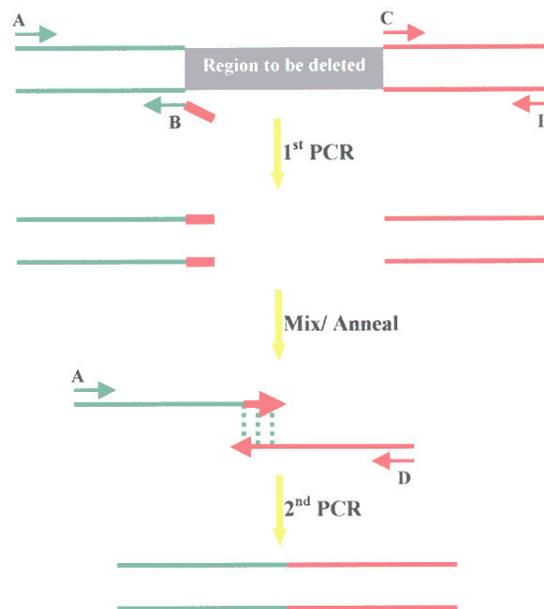
X.4. Materiali e Metodi

X.4.1. Creazione dei ceppi mutanti

La creazione dei mutanti è stata ottenuta tramite SOE-ing PCR (splicing by overlap extension) metodo che assicura la completa e precisa delezione di un gene tramite l'utilizzo di due coppie di primers che amplificano le regioni a monte e a valle del gene in questione. I primers, denominati A, B, C, e

D,sono disegnati in modo tale che i tratti terminali delle due molecole contengano sequenze complementari.

Si esegue una prima PCR, utilizzando i primers A e B ,allo scopo di amplificare la regione a monte del gene in questione .Una seconda viene effettuata, utilizzando i primers C e D, per amplificare la regione a valle. I due prodotti così ottenuti vengono estratti dal gel quindi mixati,e sottoposti ad una nuova amplificazione utilizzando i primers esterni A e D. Successivamente con la denaturazione si creano filamenti di Dna a singola elica che veicolano sequenze complementari. I singoli filamenti si appaiano tramite la sequenza complementare che funge da primers. L'estensione dell'area appaiata ad opera della DNA polimerasi da luogo a una molecola di Dna a doppio filamento in cui le due molecole originali sono legate insieme con la completa delezione della regione interposta.



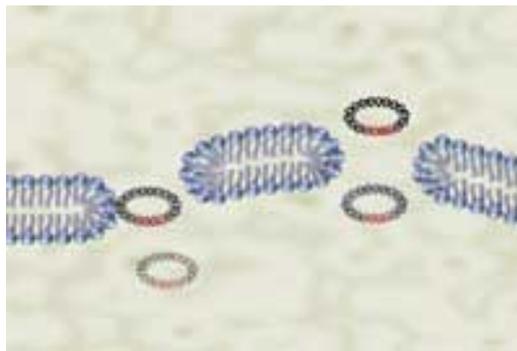
Nel nostro caso sono state utilizzate 2 coppie di primers per ogni gene da eliminare I primers utilizzati sono i seguenti:

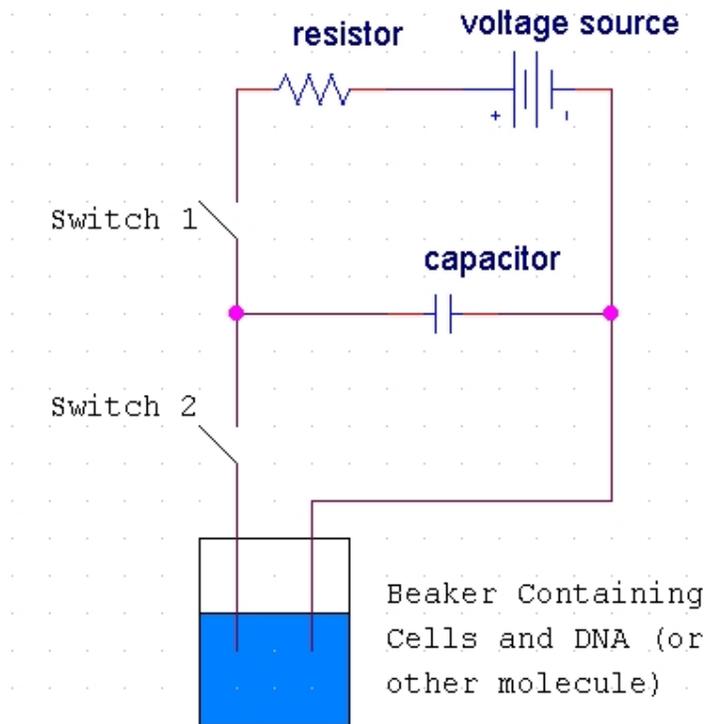
<i>NOME PRIMER</i>	<i>SEQUENZA DEL PRIMER</i>
DltAsoe A(EcoR1)	A <u>AGAATTC</u> CATGCATGGGCAGAG
DltAsoeB	GTTGTTAGGCAGCTCTTCTG
DltAsoeC	CAGAAGAGCTGCCTAACACGGTTATCAAGCCTATCGCACA
DltAsoeD(Sma1)	ATT <u>CCCGGG</u> GGATCATGTATGC
MprFsoeA(EcoR1)	A <u>AGAATTC</u> CATGCAAGCCTATGC
MprFsoeB	AGTAAAGGTATTCGTAATCC
MprFsoeC	GGATTACGAATACCTTTACTGGTTTCTCATTAGGATTCTTC
MprFsoeD(Sma1)	AAG <u>CCCGGG</u> TAATCGTTCACCTAG
VirRsoeA(EcoR1)	AT <u>GAATTC</u> CAAGCAGGTATGGC
VirRsoeB	CACTTCTACATCTTCTACGAT
VirRsoeC	ATCGTAGAAGATGATGAAGTGCAAGGATATATGATTGAATG
VirRsoeD(Sma1)	ATT <u>CCCGGG</u> AATAACATCCCAGTC

I frammenti così ottenuti contengono una delezione di 652.pb per *dlt*, di 654 pb per *mprf* e di 699 pb per *virr*. I frammenti Δ dltA, Δ mprf e Δ virr sono stati digeriti con enzimi di restrizione EcoR1 e Sma I e clonati all'interno del

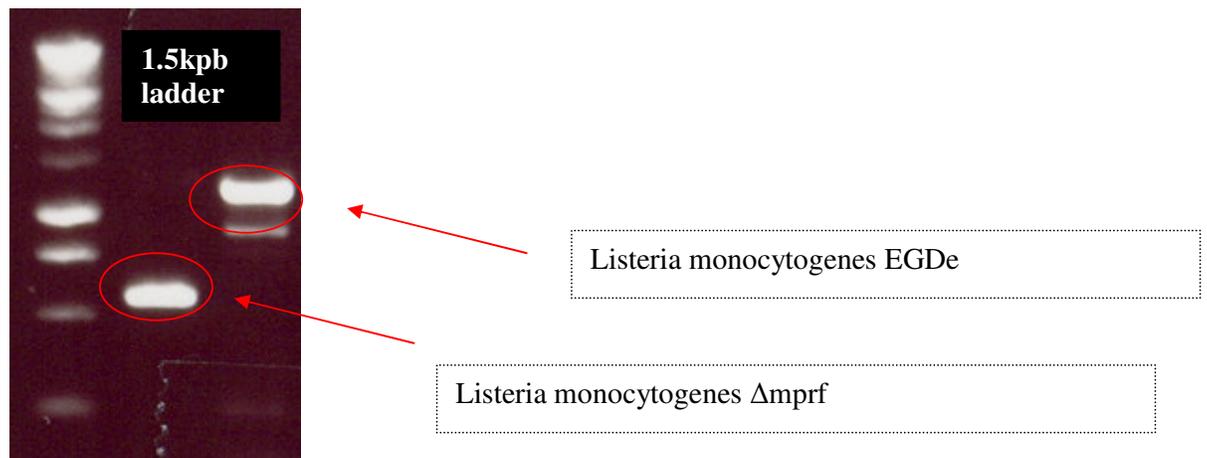
vettore cloramfenicolo sensibile PKSV7. Il plasmide risultante è stato quindi inserito tramite elettroporazione all'interno di *Listeria monocytogenes* EGDe e l'integrazione del plasmide è stata ottenuta tramite crescita dei ceppi trasformati a temperatura di 42°C in presenza di cloramfenicolo. L'escissione del plasmide dal ceppo mutante è stata ottenuta tramite passaggi seriali su BHI a 30°C. Ad intervalli regolari sono state allestite diluizioni seriali dalla brodocultura e si è proceduto successivamente al passaggio in piastre di BHI agar. Le colonie isolate sono state trasferite su BHI e BHI+Cam agar in modo da evidenziare quelle cloramfenicolo sensibili in cui si era avuta l'escissione del plasmide.

La membrana cellulare, data la sua struttura con estremità idrofobiche all'interno e all'esterno della cellula, non permette l'entrata di molecole polari tra cui il DNA. La tecnica dell'elettroporazione si basa sulla capacità del bilayer lipidico di riassemblarsi dopo un insulto esterno. Un veloce shock elettrico determina quindi una temporanea disorganizzazione della membrana plasmatica che permette l'entrata di molecole polari a cui segue una riorganizzazione della membrana stessa.





Le colonie cloramfenicolo sensibili sono state quindi trasferite in BHI broth e sottoposte ad amplificazione con i primers esterni A e D. Le colonie in cui è avvenuta la sostituzione del gene intero con quello deleto risultano quelle che presentano un prodotto di amplificazione di dimensioni ridotte.



X.4.2.Crescita in presenza di nisina

Il grado di crescita di *L. monocytogenes* EDGe, Δ VirR, Δ MprF e Δ DltA in presenza di differenti livelli di nisina(2% di inoculo in BHI broth contenente 50,100,200 o 300 μ g di polvere di nisina powder [Sigma, St Louis, Mo.]/ml) è stato valutato monitorando la densità ottica a 600 nm (OD600) con uno Spectra Max 340 spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.) in un periodo di 24h.

X.4.3.Valutazione dell'antibioticoresistenza

Per valutare la sensibilità di *Listeria monocytogenes* e dei suoi ceppi mutanti a diversi tipi di antibiotici sono stati condotti test mediante l'agar diffusione. A tal fine i ceppi posti in BHI broth dopo 24 h di incubazione con una densità ottica di 10^6 UFC/ml sono stati seminati in BHI agar.

Sulla superficie dell'agar sono stati posizionati dischetti (6 mm in diameter; Oxoid) contenenti 30 μ g di antibiotico(se non diversamente indicato).Le piastre sono poi state incubate a 37°C per una notte e successivamente è stata misurata il diametro dell'area di inibizione attorno al dischetto. La sensibilità dei differenti ceppi ai vari antibiotici è stata correlata all'ampiezza della zona di inibizione: all'aumento dell'area di inibizione corrisponde una maggiore

sensibilità. Gli antibiotici utilizzati sono i seguenti: Cefalotonina, Sulfametoxazole Trimetroprin, Ac. Nalidixico, Cefoperozonal, Minociclina, Colistina solfato (25 µg), Acido fusidico(10 µg), Novobiocina, Clindamicina, Cefotixin, Cefoteten, Rifampicina, Neomicina ,Spectinomicina(25 µg),, Bacitracina, Ampicillina(25 µg), Vancomicina, Novobiocina, Polimixina B(300 µg) e Cloramfenicolo.

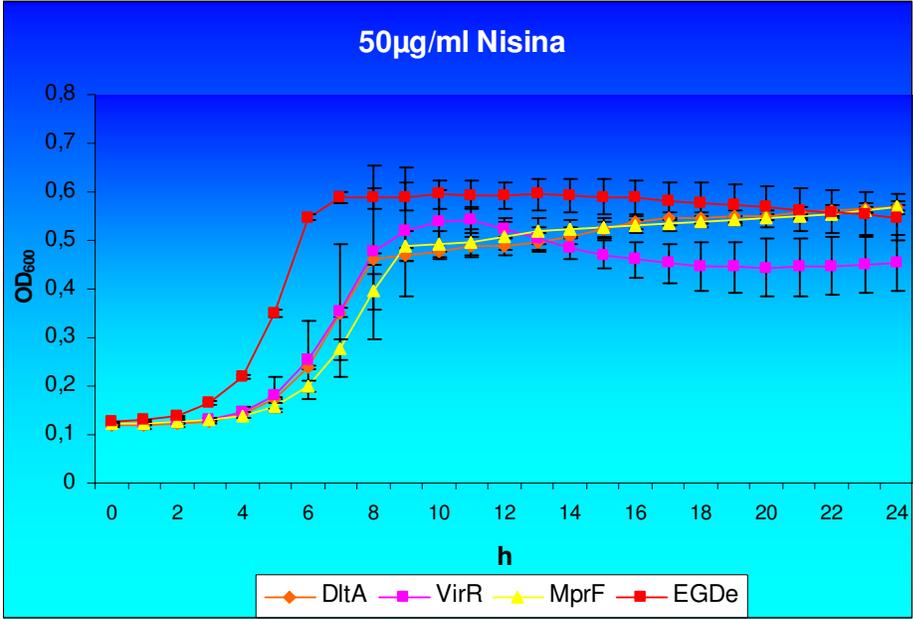
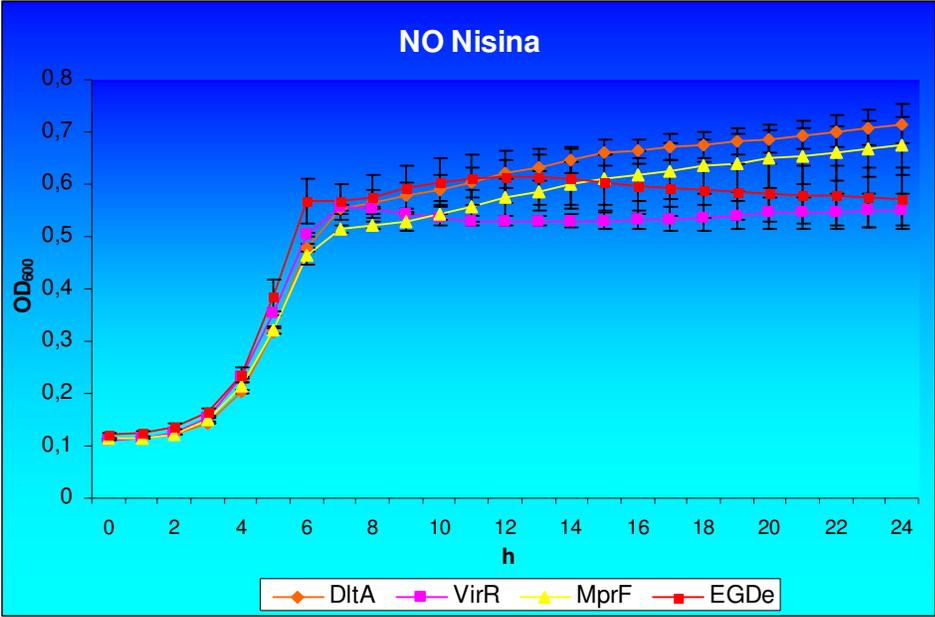
X.4.4.Spot-on-the-lawn assay

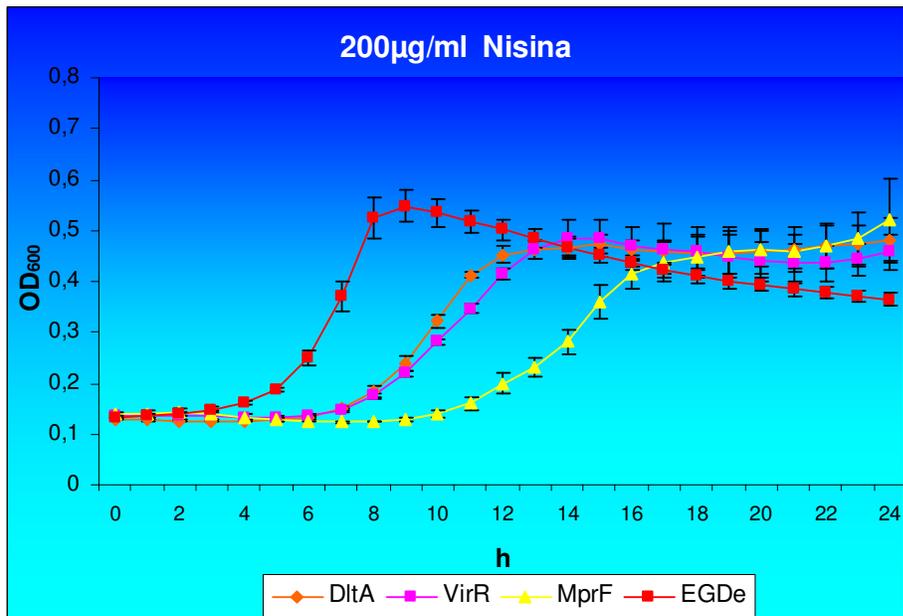
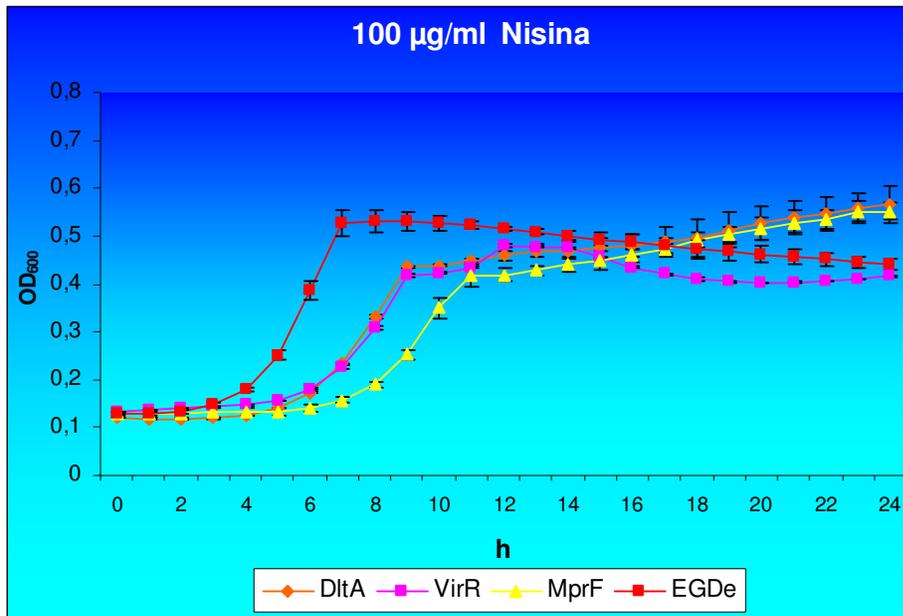
Per valutare l'azione antibatterica della lactacina è stato utilizzato il sistema spot on the lawn. A tal fine 24 diversi ceppi di *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* produttori di lactacina 3147(stoccati in glicerolo a -20°C) sono stati cresciuti in Gm17 per 24h a 30°C. Dopo 24h, 10 µl della brodo coltura sono stati trasferiti in Gm17 agar e incubati per ulteriori 24 h a 30°C al fine di ottenere colonie isolate. Singole colonie sono state poi trasferite su piastre di BHI in modo da ricavare piastre contenenti colonie isolate dei 24 ceppi di *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Le stesse sono state quindi coperte con circa 8 ml di BHI contenente l'1% di agar inoculato con *Listeria monocytogenes* e con i ceppi deleti , Δ VirR, Δ MprF e Δ DltA ad un livello di 10^6 ufc/ml. Le piastre così ottenute sono state quindi incubate a 37°C per 24 h dopodiché sono state evidenziate le zone di inibizione.

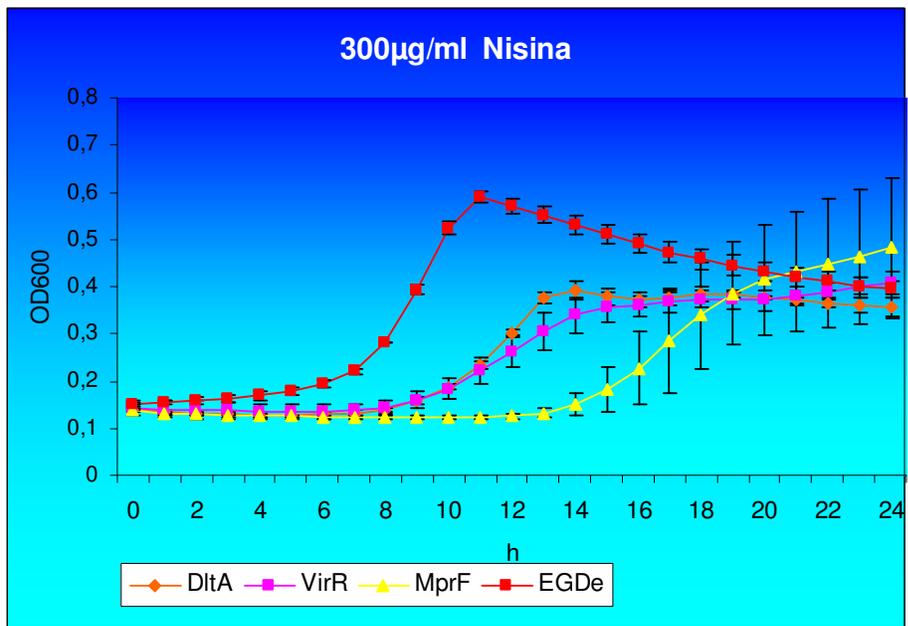
X.5.Risultati

X.5.1.Crescita in presenza di nisina

Le curve di crescita di *Listeria monocytogenes* EGDe dei suoi ceppi mutanti a diverse concentrazioni di nisina sono riportati nei grafici successivi. E' possibile osservare come fino ad una concentrazione di nisina pari a 100 µg/ml non esistono differenze significative di crescita tra il ceppo selvaggio e i ceppi mutanti. Diversamente da una concentrazione di nisina di 200 µg/ml si verifica una marcata differenza tra il ceppo EGDe e il ceppo Δ MprF che presenta una Lag phase notevolmente più lunga. Ad una concentrazione di nisina di 300 µg/ml c'è un'accentuazione del divario tra i ceppi deleti ed il ceppo EGDe che presenta una Lag phase ridotta rispetto agli altri ceppi e inoltre ha valori di densità ottica maggiore rispetto agli altri. Il gene *mprf* si dimostra quindi essenziale per la crescita di *Listeria monocytogenes* in presenza di nisina anche a concentrazioni contenute mentre i geni *dlta* e *virr* pur influenzando la crescita di *Listeria monocytogenes* risultano avere un'azione meno marcata.

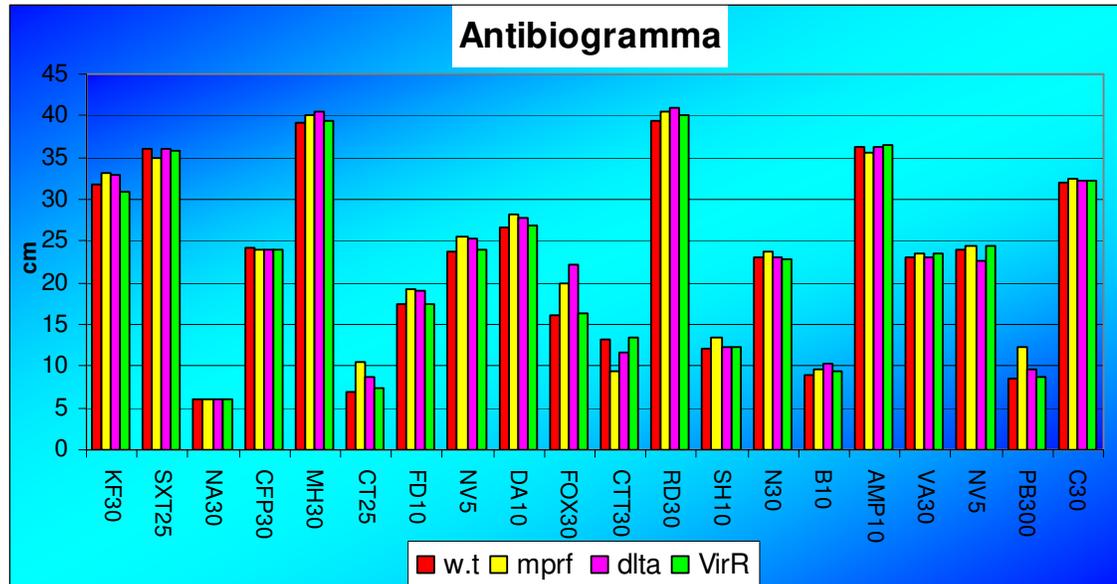






X.5.2 Antibiotico resistenza

I risultati dell'antibiogramma sono riportati nel grafico sottostante.



Non si evidenziano differenze significative tra il ceppo selvaggio e i mutanti Δ VirR e Δ DltA. Differenze significative sussistono invece tra il ceppo selvaggio EGDe e il mutante Δ MprF ($P < 0,05$). Le differenze riguardano soprattutto i valori di Polimixina B e Colistina solfato che risultano più efficaci nell'inibizione della crescita del ceppo Δ MprF. La Polimixina B e la Colistina appartengono alla classe di antibiotici nota come **POLIPEPTIDI CICLICI SURFATTIVI**. La polimixina B è stata isolata nel 1947 da un bacillo, *B. polymyxa*; la colistina viene estratta da *Aerobacillus colistinus*. La colistina A è identica alla polimixina E. Chimicamente, si tratta di decapeptidi basici amminici ciclici; che presentano una catena costituita da 10 aminoacidi, 7 dei quali formano un anello: treonina, acido diaminobutirrico

(DAB), leucina, fenilalanina, con un acido grasso alla coda: l'acido 6-metilottanoil. L'attività battericida rapida di questi antibiotici policationici, dovuta alla loro ricchezza in radicali idrofilici ed idrofobici, è simile a quella dei detergenti cationici. Grazie alle loro proprietà tensioattive, l'azione battericida si esercita sui fosfolipidi presenti sullo strato esterno della membrana citoplasmatica dei batteri, i quali divengono abnormemente permeabili, con alterazione dell'equilibrio osmotico della stessa cellula batterica e fuoriuscita di costituenti cellulari nell'ambiente extracellulare. L'effetto battericida è rapido (1-2 ore) e si esercita contemporaneamente sia sui batteri in fase quiescente che sui batteri in fase di attiva moltiplicazione. La carica elettrica positiva delle molecole in questione permette un accumulo a livello della membrana plasmatica. In assenza del gene *mprF* tale accumulo aumenta sensibilmente aumentando l'azione antibatterica delle molecole.

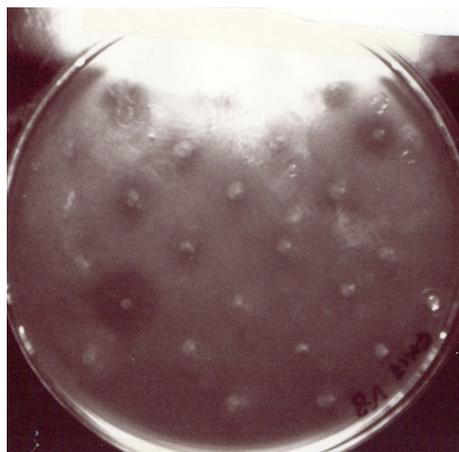
X.5.3. Spot-on-the-lawn assay

I risultati della prova sono evidenziati dalle immagini sottostanti. Il ceppo risultò più sensibile all'azione della lactacina e il ceppo $\Delta MprF$. L'area di inibizione evidenziabile intorno alle colonie di *Lactococcus lactis* è di dimensioni maggiori. Anche i ceppi $\Delta VirR$ e $\Delta DltA$ risentono dell'azione

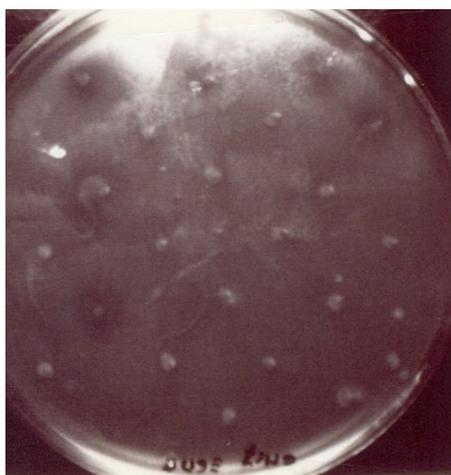
della lactacina prodotta dai ceppi di *Lactococcus* ma meno rispetto al ceppo Δ MprF.



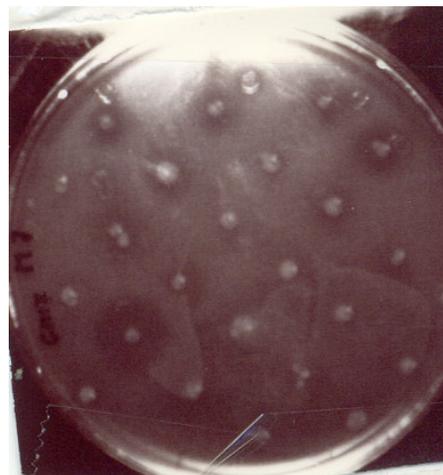
Δ MprF



Δ VirR



EGDe



Δ DltA

X.6.Conclusioni

Dai risultati dei test eseguiti si evidenzia che il gene *mprf* è fondamentale per proteggere *Listeria monocytogenes* dall'azione di sostanze antimicrobiche quali nisina e lactacina. Lo stesso gene risulta inoltre implicato nella protezione nei confronti di Colistina e Polimixina B. Minore importanza ricoprono i geni *virr* e *dlta*. Indirettamente si evince che nisina e lactacina 3147 possono essere utilizzati come validi strumenti di controllo della proliferazione di *Listeria monocytogenes* nelle matrici alimentari. L'uso di antimicrobici naturali, quali la nisina e la lactacina, unitamente alle normali condizioni di stoccaggio, come la refrigerazione, può costituire un'ulteriore garanzia di sicurezza dei prodotti alimentari.

BIBLIOGRAFIA

- Bayer, A. S., D. Cheng, M. R. Yeaman, G. R. Corey, R. S. McClelland, L. J. Harrel, and V. G. Fowler, Jr.** 1998. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein among clinical bacteremic isolates of *Staphylococcus aureus* correlates with an endovascular infectious source. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3169–3172.
- Bayer, A. S., P. J. McNamara, R. A. Proctor, L. I. Kupferwasser, N. Lucindo, R. Prasad, T. Prasad, A. Peschel, and M. R. Yeaman.** 2003. Disruption of the *mnhA-G* Na⁺/H⁺ antiporter operon is associated with resistance to the microbicidal activity of thrombin-induced platelet microbicidal protein-1 in *Staphylococcus aureus*, abstr. 2482. Abstr. 103rd Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Bayer, A. S., R. Prasad, J. Chandra, A. Koul, M. Smriti, A. Varma, R. A. Skurray, N. Firth, M. H. Brown, S.-P. Koo, and M. R. Yeaman.** 2000. In vitro resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal proteins is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infect. Immun.* **68**:3548–3553.
- Cole, A. M., T. Ganz, A. M. Liese, M. D. Burdick, L. Liu, and R. M. Strieter.** 2001. Cutting edge: IFN-inducible ELR-CXC chemokines display defensinlike antimicrobial activity. *J. Immunol.* **167**:623–627.
- Collins, L. V., S. A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K. P. Van Kessel, J. A. Van Strijp, F. Goetz, B. Neumeister, and A. Peschel.** 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* **186**:214–219.
- De Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. Van Kessel, and J. A. Van Strijp.** 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J. Exp. Med.* **199**:687–695.
- Dhawan, V. K., A. S. Bayer, and M. R. Yeaman.** 1998. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with enhanced progression and hematogenous dissemination in experimental *Staphylococcus aureus* infective endocarditis. *Infect. Immun.* **66**:3476–3479.
- Dhawan, V. K., M. R. Yeaman, A. L. Cheung, E. Kim, P. M. Sullam, and A. S. Bayer.** 1997. Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in vitro is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **65**:3293–3299.
- Cohen, M. S.** 1994. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin. Infect. Dis.* **18**(Suppl. 2):S170–S179.
- Collins, L. V., S. A. Kristian, C. Weidenmaier, M. Faigle, K. P. M. van Kessel, J. A. G. van Strijp, F. Goetz, B. Neumeister, and A. Peschel.** 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to neutrophil killing and are virulence-attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* **186**: 214–219.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn.** 1996. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect. Immun.* **64**:3512–3517.
- Lehrer, R. I., and T. Ganz.** 2002. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. *Curr. Opin. Hematol.* **9**:18–22.
- Lehrer, R. I., and T. Ganz.** 2002. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:96–102.
- Arthur, M., Depardieu, F., Molinas, C., Reynolds, P., and Courvalin, P.** (1995) The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* **154**: 87–92.

- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., and Charbit, A.** (2003) Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect Immun* **71**: 4463–4471.
- Cossart, P., and Lecuit, M.** (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J* **17**: 3797–3806.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G., and Hill, C.** (1999) Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **181**: 6840–6843.
- Cotter, P.D., Guinane, C.M., and Hill, C.** (2002) The *LisRK* signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2784–2790.
- Dons, L., Olsen, J.E., and Rasmussen, O.F.** (1994) Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *DNA Seq* **4**: 301–311.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P.** (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**: 251–261.
- Doolittle, R. F.** (2002). Microbial genomes multiply. *Nature* **416**, 697±700.
- Gaunt, M. J., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. & Young, J. P. W.** (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the SSU rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 2037±2048.
- Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V. & 25 other authors** (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529±533.
- Sullivan, J. T., Eardly, D. B., van Berkum, P. & Ronson, C. W.** (1996). Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2818±2825.
- Turner, S. L. & Young, J. P. W.** (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**, 309±319.
- Zhang, X. X., Guo, X. W., Terefework, Z., Cao, Z., Hu, F. R., Lindstrom, K & Li, F. D.** (1999). Genetic diversity among rhizobial isolates from field grown *Astragalus sinicus* of Southern China. *Syst Appl Microbiol* **22**, 312±320.
- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. & Trieu-Cuot, P.** (2002). Formation of D-alanyllipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**, 1–14.
- Ames, B.** (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* **8**, 115–118.
- Bidlingmeyer, B., Cohen, S. & Tarvin, T.** (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivitization. *J Chromatogr* **336**, 93–104.
- Bierbaum, G. & Sahl, H.-G.** (1987). Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22, influence of cationic peptides on activity of N-cetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol* **169**, 5452–5458.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911–917.
- Chen, Y., Shapiro, R., Eisenstein, M. & Montville, T.** (1997). Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl Environ Microbiol* **63**, 524–531.
- Crandall, A. D. & Montville, T. J.** (1998). Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl Environ Microbiol* **64**, 231–237.

Dalet, K., Cenatiempo, Y., Cossart, P. & Hechard, Y. (2001). A s54-dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147, 3263–3269.