

**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
XXII CICLO**

*Valutazione della conservabilità in diverse
matrici alimentari.*

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

*Candidata
Carmela Ceres*

*Relatore
Ch.ma Prof.ssa
Nicoletta Murru*

RIASSUNTO- La crescente richiesta da parte del consumatore di pesce fresco e di nuove preparazioni, a base di prodotti ittici, ha indotto l'industria alimentare a sviluppare tecnologie di conservazione innovative, atte a prolungare la vita commerciale di tali derrate alimentari, la cui materia prima fresca è caratterizzata da un'elevata deperibilità. La conservazione dei prodotti è legata al mantenimento da parte dell'alimento stesso delle caratteristiche proprie di qualità igienico-sanitaria, commerciale e organolettica. La tecnologia industriale gioca un ruolo importante nella protezione degli alimenti dal deterioramento. Le tecniche di conservazione hanno lo scopo di impedire o rallentare l'instaurarsi di processi alterativi di diversa natura e rispondere alle attuali esigenze di mercato che richiedono sempre più alimenti pronti. Nei prodotti della pesca, in assenza di una corretta conservazione, si instaurano rapidamente processi batterici, enzimatici e chimici che portano alla perdita delle caratteristiche di freschezza con riduzione della vita commerciale e, in certi casi, all'insorgenza di rischi sanitari. In questo studio vengono messe in evidenza diverse tecnologie di conservazione, a partire da tecniche di conservazione tradizionali (come la salatura), e la messa a punto di soluzioni di *packaging*, tra queste il confezionamento in atmosfera modificata (*Modified Atmosphere Packaging*) e l'uso dell'ozonizzazione, metodo oggetto di studi e sperimentazioni.

Parole chiave: *Map, packaging, shelf life.*

INDICE

INTRODUZIONE.....	6
1. PRODOTTI DELLA PESCA.....	6
2. GENERALITÀ DELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE.....	11
3. COMPOSIZIONE DELLE CARNI.....	13
4. LA QUALITÀ DEI PRODOTTI ITTICI.....	17
5. CARATTERISTICHE NUTIZIONALI.....	19
5.1 PROTEINE.....	21
5.2 COSTITUENTI AZOTATI NON PROTEICI.....	22
5.3 CENERI.....	23
5.4 ACQUA.....	24
5.5 LIPIDI.....	25
5.6 ACIDI GRASSI.....	29
5.7 VITAMINE LIPOSOLUBILI.....	31
5.8 COLESTEROLO.....	32
6. DEPERIBILITÀ DEI PRODOTTI ITTICI.....	34
6.1 CONTAMINAZIONE MICROBICA.....	37
6.2 I NUOVI SCENARI DI MALATTIA ALIMENTARE.....	42
6.3 METALLI PESANTI.....	46
6.4 VIRUS.....	49
6.5 ZOONOSI PARASSITARIE TRASMESSE DAI PRODOTTI ITTICI.....	50
7. VALUTAZIONE DELLA FRESCHEZZA.....	53
8. SHELF LIFE.....	54
9. TECNICHE DI CONSERVAZIONE TRADIZIONALI E NUOVE TECNOLOGIE.....	58
9.1 REFRIGERAZIONE.....	58
9.2 REFRIGERAZIONE PASSIVA.....	61
9.3 IMPIEGO DEL SALE.....	62
9.4 DAL CONFEZIONAMENTO IN ARIA A QUELLO IN “ATMOSFERA PROTETTIVA”	64
9.5 OZONIZZAZIONE.....	76
9.5.1 EFFETTI ANTIMICROBICI DELL’OZONO.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	94
PARTE SPERIMENTALE.....	110

I. TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DELLA “COLATURA DI ALICI” E CARATTERIZZAZIONE DELLA FLORA MICROBICA...	111
ABSTRACT.....	111
INTRODUZIONE.....	112
TECNOLOGIA DI PRODUZIONE.....	118
MATERIALI E METODI.....	127
CONTROLLI DI LABORATORIO.....	130
a. Controlli microbiologici in corso di salagione e sul prodotto finito.	130
b. Controlli organolettici.	133
c. Determinazione del pH e dell’a_w.	133
RISULTATI.....	134
a. Risultati dei controlli microbiologici delle alici in corso di salagione.	134
a. 1.Risultati dei controlli microbiologici del prodotto finito “Colatura di alici”.	140
b. Risultati dei controlli organolettici.	141
c. Risultati della determinazione del pH e dell’a_w.	145
CONCLUSIONI.....	147
BIBLIOGRAFIA.....	150
II. CONFEZIONAMENTO IN ATMOSFERA PROTETTIVA DI FILETTI DI SPIGOLA (Dicentrarchus Labrax) E DA FILETTI DI ORATA (Spaurus Aurata) PROVENIENTI DA IMPIANTI DI MARINOCOLTURA.	153
ABSTRACT.....	153
INTRODUZIONE	153
MATERIALI E METODI.....	160
CONTROLLI DI LABORATORIO.....	163

a. Controlli materia prima.	163
b. Controlli microbiologici sui quattro lotti.	164
c. Controlli organolettici.	166
d. Determinazione del pH.	166
RISULTATI	167
a. Risultati dei controlli microbiologici dei lotto A e B (spigole).....	167
b. Risultati dei controlli microbiologici dei lotto C e D (orate).....	172
c. Risultati dei controlli organolettici dei lotto A e B (spigole).....	177
d. Risultati dei controlli organolettici dei lotto C e D (orate).....	180
e. Risultati della determinazione del pH e dell' a_w	183
CONCLUSIONI	184
BIBLIOGRAFIA	190
III. EFFETTI DELL'UTILIZZO DELL'OZONO NELLA CONSERVAZIONE DI DUE SPECIE ITTICHE: <i>Merluccius merluccius</i> e <i>Aristeus antennatus</i>.	192
ABSTRACT	192
INTRODUZIONE	192
MATERIALI E METODI	198
CONTROLLI DI LABORATORIO	201
a. Controlli microbiologici campioni.....	201
b. Controlli microbiologici sui tamponi.....	204
c. Controlli organolettici.....	206
d. Determinazione del pH e dell' a_w	208

RISULTATI.....	209
a. Risultati dei controlli microbiologici campioni.....	209
b. Risultati dei controlli microbiologici sui tamponi.....	221
c. Risultati dei controlli organolettici.....	224
d. Risultati della determinazione del pH e dell'a_w.....	230
CONCLUSIONI.....	231
BIBLIOGRAFIA.....	238
CONSIDERAZIONI.....	241
RIFERIMENTI LEGISLATIVI.....	245

INTRODUZIONE

1. PRODOTTI DELLA PESCA

Il consumo di pesci e molluschi rappresenta un elemento fondamentale della dieta umana in molte parti del mondo, e sta imponendosi per quote crescenti anche in paesi tradizionalmente meno dipendenti da questa fonte alimentare. Pur restando al di sotto della media europea, negli ultimi 25 anni in Italia il consumo giornaliero pro capite di prodotti ittici è quasi raddoppiato, passando dai 13 kg degli anni '80 a circa 21 kg (dati Federalimentari, 2007).

L'incremento dei consumi di pesce fresco ha determinato, altresì, un progressivo depauperamento delle risorse marine. Fra il 1995 ed il 2001 si è, infatti, verificato nei Paesi dell'Unione Europea (UE) un forte calo del pescato e, parallelamente una notevole crescita (dal 24 al 34%) delle importazioni dai Paesi Terzi (Norvegia, Islanda, Russia, USA, Cina e Sud America). Per sopperire alle difficoltà di approvvigionamento dei prodotti della pesca effettuati con i metodi tradizionali, si è assistito negli ultimi anni ad un progressivo sviluppo ed incremento di produttività di impianti di acquacoltura in molti paesi dell'UE e soprattutto in quelli dell'area Mediterranea. Le statistiche FAO dimostrano, infatti, che il contributo dell'acquacoltura al commercio ittico è in continua crescita, aumentando dal 3,9% della produzione totale nel 1970 al 29,9% nel 2002 (FAO, 2004). Il prodotto di allevamento si è, quindi, conquistato una notevole fetta di mercato. La possibilità di reperire sul mercato specie ittiche particolarmente apprezzate dal punto di vista nutrizionale ed

Dott.ssa *Carmela Ceres*

organolettico, nonché la possibilità di standardizzazione del prodotto richiesta dell'industria alimentare, hanno determinato una notevole affermazione del prodotto di allevamento, affermazione aumentata anche dal miglioramento delle tecniche di produzione dell'acquacoltura. In Italia oggi la piscicoltura marina rappresenta il secondo comparto dopo la zootecoltura.

In riferimento al consumo nazionale di prodotti ittici si è registrato, in questi ultimi anni, un trend positivo sia per i consumi domestici che extradomestici. Dopo la forte flessione accusata nel 2000 (-9,1% in volume e 2.8% in valore) gli acquisti di pesce delle famiglie hanno fatto registrare nel 2004 un aumento dell'1.8% in quantità e dell'1.9% in valore, rispetto all'anno precedente. La principale modalità di vendita di pesce fresco in Italia è sotto forma di pezzi interi, principalmente attraverso le tradizionali pescherie.

Più recentemente, però, i cambiamenti nello stile di vita e nelle abitudini alimentari dei consumatori hanno determinato un aumento della domanda per i prodotti porzionati ed, in particolare, per i filetti ed i tranci, molto spesso venduti attraverso il canale dei supermercati o degli ipermercati sotto forma di vassoi preconfezionati (United States Department of Agriculture, USDA 2006). Il pesce intero, come tale, non è più il "prodotto finito" destinato ad essere venduto direttamente al dettaglio dopo essere transitato in un mercato ittico all'ingrosso ma nella maggioranza dei casi sta diventando una materia prima o un semilavorato che, dopo la cattura o la raccolta (se prodotto d'allevamento) viene conferito ad un'industria di trasformazione.

Per quanto riguarda i prodotti ittici gli Italiani, pur essendo un popolo di grandi tradizioni marinare, non sono dei fortissimi consumatori: si stima che ogni anno ciascuno di noi consumi circa 22 kg di prodotti della pesca, a fronte di oltre 55 kg consumati dai Finlandesi e degli oltre 105 kg annui dei Giapponesi. Inoltre, una parte cospicua del pesce che consumiamo è costituita da alimenti salati e/o essiccati, come baccalà e stoccafisso, oppure in conserva, come il tonno. Si stima che solo il 30% dei consumi ittici degli Italiani sia formato da prodotto fresco e di questa quota una parte consistente è formata da molluschi bivalvi che, per consuetudine difficile da eradicare, sono consumati sovente crudi o poco cotti.

In questi ultimi dieci anni, abbiamo assistito ad una “piccola rivoluzione” anche nel comparto dei consumi ittici: sempre più spesso gli Italiani trovano pratico e conveniente ricorrere a prodotti già elaborati e pronti a cuocere (i cosiddetti RTC Ready-To-Cook foods) o già precotti e pronti a consumo che basta riscaldare in microonde (i prodotti RTE Ready-To-Eat). Stime di mercato segnalano che aumentano in misura lieve, ma regolare, i consumi di prodotti ittici già sfilettati e/o impanati, pronti a cuocere, o dei piatti precucinati a base di pesce, molluschi e/o crostacei mescolati con altri ingredienti di origine non animale. Sovente queste preparazioni gastronomiche sono confezionate in pellicola plastica sotto vuoto o in atmosfera protettiva (MAP Modified Atmosphere Packaging). Le condizioni di anaerobiosi che si possono creare a ridosso dell'alimento da un lato ne limitano il deterioramento microbico sostenuto dagli Agenti Specifici di Putrefazione (SSO Specific Spoilage Organism), dall'altro, però,

possono favorire la moltiplicazione di microrganismi responsabili di malattia alimentare quali *Listeria monocytogenes* e *Clostridium (perfringens e botulinici)*.

Nel 2006, secondo gli ultimi dati elaborati dalla Fao, non si è arrestata la flessione della produzione ittica comunitaria: i quantitativi complessivamente pescati e allevati dai 27 Paesi dell'Unione Europea sono risultati poco meno di 6,9 milioni di tonnellate (-1,1% rispetto all'anno precedente) e la flessione produttiva ha riguardato non solo i principali paesi, quali Danimarca, Francia e Regno Unito, ma anche altri di minore rilievo, quali Paesi Bassi e Irlanda. Nonostante la diminuzione, l'Ue si è confermata al terzo posto nella graduatoria mondiale dei principali produttori, dopo Cina e Perù. La contrazione della produzione è imputabile alla dinamica negativa del comparto della pesca (-1,5% nel 2006, dopo il -2,8% nel 2005), mentre l'acquacoltura comunitaria è rimasta pressoché stabile (+0,6% rispetto al 2005), arrestando la flessione che aveva interessato il comparto nel biennio 2004-2005. I motivi del calo delle catture nell'Ue, in atto ormai da numerosi anni, sono in parte da ricercare nell'applicazione di una politica comunitaria finalizzata alla conservazione degli stock ittici (in relazione al crescente depauperamento delle risorse marine) che si è tradotta in una riduzione dello sforzo di pesca. L'acquacoltura nell'Ue ha invece registrato negli ultimi anni un andamento altalenante, da attribuire alle vicende produttive dei molluschi (mitili, ostriche e vongole) e dei pesci diadromi (trote, anguille e salmoni); in costante crescita è risultato, invece, l'allevamento di pesci marini (spigole, orate e rombi).

In futuro, la crescita dovrebbe caratterizzare soprattutto i pesci marini (in particolare spigole e orate), mentre si prevede una sostanziale stabilità per la produzione di molluschi bivalvi che da sola rappresenta oltre la metà della produzione totale comunitaria. In tendenziale flessione dovrebbe risultare l'allevamento di pesci d'acqua dolce e diadromi.

2. GENERALITÀ DELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE

Per comprendere le tecniche di conservazione dei prodotti della pesca bisogna conoscere bene i processi alterativi di questi prodotti. Molte modificazioni sensoriali sgradevoli che caratterizzano l'alterazione dei prodotti ittici sono esito di autolisi endogena al pesce o di un'eccessiva proliferazione microbica. Queste modificazioni sono indotte, quindi, da enzimi endogeni al pesce oppure da enzimi prodotti da batteri e/o miceti. In piccola parte, i processi alterativi dei prodotti della pesca indotti da processi chimici (ossidazione dei lipidi o imbrunimenti non enzimatici). Lo scadimento è segnalato da scolorimento, formazione di patine viscosi superficiali, sviluppo di gas, odori sgradevoli e/o sapori strani.

Il pescato inizia a degradarsi immediatamente dopo la cattura e la morte. Nelle prime 24-48 ore i processi degradativi sono autolitici, catalizzati da enzimi endogeni. Di regola questi processi non si manifestano con alterazioni sensoriali e la microflora del prodotto è tenuta stabile dalle basse temperature di conservazione. Dopo le prime 48 ore, la microflora inizia a duplicare e a produrre enzimi proteolitici, lipolitici e saccarolitici che degradano il substrato (problema di esoenzimi). Le alterazioni sensoriali dei prodotti ittici sono condizionate dalla composizione chimica del substrato e dal tipo di flora microbica che si sviluppa (Giaccone, 2006).

La microflora dei prodotti della pesca è condizionata da tre fattori: struttura anatomica delle masse muscolari, abitudini di vita dell'animale, composizione centesimale del muscolo. I prodotti ittici

Dott.ssa *Carmela Ceres* 11

sono ricchi di proteine, ma anche di composti azotati non proteici NPN (No Proteic Nitrogen) composti di basso PM facilmente degradabili dai microrganismi. Il muscolo dei pesci contiene da 5 a 10 volte più composti NPN del muscolo dei vertebrati terrestri. I prodotti ittici sono variamente ricchi di lipidi soprattutto di acidi grassi insaturi (facile tendenza all'ossidazione dei lipidi). Alcuni tipi di prodotti della pesca (crostacei) contengono anche discrete quantità di carboidrati semplici o complessi. L'autolisi endogena è la prima ad attivarsi dopo la cattura, favorisce una prima degradazione dei composti e la proliferazione microbica. La proliferazione microbica, a sua volta, può favorire le alterazioni di tipo chimico. Il muscolo dei pesci contiene appena il 25% del connettivo dei vertebrati terrestri quindi risulta più agevole la diffusione dei batteri dalla superficie all'interno dei muscoli. Il pesce, in genere, è povero di carboidrati (semplici e complessi), quindi vi è una scarsa acidificazione post mortem delle masse muscolari.

I batteri degradano facilmente i composti azotati non proteici del pesce, producendo urea e ammoniaca (componenti dell'odore di pesce). Il muscolo di pesce è più o meno ricco di ossido di trimetilammina (TMAO). I batteri lo possono convertire a TMA (altro componente tipico dell'odore di pesce). La TMA può essere liberata anche dagli enzimi autolitici del muscolo.

3. COMPOSIZIONE DELLE CARNI

La composizione chimica delle carni dei prodotti ittici è molto simile a quella degli altri animali. Tuttavia le carni in questione contengono meno tessuto connettivo, e ciò dimostra la loro maggior tenerezza, non presentano depositi di grassi visibili, indipendentemente che l'animale sia di piccola o grossa taglia, e contengono un tipo di collagene che gelifica tra i 45°-50°C.

La rigidità cadaverica e il suo superamento si realizza in tempi rapidi. L'abbassamento del pH dopo la morte dell'animale è limitato e, a differenza di quanto avviene nella carne degli altri animali non raggiunge mai valori inferiori a 6,2-6,0.

I principali costituenti sono l'acqua, le proteine, i lipidi, le sostanze minerali e i carboidrati. La composizione delle carni è influenzata dalla specie, dalla morfologia, dalla fisiologia, dalla genetica, dalle condizioni di sviluppo, dal periodo riproduttivo e dal regime alimentare dell'animale. È noto che, a causa di un regime alimentare spesso "forzato", i prodotti ittici allevati contengono mediamente una maggior concentrazione di grasso rispetto a quelli catturati in ambienti naturali.

Proprio in base alla concentrazione dei lipidi, i prodotti ittici ed i pesci in particolare, sono suddivisi in "magri", in "semigrassi" e in "grassi". I pesci magri contengono una concentrazione di grassi inferiore all'1% e comprendono il merluzzo, la passera, la sogliola, il palombo ed il nasello. I pesci semigrassi contengono una

concentrazione di lipidi compresa tra l'1-8%, a questi appartengono il cefalo, il pesce persico, la sardina, il suro, l'alice ed il branzino.

Ai prodotti ittici "semigrassi" appartengono anche i molluschi ed i crostacei. Infine i pesci grassi contengono una concentrazione di lipidi superiore all'8% e comprendono l'aringa, il tonno, la trota, il luccio, l'anguilla, lo sgombro ed il salmone.

I lipidi includono la frazione saponificabile (trigliceridi e fosfolipidi) ed insaponificabile (idrocarburi, steroli, carotenoidi e vitamine liposolubili). Le concentrazioni delle diverse frazioni possono variare con le specie considerate e talvolta la composizione di alcuni lipidi caratterizzano la specie ittica.

Gli acidi grassi sono presenti in forma prevalentemente insatura e in massima parte esterificati (circa il 90% del totale). Non esiste differenza significativa tra gli acidi grassi di crostacei, molluschi e pesci di mare o di acque dolci. Tuttavia la loro composizione è spesso caratteristica della specie, ma può essere influenzata dalla dieta e dalle condizioni dell'ecosistema. Pesci pescati in ambiente naturale contengono una frazione insatura nettamente superiore a quella di pesci allevati. Le cause di queste differenze sono molteplici. Il regime alimentare spesso forzato, l'ambiente confinato, la temperatura dell'acqua e i cicli stagionali possono influenzare e incrementare il grado di insaturazione e la lunghezza degli acidi grassi. In mare proprio la temperatura dell'acqua, influenzando il tipo di acidi grassi dei crostacei planctonici, caratterizza il grado di insaturazione dei grassi di tutti gli animali della catena alimentare (Ackman, 1995).

I prodotti ittici contengono composti azotati di origine proteica e non proteica.

Le proteine rappresentano la componente fondamentale dei muscoli dell'animale e risultano importanti per l'equilibrio della idratazione dei tessuti. Come tutte le proteine animali anche quelle dei prodotti ittici, si suddividono in proteine di sostegno, proteine fibrillari e proteine globulari.

La frazione azotata non proteica, influenza il sapore delle carni ed è rappresentata da molecole di aminoacidi liberi (arginina, lisina, istidina), da creatina e creatinina, da dipeptidi (carnosina, anserina), da oligopeptidi, da urea, da ammoniaca, da ossido di trimetilammina (TMAO). Come per i grassi la composizione della frazione non proteica varia da specie a specie. I pesci a carni rosse, sia di mare (sgomberidi) che di acque dolci, contengono alte concentrazioni di istidina, che influenza il loro sapore, ma le rende pericolose in caso di deterioramento microbico. Infatti, in queste carni è possibile riscontrare alti valori di istamina e di altre amine biogene, qualora gli animali non siano stati rapidamente eviscerati, congelati o refrigerati. Condizioni di abuso termico generano incrementi di microrganismi in grado di decarbossilare gli aminoacidi liberi.

L'ossido di trimetilammina, la cui funzione è ancora sconosciuta, è responsabile dell'odore tipico dei prodotti ittici di mare e viene degradato rapidamente in trimetilammina e dimetilammina per via enzimatica (Shahidi, 1995).

L'urea è una molecola tipica dei selaci. Questi la accumulano con il TMAO a livello di tessuto, assieme all'ammoniaca. La presenza di ammoniaca, urea e TMAO a livello muscolare in carni di selaci è indice di alterazione.

Tra i costituenti azotati non proteici si annoverano gli acidi nucleici o i nucleotidi liberi (ATP, GTP, etc.). essi sono presenti a livello cellulare e vengono degradati subito dopo la morte dell'animale, producendo modificazione delle caratteristiche organolettiche dello stesso.

I glucidi sono contenuti nelle masse muscolari sottoforma di glicogeno. Anche in questo caso la concentrazione varia a seconda del tessuto considerato, della specie, dell'età e delle condizioni nutritive dell'animale. La maggior parte dei pesci contiene solo tracce di carboidrati. Infatti subito dopo la morte non viene mai osservato in questi animali un netto calo del pH, come avviene negli animali terrestri, dove la glicolisi anaerobica degrada il glicogeno presente e produce acido lattico, che abbassa il pH del muscolo. I molluschi, invece, possono contenere alte percentuali di glicogeno (1-6%) a seconda della specie considerata, e di conseguenza la diminuzione del pH delle carni è indice di alterazione.

I prodotti ittici contengono discrete quantità di vitamina A e D nei grassi e nel fegato e vitamine del gruppo B (B₂ e B₆) e PP nei muscoli. La vitamina C sembra essere contenuta in alcune specie di ostriche.

4. LA QUALITÀ DEI PRODOTTI ITTICI

Il termine “qualità” riferito ai prodotti ittici tiene conto di molteplici fattori tra cui alcune proprietà intrinseche della specie, attributi quali la freschezza e la sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario, caratteristiche merceologiche, sensoriali e nutrizionali.

Importanti anche le informazioni inerenti la potenziale conservabilità, la comodità d’uso legata alla tipologia di conservazione e *packaging* e anche il grado di accettabilità da parte dei consumatori, che dipendono da limiti etici ed etnici, e che contribuiscono complessivamente a delineare le caratteristiche di qualità globale di un prodotto (Poli, 1999; Poli *et al.*, 2001; Uniprom, 2005). La freschezza assume un ruolo di primo piano, sia per il prodotto fresco intero che per quello destinato alla trasformazione ed alla conservazione.

Per quanto riguarda le caratteristiche corporee dei pesci, alcune di queste assumono significato merceologico importante, in quanto, influenzando parametri come la taglia, la resa in parte edule e la percentuale di scarto, determinano il rapporto qualità-prezzo del prodotto (Poli, 1999; Poli *et al.*, 2001).

Alla definizione di tali caratteristiche contribuiscono la specie, l’età, il sesso, la taglia e alcuni parametri ambientali, tra cui includiamo la disponibilità di alimento (Sargent *et al.*, 2002).

Le proprietà nutrizionali, rappresentate dall’apporto e dalla biodisponibilità di macro e micronutrienti, di importante valore biologico e dietetico, sono tra quelle più importanti nel definire la

qualità e quelle che suscitano maggiore interesse tra i consumatori, sempre più attenti ad una dieta corretta e bilanciata.

Attributi come la freschezza, la sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario, il valore di alcuni parametri merceologici, la composizione in macro e micronutrienti, la conservabilità o *shelf-life* dei prodotti ittici si prestano ad una precisa valutazione analitica. L'informazione sulle proprietà nutrizionali, la conservabilità e la possibilità di diversificare la produzione con la commercializzazione di sfilettati, trasformati, salati, marinati, può contribuire a conferire ad alcuni prodotti ittici un valore aggiunto, con conseguenze positive sia per la risorsa naturale, che per gli operatori del settore, aumentando la sostenibilità della pesca.

5. CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI

Tra gli attributi di qualità di un prodotto ittico, le caratteristiche nutrizionali ricoprono, sicuramente, un ruolo centrale. Esse dipendono dalla composizione chimica delle carni e dalla presenza, proporzione e biodisponibilità, di componenti chimiche a significato funzionale, integrativo, protettivo o anche di rischio per la salute del consumatore (Sargent *et al.*, 1989; Ackman, 1995).

Il profilo nutrizionale è definito principalmente dai macronutrienti contenuti nelle carni dei pesci, come proteine, lipidi e carboidrati. Queste componenti sono soggette a variazioni dovute alla disponibilità di alimento, all'attività natatoria intensa durante i movimenti migratori e alle variazioni metaboliche tipiche dei pesci durante il loro periodo riproduttivo (Ackman, 1995).

La parte edule nei pesci è rappresentata dai “filetti”, ossia dalla massa muscolare, distinguibile in dorsale e ventrale, distribuita ai due lati del corpo. Essa è costituita da fibre muscolari che si estendono parallele alla direzione longitudinale del corpo. Poiché la lunghezza delle fibre muscolari è variabile procedendo dall'estremità cefalica a quella caudale, i filetti sono eterogenei. Il tessuto muscolare, come nei mammiferi, è costituito da muscolo striato la cui unità funzionale è rappresentata dalla cellula muscolare, circondata all'esterno da sarcolemma e composta da sarcoplasma, nuclei, riserve di glicogeno, mitocondri ed un elevato

numero di miofibrille (fino a 1000) nella cui costituzione rientrano le proteine contrattili, actina e miosina.

La maggior parte dei pesci possiede per gran parte muscolo bianco. La quantità di muscolo bruno è variabile di specie in specie. È maggiore nelle specie pelagiche (fino al 48 % del peso corporeo) che hanno un'attività natatoria continua, e minore in quelle demersali che si alimentano sul fondo ed hanno un'attività natatoria più ridotta (Love, 1970). È localizzato proprio al di sotto della pelle lungo la linea mediana per tutta la lunghezza del corpo, di colorazione variabile dal marrone al rosso. La sua quantità varia a seconda dell'attività dei pesci. Dal punto di vista chimico il muscolo bruno è caratterizzato da un maggiore contenuto di lipidi, di mitocondri e di mioglobina rispetto a quello bianco, questo è uno dei motivi per cui le specie che ne sono ricche sono soggette a problemi maggiori di rancidità.

Nei due tipi di muscolo si osservano due differenti pattern metabolici. Nel muscolo bianco l'energia, sottoforma di ATP, viene ricavata dal glicogeno attraverso un processo anaerobio, da cui si ottiene acido lattico che viene nuovamente metabolizzato nel fegato. Nel muscolo scuro l'energia viene ricavata dai lipidi attraverso un'intensa attività aerobia, analoga a quella del fegato, che genera anidride carbonica ed acqua. I due diversi tipi di attività metabolica rendono il muscolo bianco più adatto a contrazioni forti e rapide, ed il muscolo scuro ad un'attività prolungata ma non intensa. I lipidi rappresentano le principali riserve energetiche, tuttavia nelle specie che compiono lunghe migrazioni, per

raggiungere i luoghi deputati alla riproduzione, vengono utilizzate anche le riserve proteiche (Ackman, 1995).

5.1 Proteine

I prodotti ittici sono fonte preziosa di proteine nobili per l'alimentazione umana, in proporzione variabile, a seconda delle specie, tra il 10 e il 30 % (Shahidi, 1995). Le proteine presenti nel muscolo dei pesci hanno un elevato valore biologico, poiché sono ricche di amminoacidi essenziali per l'uomo. Anche tra le proteine contenute nella porzione edibile di pesce possiamo distinguere proteine sarcoplasmatiche, miofibrillari e stromali che, a seconda delle specie, contribuiscono in percentuale variabile al contenuto proteico totale. Quelle sarcoplasmatiche, comprendenti principalmente albumine e proteine con funzione enzimatica, costituiscono circa il 26 – 30 % delle proteine del muscolo di pesce e sono particolarmente elevate nelle specie pelagiche rispetto alle demersali. Generalmente il muscolo bruno contiene meno proteine sarcoplasmatiche rispetto a quello bianco. Tra le proteine sarcoplasmatiche vi sono enzimi idrolitici e glicolitici responsabili della degradazione *post-mortem* cui vanno incontro i tessuti dei pesci (Shahidi, 1995). Molte proteinasi della frazione sarcoplasmatica possono inoltre contribuire all'ulteriore degradazione della frazione azotata muscolare. La loro attività è strettamente dipendente da fattori specie-specifici ed ecologici, ma anche dai trattamenti cui è sottoposto il pescato (Shahidi, 1995).

Quelle miofibrillari (actina, miosina, actomiosina, tropomiosina) costituiscono la maggior parte delle proteine intracellulari e rappresentano dal 40 al 65% delle proteine grezze. Sono le proteine che variano principalmente durante il *rigor mortis*, la risoluzione del *rigor* e il congelamento a lungo termine, e sono quelle che conferiscono ai prodotti ittici alcune proprietà definite “tecnologiche”, come la consistenza e la tessitura della carne, fondamentali nella definizione della qualità dei prodotti ittici freschi, ma anche in quelli trasformati (Shahidi, 1995). Le proteine di sostegno o extracellulari (stroma), insolubili in soluzioni saline, che rientrano nella composizione delle membrane e dei tendini (collagene, elastina, cheratina, ecc.), sono presenti nei muscoli dei pesci in percentuale variabile dallo 0,2 al 3 %. Sono responsabili anche della consistenza delle carni e nei cefalopodi determinano la caratteristica durezza dopo i processi di cottura (Shahidi, 1995).

5.2 Costituenti azotati non proteici

Presenti in notevoli quantità soprattutto nelle masse muscolari dei pesci, sono responsabili della loro facile deperibilità, perché dalla degradazione di alcuni di essi dipende l'involutione delle caratteristiche sensoriali dei pesci. I costituenti azotati non proteici rappresentano una frazione cospicua dell'azoto totale, nei teleostei sono rappresentati tra il 9–18 % mentre negli elasmobranchi si aggirano intorno al 30%. In questa frazione sono incluse sostanze a basso peso molecolare come amminoacidi liberi e dipeptidi, ossido di trimetilammina, urea, betaine, ammoniaca. I

composti presenti nella frazione non proteica non solo sono diversi a seconda della specie, ma talvolta la loro composizione può caratterizzare la specie d'origine. Così, ad esempio, gli Elasmobranchi possiedono come componente chimica la sarcosina, mentre i Gadidi possiedono quali elementi tipici l'anserina, la metilistidina. L'istidina si trova in misura elevata nei pesci a elevato contenuto di muscolo rosso (pesci grassi), di mare o di acqua dolce, essa viene ritenuta responsabile del particolare sapore delle carni di tali specie. Le sostanze azotate non proteiche sono ritenute principalmente responsabili delle proprietà organolettiche dei pesci, in particolare del sapore (Orecchio e Joseffini, 2000).

5.3 Ceneri

Come il contenuto di proteine, anche il contenuto di ceneri ricopre un'importanza fondamentale dal punto di vista dietetico e nutrizionale, in quanto rappresenta la frazione di sali minerali cui la specie umana è strettamente dipendente, per le molteplici funzionalità che essi svolgono nell'organismo.

Nei pesci il contenuto di ceneri è regolato in maniera endogena ed è soggetto a variazioni in relazione alla fisiologia e all'ecologia della specie (Morris, 2001). In condizioni di stress nutrizionale o di dismetabolie, che portano ad una deficienza di minerali, il loro contenuto può subire un declino e in funzione di ciò può riscontrarsi una riduzione di ceneri a livello di composizione tissutale (Morris, 2001). Anche una dieta sbilanciata o in grado di non rendere biodisponibili i sali minerali può

determinare una carenza nei pesci specialmente in allevamento, in cui una corretta proporzione di sali minerali nella dieta è indispensabile per l'accrescimento e per ottenere buoni indici di conversione. Di contro, un eccesso di ceneri nella formulazione delle diete può determinare una riduzione dell'energia disponibile, quindi influenzare negativamente l'accrescimento (Shearer *et al.*, 1992).

5.4 Acqua

Insieme al contenuto di lipidi, il contenuto di acqua tissutale, nell'ambito della composizione corporea dei pesci, risente di variazioni che dipendono dello *status* fisiologico, dalla dieta, da variabili ecologiche (Morris, 2001). Generalmente il contenuto di acqua del corpo intero e della porzione edule tende a variare in maniera inversamente proporzionale a quello dei lipidi (Jobling *et al.*, 1998). Questa situazione può essere sfruttata per risalire alla composizione lipidica dei pesci dopo aver stabilito un'attendibile retta di calibrazione che mette in relazione il tenore lipidico tissutale con quello di acqua, e disporre in questo modo di un metodo indiretto per la determinazione del contenuto di lipidi nei pesci (Kent *et al.*, 1991). Nei pesci magri, in condizioni di digiuno, vengono utilizzate a scopo energetico più le proteine che i grassi, quindi l'aumento di acqua è più correlabile ad una riduzione di proteine (Love, 1980). L'aumento del contenuto di acqua libera

viene solitamente riscontrato nella porzione edule anche con il passare dei giorni di conservazione del prodotto ittico fresco, per l'attivazione di proteasi pH dipendenti che, degradando la componente proteica muscolare, determinano un rilascio dell'acqua legata alle proteine (Shahidi, 1995). L'aumento di acqua tissutale, parallelamente alla riduzione del contenuto lipidico, determinando variazioni della consistenza, dell'elasticità e della tessitura della carne, può influenzare negativamente l'aspetto dei prodotti ittici e quindi la loro qualità generale (Torrissen *et al.*, 2001).

5.5 Lipidi

I lipidi sono componenti importanti della parte edibile dei pesci. Oltre al ruolo energetico, svolgono un importante ruolo strutturale, veicolano vitamine, colesterolo, e sono precursori di importantissimi composti biologicamente attivi. Il contenuto di lipidi nei tessuti dei pesci è strettamente specie-specifico e dipende da numerosi fattori correlati alla biologia e all'ecologia della specie (Ackman, 1995). La componente lipidica tissutale, inoltre, risente in maniera diretta della dieta e perciò i lipidi sono i costituenti soggetti a maggiore variabilità nell'ambito della composizione percentuale grezza dei pesci (Shearer, 1994). I trigliceridi rappresentano la principale forma di lipidi di deposito. I fosfolipidi, in quanto componenti strutturali delle membrane biologiche, sono anche definiti lipidi strutturali. I lipidi di deposito sono

differentemente distribuiti attraverso la struttura muscolare. Ogni porzione del filetto può essere suddivisa, inoltre, in una porzione dorsale e in una porzione ventrale. Analizzando la componente lipidica in ogni porzione di filetto, è stato visto che la distribuzione dei lipidi non è omogenea, ma segue sia un gradiente longitudinale che un gradiente dorso-ventrale (Fjellanger *et al.*, 2001).

Questo gradiente è dovuto al diametro decrescente delle fibre muscolari man mano che ci si sposta dalla parte cefalica verso la parte caudale e di conseguenza alle differenti necessità energetiche che si hanno nei diversi punti delle fibre stesse. Spostandosi lungo l'asse longitudinale è possibile osservare anche una variabilità nelle lunghezze delle fibre muscolari, caratteristica che conferisce ai filetti un aspetto eterogeneo. Oltre al tessuto muscolare, nei Teleostei esistono altri siti di deposito dei lipidi. La localizzazione dei lipidi è, generalmente, specie-specifica ma si possono identificare 4 siti di deposito principali (Sheridan, 1988):

- A livello muscolare
- Sotto forma di grasso periviscerale
- A livello sottocutaneo
- A livello epatico

Nell'orata (*Sparus aurata*) e nel salmone atlantico (*Salmo salar*), il fegato risulta meno coinvolto nel processo di accumulo dei lipidi. In questo caso infatti l'accumulo dei lipidi avviene essenzialmente e pressoché equamente nel grasso periviscerale e nel muscolo scheletrico. Nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) l'accumulo di lipidi avviene a livello periviscerale, a livello del

muscolo scheletrico, ma anche a livello epatico (Dias *et al.*, 1998). Nel caso della spigola, i depositi lipidici sottocutanei sono generalmente considerati modesti, ma possono anche raggiungere livelli consistenti in risposta a componenti della dieta (Dias *et al.*, 1998; Messina 2004). In alcune specie marine il fegato può arrivare a contenere dal 50 al 75 % di sostanze lipidiche sul peso fresco, come nel caso del merluzzo atlantico e del tonno rosso (Ackman, 1980; Ando *et al.*, 1993). Le specie definite grasse hanno come sito di deposito preferenziale le cellule adipose situate generalmente a livello del tessuto sottocutaneo, mentre le specie magre accumulano i lipidi essenzialmente a livello epatico. Nel 1995 Ackman ha proposto una classificazione delle specie ittiche sulla base del contenuto di lipidi nel muscolo. Le specie con un contenuto di lipidi superiore al 10 % del peso fresco dello stesso sono considerate specie grasse, mentre quelle che hanno un contenuto di lipidi inferiore al 10 % sono considerate specie magre (Ackman, 1995). Lo studio della componente lipidica assume particolare importanza soprattutto nelle specie ittiche allevate in intensivo, che sono molto spesso caratterizzate da maggiori contenuti lipidici rispetto alla controparte selvatica (Sargent *et al.*, 1989). Inoltre, la conoscenza delle modalità di accumulo lipidico e dei processi e dei fattori che regolano questo accumulo, è rilevante ai fini della messa a punto di interventi che hanno l'obiettivo di modulare il contenuto lipidico delle specie ittiche allevate.

L'accumulo di lipidi nella porzione edule dei pesci è soggetto a variazioni stagionali correlate alla temperatura e al ciclo

biologico; è emblematico il caso della sardina in cui, a seconda delle stagioni, si possono osservare valori che variano dall'1,6 % al 22,4 % (Ackman, 1995). Alcuni studi hanno evidenziato che il contenuto lipidico totale nei pesci può aumentare all'aumentare della taglia (Kiessling, *et al.*, 1991; 2001). In condizioni stabili, la crescita è correlata alla razione alimentare e all'età e alterazioni nel livello di alimentazione possono influenzare questo equilibrio (Kiessling, 1991).

È stato dimostrato che l'accumulo di lipidi non è determinato soltanto da una razione alimentare eccessiva. Pesci alimentati in maniera discontinua, infatti, possono presentare un maggiore accumulo lipidico rispetto a pesci della stessa taglia che ricevono una razione alimentare continua (Kiessling *et al.*, 1991). Dal punto di vista commerciale è chiaro che ciò assume un significato importante in acquacoltura, dove è necessario mettere a punto adeguati protocolli di alimentazione (continui, intensivi nelle prime fasi o intensivi durante il finissaggio) perché l'alimentazione definisce la composizione dei filetti, soprattutto in termini di contenuto di acidi grassi, quindi il valore nutrizionale del prodotto finito. Per questo motivo, come abbiamo già detto, la valutazione della composizione lipidica della porzione edule dei pesci allevati ricopre un ruolo importante nel definirne la qualità per il consumatore.

5.6 Acidi grassi

I lipidi assumono un significato importante non solo dal punto di vista quantitativo ma anche da quello qualitativo e dietetico in particolare, poiché alcuni acidi grassi possono svolgere ruolo benefico nella prevenzione di patologie cardiovascolari, altri invece hanno un ruolo sospetto. I benefici nutrizionali che si possono trarre dal consumo dei prodotti ittici determinano in parte l'aumento della domanda dei consumatori. Infatti il tenore lipidico e la presenza di acidi grassi polinsaturi della serie ω -3 (PUFA), in particolare acido eicosapentaenoico (EPA, C 20:5 ω -3) e acido docosaesaenoico (DHA, C 22:6 ω -3) rappresentano componenti ad effetto benefico sulla salute umana, (Ruxton *et al.*, 2004), oltre ad essere essenziali per i pesci (Kanazawa, 1985; Henderson e Tocher, 1987; Ackman, 1995).

La composizione in acidi grassi varia tra le specie ed è influenzata dalla dieta e da fattori ambientali quali la salinità, la temperatura, la stagione ecc. (Castell, 1979; Ackman, 1995).

Le specie ittiche carnivore, poiché predano altri pesci, presentano il contenuto più elevato di PUFA ω -3 nei loro tessuti (Henderson e Tocher, 1987; Ackman, 1995). Riguardo alla salinità e alla temperatura è noto che nelle specie d'acqua dolce gli enzimi elongasi e denaturasi, che denaturano ed allungano le catene carboniose, hanno una maggiore attività rispetto a quelli d'acqua di mare, che, proprio per questo, necessitano di un apporto esogeno di PUFA ω -3 nella loro dieta. Le specie d'acqua fredda possiedono livelli più elevati di PUFA ω -3 rispetto alle specie temperate,

probabilmente perché un maggiore grado d'insaturazione aiuta a mantenere la flessibilità delle membrane (Castell, 1979; Henderson e Tocher, 1987).

La complessità delle interazioni tra fattori intrinseci (specie e ciclo biologico) ed estrinseci (ambiente, dieta, regolarità di alimentazione) complica la definizione dei parametri che possono concorrere al miglioramento della qualità. In ogni caso l'aspetto qualitativo va valutato riferendosi alla presenza di alcune categorie ben precise di acidi grassi presenti nel profilo lipidico tissutale (Orban *et al.*, 1998; Poli, 1999). Come precedentemente detto, alcune classi di acidi grassi ricoprono ruolo benefico nell'alimentazione umana, altri sono noti come potenziali fattori di rischio. In particolare, tra gli acidi grassi saturi sono accettati come fattori di rischio l'acido laurico (C 12:0), l'acido miristico (C 14:0) ed il palmitico (C 16:0), mentre non lo sono gli acidi grassi saturi a catena corta (Ulbricht e Southgate, 1991). Differiscono nella loro azione anche gli acidi grassi antiaterotogeni, come i polinsaturi della serie ω -6 quali il linoleico (C 18:2) e antitrombogenetici come i polinsaturi della serie ω -3, quali il linolenico (C 18:3), l'EPA e il DHA (Ulbricht e Southgate, 1991).

Anche gli acidi grassi monoinsaturi come l'oleico (C 18:1 ω -9), hanno evidenziato un ruolo protettivo nei confronti della salute umana poiché diete ricche in tali componenti sono risultate altrettanto efficienti nell'abbassare i tassi ematici di colesterolo quanto i polinsaturi della serie ω -3. In più, i monoinsaturi hanno anche l'effetto di ridurre il colesterolo contenuto nelle lipoproteine

LDL, cioè quello dannoso, e di non abbassare il colesterolo delle HDL, cioè quello buono, con effetto protettivo nei confronti delle malattie coronariche, a differenza dei polinsaturi della serie ω -6 che invece abbassano sia il colesterolo LDL che HDL (Ulbricht e Southgate, 1991). Riguardo i fattori antitrombogenetici, i polinsaturi della serie ω -3 si sono dimostrati più efficaci dei monoinsaturi. In particolare, l'EPA ed il DHA inibiscono direttamente o indirettamente l'aggregazione piastrinica. Riassumendo, quindi, gli acidi grassi saturi a lunga catena sono responsabili dell'attività aggregante delle piastrine, gli ω -6 determinano la riduzione dei lipidi serici, gli HUFA della serie ω -3 hanno effetto antitrombogenetico, ossia di riduzione dell'attività piastrinica. Inoltre gli HUFA della serie ω -3 esercitano un ruolo lenitivo nei confronti delle malattie infiammatorie, poiché essi rientrano nel processo di sintesi di prostaglandine, trombossani e leucotrieni (Ulbricht e Southgate, 1991).

5.7 Vitamine liposolubili

I pesci grassi sono la fonte principale di vitamine liposolubili per l'alimentazione umana come la vitamina A, la vitamina D, la vitamina E e la vitamina K (Lall e Parazo, 1995; Hole *et al.*, 1996; Takur e Srivastava, 1996; Baker, 2001; Navarro *et al.*, 2004). La fonte principale di vitamina A è il fegato dei pesci, in particolare di merluzzo. La vitamina A è indispensabile al meccanismo della visione perché attiva i recettori retinici, inoltre il suo normale assorbimento intestinale attraverso la componente lipidica,

garantisce un regolare accrescimento nei neonati e previene alterazioni a carico delle mucose. La vitamina D può essere estratta in grande quantità dalla componente muscolare dei teleostei. Essa ricopre un ruolo importante nella regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo, e pertanto, facilitando la calcificazione ossea contribuisce alla prevenzione del rachitismo. La vitamina E, nella forma *α-tocoferolo* funziona da antiossidante, e si ritrova, principalmente, nell'olio di pesce e nell'olio di germe di grano. La vitamina K ha invece un'importante ruolo nel processo di coagulazione del sangue. È importante sottolineare che il processo di irrancidimento dei grassi danneggia le vitamine liposolubili e quindi la loro biodisponibilità.

5.8 Colesterolo

Il colesterolo è componente essenziale delle membrane biologiche e precursore importante di ormoni sessuali, di acidi biliari e della vitamina D. Il suo trasporto ai vari distretti tissutali è affidato alle lipoproteine. Le lipoproteine a bassa densità (LDL) trasportano il colesterolo dal luogo di sintesi, il fegato, ai vari tessuti dove viene utilizzato per i vari scopi. Le lipoproteine ad alta densità (HDL) allontanano dalle cellule il colesterolo in eccesso, riportandolo al fegato per consentire la sua degradazione ad acidi biliari e l'eventuale escrezione attraverso le feci (Brown e Goldstein, 1986). Per i suoi molteplici ruoli il colesterolo è un componente tanto prezioso quanto potenzialmente dannoso per la salute umana, ed è per questo che i nutrizionisti ne raccomandano

un'assunzione controllata attraverso la dieta. I prodotti ittici contengono una quantità di colesterolo che mediamente si aggira tra i 50 e i 100 mg per 100 grammi di parte edibile, subendo oscillazioni dipendenti dal periodo di prelievo e indipendenti dalle variazioni del tenore lipidico tissutale totale (Ackman, 1995). Poiché i consumatori sono sempre più informati e attenti all'alimentazione, l'informazione sul contenuto di colesterolo nelle carni di pesce può contribuire a rendere più completo il profilo della qualità nutrizionale dei prodotti ittici.

6. DEPERIBILITÀ DEI PRODOTTI ITTICI

I prodotti ittici vanno incontro rapidamente ad alterazione. I fattori che favoriscono il deterioramento, come precedentemente accennato, sono la stessa composizione delle carni, l'insufficiente acidificazione post mortem, la presenza di una quantità esigua di tessuto connettivo e l'umidità superficiale delle carni, vivendo l'animale in ambiente acquatico. Di conseguenza subito dopo la cattura, il prodotto ittico deve essere manipolato in maniera da prolungare la sua shelf-life. Infatti esso deve essere rapidamente portato a una temperatura di 2°-4°C, o congelato oppure trasformato in una conserva o semi-conserva. Più rapidamente avvengono queste fasi, maggiore probabilità ha il prodotto di mantenere intatte le sue caratteristiche organolettiche e la sua freschezza.

Con la risoluzione del rigor mortis e la mancata acidificazione dovuta all'assenza di alte concentrazioni di glicogeno, le proteasi autoctone iniziano a degradare le molecole organiche presenti nelle carni. Questa attività enzimatica, prodotta da catepsine, peptidasi e proteasi, stimola l'attività di microrganismi endogeni ed esogeni. Inoltre spesso la mancata eviscerazione dell'animale permette agli enzimi intestinali di degradare l'epitelio intestinale e di conseguenza permette ai batteri, ivi presenti, di invadere le masse muscolari. Gli stessi batteri, che vivono sulla cute e sulle branchie intervengono nel processo alterativo.

L'azione di degradazione consiste nella idrolisi delle proteine a polipeptidi, tripeptidi, dipeptidi e aminoacidi e nell'intervento della

flora batterica che produce metaboliti volatili sia per via catabolica sia per via anabolica.

Il processo si completa con l'attività sui lipidi che vengono trasformati in acidi grassi sia per autossidazione sia per l'intervento di enzimi autoctoni e batterici. L'alterazione di questi prodotti è, comunque, un processo complesso, nel quale intervengono sia reazioni chimiche, che enzimatiche. In alcuni casi le reazioni autolitiche producono substrati, che vengono successivamente trasformati in altri metabolici da enzimi autoctoni e batterici.

Le stesse proteine vengono degradate da enzimi autoctoni in aminoacidi, questi sono poi trasformati in chetoacidi e soprattutto in amine biogene da enzimi batterici.

L'ossido di trimetilamina viene trasformato da enzimi batterici in trimetilamina e dimetilamina. I batteri operano questa trasformazione dopo circa 6-7gg dalla cattura dell'animale. L'attività è favorita dall'anaerobiosi e non viene rallentata dalla bassa temperatura di conservazione del prodotto. In ogni caso la concentrazione di trimetilamina aumenta fino a raggiungere un valore soglia oltre il quale si può notare una diminuzione, perché trasformata in dimetilamina, in monometilamina e in formaldeide. L'ammoniaca è un'altra molecola di origine batterica, deriva dalla degradazione delle componenti azotate e il suo valore aumenta con il prolungarsi della conservazione del prodotto. Tale molecola con la trimetilamina e derivati costituisce la frazione nota come azoto basico volatile. Dalla demolizione degli aminoacidi, inoltre, e in condizioni anaerobiche i

microorganismi producono acido solfidrico oltre a tioli e mercaptani. Tale alterazione è riscontrabile soprattutto negli sgombri. Infine i batteri, coadiuvati da lipasi tissutali, degradano i trigliceridi ad acidi grassi e questi possono essere trasformati ad aldeidi e chetoni. In particolare gli acidi grassi a basso peso molecolare derivano sia dalla demolizione dei lipidi, ma anche e soprattutto dalla demolizione di alcune componenti azotate. In generale, quindi, i meccanismi di deterioramento del pesce e dei molluschi possono essere divisi in tre diversi tipi: microbici, enzimatici e chimici.

6.1 CONTAMINAZIONE MICROBICA

Fra tutti gli alimenti che notoriamente sono soggetti a contaminazione, i prodotti ittici rappresentano quelli che maggiormente risentono delle caratteristiche igieniche dell'ambiente di raccolta o allevamento (Caruso et al., 2004); è stato infatti dimostrato da vari studi che la qualità del prodotto finale dipende dalle caratteristiche microbiologiche, chimiche e biotossicologiche dell'area di produzione (Scoglio et al., 2000; Croci e Suffredini, 2003). Il concetto di "qualità totale" dei prodotti ittici riguarda aspetti legati alla qualità nutrizionale, organolettica ed igienico-sanitaria, quest'ultima costituisce un requisito fondamentale per la sicurezza d'uso dell'alimento, in quanto garantisce l'assenza di rischi derivanti da contaminazione microbica. La qualità microbiologica è difatti correlata all'assenza di microrganismi in grado di provocare processi di alterazione ed alla applicazione di norme di buona pratica di allevamento e di conservazione.

I prodotti della pesca rappresentano degli alimenti soggetti a facile deterioramento, per cui devono essere consumati freschi, o conservati mediante appropriate tecnologie. Inoltre la microflora stessa dei pesci riveste non poca importanza ai fini dell'alterabilità dei prodotti ittici. La colonizzazione, la sopravvivenza o lo sviluppo dei microrganismi nell'alimento sono condizionati sia da fattori estrinseci quali la temperatura delle acque ed il tipo di lavorazione a cui viene sottoposto il prodotto, che da fattori intrinseci quali lo stato nutrizionale dell'animale. La conservabilità dei prodotti ittici è quindi fortemente influenzata dalla zona di mare in cui essi vengono pescati,

Dott.ssa *Carmela Ceres* 37

sia perché la loro contaminazione è direttamente proporzionale a quella ambientale, sia perché la temperatura dell'acqua influenza la flora batterica.

È infatti noto che, in condizioni normali, i prodotti ittici ospitano sulla cute e nelle branchie una flora microbica *autoctona* di tipo saprofito, particolarmente variegata, appartenente ai generi *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* e *Micrococcus*, tipici componenti della flora batterica delle acque marine. Dal punto di vista sanitario essi non rappresentano una fonte di rischio a trasmissione alimentare, mentre agiscono da invasori secondari nella decomposizione precoce *post-mortem* del prodotto. Infatti, negli animali in vita, le masse muscolari sono fondamentalmente sterili, ma dopo la morte la graduale proliferazione batterica a partire dall'intestino viene favorita dalla presenza nel muscolo di enzimi idrolitici come le proteasi (catepsine e peptidasi).

I germi contaminanti provvisti di attività proteolitica diventano prevalenti soprattutto dopo che i composti a basso peso molecolare (carboidrati, aminoacidi, nucleotidi) sono stati degradati e consumati dalla flora batterica inizialmente presente. È pertanto necessario sottoporre immediatamente dopo la cattura i prodotti ittici ad un trattamento di refrigerazione in modo da rallentare il processo di trasformazione fisico-chimica e biologica. Dopo 2-3 giorni di stoccaggio a temperature di refrigerazione, iniziano a prevalere all'interno della flora microbica batteri Gram-negativi psicofili aerobi appartenenti ai generi *Pseudomonas* ed *Alteromonas* che, insieme alle Enterobacteriaceae, risultano responsabili dei processi di

deterioramento (*fish spoilage*). Con l'ulteriore protrarsi della conservazione, *Pseudomonas* raggiunge livelli notevoli, potendo in alcuni casi costituire oltre l'80% della microflora presente. Nel caso di un ritardo iniziale nella conservazione a basse temperature, quando il prodotto raggiunge uno stato di deterioramento più o meno evidente, si può invece riscontrare un elevato numero di *Bacillus* e *Aeromonas*. (Rapporti Istisan, 97/5). Per quanto riguarda l'induzione di patologie nell'uomo, alcune specie di *Pseudomonas*, *Klebsiella* o *Staphylococcus* sono state in diverse occasioni segnalate come responsabili; sono poi ampiamente documentati casi di gastroenteriti da Vibrionaceae, specialmente dopo il consumo, senza cottura, di pesci provenienti da mari caldi. Anche le contaminazioni del pesce da parte di spore botuliniche, provenienti dall'acqua o dai sedimenti fangosi, non sono un evento raro ed un piccolo numero di *Clostridi* produttori di tossine botuliniche può albergare nell'intestino dei pesci. Le eventuali azioni pericolose, tuttavia, si creano in questi casi solo dopo cottura inadeguata e conservazione sottovuoto a temperatura ambiente. Rare enteriti umane sono infine dovute a *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*, mentre non sono importanti le infezioni virali. In via teorica, infatti, contaminazioni fecali umane possono produrre contaminazioni dei pesci con virus enterici, ma non ne risulta mai una concentrazione tale da essere pericolosa.

Oltre ai microrganismi saprofiti di origine autoctona, nella valutazione della qualità batteriologica dei prodotti ittici occorre tenere in considerazione l'eventuale presenza di batteri di origine *alloctona*, che comprendono microrganismi di origine ambientale (es.

presenti in acque superficiali come *Aeromonas* spp., o humus del terreno, oppure introdotti nell'ambiente attraverso deiezioni umane o animali) e microrganismi potenzialmente responsabili di infezioni e tossiinfezioni alimentari, provenienti da contaminazione umana (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*) o da contaminazione lungo la filiera (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, talune specie di *Vibrio* quali *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*).

Il riscontro di tali germi in un alimento, alcuni dei quali sono riconosciuti come patogeni emergenti, rappresenta un rischio molto elevato per la salute del consumatore in relazione alla loro concentrazione (WHO, 1999; Croci e Suffredini, 2003). L'ampia diffusione dei microrganismi prima citati nell'ambiente idrico e la capacità di sopravvivenza e in alcuni casi di moltiplicazione alle basse temperature, come riportato ad esempio per *Listeria monocytogenes*, (Scoglio et al., 2000) rendono i prodotti ittici degni di particolare attenzione nel caso in cui ci si accinga ad una valutazione dei rischi potenziali associati al consumo di questi alimenti.

I pesci provenienti da mari freddi sono prevalentemente colonizzati da batteri Gram negativi psicrofili, mentre quelli provenienti da mari tropicali prevalentemente da batteri Gram-positivi mesofili. La maggior parte dei Gram-negativi appartiene ai generi *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*. I Gram positivi, invece, appartengono più spesso ai generi *Micrococcus* e *Bacillus*. Nei gamberi tropicali sono state rinvenute significative colonizzazioni da parte di

Dott.ssa Carmela Ceres

Corynebacterium e Gram-negativi bastoncellari. Sulla cute e nelle branchie generalmente predominano specie aerobie (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Cytophaga*), mentre a livello intestinale si ritrovano germi Gram negativi aerobi-anaerobi facoltativi (*Vibrio* spp. in gran maggioranza, *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Xanthomonas* spp.) e in forma più modesta alcuni Gram-positivi (*Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corinebacterium*) (Shewan JM., 1961). Inoltre, va notato che molte delle specie che colonizzano i prodotti ittici (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, ecc.) sono psicrotrofe o psicrofile e possono, quindi, svilupparsi anche nel corso della loro conservazione (Castell, 1971; Gram & Huss, 1996; Huss, 1995; Orban, 1996; Tiecco, 2000a, 2000b).

6.2 I NUOVI SCENARI DI MALATTIA ALIMENTARE

Per definizione le malattie alimentari sono forme cliniche che l'uomo contrae per assunzione e/o manipolazione di alimenti che possono contenere microrganismi patogeni, loro tossine e/o prodotti del loro metabolismo. Di recente Kanki e coll. (2004) hanno segnalato, in Giappone, un episodio di intossicazione da istamina significativo, perché provocato da un microrganismo sinora mai segnalato come causa di intossicazione alimentare da istamina, *Photobacterium phosphoreum*, un batterio Gram negativo che costituisce uno dei più tipici agenti specifici di alterazione dei prodotti della pesca (*Specific Spoilage Organism, SSO*). L'alimento causa del malessere, per fortuna lieve, era una specialità tipica giapponese a base di sardine salate ed essiccate all'aria gelida, chiamato *iwashi maruboshi*. A seguito della segnalazione del malessere, negli avanzi della preparazione è stata rilevata la presenza di oltre 1.700 mg di istamina/kg di prodotto e le analisi hanno evidenziato la presenza, in purezza, di un ceppo di *Photobacterium phosphoreum* in grado di produrre forti quantità di istamina persino a 4° e 12°C, temperature alle quali altri batteri Gram negativi istamino-produttori quali *Morganella* e *Hafnia* non sono più in grado di moltiplicare e di agire.

L'istamina, assieme ad altre sostanze quali la tiramina, la cadaverina, la putrescina, è un composto azotato. Tutte queste sostanze sono chiamate anche “ammine biogene”, e possono essere presenti in vari tipi di alimenti a seguito dell'azione di microrganismi. L'istamina deriva dalla decarbossilazione dell'amminoacido L-istidina

che è naturalmente presente nella muscolatura di varie famiglie di pesci marini.

La formazione di istamina è solo in minima parte riconducibile a fenomeni autolitici di origine tissutale. Essa è infatti prevalentemente di origine batterica, derivando dall'azione di enzimi (in primo luogo l'istidina–decarbossilasi), elaborati soprattutto da germi Gram negativi (generi: *Morganella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Vibrio*, *Photobacterium*), che hanno contaminato le carni del pesce post-mortem.

L'istamina, inoltre, è altamente termostabile e non è denaturata dai trattamenti di cottura e di inscatolamento. Le quote più elevate di istidina libera (precursore dell'istamina), sono state riscontrate nel tessuto muscolare di alcune specie ittiche a carne rossa, a livello inter ed intracellulare, oltre che nel sangue. Le famiglie di pesci più a rischio sono: *Scombridae* (tonno, sgombro) *Clupeidae* (sardina, aringa, spratto, alaccia, cheppia), *Engraulidae* (acciuga) e *Coryphaenidae* (lampuga).

Secondo il National Institute of Allergy and Infectious diseases statunitense (2002), sono almeno 250 i microrganismi, i parassiti o i composti tossici che possono provocare una malattia alimentare nell'uomo.

I prodotti della pesca freschi e conservati possono veicolare all'uomo vari agenti di malattia alimentare che sotto il profilo della classificazione tassonomica si possono suddividere in:

(1) batteri: *Campylobacter termotrofi*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, ceppi verocitotossici (VTEC) e enteropatogeni di *Escherichia coli*, ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinici*, per citare solo quelli di maggiore prevalenza;

(2) virus del genere *Norovirus* (virus di *Norwalk* e affini), virus dell'epatite infettiva di tipo A;

(3) protozoi enteropatogeni: *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Entamoeba*.

Questi microrganismi possono arrivare ai prodotti ittici in vari momenti della catena produttiva e distributiva, provenendo da una serie di fonti differenti:

(1) dall'intestino degli animali da reddito (*Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, virus enterici). In questo caso, il punto critico in cui si concretizzano le contaminazioni è la contaminazione delle acque con scarichi fognari non depurati o l'immissione di fiumi che portano a mare anche i liquami degli animali allevati, direttamente immessi nelle acque o per il dilavamento dai campi coltivati, fertilizzati con deiezioni animali;

(2) dall'ambiente di lavoro in cui gli agenti di malattia alimentare sono più o meno ubiquitari (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus e*

Clostridium, virus e protozoi). In questa voce confluiscono fonti di contaminazione che sono, di volta in volta, rappresentate dalle superfici di lavoro, dal personale lavorante o dalla cosiddetta “acqua di lavoro” al cui interno possono essere sospesi i patogeni.

Nel caso specifico dei prodotti della pesca, sono più esposti a rischio di contaminazione quei prodotti che prima di arrivare al consumatore sono sottoposti a più manipolazioni, quali soprattutto i prodotti pronti a cuocere e pronti a consumo (RTE). Di conseguenza, le strategie per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da parte dei singoli patogeni devono necessariamente essere diversificate. Nel caso delle contaminazioni che provengono dall'intestino degli animali vivi (caso 1), le strategie migliori per ridurre il rischio di contaminazione microbica per i prodotti della pesca devono mirare a una maggiore attenzione verso la depurazione degli scarichi fognari e di industrie quali allevamenti di animali da reddito e macelli, quindi rivolgendo particolare attenzione all'ambiente. Per ridurre il rischio delle contaminazioni microbiche di origine ambientale (caso 2 sopra indicato), la strategia più immediata è quella di curare al massimo la deterzione e la disinfezione delle superfici di lavoro. Da questo punto di vista, non bisogna dimenticare che le superfici di lavoro sono fatalmente portate a sviluppare dei biofilm microbici, aggregati di batteri immersi in una matrice mucopolisaccaridica che li protegge dall'azione dei disinfettanti (Giaccone, 2008).

6.3 METALLI PESANTI

La valutazione del rischio tossicologico per l'uomo quale consumatore di prodotti ittici rientra nel più ampio discorso della sicurezza alimentare che è da tempo l'obiettivo per l'EFSA (*European Food Safety Authority*), incaricata dal Parlamento Europeo di svolgere una valutazione scientifica al riguardo, con particolare attenzione alle specie di elevato valore commerciale nell'Unione Europea quali salmone, aringa, acciuga, tonno, sgombro, trota e carpa.

Oltre ai composti organici persistenti quali PCB, diossine, ecc. (SEVERINO *et al.*, 2006), anche alcuni metalli quali piombo, cadmio e, in particolare, mercurio possono destare preoccupazioni per il consumatore in virtù della loro capacità di bioaccumulare e biomagnificare lungo la catena trofica (DI DOMENICO *et al.*, 2003) fino a raggiungere nei pesci predatori, come tonno e pesce spada, i più elevati livelli di contaminazione (STORELLI *et al.*, 2005).

Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg) e Piombo (Pb) sono, tra gli elementi inorganici, i contaminanti alimentari più pericolosi. Questi elementi appartengono ai metalli cosiddetti "pesanti" per la loro elevata massa volumica specifica. Tali metalli sono stati utilizzati dall'uomo da sempre, anche se il recente massiccio aumento del loro impiego ha causato una crescente mobilitazione dai loro depositi naturali e una diffusa contaminazione ambientale, specie in prossimità di insediamenti industriali, discariche e zone agricole trattate con fertilizzanti a base di metalli. A tale contaminazione è da aggiungere quella legata a cause naturali, vulcanismo o anomalie geochimiche. La principale fonte di esposizione per la popolazione generale è costituita

dagli alimenti e dall'acqua potabile. La loro tossicologia è stata estesamente studiata tanto da fissare dei limiti cautelativi di assunzione su base settimanale per Cd, Hg e Pb, mentre per il Cr, elemento essenziale ma tossico in alte dosi, sono stati definiti i livelli minimi e massimi. I metalli sono fortemente bioconcentrati dai prodotti della pesca, in particolar modo dai molluschi, fino a raggiungere livelli anche elevati.

Il **piombo** è un metallo molto diffuso in natura, esso è rilasciato nell'atmosfera dalle industrie di smalti e vernici, durante i processi di fusione dell'acciaio, di combustione dei carburanti fossili, e, fino a non molto tempo fa, della benzina. Viene immesso nell'ambiente acquatico a seguito del dilavamento superficiale del suolo, anche se il contributo maggiore è attribuibile alle deposizioni atmosferiche (*fall-out*). Il principale meccanismo che regola le concentrazioni di piombo nell'ambiente acquatico è l'assorbimento ai sedimenti o al particolato. Negli ultimi anni, l'assunzione di tale contaminante per via alimentare è in corso di diminuzione a seguito delle misure preventive intraprese a vari livelli.

Per quanto riguarda il **cadmio**, è stato stimato che circa il 50% di tale metallo presente nel mare proviene da attività umane. Le principali fonti di contaminazione di origine antropica sono associate alle attività minerarie, alle industrie metallurgiche, all'uso di fertilizzanti prodotti con fosfati di origine minerale, alle industrie di vernici e smalti e alle industrie della galvanoplastica (WHO, 1992). Nelle acque marine si riscontra abbondantemente la presenza di ioni cadmio che formano complessi piuttosto stabili con gli ioni cloro. I

molluschi tendono ad accumulare il cadmio in quantità notevolmente superiori agli altri organismi; ciò nonostante la catena alimentare acquatica ha un impatto limitato per il consumatore, salvo casi particolari e abitudini alimentari speciali. Nell'ambiente acquatico il cadmio ivi presente viene trasferito dai sedimenti e si concentra specialmente nel fitoplancton, nelle macrofite e di conseguenza nei crostacei e nei molluschi. Nei pesci i fattori di accumulo sono più bassi e il metallo si concentra principalmente nel rene e in porzioni non edibili per il consumatore come le branchie e l'epatopancreas (DEMIRAK *et al.*, 2006).

Il *mercurio* è un metallo pesante la cui presenza nell'ambiente è sia di origine naturale che antropica. Gli effluenti più pericolosi sono quelli dell'industria cartiera e degli impianti cloro-soda. Negli ultimi decenni l'utilizzo industriale di mercurio, a causa della contaminazione della catena alimentare, è stato notevolmente ridotto, ad esempio nelle apparecchiature elettriche, nelle batterie e per usi farmaceutici. Sono stati, invece, completamente banditi gli usi agricoli del metallo. La sua presenza nell'ambiente, tuttavia, è stazionaria a causa dell'elevata persistenza nelle precipitazioni atmosferiche e nei sedimenti marini. Nell'ambiente marino, subisce la trasformazione in composti organici, come il metilmercurio, ad opera di microrganismi negli strati superficiali dei sedimenti. Il metilmercurio entra nella catena alimentare attraverso il plancton per passare, poi, attraverso gli invertebrati e i pesci situati ai più bassi livelli della catena trofica ai grandi predatori dove si rinvencono le concentrazioni maggiori. Le specie ittiche eliminano difficilmente il mercurio assorbito e i tempi

di dimezzamento del metallo variano da 6 mesi per i mitili fino a 2 anni per il luccio. L'accumulo nei pesci è maggiore nel tessuto muscolare rispetto a quello adiposo e circa il 90-99% del mercurio presente nei pesci si trova sotto forma di metilmercurio, forma estremamente tossica del metallo (FERRARA *et al.*, 2004).

6.4 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.

6.5 ZONOSI PARASSITARIE TRASMESSE DA PRODOTTI ITTICI

Le infezioni parassitarie legate al consumo di prodotti ittici rappresentano un grave problema di salute pubblica a livello mondiale. Infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima una prevalenza di circa 60 milioni di casi a livello mondiale e una popolazione esposta al rischio di infezione di circa 400 milioni. In Italia la situazione è nettamente più favorevole soprattutto per le abitudini alimentari che non contemplano il consumo di elevate quantità di prodotti ittici crudi o poco cotti sia di origine marina che di acque dolci. Al problema delle infezioni vere e proprie acquisite per consumo di prodotti ittici, bisogna aggiungere il recente aumento delle allergie legate al consumo di prodotti ittici infetti da parassiti, anche se questi sono stati devitalizzati con la cottura. In Italia, per molte di queste infezioni parassitarie trasmesse dai prodotti ittici non sono mai stati raccolti dati epidemiologici sulla prevalenza per permettere una stima del rischio per il consumatore. Per alcuni parassiti la loro presenza si basa su più o meno frequenti episodi di infezioni nell'uomo o sulla base della prevalenza nei prodotti ittici.

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.

Per la profilassi bisogna procedere ad una pronta eviscerazione dei pesci e molluschi dopo la pesca per evitare che le larve presenti nella cavità celomatica migrino nei tessuti muscolari. Per la ricerca delle larve nel pesce bisogna esaminare la cavità celomatica e se i pesci non sono stati eviscerati e sono trascorse alcune ore dalla loro morte bisogna ricercare le larve tra le fibre muscolari tramite sfilettatura e osservazione controluce artificiale, o tramite digestione artificiale. Nei pesci morti da poche ore le larve di *Anisakis* vengono generalmente reperite sulla superficie delle sierose parietali e viscerali. Le larve possono essere devitalizzate mediante congelamento a -20 °C per almeno 24 ore o mediante trattamento termico ad almeno 60 °C per 10'. Chiaramente questi valori devono riguardare la parte interna del pesce per cui i protocolli variano in relazione alla specie e alla taglia del pesce. Il mantenimento in ghiaccio del pescato ritarda la migrazione delle larve. Bisogna inoltre evitare il consumo di pesce crudo o poco cotto. In 1 minuto a 65 °C o oltre, si disattivano le larve eventualmente presenti nei muscoli, è importante che questa temperatura sia raggiunta nel cuore del filetto. Le temperature dei congelatori domestici non sono sempre in grado di disattivare le larve. Ad una temperatura di -20 °C sono necessari almeno 3 giorni per

devitalizzare le larve. L'affumicatura e la marinatura non sono in grado di devitalizzare con sicurezza le larve di anisakidi. La salagione secca, se il sale è in grado di raggiungere tutte le parti del muscolo devitalizza il parassita.

7. VALUTAZIONE DELLA FRESCHEZZA

In ragione dell'estrema deteriorabilità dei prodotti della pesca, la valutazione della loro freschezza riveste un ruolo particolarmente importante, sia ai fini commerciali, che a quelli igienici. Per giunta, le attuali condizioni del mercato dei prodotti della pesca, caratterizzate da una domanda sempre più elevata ed un'offerta coinvolgente tutte le aree del globo, richiedono tecniche di valutazione della freschezza sempre più accurate. A fronte di queste aspettative, le modalità con cui si svolgono i controlli previsti dalla normativa vigente dimostrano di non soddisfare pienamente le esigenze di efficacia ed oggettività. Ciò dipende essenzialmente dall'estrema eterogeneità che questi prodotti esprimono in termini di specie coinvolte, tipi di alterazioni, ambienti di provenienza, condizioni di pesca, condizioni di conservazione etc. Il controllo ufficiale è tuttora basato sulla valutazione organolettica, metodo che manca di criteri oggettivi e universalmente validi, poiché affidato all'esperienza ed alla discrezione dell'operatore (Cianti et al., 2007). Il *Quality Index Method* (QIM), sviluppato dalla *Tasmanian Food Research Unit*, si basa sull'identificazione di alcuni parametri sensoriali significativi per la valutazione della freschezza del pesce (Bremner, 1985).

Lo schema da seguire per attribuire il punteggio varia a seconda della specie: viene dato un punteggio di demerito da 0 a 3 per ciascuno degli attributi indicati nello schema di valutazione ed i punteggi attribuiti ad ogni parametro sono sommati tra loro per ottenere un punteggio totale che rappresenta il cosiddetto *Quality*

Index. Il punteggio totale viene poi comparato con una curva di calibrazione, per stabilire la relativa freschezza in termini di giorni di conservazione in ghiaccio. In questo modo può essere ottenuta una stima della *shelf-life* rimanente. Infatti il punteggio totale ottenuto dalla somma dei punti dei singoli parametri si è dimostrato essere correlato linearmente al tempo di conservazione in ghiaccio del pesce fresco. Il vantaggio di questo metodo consiste nel fatto che esso fornisce agli utilizzatori (produttori, grossisti, venditori e dettaglianti) una misura attendibile e standardizzata della freschezza del prodotto. Secondo alcuni Autori, con il metodo QIM si può giungere ad una stima della *shelf-life* con un errore di 1-2 giorni, peraltro accettabile, rispetto ai classici metodi di laboratorio, che richiedono esami chimici e microbiologici, difficilmente realizzabili di *routine* (Lougovois et al., 2003). Il punto di debolezza del metodo è costituito dalla specie-specificità. Gli schemi di valutazione attualmente disponibili riguardano solo un numero limitato di specie ittiche. Sarebbe pertanto auspicabile che gli esperti del settore contribuissero a validare gli schemi di valutazione applicabili alle specie ittiche non ancora prese in considerazione.

8. LA SHELF LIFE

La *shelf life* di un prodotto alimentare confezionato è da molto tempo è da molto tempo dibattuta: l'organizzazione della produzione e della distribuzione, la scelta delle caratteristiche dell'imballaggio, la definizione del “termine minimo di conservazione” e della “data di scadenza”, ad esempio, sono problemi che possono essere affrontati correttamente solo conoscendo ciò che definiamo appunto “la *shelf life* del prodotto”. La traduzione letterale di *shelf life*, del termine inglese che più frequentemente viene utilizzata per descrivere la “durabilità” di un prodotto, è illuminante. Le parole “Vita di scaffale”, evocando il punto di vendita, infatti, rendono bene il significato *commerciale* del dato di *shelf life*.

La *shelf life* di un prodotto non corrisponde obbligatoriamente alla reale “vita” del prodotto perché la perdita di alcune caratteristiche (in particolare quelle sensoriali) corrisponde alla fine della commerciabilità di un prodotto, ma non necessariamente alla perdita delle caratteristiche merceologiche fondamentali o di quelle igieniche di sicurezza o, ancora, di efficacia nutrizionale di un prodotto. Non ha senso parlare in assoluto di shelf life senza specificare in quali circostanze è stata valutata o misurata, in quali condizioni di magazzinaggio, di trasporto e di distribuzione, in quali climi, in quale stagione ecc.

Una delle migliori definizioni che si possano dare del termine *shelf life* e delle traduzioni correlate è probabilmente la seguente:

...quel periodo di tempo che corrisponde, in definite circostanze (confezione, trasporto, condizioni di conservazione, clima), ad una tollerabile diminuzione della qualità di un prodotto confezionato..(L.Piergiovanni, 2002).

In questa definizione sono contenuti tutti gli elementi che danno concretezza all'espressione *shelf life*. L'aggettivo tollerabile, in particolare, va enfatizzato perché il decadimento qualitativo nel tempo di un prodotto alimentare confezionato è un evento sostanzialmente ineliminabile. Uno studio sulla *shelf life* rappresenta dunque:

- il miglior supporto per la progettazione dell'imballaggio per un nuovo prodotto;
- lo strumento ideale per l'ottimizzazione dell'imballaggio di un prodotto consolidato;
- il percorso indispensabile per prolungare lo stato qualitativo di un prodotto.

L'utilizzo di parametri microbiologici e la loro elaborazione per la previsione della *shelf-life* e della *shelf-life* rimanente (tempo di conservazione rimanente dopo l'analisi) dei prodotti ittici lavorati si è rivelato, secondo alcuni autori (*Guerzoni M.E., Spiller E., Vannini L., Kamdem S.S.*) molto più adeguato rispetto all'analisi organolettica. Comunque, è necessaria un'indagine molto estesa

sulle varie specie commerciali e sui prodotti finiti, anche con strumenti molecolari, per aver un'idea molto chiara delle modificazioni che avvengono a carico della microflora durante il processo produttivo.

Un approccio che mette a confronto l'evoluzione dei diversi gruppi microbici con l'andamento di parametri legati alle proprietà sensoriali, può permettere di individuare livelli critici di carica microbica per ogni prodotto ittico lavorato o semilavorato.

Un'integrazione maggiore tra parametri microbiologici, sensoriali e chimici è necessaria ed auspicabile, per determinare la *shelf-life* di prodotti ittici lavorati e semilavorati.

9. TECNICHE DI CONSERVAZIONE TRADIZIONALI E NUOVE TECNOLOGIE

I fattori connessi al deterioramento del pesce fresco sono strettamente correlati alla tecnica di pesca impiegata, ai tempi di permanenza delle imbarcazioni in mare, ai sistemi di lavorazione attuati a bordo, alla stagione di pesca, all'area di cattura, al rispetto della catena del freddo, alle condizioni di stoccaggio, ai sistemi di trasporto e di sbarco, alle caratteristiche di specie, e nell'ambito di ogni specie, alla taglia dei prodotti ittici in questione.

I prodotti ittici possono essere conservati attraverso l'impiego del freddo (refrigerazione, congelamento, surgelazione) attraverso l'impiego del calore o attraverso la fermentazione (semiconserve, conserve).

9.1 REFRIGERAZIONE

I prodotti ittici vengono conservati a temperatura di 0-1°C in celle frigorifere oppure mescolati a ghiaccio in scaglie in scatole di polistirolo (ghiacciatura). Il prodotto è conservato tal quale oppure viene prima eviscerato; può essere conservato anche in forma di filetto o di pesce in toto, eviscerato e confezionato sottovuoto o in atmosfera modificata. La sua vita commerciale è di circa 7-8 gg per il prodotto ittico tenuto in ghiaccio, mentre di 9-10gg per il prodotto confezionato sottovuoto. Il principale punto critico di controllo della conservazione dei prodotti ittici refrigerati è il

mantenimento della catena del freddo, durante il loro stoccaggio al mercato o al punto di vendita e il trasporto. 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.

I metodi di raffreddamento e di conservazione del pescato comprendono l'uso di acqua refrigerata di mare o dolce, ghiaccio, miscele di ghiaccio-acqua. La scelta di un sistema di raffreddamento dipende principalmente dal tipo di pesca e di battello di pesca. In certi casi il pesce viene raffreddato solo a terra. L'acqua di mare refrigerata (RSW), oltre alla sua immediata disponibilità, offre il vantaggio che, avendo l'acqua marina un punto di congelamento inferiore a quello dell'acqua dolce, può essere portata a temperature di 0°/-2°C. Necessita però di tempi di raffreddamento lunghi e si registrano svantaggi quali dilavamento del muco cutaneo ed un certo assorbimento di sale da parte della carne del pesce, che può essere controllato mantenendo il rapporto pesce /acqua il più alto possibile (Mc Lay R. 2001).

Il ghiaccio può essere prodotto con acqua salata o con acqua dolce, nel primo caso, e la FAO lo sconsiglia, deve essere prodotto

con un processo molto rapido, altrimenti il ghiaccio si forma dapprima da acqua dolce, lasciando una soluzione concentrata salina che congela successivamente; il ghiaccio ottenuto non è quindi omogeneo, con il risultato che del pesce può congelare o diventa troppo salato.

Il ghiaccio di acqua dolce può essere prodotto in blocchi o in piccoli pezzi come scaglie piatte o curve, cilindri cavi, e altri di varia forma. I pareri rispetto alle diverse qualità di ghiaccio in pezzi piccoli sono vari; il ghiaccio in scaglie o fiocchi raffredda in breve tempo, fondendo rapidamente, ma è più voluminoso del ghiaccio tritato. Più recente, anche se la tecnologia è della fine degli anni '70 e le prime applicazioni furono descritte nel 1990 da Chapman L., è l'impiego di *slurry ice*, costituito da sospensioni di microparticelle sferiche di ghiaccio (diametro 0,25- 0,50 mm) in acqua di mare (con concentrazioni in ghiaccio dal 15%, impiegato in Norvegia per il salmone intero, al 30% per il merluzzo nordico eviscerato in Nuova Scozia, e fino al 40% sulle navi da pesca spagnole) che possono essere pompate in tubi, offrono un miglior trasferimento del freddo rispetto a tutti gli altri sistemi di raffreddamento e hanno il vantaggio di coprire il pesce senza danneggiarlo, producendo una barriera all'aria, quindi all'ossidazione e alla disidratazione. La temperatura della miscela liquida è di circa $-1,5^{\circ}\text{C}$, contro $-0,5^{\circ}\text{C}$ del ghiaccio in scaglie. Gli effetti dei sistemi *slurry ice* rispetto al metodo tradizionale con ghiaccio in scaglie sono stati passati in rassegna, sia dal punto di vista tecnologico (rendimento nel raffreddamento), sia rispetto al

mantenimento delle caratteristiche fisiche e sensoriali del pesce (Piñeiro C., Barros-Velázquez J., and Aubourg S. P. 2004).

Tra i vantaggi dei sistemi *slurry ice*, gli stessi autori hanno sottolineato minori costi di gestione, un più rapido raffreddamento del pesce, prolungamento della vita commerciale e minore danno alla cute per il contatto con particelle sferiche microscopiche. Tra gli svantaggi sono indicati i maggiori costi di investimento iniziali e benefici qualitativi variabili a seconda della specie, riscontrandosi difetti come opacità dell'occhio nel branzino e decolorazione nei crostacei. Il migliore mantenimento della qualità e l'estensione della *shelf life* dei prodotti ittici conservati in *slurry ice* derivano dal rallentamento della crescita microbica e del meccanismo di degradazione biochimica (Yamada M., Fukusako S., Kawanami T. 2002) .

9.2 REFRIGERAZIONE PASSIVA

La tecnologia della Refrigerazione Passiva (PRS) si basa sull'accumulo termico, realizzato mediante congelamento di eutettici, ottenuto facendo circolare fluido frigorifero quando l'energia è disponibile e/o ha prezzi competitivi.

L'entalpia di fusione ed il punto di passaggio di stato mantengono successivamente le condizioni ottimali di conservazione per il periodo specificato mediante l'assorbimento del calore in modo progressivo e proporzionale al fabbisogno senza ulteriore impiego di energia e di gruppi frigoriferi.

La PRS quindi si basa sulla capacità di trasferire in accumulatori termici ad alta efficienza le “frigorie” necessarie per il funzionamento autonomo nel periodo specificato.

I vantaggi della PRS sono:

a) La temperatura dell’ambiente non viene regolata da un termostato ma dal punto di passaggio di stato del fluido refrigerante, garantendo una precisione nettamente superiore ed assenza di oscillazione.

b) La temperatura dell’ambiente è uniforme senza necessità di ventilazione in quanto la “sorgente di freddo” è distribuita uniformemente. Pertanto il calo peso è mediamente ridotto al 25% rispetto alla refrigerazione convenzionale.

c) Il gradiente termico fra aria e superficie di scambio è sempre inferiore a 2 °C e pertanto l’umidità relativa si mantiene costantemente sopra il 90%.

9.3 IMPIEGO DEL SALE

La salatura è il trattamento degli alimenti con il sale da cucina, cloruro di sodio, usato da secoli nella conservazione dei cibi. Il sale può essere impiegato in tutti gli alimenti, sia a secco per aspersione o miscelazione, sia disciolto in salamoie.

Può essere impiegato da solo o con altri agenti aventi azione tecnologica e conservativa sull’alimento, secondo il tipo di alimento e le prescrizioni di legge. La concentrazione alla quale è

impiegato dipende dal tipo di alimento; ne conseguono effetti diversi sia per la qualità dell'alimento, sia per l'effetto conservativo. Infatti ad alte concentrazioni come quelle impiegate nella conservazione del baccalà, alici, sardine, il ruolo del sale è diverso da quello che ha in altri alimenti come ad esempio un prodotto a base di carne (Chapman e Hall, 1995).

L'azione conservante del sale si esplica secondo due vie di inibizione:

- diminuzione dell'attività dell'acqua;
- effetto inibente specifico dello ione Na^+ ;

Alle alte concentrazioni saline l'effetto principale è quello della riduzione di a_w , ne consegue che a seconda della concentrazione salina, quindi della riduzione di a_w ottenuta, si avranno effetti diversi sulle varie specie microbiche secondo la loro sensibilità alla riduzione di a_w .

Le due vie di inibizione sono correlate, ma alle concentrazioni di NaCl impiegate negli alimenti carnei l'effetto principale è di solito quello specifico inibente degli Na^+ . Con alcune eccezioni, i microrganismi che sono sensibili alla riduzione di a_w sono sempre sensibili all'azione inibente degli ioni Na^+ . Contrariamente a quanto si verifica con le variazioni di pH, i microrganismi si adattano molto limitatamente alla crescita a concentrazioni elevate di NaCl.

Vengono inibiti soprattutto i microrganismi deterioranti come *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobatteriacee*, *Clostridium* e *Bacillus*, mentre microrganismi come

Staphylococcus aureus, micrococchi, batteri alofili e lieviti alotolleranti risentono meno a seconda della concentrazione salina e della temperatura. Concentrazioni saline più alte possono favorire lo sviluppo di microrganismi alofili. Gli alofili estremi sono tutti bastoncini o cocci Gram negativi, come *Halobacteriaceae*, genere *Halobacterium* e *Halococcus*.

Più che la concentrazione nell'alimento conta la concentrazione nella fase acquosa, WPS, Water Phase Salt, cioè il contenuto salino nella fase acquosa al netto del sale, valore che risulta tanto più alto, tanto meno l'alimento è umido.

9.4 DAL CONFEZIONAMENTO IN ARIA A QUELLO IN “ATMOSFERA PROTETTIVA”

Il confezionamento in atmosfera protettiva (*Modified Atmosphere Packaging* MAP) costituisce l'estremo sviluppo del confezionamento in pellicola plastica degli alimenti, iniziato ormai nei primi decenni del 1900. Ad esso si è arrivati attraverso il confezionamento sotto vuoto (*Vacuum Packaging* VP) per una serie di progressive considerazioni poste dal mercato e dalla produzione:

- Nella stragrande maggioranza dei casi, gli alimenti (prodotti ittici compresi) vanno incontro a deterioramento delle caratteristiche sensoriali per causa microbiologiche.

- Per l'industria alimentare è sempre stato di primaria importanza estendere il più possibile la vita commerciale dei prodotti, in modo da favorire la distribuzione capillare ai punti di vendita e la successiva conservazione nelle case di consumatori.

L'acronimo MAP deriva dalle parole inglesi "Modified Atmosphere Packaging" che tradotte in lingua italiana, significano "Confezionamento in atmosfera modificata". La legge prevede il termine di **ATMOSFERA PROTETTIVA**. Nel linguaggio tecnico scientifico, tuttavia, i termini **ATMOSFERA PROTETTIVA** e **ATMOSFERA MODIFICATA** sono spesso utilizzati come sinonimi.

Il confezionamento in "atmosfera protettiva" dei prodotti della pesca rappresenta indubbiamente una delle tecniche più interessanti nel settore della produzione di nuove preparazioni a base di pesce. Come le altre tecniche, esso esprime al massimo la sua efficacia se agisce su un substrato in buone condizioni organolettiche iniziali e, soprattutto, in ottime condizioni microbiologiche. In altri termini, il successo del confezionamento in MAP dei prodotti ittici non può prescindere dalla composizione chimica della materia prima e dalle condizioni microbiologiche di partenza.

Nonostante l'uso di gas per la conservazione degli alimenti sia nota da circa cinquanta anni, l'applicazione tecnologica di tale conoscenza è piuttosto recente. In particolare

si è sviluppata parecchio la tecnologia nel campo dei film per il confezionamento e delle macchine confezionatrici. La finalità del confezionamento in atmosfera protettiva è di prolungare la *shelf life* del prodotto e ridurre la quantità di additivi da aggiungere. Le tecniche di confezionamento in atmosfera protettiva agiscono contrastando le alterazioni causate dall'atmosfera e dei gas che agiscono sull'alimento in modo diretto o indiretto: si esegue modificando la composizione in gas dell'atmosfera interna alla confezione in cui è contenuto il prodotto, controllando così le reazioni chimiche enzimatiche ed i processi microbiologici che interessano l' alimento stesso. Dal punto di vista pratico, i vantaggi comportati dall'uso di MAP nell'industria alimentare sono di tipo economico (un prodotto con una *shelf life* più alta consente di sfruttare al meglio le economie di scala della produzione, adattare la conservazione ed il trasporto, estendere l'esportazione ai mercati esteri), igienico mantenendo nel contempo buone caratteristiche organolettiche, tecnologico per una relativa semplicità di applicazione e per la possibilità di ridurre la quantità di additivi utilizzati.

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 il MAP come “*confezionamento 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. I parametri d'interesse sono il tipo di macchina confezionatrice utilizzata, il film protettivo che deve fungere da barriera ai gas, e la miscela stessa di gas. La tipologia di prodotto che può essere conservata in MAP è piuttosto ampia: formaggi, latte in polvere, carni, insaccati, prodotti da forno, vino, frutta secca, caffè, succo di frutta, cibi precotti, prodotti forno molti altri.

I gas vengono usati in diverse percentuali a seconda delle diverse casistiche. Chiaramente, lo scopo della tecnica è di modificare la composizione gassosa rispetto a quella dell'aria,

che solitamente è data al 78,08% da azoto, al 20,95% da ossigeno al 0,934 da argon, 0,033% da anidride carbonica, da 18,2 ppm di neon, da 5,12 ppm di elio, da 2,0 ppm di metano, 1,1 ppm di krypton, da 0,5 ppm di idrogeno, da 0,5 ppm di NO₂, da 0,09 ppm di xeno (sono presenti anche acqua microrganismi e contaminanti ambientali in quantità variabili).

Ad ogni modo i più utilizzati sono:

- I. L' ossigeno, che è un gas incolore ed inodore. Ha bassa solubilità in acqua. Viene utilizzato quasi esclusivamente per il confezionamento della carne fresca e di alcuni pesci quali tonno e pesce spada, per fare in modo che vi sia un mantenimento prolungato del colore originario tramite ossidazione della mioglobina a ossimioglobina di colore rosso vivo. In tali casi si opera in percentuali superiori al 20%. Eventualmente, l' aggiunta di una quantità ridotta di ossigeno può essere effettuata per impedire la proliferazione dei batteri anaerobi costituenti rischio igienico. Chiaramente l'ossigeno è responsabile di reazioni di ossidazione quali ossidazione lipidica ed irrancidimento, per cui si deve prestare attenzione nei casi in cui si operi con carni o pesci (sgombri, salmoni, tonni) grassi. Agisce anche sul beta-carotene. Specificamente, gli acidi grassi polinsaturi sono molto instabili per via dei doppi legami e a seguito di ossidazione originano radicali liberi che come è noto, attivano reazioni a catena le quali terminano con la produzione di aldeidi e chetoni che

conferiscono sapore sgradevole. La tensione parziale di ossigeno è rilevata tramite specifici strumenti che possono essere utili nel valutare la concentrazione di ossigeno in confezioni appena prodotte.

- II. L' anidride carbonica, che è un gas incolore che ha un odore pungente ad elevate concentrazioni. Ha rilevanza dal punto di vista chimico, microbiologico ed enzimatico. In linea di massima si può affermare che tale gas ha un effetto batteriostatico, aumentando la fase di Lag ed inibisce fortemente lo sviluppo di muffe e batteri alla percentuale di 15- 40%. L' azione battericida si ha esclusivamente a percentuali molto alte. I batteri che più risentono dell' effetto dell' anidride carbonica sono muffe, lieviti ed aerobi stretti. Invece per dosi molto elevate di gas, alcuni batteri proliferano maggiormente. Tali batteri sono ad esempio clostridi, lattobacilli, stafilococchi, micrococchi (in ogni caso, i Gram negativi sono più sensibili all' anidride carbonica di quanto non lo siano i Gram positivi). Dal punto di vista chimico-enzimatico l' anidride carbonica ha azione acida che può denaturare gli enzimi che possono dare alterazioni organolettiche. La sua solubilità (e quindi la capacità di dare effetto acido) è influenzata dalla temperatura: infatti in condizioni di refrigerazione si hanno effetti migliori. Tali effetti, inoltre, si mantengono nel tempo anche dopo l' apertura della confezione: la solubilità a 0 °C è di 1,71

ml/ ml di acqua. L' anidride carbonica è solubile anche in lipidi ed altri solventi organici. Com'è noto l' anidride carbonica porta all' acidificazione del prodotto. Nelle carni, dosi troppo elevate di anidride carbonica determinano disidratazione in quanto riducono l' adsorbimento dell' acqua da parte delle proteine, facendo raggiungere all' actina ed alla miosina il loro punto isoelettrico. Nei vegetali, oltre ad inibire la respirazione di tali tessuti evitandone la maturazione, inibisce anche l' idrolisi delle pectine evitando così la fluidificazione. Vengono anche ridotti i danni da freddo sui tessuti vegetali. Inoltre l' anidride carbonica è in grado di aumentare la permeabilità di membrana in quanto aumenta la fluidità degli acidi grassi e si lega alle proteine. Si deve però considerare che l' anidride carbonica solubilizzandosi nel prodotto riduce il proprio volume nella confezione, con la conseguenza che ciò può deformare la confezione. Questo problema può essere superato tramite l'uso di *sovrapressione*, e cioè confezionando ad una pressione superiore a quella atmosferica.

III. L' azoto, che è inodore ed incolore e viene usato per la sua inerzia. È meno denso dell' aria, non è infiammabile ed è poco solubile in acqua (0.018 g/kg a 100 kPa e 20° C). È attivo solo ad altissime pressioni e concentrazioni, è inodore ed insapore. Viene dunque usato per togliere

spazio all'ossigeno limitandone gli effetti e per fare in modo che la confezione non collassi quando l'anidride carbonica si discioglie nell'alimento. Inoltre l'azoto è scarsamente in grado di permeare i film e le pellicole, dunque un'atmosfera ad elevato valore di azoto sarà più stabile nel tempo. Un'importante caratteristica dell'azoto è quella di esercitare un'azione inibitrice sugli enzimi proteolitici, prevenendo così la perdita di esudato nella carne. Vi è azione anche su alcune lipasi e decarbossilasi. Preserva inoltre la nitrossimioglobina. Non viene inoltre raggiunto il punto isoelettrico delle proteine, come invece capitava con l'uso di anidride carbonica.

- IV. L'argon, in piccole quantità, in quanto pare competere con l'ossigeno a livello di reazioni chimiche ed enzimatiche, dato che pur avendo struttura molecolare simile ha maggiore solubilità (Anon,1999).

Vengono usati anche altri gas nobili, come l'elio, lo xeno ed il neon. I materiali comunemente utilizzati in questo tipo di tecnologie sono pellicole e vaschette multistrati plastiche o metallizzate in quanto, essendo flessibili, si adattano efficacemente al prodotto da confezionare. Le vaschette, in particolare, dovranno essere ricoperte da un film plastico flessibile. Inoltre il materiale da confezionamento deve avere resistenza alle sollecitazioni meccaniche (stress e punture), anche per quanto riguarda le chiusure che devono essere sempre

ermetiche. Deve inoltre essere innocuo per il consumatore sia dal punto di vista salutistico che organolettico.

Lo svantaggio nel caso di pellicole trasparenti è rappresentato dal fatto che sono attraversate dalla luce rendendo possibili eventuali ossidazioni lipidiche. La resistenza del materiale deve essere inoltre estesa alla temperatura, nel senso che la confezione non si deve accartocciare in caso di basse temperature, né deformarsi in caso di alte temperature o di microonde (per i prodotti *ready-to-use* da cuocere direttamente in forno a microonde non si usano mai materiali a basso punto di fusione quali PVC e suoi poliaccoppiati). Si possono accoppiare, per un maggior effetto complessivo, materiali con effetti barriera diversi: in questo caso sono importanti sia i materiali che formano la confezione sia il loro spessore.

Il materiale per il confezionamento, nel caso che si tratti di una pellicola trasparente, deve anche essere poco soggetto all'appannamento facendo in modo che le goccioline si aggregino tra loro formando gocce più grandi che non impediscono la diminuzione della visibilità del prodotto. Tale caratteristica è detta *antifog*, ed è importante per prodotti come l'insalata confezionata.

Vi sono alcuni fattori e problematiche di rilevanza notevole nell'ambito delle tecnologie che si avvalgono di MAP: è sempre necessario conoscere la deperibilità dell'alimento a contatto con la normale atmosfera gassosa, il comportamento

della microflora tipica dell'alimento a contatto con l'atmosfera da noi introdotta, il modo in cui l'anidride carbonica agisce a contatto con l'alimento, la permeabilità dei materiali di confezionamento, l'effettiva integrità della confezione, l'efficacia dell'operazione di sostituzione dell'aria e la valutazione della reale composizione della miscela gassosa interna alla confezione.

Generalmente nei prodotti ittici l'atmosfera è data all' 1-3% da ossigeno al fine di prevenire la crescita di *Clostridium botulinum*, e per il resto da anidride carbonica. Mediamente, la durata di un prodotto ittico in MAP è di 10-15 giorni a temperatura di refrigerazione. Per i pesci a carne scura come tonno e pesce spada si preferiscono miscele composte al 40% da anidride carbonica, al 30% da ossigeno, al 30% da azoto. Per i pesci a carne chiara invece, sia che si tratti di magri come merluzzo, spigola, sogliola, orata, sia di semigrassi e grassi come trota, sardina, salmone, sgombro ecc., oltre che di molluschi e crostacei, si usano miscele prive di ossigeno per evitare l' irrancidimento legato all'ossidazione dei lipidi. Inoltre il rapporto ottimale pesce/gas è di 3:1.

È fondamentale, ovviamente, che il substrato sia in buone condizioni organolettiche e microbiologiche. La pellicola plastica usata in questo caso è trasparente ma impermeabile agli scambi gassosi. Le diverse miscele realizzate sono selezionate in funzione del tipo di prodotto come già descritto.

Come per altri prodotti la bassa o addirittura nulla concentrazione di ossigeno implica l'impossibilità di proliferazione per specie Gram negative aerobie quali *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, oltre che per specie aerobie- anaerobie facoltative quali le enterobatteriacee.

Per lo stesso motivo tendono a proliferare batteri lattici quali micrococchi, pediococchi, lattococchi, stafilococchi e lattobacilli. Tali batteri, grazie al loro metabolismo, forniscono una ulteriore azione protettiva, ad esempio tramite la sintesi di acidi organici e di batteriocine, tramite la produzione di acqua ossigenata, metaboliti a basso peso molecolare, oltre che alla pura e semplice competizione per i principi nutritivi e per lo spazio vitale. Si deve prestare molta attenzione ad una eventuale proliferazione di specie quali *Clostridium*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, anche in relazione ad altri parametri quali pH ed a_w del substrato.

Per prevenire l' eventuale proliferazione di *Clostridium botulinum*, è sempre necessario mantenere una certa quantità di ossigeno nella confezione.

La catena produttiva e di vendita della filiera del pesce richiede in ogni caso temperature inferiori a 3 °C per controllare l' eventuale proliferazione in confezione di microrganismi già presenti nella materia prima o legati a contaminazioni secondarie del pescato conseguenti a manipolazione o contaminazioni crociate.

Nello specifico caso del merluzzo, usato per la produzione di stocafisso ma anche di filetti e polpa, è di grande interesse soprattutto nei paesi scandinavi il prolungamento della *shelf life* di tali prodotti attraverso il confezionamento in atmosfera protettiva. In questo specifico caso, il rapido scadimento qualitativo del prodotto è da ascrivere alla formazione di trimetilamina e all' aumento complessivo dell' azoto basico volatile totale a causa dell' attività di enzimi batterici sulle masse muscolari. Il batterio responsabile di tale fenomeno è il *Phobacterium phosphoreum*, classificato come Specific Spoilage Organism.

Per quanto concerne i crostacei, ad esempio i gamberi, è conveniente confezionarli in assenza di ossigeno, in confezioni non permeabili alla luce per evitare ossidazioni e con un materiale oltre che poco permeabile, anche resistente dal punto di vista meccanico per evitare forature causate dalle antenne e altre parti appuntite dei crostacei stessi (Giaccone V., 2001).

9.5 OZONIZZAZIONE

Nel 2001 la Food and Drug Administration (FDA) ha modificato le norme riguardanti gli additivi per rendere possibile l'uso dell'ozono, quale agente antimicrobico, sia in fase acquosa che gassosa, per il trattamento e la conservazione degli alimenti.

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 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. 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.

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 °C, bolle a 111,9 °C e condensa a -112 °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.

È un gas parzialmente solubile in acqua e la solubilità aumenta quando la temperatura dell'acqua diminuisce. Ha la singolare proprietà dell'auto decomposizione per cui produce numerosi radicali liberi, tra cui quello maggiormente rappresentato è il radicale idrossido. 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. Questo forma delle bolle le cui dimensioni aumenteranno in presenza di un diffusore.

Il primo generatore industriale di ozono fu ideato da Siemens nel 1957. Esso era basato sull'effetto corona. 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. Secondo Kogelschatz, ciascuna singola microscarica ha una durata di pochi nanosecondi, ma questa risulta 2.5 o anche 3 volte maggiore nell'aria che nell'ossigeno puro. 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).

Con il metodo fotochimico, l'ozono si forma quando l'ossigeno è esposto a raggi UV con lunghezza d'onda pari a 140-190 nm. Lunghezze d'onda maggiori, intorno ai 250 nm, sono più efficaci per distruggere l'ozono piuttosto che per produrlo. L'energia delle radiazioni ultraviolette scinde alcune

molecole di O_2 in 2 atomi di O che collidono con altre molecole di O_2 producendo ozono (O_3). In questo sistema l'aria è soffiata in un cilindro posto attorno ad una lampada ad ultravioletti. Poiché le sorgenti di luce UV non sono monocromatiche, vengono generate onde di varia lunghezza cosicché in questo sistema l'ozono viene simultaneamente prodotto e distrutto. La concentrazione dell'ozono dipende dalla potenza delle lampade usate, dal diametro del cilindro che circonda la lampada, dalla temperatura, dall'umidità, dall'ossigeno contenuto nell'aria e dalla quantità di aria che viene fatta passare attraverso il generatore.

Per rilevare la presenza di ozono vengono impiegati sensori elettrochimici che operano continuamente e richiedono una minima manutenzione. La temperatura ambientale rilevata è tra i $-25^{\circ}C$ e i $50^{\circ}C$. La quantità di ozono varia in un range che va da 0 a 10 ppm con una sensibilità pari a 0.1 ppm. Il segnale in uscita può essere inviato attraverso un circuito di 4-20 mA (milliAmpere) di corrente, ad un display .

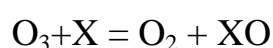
Nel metodo elettrolitico l'ozono è generato dall'elettrolisi dell'acido solforico. Molti vantaggi sono associati a questo metodo, tra cui l'uso di bassi voltaggi di corrente, nessun bisogno di gas, apparecchiature di ridotte dimensioni, possibilità di produrre ozono ad alte concentrazioni e produzione nell'acqua. Gli svantaggi sono legati alla corrosione ed alla erosione degli elettrodi ed al bisogno di appositi elettroliti o di acqua a bassa conducibilità.

Nel metodo radiochimico l'ozono si forma tramite l'irradiazione ad alta energia di ossigeno con radiazioni radioattive. A causa della complessità del processo questo metodo non è stato usato nel trattamento delle acque.

9.5.1 EFFETTI ANTIMICROBICI DELL'OZONO

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. È 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 lisi 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.

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. È 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 molto 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 contro 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*.

In presenza di materiale organico, i tempi di sopravvivenza di *S. aureus* rispetto a *L. monocytogenes*, e di *E. coli* rispetto a *S. typhimurium*, posti in acqua ozonizzata, non sono risultati influenzati dall'aggiunta di amido solubile ma sono stati fortemente ridotti dall'addizione di 20 ppm di sieroalbumine bovine. 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. I livelli medi di rendimento dell'ozono non differiscono in acqua deionizzata (0.188 mg/ml) o in acqua con amido solubile (0.198 mg/ml) ma sono significativamente più bassi in acqua contenente sieroalbumina bovina (0.149 mg/ml).

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 microbicida dell'ozono avviene nei primi cinque secondi del trattamento. Una concentrazione 1.5 volte maggiore rispetto a quella utilizzata per uccidere batteri MRSA, è sufficiente ad uccidere batteri resistenti, isolati sul campo. Soluzioni contenenti ozono potrebbero essere utili per ridurre il numero di infezioni causate da disinfezioni inadeguate a combattere nuove specie resistenti.

Recentemente è stata condotta una comparazione tra l'acqua ozonizzata e i disinfettanti clorati per valutare l'efficacia nell'eliminazione di batteri presenti nel latte trattato. Latte pastorizzato UHT inoculato con colture pure di *Pseudomonas fluorescens* o *Alcaligenes faecalis*, è stato incubato in contenitori di acciaio inossidabile. Dopo l'incubazione i contenitori sono stati rimossi e sciacquati in PBS sterile. Da uno dei contenitori è stato fatto un tampone di controllo ed è stato messo in coltura di agar standard. Un secondo contenitore è stato coperto e trattato per due minuti con un comune disinfettante clorato (dicloro-s-triazinetriene). Dopo il trattamento il contenitore è stato risciacquato due volte con PBS sterile, poi è stato fatto un tampone. Un terzo contenitore è stato posto in acqua ozonata deionizzata (5 ppm di ozono) per 10 minuti, sciacquato due volte come descritto, eseguito un tampone e seminato.

Sia l'ozonizzazione che la clorazione riducono la popolazione batterica iniziale del 99.9% in film di latte poste su

superfici di acciaio inossidabile, partendo da una densità iniziale compresa tra 1.24 e 8.56×10^5 CFU/cm² per *P. Fluorescens* e tra 1.53×10^4 e 8.56×10^5 CFU/cm² per *A.Faecalis*.

L'attività battericida 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 battericida verso cellule in fase vegetativa di tutte le cinque specie di batteri. L'età delle colture cellulari può influenzare la risposta cellulare alla seguente 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 battericidi simili sono stati osservati sulla superficie di pesce trattato con ozono, con una diminuzione di 1 log di CFU/cm².

Sono stati studiati infine la 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 di

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.

Negli ultimi anni, le tecnologie riguardanti l'ozono sono state usate soprattutto nelle industrie agrarie ed alimentari, anche se per molto tempo sono state utilizzate in altri campi. 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. 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, sia per quanto riguarda la lavorazione che il confezionamento, 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 pubblicate, 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 della carcassa.

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 $2.5 \log_{10}$ 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.

Chen e i suoi collaboratori hanno esaminato la solubilità e la stabilità dell'ozono in estratto di polpa di gamberetti (SME), 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 SME 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. È 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.

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. La tossicità dell'ozono dipende dai suoi livelli nell'ambiente e dalle condizioni d'azione come la durata dell'esposizione.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Varnam e J. Sutherland, Chapman & Hall, London, 1995
Meat and Meat products (3/217).
2. A.A.VV. (2001). *Sviluppo e sperimentazione di tecniche e tecnologie di maricoltura off-shore. Valutazione di impatto ambientale. Qualità del prodotto ittico*. Consiglio Nazionale delle Ricerche-Istituto Sperimentale Talassografico- Messina, pp 1-41.
3. Ackman R.G., 1995. *Composition and nutritional value of fish and shellfish lipids*. In: *Fish and Fisheries Products. Composition, Nutritive Properties and Stability*, pp. 117-156. Ruiter A. Ed. CAB International, Wallingford, UK.
4. Alasalvar C., Taylor K.D.A., Oksuz A., Garthwaite T., Alexis M.N., Grigorakis K. (2001). *Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods*. *Food Chemistry*, 72, 33-40.
5. Almansa E., Martin M.V., Cejas J.R., Badia P., Jerez S., Lorenzo A. (2001) *Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA*. *Journal of Fish Biology*.
6. Andrade, A., Nunes, M.L., Batista, I. (1997). *Freshness quality grading of small pelagic species by sensory analysis*, pp. 333-338.

7. Anonymous (2005) “Annual Report on Zoonoses in Denmark 2005” <http://www.dfvf.dk/Default.aspx?ID=9606>.
8. AOAC Bacteriological Analytical Manual (1998) 8th Edition, Revision A.
9. Arcangeli G., Baldrati G., Pirazzoli P. (2003). *La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione*. SSICA, Litografica Faenza, Faenza (Ra).
10. Austin B. (2002) *The bacterial microflora of fish*. The Scientific World Journal, 2: 558-572.
11. Badiani A., Adinolfi F., Bonaldo A., Fagioli P., Foschi C., Testi S., Gatta P.P. (2007) Guida alla valutazione sensoriale della freschezza di nasello (*Merluccius merluccius*), lanzardo (*Scomber japonicus*), suro (*Trachurus spp.*). Libreria Bonomo Editrice, Bologna, 178 pp.
12. Baker R.T.M., 2001. *The effect of certain micronutrients on fish flesh quality*. In: Farmed fish quality, pp. 180-191. Kestin S.C. e Warris P.D. Eds. Oxford, UK
13. Bentley S. (1997). *L'evoluzione nella disciplina dell'accertamento dei requisiti di freschezza delle derrate ittiche* – Commento al Reg. CE 2406/96. Ann. Fac. Med. Vet.
14. Becker K. e coll. (2001) “*Histamine poisoning associated with eating tuna burgers*”.

15. 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.
16. Bremner H. Allan (2000) *Safety and quality in fish processing*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
17. 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.
18. Boddi V. (2007). *L'indice di freschezza del pesce: proposta di un nuovo metodo di valutazione*. Ind. Alim., 46: 997-1003.
19. Campos C. A., Rodríguez Ó, Losada V., Aubourg S. P., Barros-Velázquez J. (2005) *Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (Sardina pilchardus)* Int. J. Food Microbiol 103, 121-130.
20. Caruso G., Maimone M., Mancuso M., Modica A., Genovese L. (2004). *Microbiological controls across the productive cycle of Dicentrarchus labrax and Sparus aurata: a study from the environment to the final product*. *Aquaculture Research*, 35(2): 184-193.
21. Cataudella S, Carrara GC. *Un mare di risorse. Introduzione alla conservazione e alla gestione delle risorse ittiche*. Roma: UNIPROM; 2000.

22. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2000). *Scombroid fish poisoning – Pennsylvania* (Vol. 49, pp. 393–398).
23. Chapman L: *Making the grade. Ice slurries get top marks for quality products*. Austral. Fish. 7 (1990) 16–19.
24. Chapman e Hall: *Meat and meat products* London 1995.
25. 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.
26. Chiappini M. (2003). *Problematiche sanitarie nel settore ittico. Criteri di freschezza*. Il Pesce, 3: 81-87.
27. Cianti L., Boccetti M., Pelatti E., Cellesi E., Catalano A., Perico A., Bavazzano P., Colzi A., Gravina M.T., Croci L, Suffredini E, Cozzi L, Toti L. *Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with E. coli, V.cholerae O1 and V. parahaemolyticus*. J Appl Microbiol 2002; 92:460-5.
28. Colwell R.R., Liston J. (1960) - *Microbiology of shellfish: bacteriological study of the natural flora of Pacific oyster (Crassostrea gigas)*. Appl. Microbiol., 8: 104-109.
29. Croci L, Suffredini E. *Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici*. Ann Ist Super Sanità 2003;39(1):35-45.

30. Dalgaard P., Gram L., Huss H. H. – (1993) – *Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres* . Int. J. Food Microbiol. 19, 283-294.
31. Dalgaard P. (1995) *Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish*. Int. J. Food Microbiol. 26: 319-333.
32. Dalgaard, P., O. Mejlholm and H.H. Huss 1996. *Conductance method for quantitative determination of Photobacterium phosphoreum in fish products*. J. Appl. Bacteriol. 81 57-64.
33. DEMIRAK A., YILMAZ F., TUNA A. L., OZDEMIR N., *Heavy metals in water, sediment and tissues of Leuciscus cephalus from a stream in southwestern Turkey*, Chemosphere, 2006, 63: 1451-1458.
34. Dias J., Alvarez M.J., Diez A., Arzel J., Corraze G., Bautista J.M. e Kaushik S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 161: 169-186.
35. EFSA (2006a) “*The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004*”. The EFSA Journal, 310.
36. Enciclopedia Multimediale Rizzoli Larousse 2000 - Copyright RCS Libri S.P.A.

37. Enciclopedia Multimediale Omnia - ©Istituto Geografico De Agostini.
38. Enciclopedia illustrata delle Specie ittiche Marine. P. Manzoni, ISTITUTO GEOGRAFICO DE AGOSTINI, NOVARA (1987).
39. 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.
40. Farber, J. M., *Microbiological aspects of MAP technology – a review*, *J. Food Prot.*, 54(1), 58, 1991.
41. FERRARA F., FUNARI E. – *Rischio chimico associato alla qualità dell'acqua del Mar Adriatico*, 2004, Rapporti ISTISAN 04/4; Rapporto finale delle attività finanziate dal progetto MURST/CNR “PRISMA2”.
42. 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.
43. Fjellanger K., Obach A. e Rosenlund G., 2001. *Proximate Analysis of Fish with Special Emphasis on Fat*. In: *Farmed Fish Quality*. pp. 307-317. Kestin S.C. e Warris P.D. Eds. Oxford UK.
44. Garrett, E. S., *Microbiological standards, guidelines, specifications, and inspection of seafood products*, *Food Technol.*, 42, 90, 1988.

- 45..Gill, C. O. (1990) *Controlled atmosphere packing of chilled meat*. Food Control 1. 74-79.
- 46..Giordano L. (2003). *La qualità dei prodotti della pesca*. Il Pesce, 3/03: 73-76.
- 47..Gram L., Huss H. H. – (1996) – *Microbiological spoilage of fish and fish products* . Int. J. Food Microbiol. 33, 121-137.
- 48..Guernoni M. E., Spiller E., Tannini L., Tandem S. S., (2006): “IL PESCE” n°1, “*Importanza dell’aspetto microbiologico nella valutazione della shelf-life residua dei prodotti ittici di nuova generazione*”.
- 49.Hallier A., Chevallier S., Serot T. e Prost C. (2007) Influence of farming conditions on colour and texture of European catfish (*Silurus glanis*) flesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 814-823.
- 50..Hatakka M., Johansson T., Lyytikäinen O., Siitonen A. (2000) “*Listeriosis cases suspected to have been caused by vacuum-packed fish products in Finland*”. Euro Surveill., 4(15).
- 51.Henderson R.J. e Tocher D.E., 1987. *The lipid composition and biochemistry of freshwater fish*. Prog. Lipid. Res., 26: 281-34
- 52..Hintlian, C. B. and Hotchkiss, J. H., *The safety of MAP – a review*, Food Technol., 40(12), 70, 1986.

- 53..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.
- 54..Holzapfel W.H. (1998) “*The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products*”. In R.G. Board & A.R. Davies (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 35–84). London, UK: Blackie Academic and Professional, London.
- 55..ISMEA, 2001. *Filiera pesca e acquacoltura*. Vol. 1, Aprile 2001.
- 56..ISMEA (2005), Osservatorio consumi ittici – Consumi domestici, report 9 gennaio-20 agosto 2005. Roma
- 57..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.
- 58..J. Kramer e C. Cantoni, OEMF Milano, II ed.1994 *Alimenti, microbiologia e igiene*.
- 59..JAMA, 285:1327-1330.CDC (2007) “*Scombroid fish poisoning associated with tunasteaks Louisiana and Tennessee*”. *MMWR* August 17, 56, 817-819.
- 60.Jobling M., Johansen S.J.S., Foshaug H., Burkow I.C. e Jorgensen E.H., 1998. Lipid dynamics in anadromous Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): seasonal variations in lipid

storage depots and lipid class composition. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 225-240.

61. Kent M., Lees A. e Christie R.H., 1991. In: *Pelagic Fish*, pp. 157-164. Burt H.R. Hardy R. e Whittle K.J. Eds., Fishing News Books, Oxford UK.

62. Kiessling A., Pickova J., Johansson L., Åsgård T., Storebakken T. e Kiessling K.H., 2001. Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. *Food Chem.* 73: 271-284.

63. Kim, T.J., Silva, J.L., Chamul, R.S., Chen, T.C., 2000. *Influence of ozone, hydrogen peroxide or salt on microbial profile, TBARS and color of channel catfish fillets*. *J. Food Sci.* 65, 1210– 1213.

64. Kosak, P. H. and Toledo, R. T., *Effects of microbial decontamination on the storage stability of fresh fish*, *J. Food Sci.*, 46, 1012, 1981.

65. Lehané, L., & Olley, J. (2000). *Histamine fish poisoning revisited*. *Journal of Food Microbiology*, 58, 1–37.

66. Lee K.-S., Yang C.C., Lin C.S. e Chow C.J. (1998). *Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life, chemical properties and color changes of fresh tilapia fillets*. *Food Science, Taiwan*, 25 (4), 477-489.

- 67..Lipp, E. K., & Rose, J. B. (1997). *The role of seafood in food-borne diseases in the United States of America*. Review of Science Technology, 16, 620–640.
- 68..Love R.M., 1970. *The Chemical Biology of Fishes*, Academic Press, New York., 547 p.
- 69.LOUGOVOIS V.P., KYRANAS E.R., KYRANA V.R. (2003) Comparison of selected methods of assessing freshness quality and remaining storage life of iced gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Food Res. Int., 36 (6): 551-560.
- 70..Love R.M., 1980. *The Chemical Biology of Fishes*, Vol. 2. Academic Press, New York.
- 71..MASSA A.E., PALACIOS D.L., PAREDI M.E., CRUPKIN M. (2005). *Postmortem changes in quality indices of ice-stored flounder (Paralichthys patagonicus)*. J. Food Biochem., 29: 570-590.
- 72.Messina C.M., Bertolino F., La Barbera L., Arena R. e Santulli A., 2001a. Quality determination of *Thunnus thynnus* reared in sea cages in western Sicily (Italy). 6^{eme} Bordeaux Aquaculture. Bordeaux - France, 20-23 Marzo 2001.
- 73.Morris, 2001. *The effects of Nutrition on the composition of farmed fish*. In: *Farmed fish quality*, pp. 161-179. Kestin S.C. e Warris P.D. Eds. Oxford UK.

74. Navarro-García G., Pacheco-Aguilar R. e Bringas-Alvarado L., Ortega-García J., 2004. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of *Dasyatis brevis* and *Gymnura marmorata* rays. *Food Chem.*, 87: 89–96.
75. 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.
76. Ogilvy, W.S and Ayres, J.C., (1951) *Post-mortem changes in meats II. The effect of atmospheres containing carbon dioxide in prolonging the storage of cut-up chicken*. *Food Technology*, 5, 97-102.
77. Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., Fujii, T., 1994. *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 631– 636.
78. Olafsdóttir, G., Luten, J., Dalgaard, P., Careche, M., Verrez-Bagnis, E., Martinsdóttir, E., and Heia, K.: *Methods to determine the freshness of fish in research and industry. Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action Evaluation of Fish Freshness*. International Institute of Refrigeration, Paris.
79. Orecchio F. e Joseffini M., 2000. *Alterazioni chimico-fisiche e problemi connessi nei prodotti della pesca*. *Rivista “Il Pesce”*, 4. <http://www.pubit.it/sunti/pes0004.html>.

- 80..Orefice L. *Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici*. In: Stacchini A (Ed.). *Contaminazione chimica e biologica dei prodotti della pesca*. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istisan, 97/5). p. 22-36.
- 81..Pedrosa-Menabrito, A. and Regenstein, J. M., *Shelf-life extension of fresh fish - a review*, J. Food Quality, 13, 129, 1990.
- 82..Piñeiro C., Barros-Velázquez J., and Aubourg S. P. (2004) *Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake-ice chilling methods*. Trend in Food Science & Technology, 15, 576-580.
- 83..Pournis N., Papavergou A., Badeka A., Kontominas M. G., Savvaidis I. N. (2005) *Shelf-life Extension of Refrigerated Mediterranean Mullet (Mullus surmuletus) Using Modified Atmosphere Packaging*. Journal of Food Protection, 68, (10), 2201-2207.
- 84.Piergiovanni L. (2002), *"Modificazioni di atmosfera"*, Distam, Milano, pp 158-173.
- 85.Poli B.M., Parisi G., Zampacavallo G., Mecatti M., Lupi P., Gualtieri M. e Franci O., 2001. Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: *shelf-life*, edible yield, nutritional and dietetic traits. Aquaculture, 202: 303-315.
- 86..PONS-SÁNCHEZ-CASCADO S., VIDAL-CAROU M.C., NUNES M.L., VECIANANOGUÉS M.T. (2006). Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. Food Contr., 17: 564-569.

- 87..Rawles, D. D., Flick, G. J., & Martin, R. E. (1996). *Biogenic amines in fish and shellfish*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 329–365.
- 88..Rodríguez Ó, Losada V., Aubourg S. P., Barros-Velázquez J. (2004) *Enhanced shelf-life of chilled European Hake (Merluccius merluccius) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity*. *Food Research Int* 37: 749-757.
- 89.Ruxton C.H.S., Reed S.C., Simpson M.J.A. e Millington K.J., 2004. *The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence*. *J. Hum. Nutr. Dietet.*, 17: 449-459.
- 90.Shearer K.D., Maage A., Opstvedt J. e Mundheim H., 1992. *Effects of high ash diets on growth, feed efficiency and zinc status of Atlantic salmon Salmo salar*. *Aquaculture*, 106, 345-55.
- 91.Sargent J.R., Tocher D.R. e Bell J.G., 2002. *The Lipids*. In: *Fish nutrition*, pp. 181-257. Edited by J.E. Halver. 2nd Edition, Academic Press, London, UK.
- 92.Shahidi F., 1995. *Seafood proteins and preparation of proteins concentrates*. In: *Seafood chemistry, processing technology and quality*, pp 3-9. Shahidi F. and Botta J.R. Eds. Chapman & Hall, UK.
- 93.Scoglio M.E., Di Pietro A., Mauro A., Picerno I., Laganà P. e Delia S.A. (2000). *Isolamento in prodotti ittici di Listeria spp., Aeromonas spp., e Vibrio spp.* *Ann. Ig.*, 12: 297-305.

- 94..Scott, D. N., Fletcher, G. C., and Summers, G., *MAP and vacuum packaging of snapper fillets*, Food Technol. Australia, 36. 330, 1984.
- 95..SCHIRONE M., RUGGERO V., VISCIANO P. (2007) *Evoluzione delle caratteristiche sensoriali di alici conservate in regime domestico*. Il Pesce, 3: 83-96.
- 96..Shewan JM. *The microbiology of sea-water fish*. In: Borgstrom G. (Ed.). Fish as food. New York & London: Academic Press; 1961.
- 97..Silliker, H. H. and Wolfe, S. K., *Microbiological safety considerations in controlled atmosphere storage of meats*, Food Technol., 34, 59, 1980.
- 98..SEVERINO L., ANASTASIO A. – *I contaminanti organici persistenti nel pesce allevato e pescato*, Il pesce n. 5, anno 2006.
- 99..Simeonidou S., Govaris A. and Vareltzis K., 1998. *Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice*. Food research international, 30,7., 479-484.
100. .Smith, J. P., Ramaswamy, H., and Simpson, B. K., *Developments in food packaging technology*. II. Storage aspects, Trends Food Sci. Technol., 11, 111, 1990.
101. STORELLI M. M., GIACOMINELLI-STUFFLER R., STORELLI A., MARCOTRIGIANO G. O. – *Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and blufin tuna from Mediterranean Sea: a comparison study*, Baseline/Marine Pollution Bulletin, 2005, 50: 993-1018.

102. .Tiecco G. (1999) “*Igiene e tecnologia alimentare*”, Ed. Agricole, Bologna, pp. 87-91.
103. Torrisen O.J., Sigurgisladottir S. e Slinde E., 2001. *Texture and Technological properties of fish*. In: *Farmed fish quality*, pp 42-57. Kestin S.C. e Warris P.D. Eds. Oxford UK.
104. Valerio Giaccone – Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria, Facoltà di Medicina veterinaria di Padova. *Malattie alimentari da prodotti della pesca: un aggiornamento*. Bologna, 24 ottobre 2008.
105. Valerio Giaccone (2001), “*Il confezionamento dei prodotti ittici sotto vuoto ed in atmosfera protettiva*”, atti del convegno “*Metodologie avanzate di ricerca e tematiche strategiche per lo sviluppo del settore agroalimentare*” tenutosi a Mosciano (Te) il 6 e 7 dicembre 2000, Media edizioni, Selva Piana di Mosciano S. A. (Te), pp 20-28
106. Valerio Giaccone (2006) “*Generalità di tecnologia alimentare dei prodotti della pesca*” Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria, Facoltà di Medicina veterinaria di Padova.
107. Ulbricht T.L.V. e Southgate D.A.T., 1991. *Coronary heart disease: seven dietary factor*. *The Lancet*, 338: 985-992.

108. Yamada M., Fukusako S., Kawanami T. (2002) *Performance analysis on the liquid-ice thermal storage system for optimum operation*. Int. J of Refrigeration, 25, 267-277
109. Waterman J.J. (2001) Torry Advisory Note, n. 21, www.fao.org.
110. Ward, D. R. and Baj, N. J., *Factors affecting microbiological quality of seafoods*, Food Technol., 42, 85, 1988.
111. WHO, – *Cadmium, Environmental Health Criteria*, 1992. Vol. 134, Ginevra.

PARTE SPERIMENTALE

I. TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DELLA “COLATURA DI ALICI” E CARATTERIZZAZIONE DELLA FLORA MICROBICA.

Abstract

La salagione è una antichissima tecnica utilizzata per la conservazione di vari alimenti ma in particolare dei prodotti della pesca. Il sale può essere usato da solo o con altri agenti aventi azione tecnologica e conservativa sull'alimento. La concentrazione alla quale è impiegato dipende dal tipo di alimento, ne conseguono effetti diversi sia per la qualità dell'alimento, sia per l'effetto conservativo. La salatura delle alici, in particolare, è una antichissima attività che risale all'alto medioevo. Inoltre se consideriamo che negli ultimi anni, si è verificato un crescente interesse dei consumatori nei confronti di prodotti alimentari con peculiari caratteristiche, è stata condotta una ricerca al fine di valutare le caratteristiche microbiologiche ed organolettiche di 5 linee di lavorazione della *Colatura di alici*, un condimento ottenuto dal processo di salagione di alici (*Engraulis encrasicolus*), prodotta in 3 differenti aziende produttrici della Costiera Amalfitana.

I bassi livelli di contaminazione riscontrati, in corso di salagione e l'eccellenza delle caratteristiche organolettiche e l'assenza di germi patogeni, valutati nella presente ricerca, rappresentano il corretto legame tra sanità, igiene e tradizione.

INTRODUZIONE

L'alice o acciuga (Denominazione obbligatoria: Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 14 gennaio 2005, G.U. n. 33 del 10 febbraio 2005, aggiornato con D.M. 25 luglio 2005, G.U. n. 181 del 5 agosto 2005), conosciuta nella nomenclatura binomiale come *Engraulis encrasicolus* (Linneo, 1758) è un pesce pelagico di piccole dimensioni che costituisce uno dei maggiori rappresentanti del pesce azzurro.

Possiede un corpo slanciato, provvisto di squame caduche, pinne ventrali poste dietro le pettorali e con una pinna dorsale provvista di raggi molli e muso breve. Le pinne pettorali sono normali e manca la pinna di tipo adiposo. La pinna caudale è forcuta. Queste caratteristiche sono dei pesci teleostei con pinne ventrali addominali appartenenti alla famiglia delle engraulidae. L'alice si distingue dagli altri clupeidi per avere la mascella inferiore più breve della superiore. Il colore è verde azzurrastro, i fianchi e il ventre sono argentei, lungo i fianchi è presente una linea marrone. L'alice è lunga circa 15-18 cm fino ad un massimo di 20 cm con testa è allungata (circa 25% della lunghezza totale), e muso prominente ed acuto. La bocca, nella parte inferiore della testa, è grande ed oltrepassa il margine posteriore degli occhi, che sono di notevoli dimensioni e negli adulti presentano una membrana adiposa. La mascella inferiore, più corta della superiore, porta piccoli denti (Figura I.1).



Figura I.1 Acciuga o alice.

È una specie dalle abitudini gregarie e migratorie, si muove in branchi molto numerosi che si avvicinano alle coste nelle stagione calda, attirati dalla presenza di plancton e fitoplancton di cui si nutre.

Il pigmento che ricopre il corpo, coperto da squame iridescenti, dà all'insieme del branco una luce azzurro-argentea caratteristica. La colorazione, tipica delle specie pelagiche, è l'azzurro con sfumature verdastre sul dorso, argentea sui fianchi e sul ventre. Le pinne sul dorso e della coda sono di colore grigio chiaro, le altre biancastre.

L'alice è molto comune nei nostri mari: per buona parte dell'anno vive vicino alla costa soprattutto durante il periodo riproduttivo (aprile-settembre), mentre nelle stagioni fredde si sposta a profondità maggiori, ogni femmina emette fino a 40.000 uova. I sessi sono separati e la maturità sessuale è raggiunta al termine del primo anno di vita (9 cm) con una riproduzione che avviene dalla primavera all'autunno in prossimità della costa. Le uova emesse da ogni femmina sono numerosissime e galleggianti, prive di gocce oleose, ellittiche, con diametro di circa 1 mm, queste, dopo 2-3 giorni schiudono e le larve, lunghe circa 2 mm, danno avvio alla vita gregaria.

Il novellame (Figura I.2) è noto con il nome di bianchetto, comune a tutto il pesce azzurro. La durata della vita raggiunge i 4 anni e a volte più.



Figura I.2 Bianchetto

L'alice è una specie eurialina si adatta bene cioè a sbalzi di salinità dell'acqua e per questo spesso la troviamo anche nelle lagune, negli stagni salmastri o negli estuari. La sua abbondanza è proporzionale alla quantità di cibo disponibile, così che nel Mediterraneo è abbondante in Adriatico, nel canale di Sicilia e nel Golfo di Genova, in ogni caso ha ampia diffusione nel Mediterraneo, nel Mar Nero e lungo le nostre coste. Questa specie è distribuita anche in Atlantico orientale, dalla parte meridionale del Mare del Nord e nelle Isole Britanniche fino al Senegal.

La produzione di acciughe è passata dalle 32.413 tonnellate prodotte nel 1986, alle 42.746 tonnellate del 1995 (dati FAO, elaborazione ISMEA), guadagnando in Italia nel 1986 e nel 1995 rispettivamente il 5° ed il 3° posto nella classifica delle prime 50 specie prodotte in Italia.

Oggi Cetara è sede della più importante flotta del Tirreno impegnata nella pesca del tonno rosso, prevalentemente destinato all'esportazione verso i mercati asiatici. Ma permane radicata nella storia e tradizione locale l'attività di pesca delle alici, destinate soprattutto alla produzione della *Colatura d'alici* di Cetara.

La *Colatura d'alici* di Cetara è un liquido ambrato ottenuto dal processo di maturazione delle alici sotto sale, secondo un antico procedimento. Regole antiche, semplici ma rigorose dei tempi sono il segreto della colatura che nasce da alici pescate con le "cianciola", tra fine marzo e inizio luglio.

Due antichi detti popolari cetaresi stabiliscono il periodo migliore per avviare e terminare la pesca di alici destinate alla salagione: "all'Annunziata 'a pampena 'e fico e l'alice salata": con l'inizio della primavera - il 25 marzo, festa dell'Annunciazione - all'albero di fico spuntano le prime foglie mentre le alici raggiungono la dimensione e la maturazione giusta per finire sotto sale. E poi "A Maddalena, 'a menaide o maiazzena", cioè col 22 luglio, ricorrenza di santa Maria Maddalena, finisce il periodo per pescare le alici da salare: è tempo di riporre gli strumenti di pesca (la menaide è un vecchio attrezzo per la pesca delle acciughe) nel "maiazzeno", un locale a pianoterra nelle tipiche case bianche o rosa dei pescatori cetaresi.

La *Colatura di alici* nasce probabilmente ad opera dei monaci cistercensi della canonica di S. Pietro a Tuezolo di Amalfi i quali salavano le alici, pescate in agosto, in botti le cui doghe, scollate dal

tempo, non erano più adatte a tenere il vino. Queste venivano sistemate sugli “mbuosti”, due travi di legno parallele murate a mezzo metro dal pavimento. Ai primi di dicembre il sale, che aveva maturato le alici, faceva perdere loro il restante liquido che colava attraverso le doghe inondando il locale di un profumo gradevole. Accortisi che il liquido aveva tutte le caratteristiche migliori dell'antico "*garum*", lo utilizzarono sulle verdure cotte con l'aggiunta di spezie ed aromi. A differenza del *garum* prodotto dell'antichità, la *Colatura di alici* è una salsa più povera perché prodotta con sole alici, ma altrettanto buona perché ottenuta nel momento in cui il processo di salagione raggiunge il perfetto punto di maturazione.

La *Colatura* diventa così, al di là del fatto puramente gastronomico, una forte ed autentica traccia del passato di un popolo marinaro. C'è grande differenza tra il *garum* e il più nobile dei suoi discendenti, la *Colatura di alici*: difatti, agli inizi, le spezie e gli aromi venivano incorporati nei recipienti unitamente ai pesci e al sale subendo così lo stesso procedimento di macerazione di questi ultimi e dando luogo a miscele di sapori ed odori non sempre graditi.

La tecnica di produzione della *Colatura di alici* fu divulgata nei monasteri della zona ed i cittadini che si organizzarono per produrla in casa filtrando con l'alambicco (cappuccio di lana o tela già utilizzato per filtrare il mosto) la salamoia delle alici che, durante la stagionatura delle stesse, fuoriusciva continuamente dai vasi utilizzati per la salagione.

Lo stesso cappuccio è usato oggi dai cetaresi per produrre la *Colatura di alici* ai quali va riconosciuto il grande merito di riproporre l'antica tradizione culinaria, simbolo della laboriosità d'intergenerazioni, che si sono tramandate di padre in figlio, l'arte di salare e quindi di filtrare il liquido dall'intenso sapore, digeribile e ricco di vitamina A, frutto della sapiente stagionatura e pressatura delle alici salate.

TECNOLOGIA DI PRODUZIONE

La *Colatura d'alici di Cetara* è un liquido ambrato ottenuto dal processo di maturazione delle alici sotto sale, seguendo un antico procedimento tramandato di padre in figlio dai pescatori di Cetara. Regole semplici e tempi precisi.

La materia prima di partenza è costituita dalle Alici o Acciughe (*Engraulis Encrasicolus*) pescate con la tecnica del 'cianciolo' (utilizzo della Lampara) esclusivamente nel Golfo di Salerno nel periodo primaverile, da fine marzo a inizio luglio. La lavorazione del prodotto può iniziare anche a bordo dei pescherecci, la fase preliminare, eseguita sempre a mano, consiste nell'allontanamento della testa esercitando una lieve pressione sulle pareti addominali, operazione che facilita la maggior parte dei visceri dalla breccia cefalica.

Lo stivaggio, in contenitori di varia capacità, si esegue disponendo alternativamente strati di pesce e di sale in grani nella concentrazione del 30%. È uso comune comprimere con un adeguato peso la composta per favorire la fuoriuscita dell'aria residua. La comparsa di piccoli punti o di una sottile patina biancastra sulla cute del pesce indica la completa maturazione del prodotto che a temperatura ambiente è ottenuta in circa 30-40 giorni. A questo punto si passa alla seconda fase della lavorazione che consiste nella trasformazione delle alici in un prodotto liquido. Le alici salate, quindi, giunte a giusta maturazione, in particolar modo nel tardo

autunno quando la salagione ha beneficiato del lungo caldo estivo, sono pressate con appositi pesi.

Il liquido originato da tale pressatura viene raccolto e collocato in tipiche sacche a forma di cappuccio conico, appese ad apposite ganciere, insieme ad una parte di alici mature triturate grossolanamente.



Figura I.3 Sacche utilizzate in una delle aziende da noi sottoposte ad indagine.

Si viene così ad originare un composto dalla consistenza morbida che viene mescolato e filtrato attraverso il tessuto della sacca, posizionata con la punta rivolta verso il basso, che presenta l'estremità apicale munita di un piccolo foro. Nell'arco di 48 ore si procede a più filtrazioni, generalmente due, fino ad ottenere un distillato colore bruno ambrato e di sapore deciso e corposo. Il liquido senza aggiunta di aromi e/o conservanti viene successivamente imbottigliato previa etichettatura. Nelle immagini successive viene riportata la tecnica di lavorazione della *colatura di alici*.

I FASE: LA PREPARAZIONE DEL TERZIGNO (DALLE ALICI FRESCHE ALLE ALICI SOTTO SALE)



1. Le alici fresche appena pescate.



2. Vengono decapitate ed eviscerate, con un semplice gesto manuale



3. Le alici prive della testa e delle interiora, cosparse di sale marino abbondante e mantenute per 24 ore.



4. Vengono prelevate e inserite in un apposito contenitore in legno di rovere, il TERZIGNO (un terzo di una botte).



5. Sistemate con la classica tecnica 'testa-coda' a strati alterni di sale e alici.



6. Terminata la fase della "salatura", la alici si lasciano maturare per quattro-cinque mesi.

Completati gli strati, il contenitore viene coperto con un disco in legno (detto *tompagno*), sul quale si collocano dei pesi (pietre marine). Per le prime 48 ore si esercita una pressatura maggiore, quindi si passa a livelli di pressione inferiore. Il liquido, per effetto della pressatura e della maturazione delle acciughe, comincia ad affiorare in superficie. Mentre nel normale processo di conservazione delle alici viene prelevato ed eliminato, esso è la base per la produzione della colatura.

II FASE: LA PRODUZIONE DELLA COLATURA: (DALLE ALICI SOTTO SALE AL LIQUIDO AMBRATO)



1. Al termine della fase di salatura, una volta riempito il "terzigno", viene appoggiato, direttamente sull'ultimo strato, un coperchio di legno detto "tompagno".



2. Sul "tompagno" viene posata una pietra marina abbastanza pesante."



3. Quando le alici giungono a maturazione, dopo quattro o cinque mesi, il liquido affiora in superficie, grazie alla pressione esercitata dalla pietra marina.



4. Al termine del processo di maturazione delle alici, in genere fra la fine del mese di ottobre e gli inizi di novembre, tutto è pronto per l'ultima fase del processo.



5. Attrezzo appuntito detto "vriale".



6. Viene praticato un foro sotto il terzigno.

Raccolto progressivamente, man mano che lo stesso si produce per effetto della pressatura e dell'azione del sale, il liquido viene inserito in boccioni o grandi bottiglie di vetro. Mentre procede la maturazione lenta delle acciughe in locali freschi ed areati (a temperatura ideale di 18°-20° C), il terzigno viene esposto a fonte di luce diretta del sole estivo: l'acqua evapora lentamente ed aumenta la concentrazione dello stesso





7. Serie di immagini che mostrano la lenta progressione del liquido dal terzigno ad un altro recipiente.



8. Attraversando lentamente i vari strati il liquido raccoglie il meglio delle caratteristiche organolettiche delle alici.

9. Il liquido fuoriesce, già filtrato dagli stessi strati di alici e sale, dal foro praticato.



10. La colatura viene raccolta in un recipiente di vetro e quindi imbottigliata.

Da qui, il liquido, può essere filtrato con l'utilizzo di appositi teli di lino, detti 'CAPPUCCI'.

Agli inizi di dicembre la *colatura di alici di Cetara* è pronta per condire il piatto forte delle feste natalizie. È quasi un rituale antico: ogni famiglia se la procura per condire gli spaghetti o le linguine, immancabili nelle cene vigiliari. Una tradizione vera, molto sentita, che ogni anno ricorda ai cetaresi la propria storia di popolo marinaro. Oggi questo tipico e genuino condimento della gastronomia locale ha trovato un suo primo riconoscimento. La *Colatura d'Alici di Cetara* è inserita nello speciale elenco, elaborato dal Ministero per le politiche agricole (D.M. 18.7.2000), dei prodotti agroalimentari tradizionali da tutelare e da salvaguardare.

Tutto ciò si è verificato mentre a livello nazionale cresce l'interesse per la tutela dei prodotti tipici e tradizionali, espressione del territorio e delle sue peculiarità, in risposta alla massificazione delle produzioni e del gusto, imposte dall'applicazione sempre più spinta di metodi industriali di produzione in grande scala di prodotti alimentari.

In questo quadro si è inserita questa normativa nazionale – il Decreto Ministeriale del 18.7.2000: 'Elenco dei prodotti agroalimentari nazionali - con la quale si è inteso porre le basi per una codificazione dei prodotti tipici e tradizionali, al fine di pervenire ad una definitiva tutela attraverso gli strumenti offerti dalla normativa nazionale ed europea in tema di prodotti DOP, IGP ecc..

Il predetto provvedimento, aggiornato con il Decreto del 19.6.2001, ha individuato la *Colatura di Alici di Cetara* fra i prodotti tradizionali meritevoli della tutela di cui agli articoli 5 e 6 del citato decreto del Ministro delle Politiche agricole.

La “*colatura d'alici di Cetara*” è presidio Slow Food dal mese di novembre del 2003.

La *colatura* è un prodotto tipico; rientra nell’elenco previsto dall’Articolo 8 del Decreto Legislativo 173/98 e dal successivo Decreto Ministeriale applicativo n. 350 del 08/09/1999 ed aggiornato con Decreto Ministeriale 19/06/07.

MATERIALI E METODI

Sono state sottoposti a controllo microbiologico ed organolettico, campioni di *Colatura di alici* provenienti da 5 linee di lavorazione prodotte in tre diverse aziende (Azienda A, Azienda B, Azienda C) ubicate nella zona di produzione in provincia di Salerno.

Complessivamente sono state analizzate 29 unità campionarie secondo lo schema riportato in tabella I.1.

Azienda	A		B		C	Totale
Linee di produzione	LINEA A ₁	LINEA A ₂	LINEA B ₁	LINEA B ₂	LINEA C	5
Numero di unità campionarie	6	6	6	6	5	29

Tabella I. 1 Unità campionarie di alici in corso di salagione e di Colatura sottoposte ad analisi.

I campioni sono stati prelevati sia durante il processo di salagione delle alici sia alla fine di tale processo sul prodotto finito secondo lo schema riportato nella tabella I. 2

Azienda	A		B		C
Linea di produzione	LINEA A ₁	LINEA A ₂	LINEA B ₁	LINEA B ₂	LINEA C
Giorni di salagione delle alici	10°	9°	10°	31°	49°
	25°	24°	25°	46°	97°
	73°	72°	73°	94°	126°
	102°	101°	102°	123°	154°
	130°	122°	130°	151°	
Prodotto finito	159°	158°	159°	180°	193°
			215°	236°	

Tabella I. 2 Calendario dei prelievi

La colatura di alici è stata prodotta, in tutte le aziende, secondo la tecnologia di lavorazione in uso nella tradizione cetarese e precedentemente descritta.

Il processo di salagione delle alici è durato, a seconda della azienda, dai 130 ai 160 giorni in rapporto alle dimensioni delle alici e alla temperatura di conservazione.

Tutti i campioni sono stati trasportati presso il Laboratorio della Sezione di Ispezione degli alimenti di origine animale del

Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli alimenti della
Facoltà di Medicina Veterinaria.

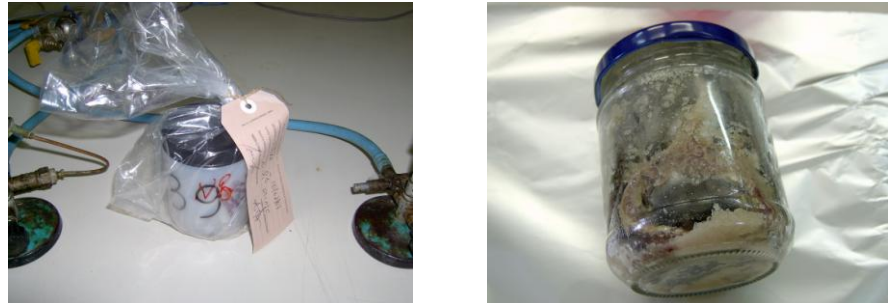


Figura I.4 Campioni

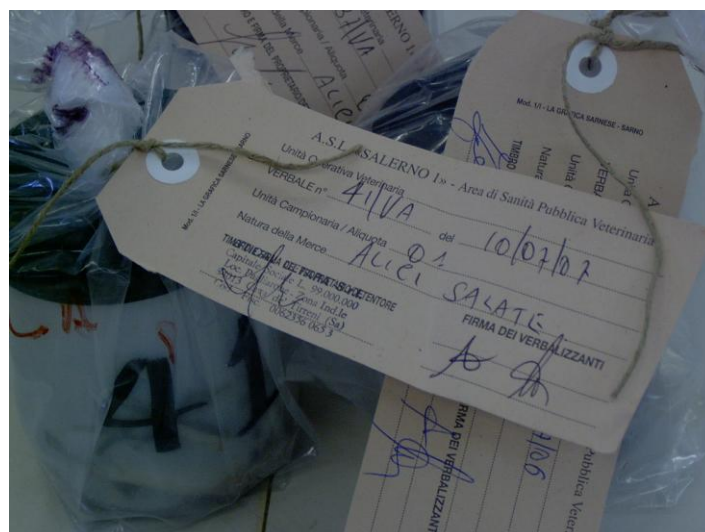


Figura I.5 Campioni etichettati per l'analisi

CONTROLLI DI LABORATORIO

a. Controlli in corso di salagione e sul prodotto finito

I campioni, prelevati durante il processo di salagione, (Figura n. I.6) sono stati omogeneizzati in Stomacher (Stomacher Lab-Blender 400, pbi international) e previo allestimento delle opportune diluizioni



Figura I.6 Campioni di alici in via maturazione

in acqua peptonata tamponata, sono state sottoposti alla ricerca dei seguenti microrganismi, impiegando i terreni e le metodiche di seguito riportate:

- Flora aerobia totale (Plate Count Agar a 20° e 30°C per 24-48 ore),
- Flora psicrofila totale (Plate Count Agar a 5°C per 10 gg.), inoculo 0.01 g;
- Coliformi ed E. coli (Brodo Lattosato Verde BrillanteBile a 37°C per 24-48 ore e prova di MacKenzie), inoculo 0.1g;

- Lattobacilli (MRS Agar a 37°C), inoculo 0.1 g;
- Enterobatteri (Violet Red Bile Glucose Agar a 37°C per 24-48 ore), inoculo 0.1 g;
- Clostridi solfito-riduttori (SPS Agar a 43°C per 24 ore), inoculo 1 g;
- Lieviti e muffe (Rose Bengal Chloramphenicol Agar + Chloramphenicol antibiotic supplement a 22° per 5 gg.) inoculo 0.1 g;
- Pseudomonas spp. (Pseudomonas Agar Base + glicerolo + Pseudomonas C-N Supplement 22° per 2 gg) inoculo 0.1g;
- Batteri produttori di idrogeno solforato (Iron Sulphite Agar a 22°C per 7 gg.), inoculo 0,1 g;
- Stafilococchi potenzialmente patogeni (Baird Parker a 37°C per 24-48 ore e successiva ricerca della coagulasi e della DNAsi), inoculo 0.01 g;
- Salmonella spp. (Acqua peptonata tamponata a 37°C per 16-18 ore, brodo selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth a 43°C per 24-48 ore, Hektoen enteric agar e Rambach agar a 37°C per 24 ore), inoculo 25 g;
- Listeria monocytogenes in 25 g (LEBB + UVM 1 a 30°C per 24 ore, semina della brodocultura 1 in LEBB + UVM) a 30°C per 24 ore, isolamento della brodocultura 2, su Palcam agar incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizioni di microaerofilia),

e Listeria monocytogenes in 10g (secondo la metodica indicata nell'OM. Del 13 12.1993) inoculando 10g di campione in 90 ml di Acqua Peptonata allestimento di diluizioni scalari fino alla - 3) inoculo di 1 ml di campione diluito in 9 ml di TSA+YE in triplice copia per ogni campione, incubato per 18-20 ore a 32°C, semina di 1 ml di ogni brodocultura in 9 ml di Fraser Broth incubato per 24-48 ore a 32°C, semina delle brodoculture positive 0,01 µl su Listeria Selective Agar Base (Oxford) incubato a 37°C per 24-48 ore; inoculo 10 g.

- Bacillus cereus (Bacillus cereus agar base 37° per 1gg; 23° per 1 gg.), inoculo 0,01g;
- Yersinia enterocolitica (Dulbecco A per 15 gg a 4°C), doppio passaggio selettivo su Yersinia Selective agar (Oxoid) incubato a 25-26°C per 18-24 ore; inoculo 0,1µg.
- Le colonie sospette isolate sono state identificate con Sistemi API Biomerièux utilizzando:
 - API Staph, e ID 32 rapid per lo Staphylococcus aureus;
 - API listeria per Listeria spp e monocytogenes;
 - API CHB per il Bacillus cereus;
 - API 20 E per Salmonella spp. e Yersinia enterocolitica.

b. Controlli organolettici

Sono stati costantemente valutati il colore, la consistenza e l'aspetto generale delle alici all'apertura della confezione e, dopo il prelievo per l'esame batteriologico, la consistenza, il colore e l'odore in profondità e quantità e caratteristiche del liquido qualora presente nel campione.

Inoltre controlli organolettici sono stati effettuati sul prodotto finito.

c. Determinazione del pH e dell' a_w

Per ogni campione è stato determinato il pH con il metodo potenziometrico utilizzando un pHmetro Metrohm 691 (Figura I.7).



Figura I.7 Valutazione del pH e dell' a_w

Per l' a_w è stato utilizzato un misuratore HygroLab 2ro-Tronic Pbi-International (Figura I.7).

RISULTATI

a. Risultati dei controlli microbiologici delle alici in corso di salagione.

I risultati relativi alla *Flora Aerobia Totale (FAT)* a 32° e a 5°C, ai lattobacilli, ai coliformi, agli enterobatteri, ai lieviti ed alle muffe, delle aziende A, B, e C sono riportati per nelle Tabelle n. I.3, I.4, I.5 e nei grafici n. 1 e 2.

Azienda	Linea di produzione	Giorni produzione	f.a.t. 3 2°C (log ₁₀ ufc/g-ml)	f.a.t. 5°C (log ₁₀ ufc/g-ml)	Lattobacilli (log ₁₀ ufc/g-ml)	Coliformi (log ₁₀ ufc/g-ml)	Enterob. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Staf. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Micr. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Lieviti (log ₁₀ ufc/g-ml)
A	Linea AI	10°	2,69	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	3,45	3,11	1,46
		25°	2	Ass.	1,47	Ass.	1	2	Ass.	Ass.
		73°	2,23	Ass.	1	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		102°	2,98	Ass.	2,71	Ass.	Ass.	2,69	2,47	1
		130°	2,55	Ass.	2,14	Ass.	Ass.	3,77	Ass.	Ass.
		159°	2,54	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		130°	3,79	Ass.	3,66	Ass.	Ass.	2,47	2,6	Ass.
	Linea AII (log ₁₀ ufc/g-ml)	9°	2,88	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.	1,77
		24°	2,55	1	2,51	Ass.	Ass.	2	Ass.	1,3
		72°	2,69	Ass.	1,69	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		101°	2,93	Ass.	2,86	Ass.	Ass.	2,47	2	1
		129°	2,74	Ass.	2,3	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	Ass.
		158°	Ass.	Ass.	1	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.

Tabella I.3 Cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) relative all' azienda A

Azienda	Linea di produ.	Giorni Produ.	f.a.t. 32°C (log ₁₀ ufc/g-m)	f.a.t. 5°C (log ₁₀ ufc/g-ml) °C	Lattobacilli (log ₁₀ ufc/g-ml)	Coliformi (log ₁₀ ufc/g-ml)	Enter. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Staf. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Micr. (log ₁₀ ufc/g-ml)	Lieviti (log ₁₀ ufc/g-ml)
B	Linea B1	10°	4,1	3,81	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		25°	1,47	3,63	1,3	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		73°	1,69	Ass.	1,47	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		102°	2,14	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		130°	1	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.
		159°	2,64	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	2,47	2,95	2,17
	215°	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	
	Linea B2	31°	1	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	4	Ass.	Ass.
		46°	1,3	3,11	1	Ass.	Ass.	2,6	Ass.	1,47
		94°	1	Ass.	1	Ass.	Ass.	2	Ass.	1,3
		123°	1,3	Ass.	1	Ass.	Ass.	2	2	Ass.
		151°	1	Ass.	1,95	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.
		180°	1,3	Ass.	1,47	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.
		180°	2	Ass.	1,77	Ass.	Ass.	2	2,69	Ass.
		236°	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.

Tabella I.4 Cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) relative alla azienda B

Azienda	Linea di produz.	Giorni produzione	f.a.t. 32°C	f.a.t. 5°C	Lattob.	Colifo.	Enter.	Staf.	Micr.	Lieviti
C	Linea C (log ₁₀ ufc/g-ml)	49°	1,95	4,9	1,3	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	1,77
		97°	1,84	Ass.	1,3	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	1
		126°	2,23	Ass.	2	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		154°	1,84	Ass.	1,95	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
		193°	1,9	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	2	2,47

Tabella I.5 Cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) relative alla azienda C

Grafico n. 1

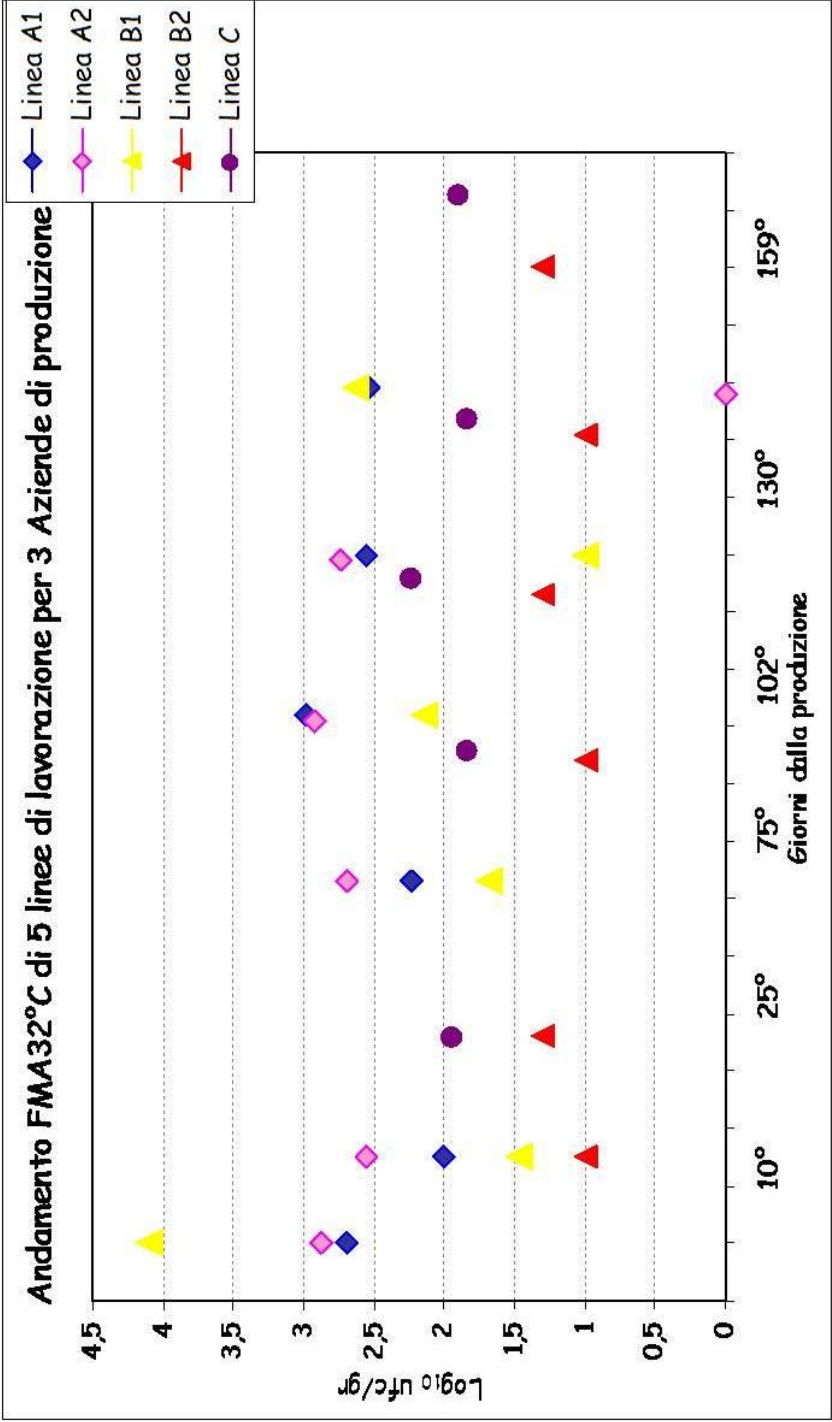
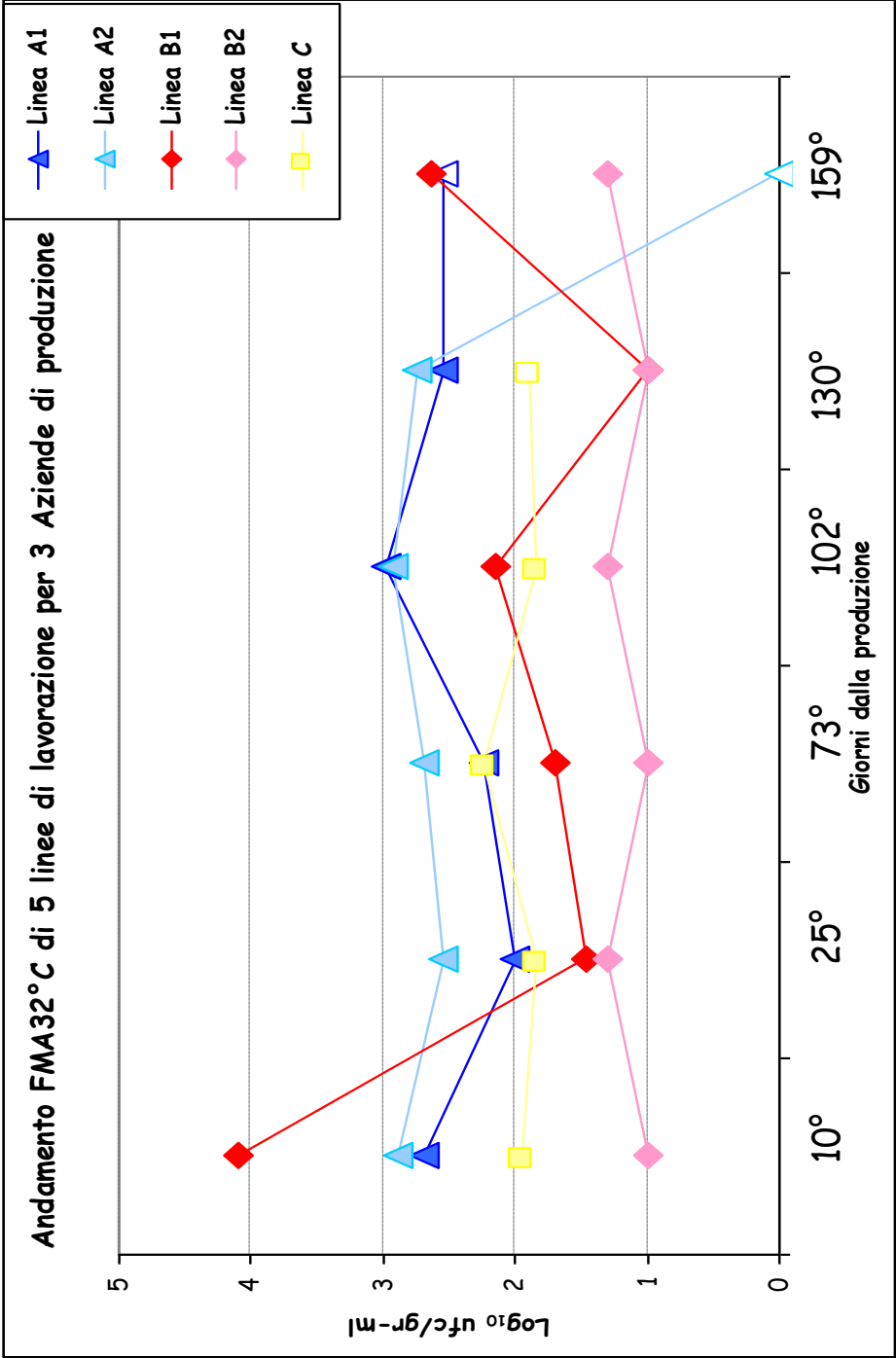


Grafico n. 2



La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* nella linea di produzione A1 si è attestata a valori compresi tra $\log_{10} 2$ e $2,98$ ufc/g.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* nella linea di produzione A2 si è attestata a valori compresi tra $\log_{10} 2,55$ e $2,93$ ufc/g.



Figura I.9 Liquido nella confezione

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* nella linea B1 si è attestata a valori compresi tra $\log_{10} 1$ e $4,1$ ufc/g.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* nella linea B2 è risultata compresa tra $\log_{10} 1$ e $1,3$ ufc/g.

I risultati della *FAT a 32°C*, nella linea di produzione C sono risultati compresi tra $\log_{10} 1,84$ e $2,23$ ufc/g.

La *Flora Aerobia Totale a 5°C* è risultata sempre assente nella linea di produzione A1, mentre nella linea di produzione A2 presente in una sola unità campionaria con un valore di $\log_{10} 1$ ufc/g.

Nella azienda B, invece i valori sono risultati compresi tra $\log_{10} 3,63$ e $3,81$ ufc/g nella linea B1 mentre nella linea di produzione B2 è

risultata presente in una sola unità campionaria con un valore di \log_{10} 3,11 ufc/g.

Nella azienda C è presente in una sola unità campionaria con un valore pari a \log_{10} 4,9 ufc/g.

I *Coliformi totali* sono risultati sempre assenti in tutte le linee di produzione.

I *Lattobacilli* nella linea A1 si sono attestati tra valori di \log_{10} 1,47 e 2,71 ufc/g, nella linea di produzione A2 sono presenti con valori compresi tra \log_{10} 1 e 2,86 ufc/g. Nella linea B1 i valori sono risultati compresi tra \log_{10} 1,3 e 1,47 ufc/g e in B2 tra \log_{10} 1 e 1,95 ufc/g. Infine, nell'azienda C tra \log_{10} 1,3 e 2 ufc/g.

Gli *Enterobatteri* sono presenti in un'unica unità campionaria al valore \log_{10} 1 ufc/g nella linea A1 e nella linea di produzione A2 in due campioni con lo stesso valore di \log_{10} 1,3 ufc/g. Nelle aziende B e C sono risultati sempre assenti.

I *lieviti e le muffe* sono risultati presenti con un valori di \log_{10} 1,46 e 1 ufc/g nella linea A1, nella linea A2 tra \log_{10} 1 e 1,77 ufc/g.

Nella azienda B i *lieviti e le muffe* sono presenti in unica unità campionaria della linea 1. Nella linea B2 sono presenti in due campioni con valori di \log_{10} 1,3 e 1,47 ufc/g. Nella linea C con valori di 1 e 1,77 ufc/g.

Stafilococchi potenzialmente patogeni sono risultati presenti in 4 unità campionarie della linea di produzione A1 con valori compresi

tra $\log_{10} 2$ e 3,77 ufc/g e nella linea A2 con valori compresi tra $\log_{10} 2$ e 2,47 ufc/g. Nella azienda B sono assenti.

Bacillus cereus è risultato presente in due aziende. Nella azienda A in entrambe le linee di produzione ed in particolare nella A1 in una unità campionaria con un valore di $\log_{10} 2$ ufc/g, nella linea A2 in tre unità campionarie con lo stesso valore di $\log_{10} 2,47$ ufc/g. Nella azienda B è risultato sempre assente, mentre nella azienda C presente in un unico campione con un valore di $\log_{10} 2,50$ ufc/g.

Pseudomonas spp., *Clostridi solfito-riduttori*, *Batteri produttori di idrogeno solforato*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* sono risultati sempre assenti.

***a1. Risultati dei controlli microbiologici del prodotto finito:
Colatura di alici.***

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* nella linea A1 si è attestata con un valore di $\log_{10} 2,54$ ufc/ml, mentre nella linea A2 è risultata assente. Nella azienda B la *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* è risultata presente in un solo campione (linea B1) con valori di 2,64 ufc/ml. Nella azienda C è risultata sempre assente.

I *Lattobacilli* presenti solo in una unità campionaria relativa alla linea di produzione A2 con un valore di $\log_{10} 1$ ufc/ml.

Staphylococcus aureus è stato isolato con un valore di $\log_{10} 2$ ufc/ml sia nella azienda B, linea di produzione B2, che nella azienda C, con un valore di $\log_{10} 2,10$ ufc/ml.

I lieviti e le muffe sono risultati presenti in unico campione della azienda B, linea B1, con un valore di $\log_{10} 2,17$ ufc/g.

La *Flora Aerobia Totale a 5°C*, i coliformi, gli enterobatteri, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridi solfito-riduttori*, Batteri produttori di idrogeno solforato, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* sono risultati sempre assenti nel prodotto finito.

b .Risultati dei controlli organolettici

I caratteri organolettici delle alici in corso di salagione per tutto il periodo di maturazione sono risultati ineccepibili. Odore, colore e consistenza sono stati considerati di eccellente qualità.

Le alici nelle aziende A e B si presentavano abbastanza grandi nelle dimensioni con un peso all'incirca di 11,2g. Nell'azienda C, invece gli esemplari avevano dimensioni ridotte, ma caratteri ugualmente ottimi (Figura I.10).



Figura I.10 Alici con dimensioni differenti

L'odore percepito è risultato sempre riferibile a quello di un prodotto fresco, con il passare dei giorni di maturazione l'odore percepito diveniva più aromatico e sempre correlabile ad un prodotto sottoposto ad un normale processo di salagione.

Il colore, rosso intenso nel punto di eviscerazione (Figura I.11) è tipico di questa area e non presenta caratteri di anomalia.

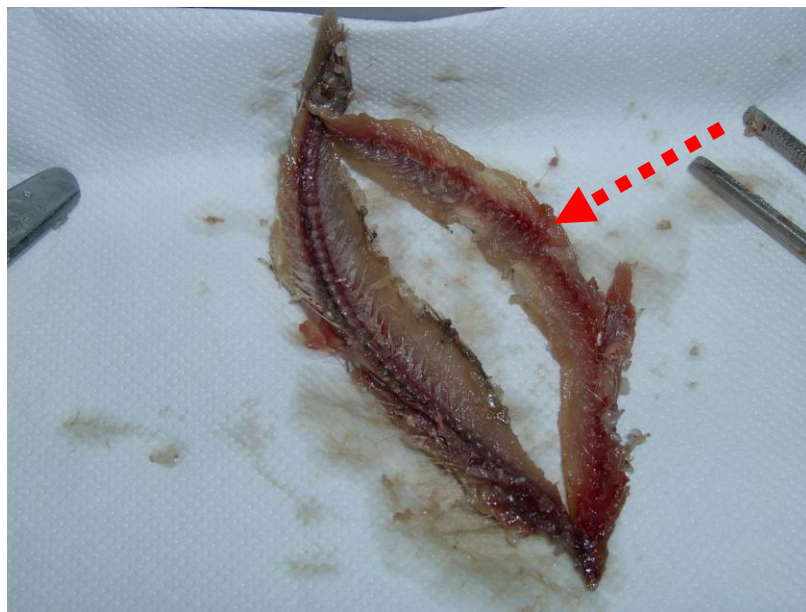


Figura I.11 Colore rosso intenso

Gli esemplari hanno sempre mantenuto l'integrità anatomica con muscolo compatto e sodo.



Figura I.12 Integrità anatomica.

Ben visibile nelle aziende *A* e *B* l'abbondanza di sale grosso (Figura I.13), cosa meno evidente nell'azienda *C*.



Figura I.13 Sale visibile.

A fine processo di salagione gli esemplari di alici risultavano meno sodi ed in alcuni casi si sono osservate modifiche del colore (Figura I.14).



Figura I.14 Variazioni di colore in corso di stagionatura

Durante il processo di maturazione aumenta il liquido contenuto nella confezione, ma nel complesso le caratteristiche organolettiche rimangono buone e stabili.

Le caratteristiche organolettiche del prodotto finito hanno rilevato un liquido di colore ambrato dal profumo gradevole, salato ed intenso (Figura I.15).



Figura I.14 Campioni di Colatura di alici

c. Risultati della determinazione del pH e dell' a_w

Nella tabella n. 4 sono riportati i dati relativi all'andamento del pH e dell'attività dell' a_w .

La media dei valori di pH è stata di 6,40, e dell' a_w 70,4.

Azienda	Linea di produzione	gg	pH	a _w
A	Linea A1	10°	5,57	72,8
		25°	6,66	71,5
		73°	6,50	80,0
		102°	6,60	69,3
		130°	6,40	68,0
		159°	6,70	73,2
		130°	6,40	68,0
	Linea A2	9°	5,75	72,9
		24°	6,59	70,9
		72°	6,43	79,4
		101°	6,60	68,3
		129°	6,30	70,3
		158°	6,60	73,4
		158°	6,60	73,4
B	Linea B1	10°	5,76	71,0
		25°	6,55	71,6
		73°	6,72	79,4
		102°	6,70	68,3
		130°	6,40	71,0
		159°	6,70	76,5
		215°	6,27	74,1
	Linea B2	31°	5,70	73,5
		46°	6,56	72,0
		94°	6,58	78,9
		123°	6,50	69,2
		151°	6,70	70,7
		180°	6,59	75,3
		236°	6,30	73,3

Tabella I.6 Valori di pH e di a_w riscontrati in corso di salagione di alici destinate alla produzione di *Colatura di alici Cetarese*

CONCLUSIONI

I livelli di contaminazione batterica riscontrati nel prodotto in corso di salagione sono risultati per la Flora aerobia a 32° C e a 5°C sempre inferiori a $\log_{10} 3$ ufc/g, rimanendo costanti nel corso della maturazione del prodotto in ogni singola linea di lavorazione.

I livelli di contaminazione delle altre specie batteriche ricercate si attestano a livelli inferiori a quelli della flora aerobia a 32° e 5°. I livelli riscontrati si possono mettere in relazione ad un normale processo di salagione delle alici.

Per la *Colatura di alici cetarese* non sono presenti in letteratura dati bibliografici riferibili a studi effettuati sul profilo microbiologico.

In passato la sicurezza di un alimento era garantita dal controllo delle caratteristiche qualitative ed igienico sanitarie del prodotto alla fine del ciclo di produzione, oggi ciò è ancora in parte attuale, ma i Regolamenti Comunitari del pacchetto igiene impongono la responsabilità di ciò che si produce all'operatore del settore alimentare, che deve attraverso lo studio del proprio prodotto assicurarne la salubrità attraverso l'autocontrollo.

Uno dei sistemi attraverso il quale il produttore può assicurare ciò è attraverso il ricorso al sistema HACCP. Una fase chiave del sistema HACCP è quella dell'identificazione dei pericoli e dei punti critici cioè di quelle del processo nelle quali si possono mettere in atto interventi, oppure individuare procedure per eliminare o ridurre il rischio.

Un altro strumento del produttore è quello di avvalersi di Manuali di buona prassi igienica che consentono una corretta gestione dell'igiene durante le fasi di produzione. Inoltre ai fini della valutazione del rischio microbiologico, connesso al consumo di questi prodotti, è opportuno una standardizzazione della tecnologia adesso ancora semi-artigianale, attraverso la scelta di materia prima ineccepibile dal punto di vista microbiologico, ed attraverso, come precedentemente sottolineato, un attento controllo e monitoraggio del processo produttivo.

L'eccellenza delle caratteristiche organolettiche e l'assenza di germi patogeni, valutati nella presente ricerca, rappresentano il corretto legame tra sanità, igiene e tradizione.

La *Colatura di alici* di Cetara è il nobile discendente del *garum* romano, menzionato da Plinio, usato dal grande cuoco imperiale Apicio che faceva grande uso di questa salsa nel preparare i suoi banchetti. Essa è un liquido ambrato ottenuto dal processo di maturazione delle alici sotto sale, seguendo un antico procedimento tramandato da padre in figlio dai pescatori di Cetara, ancora oggi praticato in molte famiglie del borgo costiero.

Cetara è uno dei luoghi turistici della Costa Amalfitana che deriva dal latino "Cetaria" cioè tonnara e da "Cetari", venditori di pesci grossi, è entrato a far parte del patrimonio dell'Unesco e fu roccaforte dei Saraceni. Con l'avvento dei Saraceni stessi fu totalmente distrutta e perse il suo ruolo nei traffici commerciali.

Cetara oggi rappresenta un posto ideale per le sue specialità gastronomiche in particolare per la stessa *Colatura di alici*. Accortisi che questo liquido aveva le caratteristiche migliori dell'antico garum romano, salatissima e fortissima salsa ottenuta dalle interiora dei pesci, iniziò un'opera di divulgazione nei monasteri della zona e tra i cittadini i quali si accinsero a produrla in casa filtrando con l'alambicco, (cappuccio di lana o telo già utilizzato per filtrare il mosto) la salamoia delle alici che, durante la stagionatura delle stesse, tracima continuamente dai vasi che la contengono. Oggi lo stesso cappuccio viene utilizzato dagli abitanti di Cetara ai quali viene riconosciuto il pregio di riprodurre l'antica tradizione gastronomica con la stessa accuratezza che ogni popolo riserva alle proprie memorie storiche ed artistiche.

Come tale, la *Colatura di alici* può essere ritenuta una dei più illustri esempi di come è possibile perpetuare le tradizioni nella storia pur adeguando e rispettando le opportune procedure di sicurezza che la legge impone ad ogni prodotto alimentare il quale necessita degli appellativi di "sanità" e "salubrità".

La Colatura di alici può essere pertanto definita come il connubio esemplare tra la nostra storia ed una realtà attuale che richiede sempre il rispetto dei parametri di massima sicurezza per la salute del consumatore.

BIBLIOGRAFIA

- AAVV. Alla riscoperta degli antichi sapori: la colatura di alici. Atti del Convegno. Cetara 02.12.93
- Adams A. M. Leja L. L. Jinneman K. Beeh J. Yuen G. A. Wekell M. M. "*Anisakid parasites, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus in Sushi and Sashimi from Seattle area restaurants*" *Journal of Food Protection* **57**(4), 311-317.
- Columella. *De re rustica*, traduzione di R. Calzecchi Onesti, intr. Di C. Carena, Torino
- Citro A., Salvati G., Bruno G., *Il Nuovo progresso Veterinario* n.8, 2008- pag.377-380.
- Demaison L., Moreau D. (2002), *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and coronary hearth disease-related mortality: a possible mechanism of action*, *Cell Mol Life Sci*, 59 (3): 463-477.
- Di Luccia et al. Componente proteica e lipidica della colatura di Alici. Qualità e sicurezza degli alimenti, V Convegno Nazionale di Chimica degli alimenti, Parma 9-12 giugno ,2003. Pagg. 531-535.
- *Elementi di economia e gestione della pesca*”, Ed. Franco Angeli, 2006.
- *Enciclopedia Multimediale Rizzoli Larousse 2000* - Copyright RCS Libri S.P.
- *Enciclopedia Multimediale Omnia* - ©Istituto Geografico De Agostini.
- *Enciclopedia illustrata delle Specie ittiche Marine*. P. Manzoni, ISTITUTO GEOGRAFICO DE AGOSTINI, NOVARA 1987).
- Ezio Falcone “*Centro di Cultura e Storia Amalfitana*.
- Ferro R., Picariello G., Di Luccia A., (2004) *Caratterizzazione proteica della colatura di alici di Cetara*. *Hydrores Information* – M. Bussani & c. eds., Trieste pagg. 43-49.

- Huss H. H. (1995): *Quality and Quality Changes in Fresh Fish*. Fao Fisheries Technical Paper, Vol. n. 348. Fao, Rome.
- Istituto Superiore di Sanità Centro di collaborazione OMS/FAO per la Sanità Pubblica Veterinaria “IMPORTANZA DEI PRODOTTI ITTICI NELLA DIETA DELL’UOMO: LE SPECIE TRADIZIONALI E LE NUOVE TENDENZE DI CONSUMO”.
- Kramer J. Cantoni C. (1991), *Microbiologia degli alimenti*, Ed. OEMF.
- "La gestione della Pesca marittima in Italia. Fondamenti tecnico-biologici e normativa vigente" a cura di Maria Emilia Gramitto. Prefazione di Antonio Artegiani.
- L'alimentazione povera dell'Italia romana, in AA.VV., *L'alimentazione nell'antichità*, V. Neri, Parma 1985.
- L. Castellone “Educazione nutrizionale, qualità e prodotti tipici”.
- Mappatura dei prodotti tipici e tradizionali 2005- Regione Campania , Settore Se.SIRCA. Roma aggiornato in G.U. n.147 del 17.06.07
- Orecchio F., Joseffini M. (2000) “Alterazioni chimico-fisiche e problemi connessi nei prodotti della pesca” - Il Pesce, Agosto.
- ‘PESCE FRESCO...FORSE...QUASI’. I° Rapporto su sicurezza alimentare e prodotti ittici in Italia Dicembre 2004.
- Spagna – Castillejo Rodríguez et alii (2000) *Food Microbiology*, 17, 421-427.
- Suslow, T. and L. Harris. Guidelines for Controlling *Listeria monocytogenes* in Small- to Medium-Scale Packing and Fresh Cut Operations. 2000. Univerisity of California Publication 8015.
- Tarr H.L.A. (1954), *Bacteriol. Rev.*, 18, 1.

- Tiecco G. (1999) “Igiene e tecnologia alimentare, Ed. Agricole, Bologna, pp. 87-91.
- Valerio Giaccone Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria, Università Padova.
- Siti internet consultati:
 - www.irepa.org, Area Sistan – Statistiche Italiane della Pesca.
 - www.ismea.it
 - www.fao.org
 - www.federcoopescas.it
 - www.pesceazzurro.it
 - www.sudpesca.it
 - www.mareinitaly.it
 - www.acquaazzurra.it
 - www.amicidellealici.org

I. CONFEZIONAMENTO IN ATMOSFERA PROTETTIVA DI FILETTI DI SPIGOLA (*Dicentrarchus Labrax*) E DI FILETTI DI ORATA (*Sparus Aurata*) PROVENIENTI DA IMPIANTI DI MARINICOLTURA

Abstract

In relazione al trend positivo nei confronti di prodotti pronti per la cottura e all'interesse del consumatore verso prodotti che hanno caratteristiche organolettiche e nutrizionali ottimali, è stata condotta una ricerca sperimentale su due lotti di filetti di orate e due lotti di filetti di spigole, entrambi allevati in acqua di mare, confezionati in atmosfera protettiva con diverse percentuali di gas, al fine di valutare le caratteristiche microbiologiche ed organolettiche durante la conservazione a +3°C.

INTRODUZIONE

La spigola è un pesce appartenente alla famiglia dei Serranidi. Il nome comune è “spigola” o “branzino”, il nome scientifico è *Dicentrarchus Labrax* (Linneo,1758).



Figura II.1 *Dicentrarchus Labrax* (fonte: <http://www.fao.org/fishery/>)

La classificazione di tale specie può così essere definita:

SUPERCLASSE: *Pesci (Pisces)*

CLASSE: *Osteitti (Osteichthyes)*

SOTTOCLASSE: *Attinoperigi*

SOTTOGRUPPO: *Teleostei*

SUPERORDINE: *Euteleostei*

ORDINE: *Perciformi (Perciformes)*

FAMIGLIA: *Moronidi*

Corpo allungato e leggermente compresso, coperto da squame ctenoidi di medie dimensioni. Squame cicloidi sono presenti sul capo e nello spazio interorbitario. Testa grande, con bocca ampia e mandibola prominente. Numerosi denti sottili disposti in più serie su mascelle, vomere e palato. Gruppo dentario vomerino non prolungato posteriormente. Bordo mascellare esteso posteriormente fino al margine anteriore dell'occhio. Sul bordo inferiore del preopercolo sono presenti spine dirette in avanti, mentre il bordo posteriore è dentellato. Gli occhi sono relativamente grandi, in vista frontale lo spazio infraorbitale appare ricoperto di squame. Sul dorso sono presenti due pinne dorsali non contigue. I primi tre raggi della pinna anale sono spiniformi. Pinna caudale nettamente forcuta. Pinne ventrali con primo raggio spiniforme. Pinne pettorali formate da soli raggi molli. Colore di fondo della livrea è grigio o grigio-verdastro sul dorso, i fianchi sono grigi con riflessi argentati ed il ventre è bianco.

La colorazione è variabile a seconda dell'ambiente, nelle lagune ed in allevamento appare verdastra, mentre nelle acque dolci è grigio argenteo. Sul margine dell'opercolo può essere presente una macchia nera o più macchiette concentrate sul margine anteriore. Negli immaturi il dorso e i fianchi sono cosparsi di piccole macchie scure. Le pinne sono chiare o grigie, con sfumature nerastre.

Specie eurialina, capace di vivere sia in mare aperto che in acque salmastre o dolci. La spigola si sposta spesso da uno all'altro di questi habitat, spesso seguendo il flusso delle maree. In acque salmastre si incontra con maggior frequenza nelle lagune. Spesso la spigola s'inoltra all'interno dei porti od in vicinanza degli scarichi urbani. In acqua dolce preferisce gli ambienti dei fiumi a lenta corrente, dei quali risale il corso anche per molti chilometri. Mentre i soggetti immaturi ed i subadulti della spigola sono gregari, i soggetti adulti di maggiore taglia e quelli senili vivono a coppie o isolati. I branchi di giovani compiono in primavera delle migrazioni trofiche dal mare alle acque salmastre al fine di alimentarsi. Da gennaio a febbraio gli adulti di taglia minore compiono invece migrazioni riproduttive dalle acque dolci e salmastre al mare. Generalmente la spigola ha il suo picco di maggiore attività durante le ore notturne o crepuscolari, ma in particolari condizioni si muove anche durante il giorno, specialmente durante le mareggiate quando le acque sono torbide. Il forte moto ondoso spinge la spigola a mettersi in caccia per predare, a livello delle onde frangenti, tutti quegli organismi che l'erosione mette allo scoperto.

La specie non sembra essere particolarmente minacciata, anche se la forte pressione di pesca ne riduce la consistenza numerica. La possibilità di poter produrre in allevamento individui da commercializzare, nonché pesci da ripopolamento, ha aiutato molto la sopravvivenza di molte popolazioni selvatiche.

Le carni della spigola sono bianche e gustose, d'altissimo interesse economico vengono commercializzate fresche o congelate. La spigola è annoverata tra i pesci più pregiati d'Europa da lunghissimo tempo e negli ultimi anni viene anche allevata.

L'orata è un pesce appartenente alla famiglia degli Sparidi.

Il nome comune è “orata”, il nome scientifico è *Sparus aurata* (Linneo,1758).



Figura II.2 *Sparus Aurata* (fonte: <http://www.ulg.ac.be/aquarium/visite/mt/dorade.html>)

La classificazione di tale specie può così essere definita:

SUPERCLASSE: *Pesci (Pisces)*

CLASSE: *Osteitti (Osteichthyes)*

SOTTOCLASSE: *Attinoperigi*

SOTTOGRUPPO: *Teleostei*

SUPERORDINE: *Euteleostei*

ORDINE: *Perciformi (Perciformes)*

FAMIGLIA: *Sparidi*

Ha un corpo alto, ovale e massiccio. La mascella superiore è lievemente più lunga di quella inferiore e le labbra sono carnose ed evidenti. Possiede da quattro a sei denti conici molto robusti nella parte anteriore di ciascuna mascella, seguiti da quattro o cinque file di denti molariformi nella mascella superiore e da tre o quattro file nella mascella inferiore. La pinna dorsale è unica, ma mentre la parte anteriore è dotata di spine robuste, quella posteriore è costituita da raggi molli. La coda è potente e forcuta, la pinna pettorale è lunga e sottile. La pinna pelvica ha un raggio spinoso e cinque raggi molli. Il colore è grigio o brunito sul dorso, argenteo sui fianchi, bianco sul ventre. All'origine della linea laterale c'è una macchia scura molto evidente, mentre il bordo esterno dell'opercolo presenta una chiazza scarlatta. La caratteristica macchia d'oro visibile sulla fronte scompare dopo la morte dell'animale. Può arrivare a una lunghezza di settanta centimetri e a una decina di chili di peso.

L'orata è diffusa nel Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, dal Golfo di Biscaglia alle coste del Ghana. Le orate vivono in acque tiepide e pertanto è facile trovarle lungo la costa d'estate ed al largo d'inverno. L'orata si trova perfettamente a suo agio nelle acque

salmastre delle lagune, specialmente dove ci sono i vivai di mitili, ma non disdegna neppure i fondali rocciosi, ricchi di scogli, di canali e di spaccature. Non ama le profondità abissali, ma non si lascia sorprendere nemmeno dove l'acqua è troppo bassa: di solito la si incontra dai dieci-quindici metri ai cinquanta-sessanta.

La spigola e l'orata sono specie euriterme ed eurialine che tollerano ampie variazioni di temperatura e salinità. Sono specie tolleranti in grado di far fronte mediante adattamenti fisiologici ad un ampio spettro di concentrazioni di O₂ disciolto. Spigola e orata possono, inoltre, essere considerate tolleranti alle variazioni del pH. Entrambe sono tra le specie più allevate in Italia in acque marine insieme al sarago.

L'allevamento in mare avviene in gabbie che possono essere collocate sia in prossimità della costa (definite "in-shore"), sia in mare aperto ("off-shore"). Questa forma d'allevamento incontra non poche difficoltà lungo la costa: per esempio richiede zone riparate dalle mareggiate, dove però ci sia un ricambio di acqua sufficientemente elevato da evitare il verificarsi di fenomeni di eutrofizzazione.

Il sito di allevamento può essere adiacente alla costa in aree protette dal moto ondoso (golfi, insenature, ecc.) oppure in mare aperto e la batimetria operativa cambia di conseguenza; generalmente per questo tipo di allevamento si utilizzano profondità che vanno da 15 a 60 metri. Il tipo di zona d'allevamento disponibile determina quindi la tipologia della gabbia flottante, dell'ancoraggio, delle strutture complementari ed il grado di difficoltà gestionale. Le gabbie,

di qualunque tipologia esse siano, rappresentano sicuramente una valida alternativa alle strutture tradizionali a terra. I vantaggi di questi impianti sono molteplici e possono essere sintetizzati nei seguenti punti:

- riduzione dei costi di investimento a parità di volume produttivo;
- utilizzo di corpi idrici esistenti;
- riduzione dei costi di produzione (ad esempio eliminazione dei costi per il pompaggio dell'acqua);
- possibilità di dislocare le strutture in altri siti;
- facilità di ampliamento dell'impianto;
- utilizzo diretto del mare, evitando il conflitto presente nelle aree della fascia costiera;
- migliore qualità delle acque con riduzione dell'incidenza delle ittiopatologie;
- accrescimento più rapido rispetto agli allevamenti a terra;
- migliore sopravvivenza, conversione degli alimenti e qualità del prodotto;
- minore impatto sull'ambiente.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati filetti di spigola (*Dicentrarchus labrax*) ottenuti da esemplari del peso di circa 400 grammi e n.140 esemplari di orata (*Sparus aurata*) del peso di circa 500 grammi, provenienti da impianti di maricoltura.

Gli esemplari, appartenenti tutti allo stesso lotto, una volta pescati e uccisi in acqua e ghiaccio, sono stati posti in contenitori di polistirolo in doppio strato diviso da un film plastico, e ricoperti in superficie da un secondo film plastico sul quale è stato adagiato del ghiaccio tritato. Per quanto concerne gli esemplari di spigola, questi contenitori così composti sono stati trasportati, mediante mezzo refrigerato, in uno stabilimento dove stati eviscerati manualmente e poi decapitati, decaudati e filettati meccanicamente. I filetti sono stati poi risciacquati con acqua potabile corrente e confezionati in atmosfera protettiva con due percentuali di gas differenti (lotto A CO₂ 70%, N 25% e O₂ 5% e lotto B CO₂ 63%, N 15% e O₂ 22%).

Per gli esemplari di orata la filettatura è stata eseguita manualmente su 10 esemplari (20 filetti) e meccanicamente su 120 esemplari (240 filetti) e completata entro 5 ore dalla cattura. I rimanenti 10 esemplari sono stati utilizzati per eseguire esami sensoriali, ed esami anatomo-patologici sui visceri. Anche in questo caso sono stati esaminati due lotti (lotto C CO₂ 70%, N 25% e O₂ 5% e lotto D CO₂ 63%, N 15% e O₂ 22%) di filetti dopo confezionamento in atmosfera protettiva.

LOTTO A

I filetti di questo lotto sono stati confezionati nello stesso stabilimento che ha provveduto alle operazioni preliminari, in vaschette di polistirolo, con pad assorbente incluso nel fondo forato, ricoperte da un film plastico del tipo Cryovac LID 2005 barriera anti-fog, impiegando una miscela di gas composta da CO₂ (70%), N (25%) e O₂ (5%). Il peso del filetto posto in ciascuna confezione è risultato in media 140 grammi (min 100,2-max 168,9).

LOTTO B

I filetti del lotto B, invece, sono stati trasportati mediante mezzo refrigerato, in un secondo stabilimento, che ha provveduto al confezionamento in vaschette rigide del tipo CRYOVAC UBRT 1621, ricoperte da un film plastico del tipo Cryovac LID 2005 barriera anti-fog, impiegando una miscela di gas composta da CO₂ (63%), N (15%) e O₂ (22%). Il peso del filetto posto in ciascuna confezione è risultato in media 129 grammi (min 103,4-max 165,5).

LOTTO C

I filetti di orata del lotto C sono stati confezionati nello stesso stabilimento che ha provveduto alla filettatura meccanica, in vaschette di polistirolo, con pad assorbente incluso nel fondo forato, ricoperte da un film plastico del tipo Cryovac LID 2005 barriera anti-fog, impiegando una miscela di gas composta da CO₂ (70%), N (25%) e O₂ (5%). Il peso del filetto posto in ciascuna confezione è risultato in media 141,26 grammi (min 129,1-max 186).

LOTTO D

I filetti del lotto D, invece, sono stati trasportati mediante mezzo refrigerato, in un secondo stabilimento, che ha provveduto al confezionamento in vaschette rigide dello stesso tipo del lotto C, impiegando però una miscela di gas diversa e composta da CO₂ (63%), N (15%) e O₂ (22%). Il peso del filetto posto in ciascuna confezione è risultato in media 150 grammi (min 99,6-max 200).

Tutte le confezioni dei quattro lotti, subito dopo la lavorazione, sono stati immesse in imballaggi di polistirolo, e trasportate nel corso della giornata successiva, con automezzo refrigerato a +4°C, al Laboratorio della Sezione di Ispezione degli alimenti di origine animale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

I campioni giunti in laboratorio, quindi al secondo giorno dopo la cattura, sono stati posti in frigorifero termostato, regolando la temperatura a +4°C.

La temperatura è stata monitorata ogni giorno e, se si esclude il rialzo successivo all'immissione dei campione nello stesso, essa si è mantenuta costante per tutto il periodo della sperimentazione.

CONTROLLI DI LABORATORIO

a. Controlli materia prima

Al fine di conoscere il livello di contaminazione della materia prima sono stati esaminati per l'orata 3 filetti filettati manualmente e 3 meccanicamente, e per la spigola solo 3 filettati meccanicamente, tutti non confezionati.



Figura II.3 Sito di prelievo (filetto di orata)

Il prelievo è stato effettuato, nella materia prima filettata meccanicamente, nella parte centrale del filetto.

b. Controlli microbiologici sui quattro lotti.

Sono state esaminate complessivamente 121 confezioni (u.c.), n. 30 per il lotto A, n.33 per il lotto B, n.23 per lotto C, n.35 per il lotto D secondo lo schema riportato:

Giorno dalla cattura	2°	4°	6°	8°	10°	12°	14°	16°	18°	20°	22°	tot
u.c. -Lotto A	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	30
u.c. -Lotto B	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	33
u.c. -Lotto C	5	3	3	3	3	3	1	1	1	0	0	23
u.c. -Lotto D	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	35

Sia dalla materia prima che dai filetti dei quattro lotti, sono state allestite opportune diluizioni in acqua peptonata, previa omogeneizzazione in Stomacher (Stomacher Lab-Blender 400, pbi international) e sono stati ricercati i seguenti microrganismi, impiegando i terreni e le metodiche di seguito riportate:

Flora aerobia totale (Plate Count Agar a 30°C per 24-48 ore),
inoculo 0.1g;

Flora psicrofila totale (Plate Count Agar a 5°C per 10 gg.),
inoculo 0.01 g;

Coliformi ed E. coli (Brodo Lattosato Verde BrillanteBile a 37°C per 24-48 ore e prova di MacKenzie), inoculo 0.1 g;

Lattobacilli (MRS Agar a 37°C), inoculo 0.1 g;

Lactic Acid Bacteria (Elliker Agar o M17+ 0,5% Lactose Oxoid, a 32°C), inoculo 0.1g;

Enterobatteri (Violet Red Bile Glucose Agar a 37°C per 24-48 ore), inoculo 0.1 g;

Clostridi solfito-riduttori (SPS Agar a 43°C per 24 ore), inoculo 1 g;

Lieviti e muffe (Rose Bengal Chloramphenicol Agar + Chloramphenicol antibiotic supplement a 22° per 5 gg.) inoculo 0.1 g;

Bacillus cereus (Bacillus cereus agar base + Bacillus cereus selective supplement 37° per 1gg; 23° per 1 gg.), inoculo 0,01g;

Yersinia enterocolitica (Dulbecco A per 15 gg a 4°C), doppio passaggio selettivo su Yersinia Selective agar (Oxoid) incubato a 25-26°C per 18-24 ore; inoculo 0,1µg;

Stafilococchi potenzialmente patogeni (Baird Parker a 37°C per 24-48 ore e successiva ricerca della coagulasi e della DNAsi), inoculo 0.01 g;

Salmonella spp. (Acqua peptonata tamponata a 37°C per 16-18 ore, brodo selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth a 43°C per 24-48 ore, Hektoen enteric agar e Rambach agar a 37°C per 24 ore), inoculo 25 g;

Listeria monocytogenes (LEBB + UVM 1 a 30°C per 24 ore, semina della brodocultura 1 in LEBB + UVM) a 30°C per 24 ore, isolamento della brodocultura 2, su Palcam agar incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizioni di microaerofilia, in 25 g;

Le colonie sospette isolate sono state identificate con Sistemi API Biomerièux utilizzando:

■ API Staph, e ID 32 rapid per lo *Staphylococcus aureus*;

■ API listeria per *Listeria spp.* ;

■ API 20 E per *Salmonella spp.*

Dopo la valutazione delle caratteristiche fenotipiche e biochimiche i ceppi isolati sono stati conservati in appositi brodi (Tryptone Soya Broth +Yeast Extract) al 25% (v/v) di glicerolo a -0°C per ulteriori indagini.

c. Controlli organolettici

Sono stati costantemente valutati il colore, la consistenza e l'aspetto generale all'apertura della confezione e, dopo il prelievo per l'esame batteriologico, la consistenza, il colore e l'odore in profondità, stato di imbibizione dello strato assorbente posto nell'intercapedine della vaschetta e quantità e caratteristiche del liquido qualora presente nella confezione. Tutti i controlli organolettici sono stati effettuati da un panel test di sei o più persone, cinque delle quali sono state sempre le stesse.

d. Determinazione del pH

Per ogni campione è stato determinato il pH con il metodo potenziometrico utilizzando un pHmetro Metrohm 691.



Figura II.4 Determinazione del pH.

RISULTATI

a. Risultati dei controlli microbiologici dei lotti A e B (spigole)

I risultati dei controlli microbiologici sono riportati nelle tabelle n. 1-2-3.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* è risultata sempre presente a livelli compresi tra \log_{10} 3,17 e 8,11 ufc/g. Nel corso dello stoccaggio si è riscontrato un aumento crescente del valore della *Flora aerobia totale* in entrambi i lotti, attestandosi ai massimi valori a partire dal 16° giorno dalla cattura (grafico 1).

La *Flora Aerobia Totale a 5°C (FAT)* è risultata sempre presente a livelli compresi tra \log_{10} 2,00 e 6,93 ufc/g, ad esclusione del lotto B nel quale è risultata sempre assente (grafico 2).

I *Coliformi totali* si sono attestati a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 4,00 ufc/g e sono risultati presenti nel 37,2% dei campioni. *Coliformi fecali* ed *E. coli* sono risultati assenti nel lotto A e presenti nel 12,1% dei campioni del lotto B a livelli compresi tra \log_{10} 2,00 e 4,00 ufc/g.

I *Lattobacilli* presenti in 25 confezioni (36,68%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 6,13 ufc/g.

I *LAB* sono invece sempre presenti a livelli compresi tra \log_{10} 2,57 e 8,15 ufc/g.

Gli *Enterobatteri* sono presenti in 33 confezioni (52,38%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 4,45 ufc/g e non hanno mostrato

correlazione significativa con il periodo di stoccaggio, mantenendosi a livelli costanti.

I lieviti e le muffe sono risultati presenti in 45 confezioni (71,42%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 4,71 ufc/g. Questa specie microbica non ha mostrato un aumento che coincida con il periodo di stoccaggio, mantenendosi altresì a livelli costanti.

Stafilococchi aureus è stato isolato in un'unica unità campionaria del lotto A (\log_{10} 2,00 ufc/g) ed in due unità campionarie del lotto B (\log_{10} 2,15 ufc/g).

Clostridi solfito-riduttori, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* e *Yersinia enterocolitica* sono risultati sempre assenti.

Listeria spp. è stata isolata nel 23,3% dei campioni del lotto A e nel 30,3% dei campioni del lotto B. *Listeria monocytogenes* è stata isolata nel 4,7% dei campioni, 1 nel lotto A e 2 nel lotto B. Le altre specie isolate sono *L. welshimeri*, *innocua* e *gray*, secondo lo schema seguente:

	L. monocytogenes	L. innocua	L. welshimeri	L. grayi	Tot.
lotto A	1 u.c.	2 u.c.	1 u.c.	3 u.c.	7
lotto B	2 u.c.	3 u.c.	3 u.c.	2 u.c.	10

Giorno dalla cattura	FAT 32°C	FAT 5°C	Coliformi Totali	Lattob.	Enterob.	Lieviti/muffe
2°	3,38	2,60	<1	Ass	Ass	Ass
	3,44	2,47	<1	Ass	Ass	Ass
	3,69	Ass	<1	Ass	Ass	2,00

Tabella II.1 Cariche microbiche (log₁₀ UFC/g) riscontrate nella materia prima.

Giorno dalla cattura	FAT 32°C	FAT 5°C	Coliformi totali	Lattobacilli	Enterobatteriacee	Lieviti/muffe
2°	5.12	3.69	<1	Ass	Ass	Ass
	4.61	4.07	<1	Ass	Ass	2.07
	4.60	2.30	<1	Ass	Ass	2.00
4°	3.97	2.69	<1	Ass	Ass	Ass
	5.48	3.90	<1	Ass	Ass	2.30
	3.41	2.00	<1	Ass	Ass	Ass
6°	3.84	2.47	<2	Ass	3.11	1.69
	3.79	3.14	<4	Ass	Ass	1.47
	4.34	3.88	<1	Ass	Ass	Ass
8°	4.14	3.20	<1	Ass	Ass	1.90
	4.91	3.75	<1	Ass	Ass	2.30
	4.92	3.74	<1	Ass	Ass	2.47
10°	5.44	4.09	<1	Ass	Ass	Ass
	5.19	3.43	<1	3.69	Ass	Ass
	5.89	4.81	<1	4.07	1.77	2.50
12°	6.31	6.62	<1	2.69	1.95	3.23
	6.91	6.17	<1	1.60	2.80	Ass
	6.35	6.45	<1	2.49	1.30	2.60
14°	6.88	5.12	<1	Ass	3.60	1.95
	6.92	5.07	<1	Ass	3.44	1.77
	7.01	4.72	<1	Ass	2.91	1.95
16°	7.07	6.38	<2	4.27	1.30	3.00
	7.45	6.26	<1	Ass	2.04	Ass
	7.74	6.56	<1	4.06	3.84	4.34
18°	7.09	5.76	<1	3.04	2.65	2.00
	7.81	5.42	<1	Ass	2.90	4.71
	7.33	5.97	<1	Ass	1.00	3.11
20°	7.91	6.71	<1	Ass	3.30	Ass
	7.69	6.85	<1	Ass	3.85	3.80
	8.04	6.92	<1	Ass	4.45	3.87

Tabella II.2 Lotto A: Cariche microbiche (log₁₀ UFC/g) riscontrate in filetti di spigola confezionati in AP (CO₂ 70%-N 25%-O₂ 5%).

Giorno dalla cattura	FAT 32°C	FAT 5°C	Coliformi Totali	Lattobacilli	Enterobatteriacee	Lieviti/muffe
2°	4.29	Ass	<2	Ass	1.30	2.47
	3.53	2.47	<2	Ass	Ass	Ass
	3.69	3.00	<1	Ass	1.00	Ass
4°	3.75	3.07	<1	Ass	Ass	1.30
	3.72	2.30	<1	Ass	Ass	1.00
	3.39	2.69	<1	Ass	Ass	1.00
6°	3.17	3.27	<2	Ass	Ass	1.30
	3.79	3.61	<1	Ass	Ass	1.69
	3.67	2.90	<2	Ass	Ass	2.30
8°	4.60	3.00	<1	Ass	Ass	2.32
	4.67	2.95	<1	1.00	Ass	1.90
	4.80	4.04	<4	3.69	2.00	3.78
10°	5.55	5.59	<1	Ass	Ass	1.30
	4.31	2.60	<1	2.47	Ass	Ass
	4.75	3.20	<1	Ass	Ass	1.00
12°	4.61	4.93	<1	1.30	Ass	1.84
	5.47	5.60	<1	2.47	1.30	2.20
	4.49	4.47	<1	Ass	Ass	Ass
14°	6.90	4.82	<1	Ass	2.88	2.47
	6.28	3.69	<1	4.07	Ass	1.47
	5.50	4.00	<1	Ass	Ass	Ass
16°	7.57	5.66	<1	4.48	3.15	Ass
	6.65	4.14	<2	4.26	3.65	3.00
	6.87	4.74	<1	3.67	Ass	Ass
18°	7.20	5.05	<1	4.99	2.39	2.00
	7.5	5.01	<1	5.09	2.00	Ass
	7.68	5.02	<1	5.38	3.16	Ass
20°	7.51	5.57	<1	Ass	2.07	3.61
	7.68	6.00	<4	6.13	2.60	3.41
	7.71	6.11	<3	5.14	2.39	2.47
22°	8.11	6.47	<1	5.61	2.99	3.93
	7.76	6.06	<3	5.09	1.80	2.94
	7.89	6.50	<1	1.47	2.93	2.50

Tabella II.3 Lotto B: Cariche microbiche (log₁₀ UFC/g) riscontrate in filetti di spigola confezionati in AP (CO₂ 63%-N 15%-O₂ 22%).

GRAFICO 1

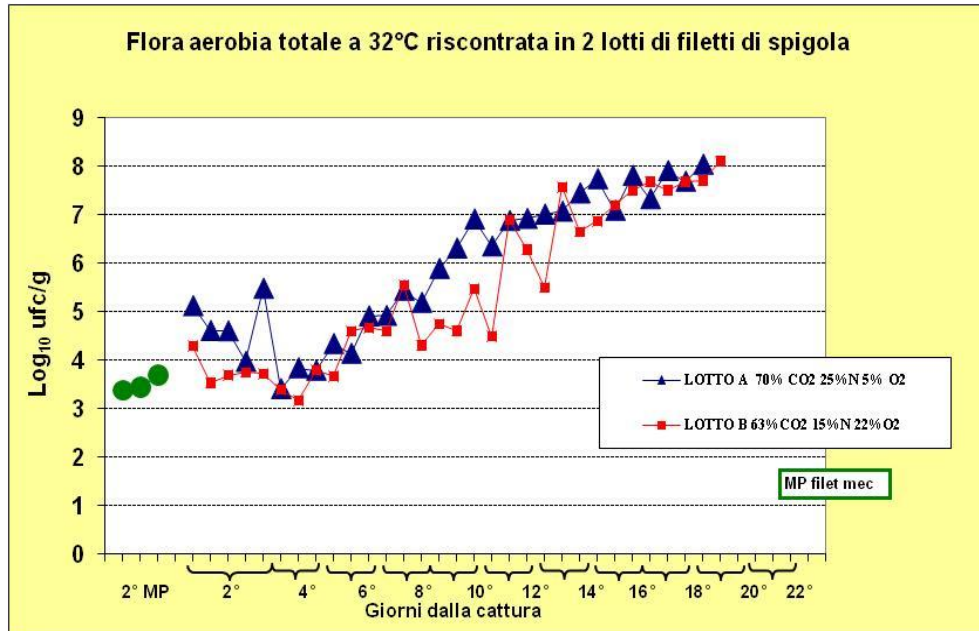
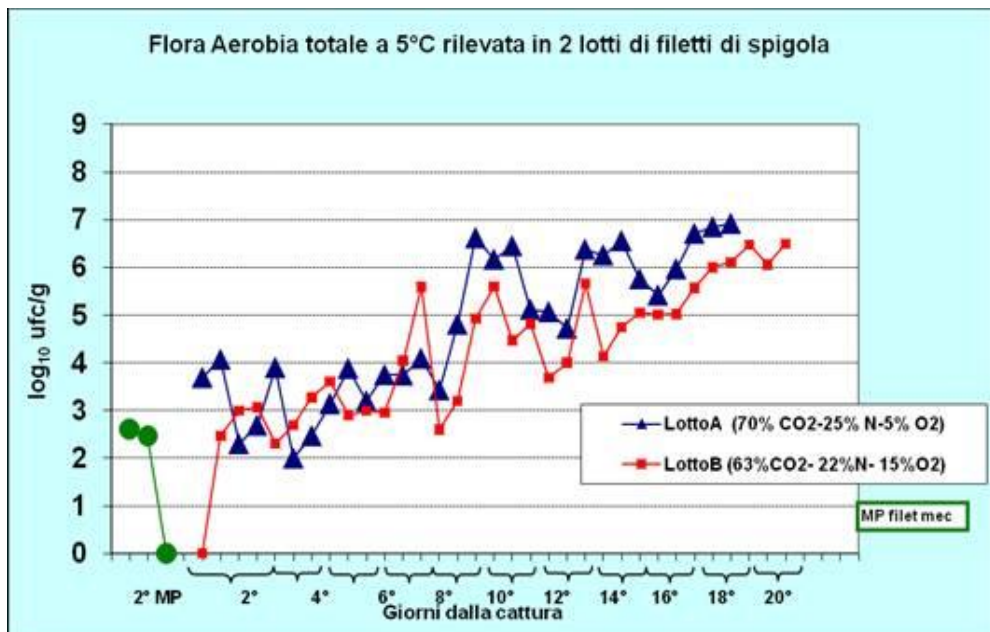


GRAFICO 2



b. Risultati dei controlli microbiologici dei lotti C e D (orate)

I risultati dei controlli microbiologici sono riportati nelle tabelle n.4-5-6.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* è risultata sempre presente a livelli compresi tra \log_{10} 3,32 e 7,26 ufc/g. Nel corso dello stoccaggio si è riscontrato un aumento crescente del valore della FAT nel lotto D, attestandosi ai massimi valori a partire dal 16° giorno dalla cattura. Non si evidenziano differenze significative nel valore della FAT nella materia prima filettata manualmente rispetto a quella filettata meccanicamente (grafico 3).

La *Flora Aerobia Totale a 5°C (FAT)* è risultata sempre presente a livelli compresi tra \log_{10} 2,69 e 6,62 ufc/g, ad esclusione di tre campioni del lotto C ed uno del lotto D nel quale è risultata sempre assente (grafico 4).

I *Coliformi totali* si sono attestati a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 4,00 ufc/g e sono risultati presenti nel 12,8% dei campioni. *Coliformi fecali* ed *E. coli* sono risultati sempre assenti.

I *Lattobacilli* sono risultati presenti in 11 confezioni (7,04%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 3,47 ufc/g.

I *LAB* sempre presenti a livelli compresi tra \log_{10} 1,90 e 7,09 ufc/g con valori sempre più alti nel lotto D.

Gli *Enterobatteri* sono presenti in 49 confezioni (31,36%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 3,45 ufc/g e non si è assistito ad un

aumento in coincidenza con il periodo di stoccaggio, ma hanno mantenuto livelli costanti.

I lieviti e le muffe sono risultati presenti in 57 confezioni (89%) a livelli compresi tra \log_{10} 1,00 e 3,56 ufc/g. Anche questa specie microbica non ha mostrato correlazione significativa con il periodo di stoccaggio, mantenendosi a livelli costanti.

Bacillus cereus è stato isolato da 1 u.c. campionaria di materia prima (ottenuta da filettatura meccanica) e da 2 u.c. del lotto C (8,6%).

Yersinia spp. è stata isolata da 2 u.c. relativi alla materia prima (ottenuta da filettatura meccanica), di cui 1 ceppo di *Yersinia enterocolitica* ed 1 ceppo di *Yersinia Kristensenii*.

Listeria monocytogenes è stata isolata nel 72,41% dei campioni cioè in 42 confezioni, di cui 16 del lotto C e 26 del lotto D. *Listeria innocua* è stata isolata in un campione del lotto C.

Clostridi solfito-riduttori, *Salmonella spp.* e *stafilococchi potenzialmente patogeni* sono risultati sempre assenti.

Giorni dalla cattura	f.a.t. 32°C	f.a.t. 5°C	Coliformi	Enterobatteri	Lieviti-muffe
0*	3.66	4.07	<10 ²	1.47	Ass
0 *	3.67	3.53	Ass	Ass	Ass
0 *	3.56	3.23	Ass	Ass	1.00
1**	3.55	3.00	<10 ²	Ass	Ass
1**	3.32	2.84	Ass	Ass	Ass
1**	3.36	2.47	Ass	Ass	Ass

* filetti separati manualmente - ** filetti separati meccanicamente

Tabella II.4 Cariche microbiche (\log_{10} UFC/g) riscontrate nella materia prima

Giorni dalla cattura	f.a.t. 32°C	f.a.t. 5°C	Coliformi	Enterobatteri	Lieviti e muffe
2°	3.83	3.20	Ass	1.00	2.60
	4.27	Ass	Ass	1.00	2.49
	3.71	3.61	<2	1.47	1.00
	3.71	3.17	<2	1.00	2.30
	4.25	4.38	Ass	2.17	1.77
4°	3.93	4.25	Ass	1.47	2.23
	4.13	4.63	<2	2.25	1.84
	4.81	5.14	<2	1.90	2.07
6°	3.40	3.00	Ass	Ass	1.60
	3.94	3.77	Ass	1.69	2.72
	3.95	4.14	<2	1.60	2.98
8°	3.85	2.60	<2	1.84	2.00
	4.34	4.25	<3	2.11	2.55
	3.64	Ass	<2	Ass	1.47
10°	4.00	4.30	<3	1.69	1.30
	4.63	5.08	<2	1.95	2.66
	5.80	5.90	<4	3.03	3.27
12°	4.74	4.00	<2	1.47	3.15
	5.90	3.39	<2	Ass	1.69
	3.68	Ass	Ass	Ass	2.17
14°	3.77	3.23	Ass	Ass	1.47
16°	4.71	3.79	Ass	1.30	2.36
18°	5.38	4.47	<2	1.00	2.32

Tabella II.5 Lotto C: Cariche microbiche (\log_{10} UFC/g) riscontrate in filetti di orata (*Sparus aurata*) confezionate in AP (CO₂ 70%-N 25%-O₂ 5%).

Giorni dalla cattura	f.a.t. 32°C	f.a.t. 5°C	Coliformi	Enterobatteri	Lieviti e muffe
2°	4.62	4.53	<2	2.14	2.91
	3.63	3.70	<2	1.30	1.60
	4.57	4.47	<3	2.75	2.61
	4.30	4.07	<3	2.27	2.51
	3.78	4.84	<2	1.47	2.30
4°	4.15	3.60	Ass	1.95	2.14
	3.86	3.84	<3	1.47	1.69
	3.61	2.47	Ass	Ass	1.60
6°	5.04	5.38	<3	2.32	3.20
	3.41	3.23	<2	1.47	2.47
	4.02	3.04	<2	1.60	2.63
8°	3.83	2.30	<2	1.77	Ass
	3.84	Ass	<2	Ass	1.30
	5.15	4.00	<2	Ass	2.07
10°	4.34	3.88	<2	1.30	1.69
	4.60	5.56	<2	3.14	3.14
	4.56	2.69	Ass	1.30	1.00
12°	4.03	3.14	Ass	1.30	1.47
	4.76	3.00	Ass	1.84	Ass
	4.90	4.17	<2	1.69	1.90
14°	4.27	3.17	Ass	Ass	1.84
	4.89	3.07	<3	1.69	1.77
	5.62	4.07	Ass	2.67	2.79
16°	4.97	3.61	Ass	Ass	2.36
	5.94	5.27	<3	2.70	3.08
	5.72	4.51	<2	1.69	2.14
18°	7.26	5.97	<2	2.43	2.75
	6.63	5.50	<2	2.56	2.20
	6.65	5.71	Ass	2.39	1.00
20°	6.60	4.82	<2	2.60	2.90
	6.99	4.49	<2	2.76	2.14
	6.36	3.43	<2	2.04	1.84
22°	7.01	6.62	<3	3.45	2.38
	7.08	6.59	<3	2.65	2.23
	5.76	6.35	<2	2.79	3.56

Tabella II.6 Lotto D: Cariche microbiche (log₁₀ UFC/g) riscontrate in filetti di orata (*Sparus aurata*) confezionate in AP (CO₂ 63%-N 15%-O₂ 22%).

GRAFICO 3

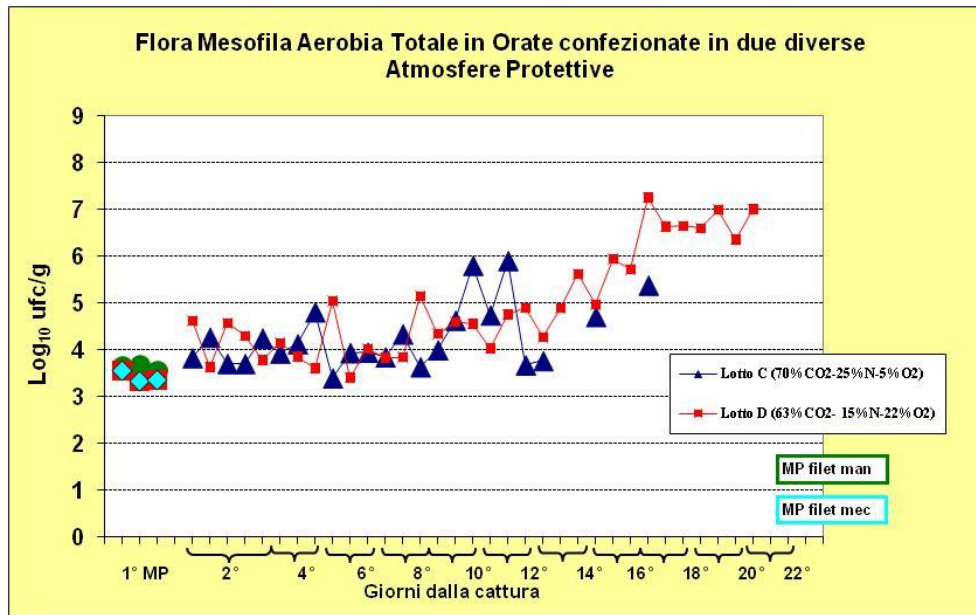
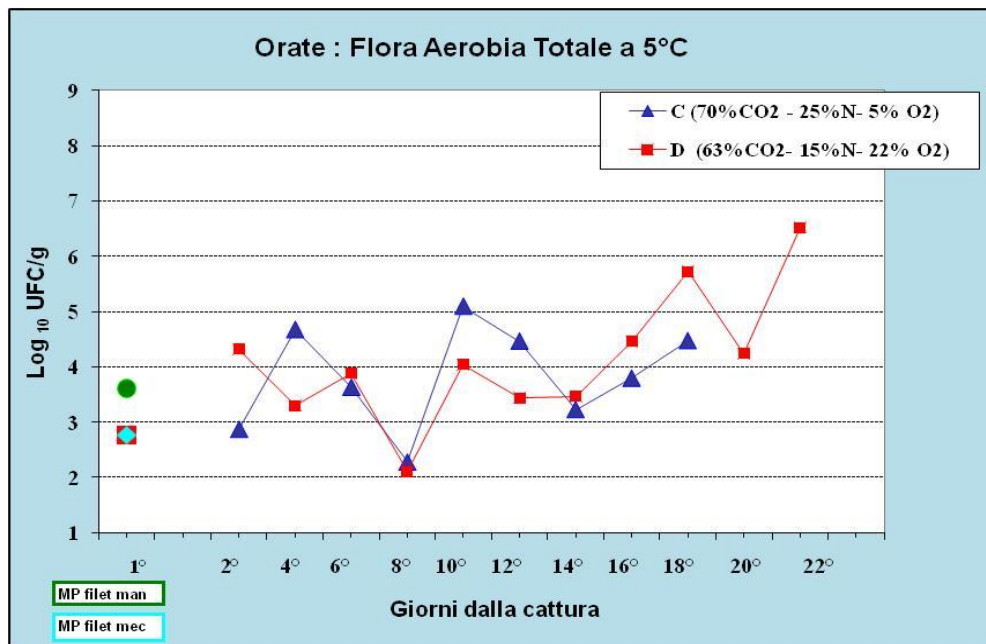


GRAFICO 4



c. Risultati dei controlli organolettici dei lotti A e B (spigole)

Nella materia prima, i controlli hanno evidenziato caratteri ineccepibili. Odore, colore e consistenza sono stati, infatti, tipici di un prodotto eccellente per qualità e caratteri di freschezza.

Nei prodotti confezionati, in entrambi i lotti, sono state evidenziate le seguenti caratteristiche:

- ✓ Dal 2° al 4° giorno dalla cattura odore, colore e consistenza sono risultati ottimi (Figura 5).



Figura II.5 Lotto A e lotto B

- ✓ Dal 4° al 6° giorno dalla cattura odore, colore e consistenza sono risultati buoni, modesta presenza di liquido trasparente in qualche campione del lotto B (Figura n.6).



Figura II.6 Presenza modesta di liquido nel lotto

- ✓ Nel lotto A, a partire dal 16° giorno, si sono evidenziati odore acidulo, consistenza diminuita, variegature del colore nella parte muscolare (Figura n.7), comunque normalmente grigiastra, e presenza di liquido nella confezione.

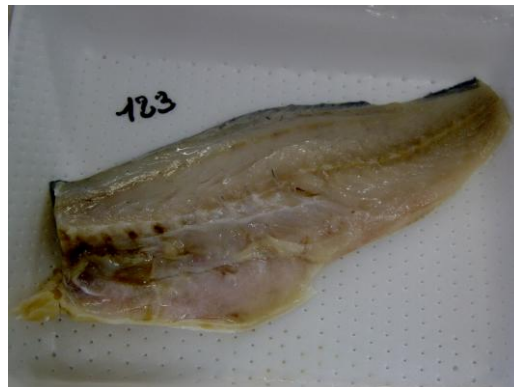


Figura II.7 Giorno 16° lotto A

- ✓ Nel lotto B, invece, a partire dall'8° giorno si sono evidenziati odore acidulo, colore sbiadito, consistenza diminuita e presenza di una quantità discreta di liquido

nella confezione, che ha assunto a volte caratteristiche di torpidità (Figura n.8).



Figura II.8 Giorno 8° lotto B

- ✓ Al 16° giorno dalla cattura i campioni mantengono un odore pungente all'apertura delle confezioni, che diminuisce dopo esposizione all'aria, variegature del colore delle superfici esposte, in particolare ai lati della colonna, e presenza di liquido rosato torbido nella confezione.
- ✓ Dal 18° al 22° giorno della cattura, si evidenzia l'accentuarsi di tutti i caratteri prima descritti che si riassumono in un odore metallico pungente, variazioni del colore con tendenza al giallognolo, presenza di liquido opaco nella confezione (Figura n.9).

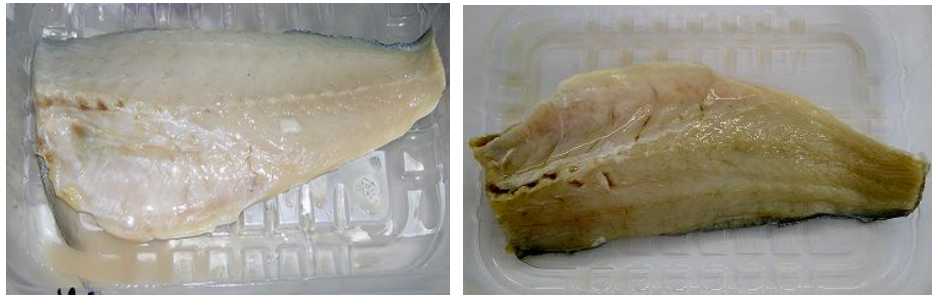


Figura II.9 Lotto A giorno 18°, Lotto B giorno 22°

d. Risultati dei controlli organolettici lotti C e D (orate)

Nella materia prima, i controlli hanno evidenziato caratteri ineccepibili. Odore, colore e consistenza sono stati, infatti, tipici di un prodotto eccellente per qualità e caratteri di freschezza.

Nei prodotti confezionati, in entrambi i lotti, sono state evidenziate le seguenti caratteristiche:

- ✓ Dal 2° al 4° giorno dalla cattura odore, colore e consistenza sono risultati ottimi (Figura n.10).

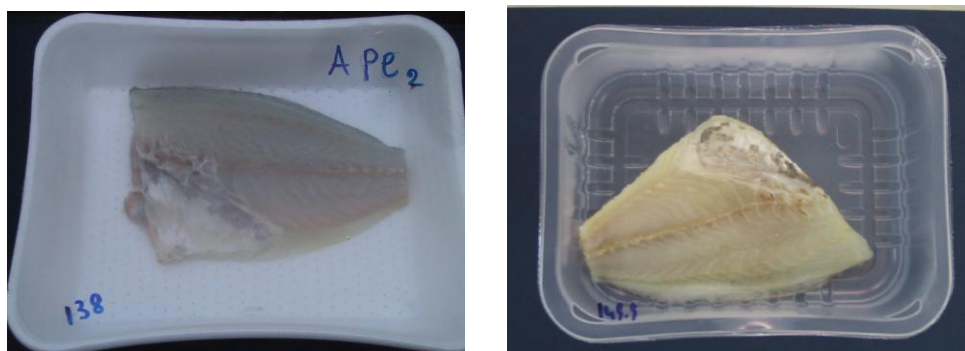


Figura II.10 Lotto C e lotto D

- ✓ Dal 4° al 6° giorno dalla cattura odore, colore e consistenza sono risultati buoni.
- ✓ Al 12° giorno dalla cattura (11° giorno dal confezionamento), le caratteristiche organolettiche cominciano a decadere con presenza di liquido nella confezione, patina viscosa che ricopre la superficie superiore del filetto e consistenza diminuita (Figura n.12).

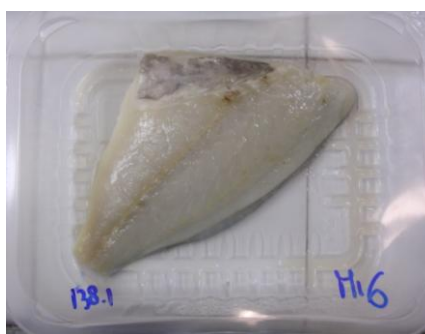


Figura II.12 Consistenza diminuita lotto D

- ✓ Al 14° giorno dalla cattura si sono evidenziati odore acidulo e pungente all'apertura della confezione, colore sbiadito, consistenza molle ed evidente bombatura della confezione.
- ✓ Al 16° giorno dalla cattura i campioni mantengono un odore pungente all'apertura delle confezioni, che diminuisce dopo esposizione all'aria, variegature del colore delle superfici esposte, e presenza di liquido rosato torbido nella confezione (Figura n.13).



Figura II.13 Variegatura colore lungo la colonna lotto D

- ✓ Dal 18° al 22° giorno della cattura, solo per i campioni del lotto D si evidenzia l'accentuarsi di tutti i caratteri prima descritti che si riassumono in un odore metallico pungente, variazioni del colore con tendenza al giallognolo, presenza di liquido opaco nella confezione (Figura n.14).



Figura II.14 Presenza di liquido opaco nella confezione lotto D

e. Risultati determinazione del pH

Il pH ha oscillato, per le spigole, da 5,87 a 6,5 con un valore medio intorno a 6,11 (Grafico 5) e per le orate da 5,89 a 6,26 con un valore medio intorno a 6,07. (Grafico 6).

GRAFICO 5

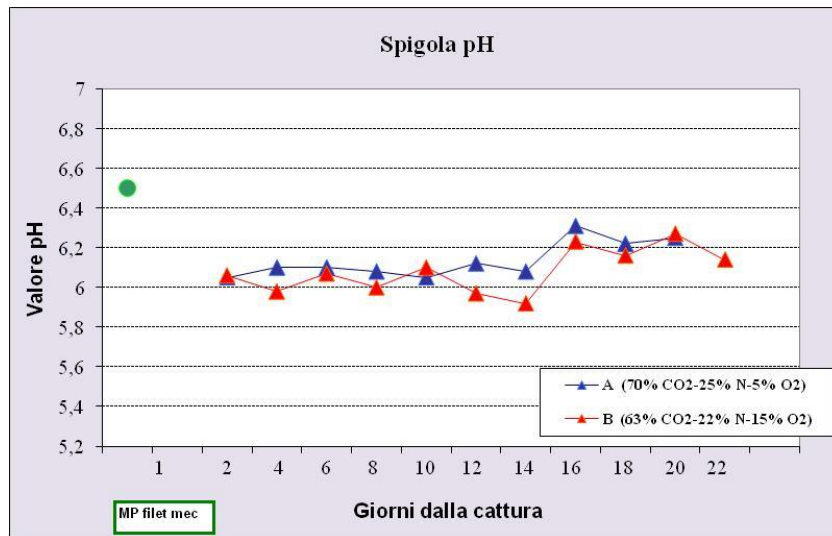
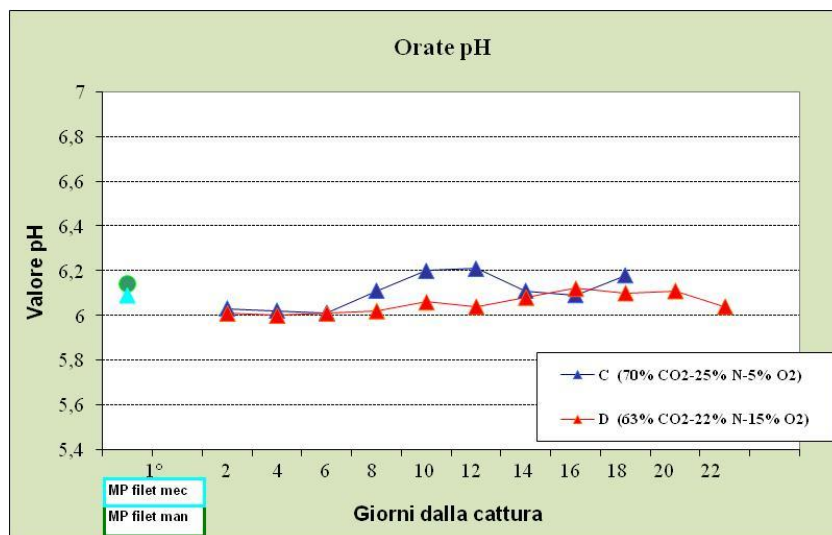


GRAFICO 6



CONCLUSIONI

Nei filetti di *Dicentrarchus Labrax* confezionati, la FAT a 32° e a 5°C non ha presentato differenze significative tra i due lotti e quindi tra le diverse miscele di gas utilizzate. Si è osservato, in ogni caso, un aumento della FAT a 32°, nel lotto A, a partire dal 10° giorno dalla cattura, e nel lotto B a partire dal 12° giorno, accompagnato, in quest'ultimo caso, da uno scadimento più considerevole delle caratteristiche organolettiche.

In linea generale le due percentuali di gas non hanno influito in maniera significativa sullo sviluppo microbico delle specie ricercate.

Sulla base dei caratteri organolettici la shelf-life è stata giudicata positivamente, per il lotto A, fino al 14° giorno dalla cattura e, per il lotto B, fino al giorno 10°. La miscela di gas utilizzata per il lotto A (CO₂ 70%, N 25% e O₂ 5%) ha fornito pertanto risultati complessivamente migliori ai fini della conservabilità.

Dal punto di vista sanitario in tutti i campioni sono risultati assenti *Salmonella spp.*, *Clostridi solfito-riduttori* e *Stafilococchi potenzialmente patogeni*.

La *Listeria monocytogenes* è stata invece isolata complessivamente in 3 campioni. La possibilità di determinare una listeriosi nell'uomo è legata alla possibilità di moltiplicazione del microrganismo nel corso dello stoccaggio, in determinate condizioni di temperatura e di pH. Quest'ultimo parametro, che si è attestato nel corso della nostra sperimentazione mediamente intorno al valore di

pH 6,13 per il lotto A e di pH 6,08 per il lotto B, è sicuramente capace di determinare la crescita del microrganismo, così come la temperatura essendo *L. monocytogenes* un germe psicrofilo. Fondamentale è sottolineare tuttavia che i filetti analizzati in questa sperimentazione si presentano, per tipologia e modalità di confezionamento, come alimenti da sottoporre a cottura e che pertanto l'uso della cottura può rendere il prodotto sicuro, vista la labilità del microrganismo alle temperature utilizzate per la cottura.

Per quanto riguarda i filetti di *Sparus Aurata*, per la materia prima gli esami batteriologici non hanno evidenziato differenze significative tra le orate filettate meccanicamente e quelle manualmente, tant'è che i risultati della FAT a 32° e a 5°C sono sovrapponibili. Nella sperimentazione sono state utilizzate, per il confezionamento in atmosfera protettiva, solo le orate filettate meccanicamente. In ogni caso la corrispondenza dei risultati relativi alla materia prima può far ritenere che standardizzando la fase di preparazione e osservando le basilari norme igieniche si possono conseguire gli stessi risultati ottenuti nella presente sperimentazione su orate filettate meccanicamente.

Per ciò che concerne le FAT a 32° e a 5°C, nei filetti confezionati, sia per il lotto C, fino al 18° giorno dalla cattura, che per il lotto D, fino al 22° giorno dalla cattura non si sono evidenziate differenze significative tra i due lotti e quindi tra le diverse miscele di gas utilizzate. Si è osservato, in ogni caso, un aumento della FAT a 32°, nel lotto D, a partire dal 16° giorno dalla cattura, accompagnato da uno scadimento considerevole delle caratteristiche organolettiche.

Non si osservano differenze significative tra i due lotti per ciò che concerne la presenza e la crescita di enterobatteri e coliformi.

Una considerazione va fatta anche sulla presenza dei lattobacilli, essendo un gruppo microbico predominante negli alimenti confezionati sottovuoto ed in atmosfera protettiva. La loro presenza soltanto in 11 confezioni ed il loro numero non eccessivamente alto nel corso dello stoccaggio sono probabilmente imputabili al prevalere di altre specie psicrotofe. Utilizzando un agar nutritivo ottimale è stato visto infatti che non solo essi sono stati isolati in tutte le confezioni analizzate, ma che addirittura il loro aumento costante ed esponenziale coincide con lo scadere delle caratteristiche organolettiche.

La selezione dei lattobacilli è considerata vantaggiosa per la shelf-life anche dei prodotti ittici, dato che il loro sviluppo può inibire germi alteranti, grazie ad attività antagoniste come la produzione di acidi organici, e di perossido di idrogeno e di CO₂ e la sintesi di batteriocine.

Per ciò che concerne la shelf-life dei due lotti di filetti di orata, è stata giudicata positivamente fino al 12° giorno dalla cattura, senza differenze tra i filetti dei due lotti. Pertanto l'efficacia ai fini della conservabilità delle due percentuali di gas, utilizzate nei due lotti sperimentali, può essere considerata simile, e la scelta di utilizzare l'una rispetto all'altra è da ritenersi discrezionale da parte del produttore.

Se consideriamo le caratteristiche organolettiche sicuramente i due lotti di orate della presente sperimentazione non possono rimanere

sul mercato se non fino al 10° giorno dal confezionamento, basandosi anche sul dato oggettivo che, dopo tale periodo, il panel di persone che ha valutato i caratteri organolettici li ha giudicati tali da pregiudicarne la commercializzazione.

Dal punto di vista sanitario tutti campioni sono risultati non contaminati da *Salmonella spp.*, *Stafilococchi potenzialmente patogeni* e *clostridi solfito-riduttori*.

Anche per i filetti di orate, come per le spigole, l'unico problema di carattere sanitario, nel corso della sperimentazione, è rappresentato dalla presenza di *Listeria monocytogenes* isolata nel 72,41% dei campioni, precisamente da 16 su 23 nel primo lotto e da 26 su 35 nel secondo lotto e da due campioni di materia prima, entrambi filettati meccanicamente.

In ogni caso non si rilevano differenze sulla distribuzione di questo microrganismo nei due diversi lotti.

La presenza di *Listeria monocytogenes* nei prodotti della pesca freschi e preparati è legata ad una contaminazione connessa a quella delle acque di pesca o di allevamento. Essa può pertanto essere presente naturalmente sul pesce, o essere connessa a contaminazioni che avvengono durante la fase di lavorazione.

La Normativa Comunitaria ha previsto da parte del produttore degli *audit* interni che hanno lo scopo di verificare il mantenimento di determinate caratteristiche microbiologiche ed organolettiche, che il produttore può essersi prefissato o che deve obbligatoriamente

osservare, come nel caso dei criteri microbiologici sanciti dal Regolamento CE/2073/2005 sui Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

A norma di tale Regolamento si definisce *criterio microbiologico* un *criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi per unità di massa o volume, area o partita.*

Se necessario gli operatori del settore alimentare devono effettuare studi per verificare nello specifico se i criteri sono rispettati durante tutta la *shelf-life*.

In particolare ciò deve avvenire per gli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di , e che possono costituire un rischio per la salute del consumatore.

Considerato, tuttavia, che sono stati preparati quattro lotti di filetti seguendo un protocollo che prevede ipotesi di lavoro standardizzate, per quanto concerne le condizioni di lavorazione e confezionamento, i risultati ottenuti possono essere estesi a lotti prodotti con le stesse modalità. Importante ed incisiva deve essere la formazione del personale che opera nell'azienda e soprattutto il controllo delle operazioni di filettatura e di tutte quelle fasi che potrebbero comportare una contaminazione da parte di germi indesiderati.

Si consiglia di operare la fase di sanitizzazione sempre in maniera scrupolosa utilizzando detergenti e disinfettanti specifici per il tipo di microrganismo che deve essere tenuto sotto controllo e/o i materiali cui deve venire a contatto, utilizzando sempre le dosi consigliate dal produttore.

La nostra sperimentazione ha infine messo in evidenza come la qualità complessiva del pesce è profondamente legata a quella microbiologica ed organolettica. Ma è auspicabile, per determinare la shelf-life di prodotti ittici lavorati e semilavorati, un'integrazione maggiore tra parametri microbiologici, sensoriali e chimici, ma è anche necessario prendere in considerazione lo studio dei fattori che influenzano l'entità e la composizione della carica batterica iniziale, il processo degradativo e la flora microbica colonizzante il prodotto ittico.

BIBLIOGRAFIA

- *Aspetti correlati al benessere degli animali nei sistemi di allevamento della spigola e dell'orata in Europa Parere del gruppo di esperti scientifici sulla salute e il benessere degli animali* (Richiesta n. EFSA-Q-2006-149) Adottato il 22 ottobre 2008.
- Balebona M.C., Zorrilla I., Morinigo M.A., Borrego J.J., 1998. *Survey of bacteriological pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) in southwestern Spain from 1990 to 1996. Aquaculture, 166, 19–35.*
- Enciclopedia Multimediale Rizzoli Larousse 2000 - Copyright RCS Libri S.P.
- Enciclopedia Multimediale Omnia - ©Istituto Geografico De Agostini.
- Enciclopedia illustrata delle Specie ittiche Marine. P. Manzoni, ISTITUTO GEOGRAFICO DE AGOSTINI, NOVARA 1987).
- FAO. © 2005-2008. Topics Fact Sheets. Main cultured species. Text by Rohana Subasinghe and David Currie. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 27 May 2005. <http://www.fao.org>
- FEAP (2006). Aquaculture statistics. www.feap.org
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2008. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (09/2008).
- Gandhi, M., Chikindas, M.L., 2007. *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*. International Journal of Food Microbiology 113, 1-15.
- George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.F., 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 6, 153-156.

- Lee K.-S., Yang C.C., Lin C.S. e Chow C.J. (1998). Effect of modified atmosphere packaging on shelf-life, chemical properties and color changes of fresh tilapia fillets. *Food Science, Taiwan*, 25 (4), 477-489.
- Nuvoloni, R., Pedonese, F., D'Ascensi, C., Rindi, S., 2005. Metodi di valutazione del rischio nei prodotti ittici. *Annali Fac. Med. Vet.*, pp. 93-107.
- Özogul F., Polat A., Özogul Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry* 85: 49-57.
- Piergiovanni L. (2002), "*Modificazioni di atmosfera*", Distam, Milano, pp 158-173.
- Pournis N., Papavergou A., Badeka A., Kontominas M. G., Savvaidis I. N. (2005) Shelf-life Extension of Refrigerated Mediterranean Mullet (*Mullus surmuletus*) Using Modified Atmosphere Packaging. *Journal of Food Protection*, 68, (10), 2201-2207.

III. EFFETTI DELL'UTILIZZO DELL'OZONO NELLA CONSERVAZIONE DI DUE SPECIE ITTICHE: *Merluccius merluccius* e *Aristeus antennatus*.

Abstract

Nel 2001 la Food and Drug Administration (FDA) ha modificato le norme riguardanti gli additivi per rendere possibile l'uso dell'ozono, quale agente antimicrobico, sia in fase acquosa che gassosa, per il trattamento e la conservazione degli alimenti. Obiettivo del progetto di ricerca è stato quello di valutare, su pesce appena pescato ed in particolare su esemplari di *Merluccius merluccius* e *Aristeus antennatus*, l'efficacia dell'ozono nei confronti di microrganismi responsabili di spoilage e di microrganismi patogeni mediante lo stoccaggio del pescato in un Thermobox a refrigerazione passiva con aria ozonizzata prodotta da un ozonizzatore. Dunque è stato valutato l'utilizzo combinato della refrigerazione passiva con l'ozono nella conservazione del pescato.

INTRODUZIONE

Il gambero imperiale, *Aristeus antennatus*, è stato descritto agli inizi del diciannovesimo secolo nel Mar Ligure da Risso, insieme ad *Aristaeomorpha foliacea*. Le due specie costituiscono gli unici rappresentanti della famiglia Aristeidae che si possono incontrare nel Mar Mediterraneo.

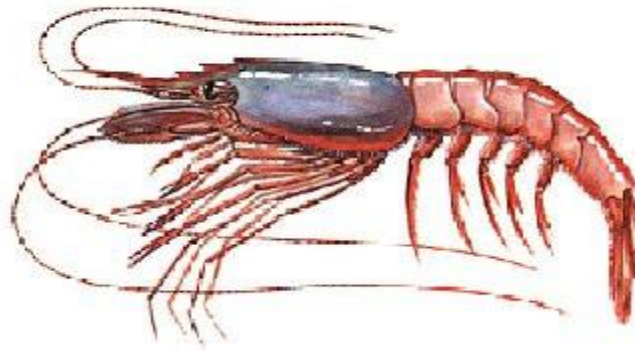


Figura III.1 Esemplare di *Aristeus Antennatus* (Risso, 1816). Fonte: Internet.

La classificazione di tale specie può così essere precisata:

PHYLUM: *Arthropoda*

CLASSE: *Crustacea*

SUBCLASSE: *Malacostraca*

ORDINE: *Decapoda*

SUBORDORDINE: *Natantia*

FAMILIA: *Aristeidae*

GENERE: *Aristeus*

A. antennatus è un crostaceo di dimensioni medie attorno ai 12 cm, max 20-22 cm., con corpo compresso lateralmente, costituito da una parte anteriore (cefalotorace) ed una posteriore segmentata (addome). Il cefalotorace è ricoperto di una robusta corazza dotata di spine (carapace) ed è provvisto di 13 paia di appendici: un paio di antennule, uno di antenne, uno di mandibole, due paia di mascelle,

Dott.ssa Carmela Ceres

cinque paia di arti per la locomozione (pereopodi), di cui quattro terminano con una piccola pinza. Il cefalotorace è seguito dalla regione posteriore o addome, che è costituita da sei segmenti articolati, lisci ed intersecati longitudinalmente da una piega, di cui i primi cinque sono muniti ciascuno di un paio di appendici per il nuoto (pleopodi) ed il sesto è formato da appendici a lamelle (uropodi) e termina con un ventaglio (telson). L'esoscheletro leggero e i lunghi pleopodi suggeriscono che la specie sia un abile nuotatore (Cau *et al.*, 2002). Il carapace è armato da un rostro munito nella parte superiore di tre denti. Il rostro presenta dimorfismo sessuale (più lungo nelle femmine e nei giovani), particolare che permette l'identificazione del sesso. I grossi occhi sono localizzati lateralmente su un peduncolo sotto il rostro e sormontano l'apparato boccale. La colorazione del corpo è rosso-chiara o rosea, con sfumature violacee nella parte superiore del carapace e lungo le giunture dei segmenti dell'addome.

Aristeus antennatus viene spesso commercializzato insieme con un'altra specie denominata gambero rosso (*Aristaeomorpha foliacea*). I caratteri che permettono la distinzione delle due specie sono:

- il numero di denti nella parte superiore del rostro (tre in *A. antennatus* e cinque-sei in *A. foliacea*);
- la colorazione, più scura nel gambero rosso che possiede anche pereopodi più lunghi e sottili.

Aristeus antennatus è diffuso nell'intero bacino del Mediterraneo, ad eccezione dell'alto e medio Adriatico ed è presente anche nell'Oceano Atlantico, dal Portogallo al Marocco, fino alle

Isole di Capo Verde. Si distribuisce su fondali fangosi tra i 300 ed i 3300 metri di profondità (Sardà et al., 2003). *A. antennatus* è una specie gregaria che vive in gruppi numerosi. Gli individui di questa specie effettuano spostamenti verticali da profondità minori (circa 200 m), dove sono presenti durante la notte, verso profondità maggiori (circa 800 m), dove sono presenti durante il giorno, suggerendo un comportamento bento–pelagico (Relini, 1981; Bianchini *et al.*, 1998). La specie effettua, inoltre, migrazioni stagionali, stazionando in acque meno profonde nei periodi più freddi.

Il nasello, *Merluccius merluccius* (Linneo, 1758), è presente nel Mar Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, dalla Norvegia alle coste della Mauritania (Bertrand et al., 1996).

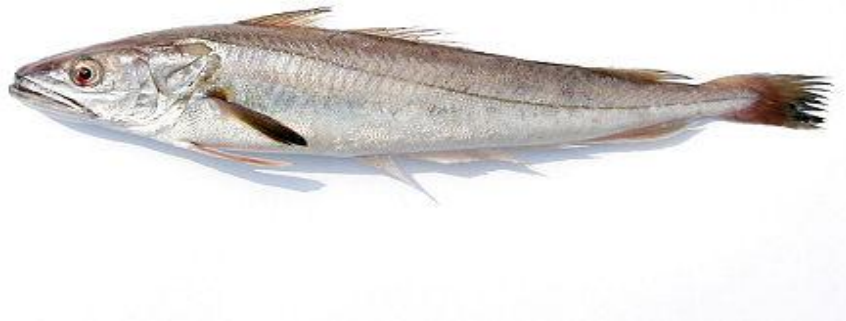


Figura III.2 Esemplare di *Merluccius merluccius* (Linneo, 1758). Fonte: Internet.

La classificazione di tale specie può così essere definita:

PHYLUM: *Chordata*

CLASSE: *Osteichthyes*

SUBCLASSE: *Actinopterygii*

ORDINE: *Gadiformes*

FAMILIA: *Merlucciidae*

GENERE: *Merluccius*

È una specie nectobentonica con un ampio intervallo di distribuzione batimetrica (20-1000 m), anche se generalmente viene catturato a profondità inferiori ai 500 m, in particolare tra 100 e 300 m (Oliver e Massuti, 1995; Goni et al., 2004). La distribuzione batimetrica, come avviene in molte altre specie, è dipendente dalla taglia: gli individui giovani (< 20 cm LT, Lunghezza Totale) sono più abbondanti tra 100 e 200 m di profondità, mentre gli individui adulti sono presenti a profondità maggiori (Maynou et al., 2003). Il nasello è una specie a vita lunga (> 15 anni), che può raggiungere taglie di circa un metro di lunghezza. Per quanto riguarda la biologia riproduttiva, è considerato un depositare parziale: una femmina, di solito, emette da 3 a 4 volte, prima che gli ovari entrino in fase di riposo (Sarano, 1986; Nannini et al., 2001). La maturità sessuale è raggiunta dai maschi nel secondo anno di vita, dalle femmine nel terzo anno (Lloret et al., 2001, Goni et al., 2004). Il periodo riproduttivo si estende per quasi tutto l'anno, sebbene siano evidenziabili dei picchi di attività, soprattutto nel periodo tardo-invernale e primaverile. Lo stock

parentale si concentrerebbe al limite della scarpata continentale per la riproduzione; le uova e le larve, invece, tenderebbero a concentrarsi lungo la fascia costiera (Nanni et al., 2001; Goni et al., 2004). Il reclutamento avviene su fondali compresi tra 100 e 200 m di profondità; le reclute hanno una taglia media di circa 6 cm LT, corrispondente ad un'età di 3-4 mesi. Anche il reclutamento avviene durante tutto l'anno, ma con picchi di maggiore intensità nei periodi tardo-primaverile ed estivo (Lloret e Lleonart, 2002; Maynou et al., 2003; Abella et al., 2005). I giovani tendono a permanere all'interno delle aree di nursery fino a quando raggiungono una taglia di circa 15 cm LT, corrispondente ad un'età di circa 10-11 mesi. Il nasello, infatti, raggiunge una taglia media al primo anno di vita di circa 18 cm LT (Morales-Nin e Aldbert, 1997; Arneri e Morales-Nin, 2000; Ligas et al., 2003; Belcari et al., 2006).

MATERIALI E METODI

Per la sperimentazione sono stati utilizzati esemplari di merluzzo (*Merluccius merluccius*) e di gambero (*Aristeus antennatus*).



Figura III. 3 *Aristeus antennatus* e *Merluccius merluccius*.

Gli esemplari, appartenenti tutti allo stesso lotto, una volta pescati e uccisi in acqua e ghiaccio e dopo poche ore dalla pesca, sono stati divisi in 2 aliquote di cui una posta in un Thermobox a refrigerazione passiva (figura n. 4-5-6) settato ad una temperatura tra -1°C e 0°C e con l'ozonizzatore settato per i primi 5 giorni a 3 cicli da 5 minuti, per la restante sperimentazione invece 4 cicli da 10 minuti (5 min 3,5-4 ppm di ozono) l'altra stoccata secondo le usuali modalità di stoccaggio ossia ricoperti con un sottile film plastico sul quale è depositato ghiaccio tritato (aliquota controllo).



Figura III.4 Thermobox a refrigerazione passiva con ozonizzatore.



Figura III.5 Thermobox



Figura III.6 Ozonizzatore

I campioni, con scadenza di due giorni, sono stati trasportati a temperatura di refrigerazione al Laboratorio della Sezione di Ispezione degli alimenti di origine animale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", dove immediatamente sono state eseguite analisi microbiologiche ed organolettiche.

CONTROLLI DI LABORATORIO

a. Controlli microbiologici campioni.

I campioni prelevati econdo il seguente schema di campionamento:

u.c.	Campioni
Lotto 1	Merluzzo controllo
Lotto 2	Merluzzo ozono
Lotto 3	Gambero controllo
Lotto 4	Gambero ozono

FiguraIII.7 Esempio di prelievo: dietro le branchie.

sono stati sottoposti a prelievo per l'esame batteriologico e sono state allestite opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica salina per la ricerca, secondo metodiche validate, dei seguenti microrganismi:

Flora aerobia totale (Plate Count Agar a 30°C per 24-48 ore),
inoculo 0.1g;

Flora psicrofila totale (Plate Count Agar a 5°C per 10 gg.),
inoculo 0.01 g;

Coliformi ed E. coli (Brodo Lattosato Verde BrillanteBile a 37°C per 24-48 ore e prova di MacKenzie), inoculo 0.1 g;

Lattobacilli (MRS Agar a 37°C), inoculo 0.1 g;

Lactic Acid Bacteria (Elliker Agar o M17+ 0,5% Lactose Oxoid, a 32°C), inoculo 0.1g;

Enterobatteri (Violet Red Bile Glucose Agar a 37°C per 24-48 ore), inoculo 0.1 g;

Streptococchi fecali (Kanamycin Esculin azide Agar Base + Kanamycin Selective Supplement a 37°C per 24-48 ore), inoculo 0.01g;

Clostridi solfito-riduttori (SPS Agar a 43°C per 24 ore), inoculo 1 g;

Lieviti e muffe (Rose Bengal Chloramphenicol Agar + Chloramphenicol antibiotic supplement a 22° per 5 gg.) inoculo 0.1 g;

Pseudomonas spp. (Pseudomonas Agar Base + glicerolo + Pseudomonas C-N Supplement 22° per 2 gg) inoculo 0.1 g;

Aeromonas spp. (Aeromonas medium base –Ryan-) inoculo 0,01g;

Stafilococchi potenzialmente patogeni (Baird Parker a 37°C per 24-48 ore e successiva ricerca della coagulasi e della DNAsi), inoculo 0.01 g;

Batteri produttori di H₂S (Iron Sulphite Agar a 22°C per 7 gg.), inoculo 0,1 g; _

Bacillus cereus (Bacillus cereus agar base + Bacillus cereus supplement 37° per 1gg; 23° per 1 gg.), inoculo 0,01g;

Photobacter phosphoreum (Specific spoilage organism) (Pre-arricchimento selettivo in Nutrient Broth al 2% NaCl e pH 4,7 incubato a 27°C per 24 ore, successive semina in TSA + 0,2% NaCl incubato a 27°C per 24 ore) in 25g;

Brochothrix thermosphacta (STAA agar base 26°C per 2 gg)
inoculo 0,01g;

Salmonella spp. (Acqua peptonata tamponata a 37°C per 16-18 ore, brodo selenite a 37°C e Rappaport-Vassiliadis R10 Broth a 43°C per 24-48 ore, Hektoen enteric agar e Rambach agar a 37°C per 24 ore), inoculo 25 g;

Listeria monocytogenes (LEBB + UVM 1 a 30°C per 24 ore, semina della brodocultura 1 in LEBB + UVM) a 30°C per 24 ore, isolamento della brodocoltura 2, su Palcam agar incubato a 37°C per 24-48 ore, in condizioni di microaerofilia, in 25 g;

Campylobacter spp., (Nutrient Broth No.2 + Bolton Broth Selective Supplement (Oxoid) + Lake Horse Blood, in microaerofilia 2 ore a 37 °C e 48h a 42°C) 0,01ml su Campylobacter selective agar + Campylobacter selective supplement + Lake Horse Blood, in microaerofilia per 48 h a 42°C, in 25 gr.

Vibrio spp. (ASPW a 42°C e/o 26°C per 24 ore, semina dal prearricchimento in 10 ml ASPW a 42° e/o 26°C per 24 ore) semina della seconda brodocultura in TCBS o medium selettivo TSAT per 24-48 ore a 37°C, in 25 g;

Le colonie sospette isolate sono state identificate con Sistemi API Biomerièux utilizzando:

- API Staph, e ID 32 rapid per lo *Staphylococcus aureus*;
- API listeria per *Listeria spp. e monocytogenes*;

- API CHB per il *Bacillus cereus*;
- API 20 E per *Salmonella spp.* e *Yersinia enterocolitica*.
- API NE per *Aeromonas* e *Pseudomonas spp.*;
- API Campy.

Dopo la valutazione delle caratteristiche fenotipiche e biochimiche i ceppi isolati sono stati conservati in appositi brodi (Tryptone Soya Broth +Yeast Extract) al 25% (v/v) di glicerolo a -20°C per ulteriori indagini.

b. Controlli microbiologici sui tamponi.

Complessivamente sono stati prelevati, dalla superficie degli esemplari di merluzzo (figura n.8), un numero di 24 tamponi, rispettivamente 12 dalla superficie della aliquota controllo, e 12 dalla superficie dei campioni sottoposti al trattamento con l'ozono, come riportato in tabella. I prelievi sono stati condotti utilizzando delimitatori d'area sterili di 3,4 x 3,4 (11,56 cm²), posizionati posteriormente all'arco branchiale.



Figura III.8 Tamponi superficiali su campioni di *Merluccius merluccius*.

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 dal stampo sterile. Successivamente all'operazione con tampone inumidito, la procedura è stata ripetuta con tampone asciutto al fine di avere un migliore recupero batterico.

Sono stati ricercati i seguenti microrganismi: la *Flora aerobia totale mesofila e psicotropa*, dei *LAB*, delle *Enterobatteriacee*, dei *Coliformi* e dell'*E. coli*, di *Bacillus cereus*,

Salmonella spp., *Campylobacter spp.* e *Listeria monocytogenes*, e *Vibrio spp.* utilizzando le stesse metodiche sopra riportate.

Le colonie sospette isolate sono state identificate con Sistemi API Biomerièux.

Giorni dal trattamento	Merluzzo controllo Lotto 1	Merluzzo ozono Lotto 2
0°	2 u.c.	2 u.c.
2°	2 u.c.	2 u.c.
5°	2 u.c.	2 u.c.
7°	2 u.c.	2 u.c.
9°	2 u.c.	2 u.c.
11°	2 u.c.	2 u.c.
TOTALE	24 u.c.	

Tabella III.1 Pool di tamponi effettuati sulle superficie cutanea (11,56 cm²) di esemplari di *Merluccius merluccius* controllo e ozono.

c. Controlli organolettici

Attualmente la valutazione dello stato di freschezza è prevista sia dall'allegato III capo II punto A del Regolamento CE 854/2004, sia dall'allegato III sezione VIII capitolo V punto A del Regolamento CE 853/2004 ed è eseguita con le modalità indicate dal punto A del Regolamento CE 2406/96.

PARAMETRI DI QUALITÀ		CARATTERISTICHE	PUNTI DI DEMERITO
Aspetto	Pelle	grigio brillante, iridescente	0
		grigio meno brillante	1
		grigio (colore rosa nella regione dorsale)	2
		grigio colore rosa- giallo nella regione dorsale)	3
Muscolatura	Consistenza (Regione Dorsale)	soda, elastica	0
		soda, meno elastica	1
		meno soda, molto meno elastica	2
		molle	3
Occhio	Cornea	trsparente iridescente	0
		leggermente opalescente	1
		opalescente	2
		opalescente iniettato di sangue	3
	Colore Della Pupilla	nero, brillante	0
		nero grigiastro	1
		nero grigiastro (simile alla cataratta) grigio biancastro (simile alla cataratta)	2 3
Forma	pianeggiante	0	
	leggermente sprofondato	1	
	sprofondato	2	
Branchie	Colore	rosso scuro rosso brillante	0
		rosso scuro con aree di decolorazione	1
		rosso scuro	2
		rosso decolorato	3
	Muco	poco muco chiaro, trasparente	0
		muco leggermente opaco	1
		muco denso e opalescente	2
		muco giallo brunastro	3
	Odore	fresco, di alghe marine	0
fresco, di alghe marine meno intenso		1	
neutro		2	
poco acido o pungente, fruttato		3	
acido pungente o amaro rancido		4	
Odore	di fresco (di alga marina)	0	
	neutro	1	
	di pesce	2	
	cattivi odori	3	

Tabella III.2 Scheda QIM del Nasello o Merluzzo, *M. merluccius*, L. 1758.

Il Regolamento CE 2406/96 suddivide i prodotti della pesca in vari gruppi, prevedendo per ciascuno uno schema per l'esecuzione dell'esame organolettico, in modo da rendere le valutazioni più precise.

Sono stati condotti, sui prodotti appena dopo il prelievo dalla cella frigorifera controlli organolettici da 2 persone, andando a valutare colore e odore, ed aspetto generale. Successivamente presso il laboratorio della Sezione di Ispezione degli alimenti, prima del prelievo per le analisi microbiologiche, è stato condotto un Quality Index Method specifico per le due specie prese in esame.

In particolare, per *Merluccius merluccius*, sono stati valutati l'aspetto generale della pelle e la presenza di muco superficiale, e la

tonicità muscolare per l'esame obiettivo generale, la limpidezza, l'aspetto e la forma della pupilla per l'occhio, il colore e l'odore delle branchie.

Nel caso del *Aristeus antennatus* sono stati presi in esame la presenza di colorazioni anormali (la loro relativa estensione in %) sulla superficie dello scolice (testa), variegature di colore dell'intero carapace, odore e consistenza, l'eventuale presenza di uova e il loro relativo colore.

I risultati dei singoli test per specie effettuati da un panel di 4 persone erano espressi con un punteggio compreso tra 0 e 3. Valori vicini a 0 indicavano un prodotto fresco, viceversa la vicinanza al valore 3 riponeva a favore dell'invecchiamento del prodotto.

d. Determinazione del pH e dell' a_w

Per ogni campione è stato determinato il pH con il metodo potenziometrico utilizzando un pHmetro Metrohm 691. Per l' a_w è stato utilizzato un misuratore HygroLab 2ro-Tronic Pbi-International (figura n.9).



Figura III.9 Strumentazione per la misurazione del pH e dell' a_w

RISULTATI

a. Risultati dei controlli microbiologici campioni

I risultati dei controlli microbiologici dei campioni sono riportati nelle tabelle n. 4 e 5 e nei grafici n.1-12.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* è risultata sempre presente nel lotto 1 (merluzzo controllo) a livelli compresi tra \log_{10} 2,58 e 5,87 ufc/g (grafico 1). Nel corso dello stoccaggio si è riscontrato un aumento crescente del valore della *FAT*. Nel lotto 2 (merluzzo trattato con ozono) si verifica lo stesso andamento esponenziale, ma con valori di circa 1 \log_{10} inferiori dopo il 5° giorno. Per il lotto 3 (gambero controllo) l'andamento è lo stesso (grafico 2) con valori compresi tra \log_{10} 3,11 e 5,92 ufc/g ma rispetto al lotto 4 (gambero ozono) si assiste ad una riduzione maggiore e cioè di circa due logaritmi, anche in questo caso, dopo il 5° giorno di stoccaggio. (grafico 3).

La *Flora Aerobia Totale a 5°C (FAT)* è risultata sempre presente nel lotto 1 a livelli compresi tra \log_{10} 2,60 e 6,81 ufc/g (grafico 4), e dopo trattamento con ozono i valori sono pressoché sovrapponibili. Nel lotto 3 (grafico 5), invece, si riscontra una differenza tra i due tipi di stoccaggio essendo i valori compresi tra \log_{10} 2,59 e 5,87 ufc/g nel controllo e tra \log_{10} 1,77 e 4,92 ufc/g nel trattato.

I *Lattobacilli* sono risultati presenti nel 30% dei campioni del lotto 1 e del lotto 2. Nel lotto 3 nel 90% dei campioni a livelli

compresi tra \log_{10} 1,30 e 3,14 ufc/g ed in tutti i campioni del lotto 4 con valori tra \log_{10} 1,30 e 2,54 ufc/g.

I *LAB* sempre presenti in tutti campioni analizzati con valori più alti rispetto ai lattobacilli, ma con una riduzione nei lotti ozonizzati.

Coliformi totali, *Coliformi fecali* ed *E. coli* sono risultati sempre assenti.

Gli *Enterobatteri* sono presenti nel lotto 1 con valori compresi tra \log_{10} 1,53 e 2,75 ufc/g e nel lotto 2 con valori compresi tra \log_{10} 1,30 e 1,77 ufc/g (grafico 6). Nel lotto 3 con valori compresi tra \log_{10} 1,00 e 1,50 ufc/g ed infine nel lotto 4 sono risultati sempre assenti (grafico 7).

I *Clostridi solfito-riduttori* sono stati ritrovati al 2° e al 5° giorno di stoccaggio sia per il lotto 1 che per il lotto 2, rispettivamente con valori di \log_{10} 2,32 e 1,84 ufc/g per il lotto 1 e \log_{10} 1,00 e 1,95 ufc/g per il lotto 2. Per il lotti 3 e 4 invece sono risultati presenti solo al 7° giorno di stoccaggio con valori di \log_{10} 2,30 e 2,07 ufc/g.

I *lieviti e le muffe* sono risultati presenti con valori compresi tra \log_{10} 1,00 e 3,10 ufc/g nel lotto 1 e nel lotto 2 solo al 9° e all'11° giorno di stoccaggio con valori rispettivamente di \log_{10} 2,94 e 2,69 ufc/g. Nel lotto 3 solo al 2° e al 9° giorno con valori di \log_{10} 1,00 e 3,67 ufc/g e negli stessi giorni anche nel lotto 4 con valori di \log_{10} 1,30 e 1,00 ufc/g

Brochothrix per il lotto 1 è risultato sempre presente dal 5° giorno di stoccaggio in poi con valori compresi tra \log_{10} 2,47 e 3,74

ufc/g. Nel lotto 2 è presente solo al giorno 7°, 9° e 11° con valori ridotti rispetto al lotto 1 (grafico 8). Lo stesso andamento si verifica anche nei lotto 3 e 4 (grafico 9).

Pseudomonas spp. è risultato sempre presente, tranne in una u.c. del lotto 3, con valori compresi per il lotto 1 tra \log_{10} 2,00 e 6,80 ufc/g, per il lotto 2 tra \log_{10} 2,00 e 5,87 ufc/g, per il lotto 3 tra \log_{10} 2,47 e 5,00 ufc/g, ed infine per il lotto 4 tra \log_{10} 2,00 e 4,47 ufc/g.

Aeromonas spp. è presente con valori compresi per il lotto 1 tra \log_{10} 3,25 e 5,64 ufc/g, per il lotto 2 tra \log_{10} 3,57 e 5,71 ufc/g, per il lotto 3 tra \log_{10} 2,30 e 5,55 ufc/g, ed infine per il lotto 4 tra \log_{10} 2,47 e 4,04 ufc/g.

Bacillus cereus è risultato presente da 1 u.c. campionaria del lotto 1 all'11° giorno di conservazione.

Stafilococchi potenzialmente patogeni sono stati isolati in 3 u.c. del lotto 1 con un valore di \log_{10} 2,00 2,30 e 2,00 ufc/g, nel lotto 2 in 2 u.c. con un valore di \log_{10} 2,00 e 3,36 ufc/g, nel lotto 3 in 1 u.c. del con un valore di \log_{10} 2,60 ufc/g ed in 2 u.c. con un valore di \log_{10} 3,04 e 2,30 ufc/g del lotto 4.

Photobacter phosphoreum è risultato sempre presente con valori compresi per il lotto 1 tra \log_{10} 5,07 e 9,30 ufc/g, per il lotto 2 tra \log_{10} 5,07 e 9,55 ufc/g (grafico 10), per il lotto 3 tra \log_{10} 5,53 e 8,81 ufc/g, ed infine per il lotto 4 tra \log_{10} 5,53 e 8,80 ufc/g (grafico 11-12).

Batteri produttori di idrogeno solforato, Vibrio spp., Salmonella spp., Listeria monocytogenes e Campylobacter spp. sono risultati sempre assenti.

Nella tabella che segue (tabella n.3) sono riportate le altre specie microbiche isolate come singole unità campionare:

Specie microbica	u.c.	matrice	Giorno di refrigerazione
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	Lotto 1	0°
	2	Tampone	0°
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	Tampone	2°
	1	Lotto 4	2°
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1	Lotto 1	2°
<i>Providencia spp.</i>	1	Lotto 1	7°
	1	Tampone	7°
	1	Lotto 2	7°
	1	Lotto 1	11°
<i>Chromobacterium violaceum</i>	1	Lotto 1	9°
<i>Hafnia alveii</i>	1	Lotto 1	9°
	1	Lotto 1	11°

Tabella III.3. Specie microbiche isolate

CAMPIONI	GIORNI DI REFRIGERAZIONE	FAT 3 (log ₁₀ ufc/g)	FAT (log ₁₀ ufc/g)	LAT. (log ₁₀ ufc/g)	LAB (log ₁₀ ufc/g)	COL. (log ₁₀ ufc/g)	COL. FEC. (log ₁₀ ufc/g)	ENT. (log ₁₀ ufc/g)	STAF. (log ₁₀ ufc/g)	MICR. (log ₁₀ ufc/g)	STR. FEC. (log ₁₀ ufc/g)	P.P. (log ₁₀ ufc/g)	BAT. S.R. (log ₁₀ ufc/g)	PSEUD. (log ₁₀ ufc/g)	AERO. (log ₁₀ ufc/g)	LIEV. (log ₁₀ ufc/g)
MERLUZZO CONTROLLO	0°	2,58	2,60	1,60	1,90	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.	Ass.	5,07	Ass.	2	Ass.	Ass.
	2°	3,40	3,81	Ass.	2,07	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	9,30	2,32	5,33	4,46	Ass.
	5°	3,88	4,19	Ass.	1,60	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	3,65	Ass.	8,30	1,84	4,67	3,25	1
	7°	4,60	5,71	Ass.	3,27	Ass.	Ass.	1,53	2,30	Ass.	Ass.	7,34	Ass.	5,73	4,79	Ass.
	9°	5,87	6,81	Ass.	3,43	Ass.	Ass.	2,09	Ass.	2,84	Ass.	8,04	Ass.	6,09	5,15	3,10
	11°	5,40	6,30	1,47	4,15	Ass.	Ass.	2,75	2	Ass.	Ass.	8,41	Ass.	6,80	5,64	2,38
MERLUZZO OZONO	0°	2,58	2,60	1,60	1,90	Ass.	Ass.	Ass.	2	Ass.	Ass.	5,07	Ass.	2	Ass.	Ass.
	2°	4,31	3,59	Ass.	2,85	Ass.	Ass.	1,30	Ass.	Ass.	Ass.	9,55	1	4,05	3,57	Ass.
	5°	3,02	4,82	Ass.	1,95	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	1	Ass.	9,20	1,95	3,50	Ass.	Ass.
	7°	3,99	5,86	Ass.	3,28	Ass.	Ass.	1,53	Ass.	Ass.	Ass.	7,43	Ass.	5,67	4,41	Ass.
	9°	5,05	6,34	Ass.	2,51	Ass.	Ass.	1,77	Ass.	Ass.	Ass.	8,14	Ass.	5,87	5,00	2,94
	11°	4,50	7,56	2,30	3,89	Ass.	Ass.	Ass.	3,36	Ass.	Ass.	8,20	Ass.	5,60	5,71	2,69

Tabella III.4 Valori delle cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) relative al merluzzo

CAMPIONI	GIORNI DI REFRIGERAZIONE	FAT 3 (log ₁₀ ufc/g)	FAT (log ₁₀ ufc/g)	LAT. (log ₁₀ ufc/g)	LAB (log ₁₀ ufc/g)	COL. (log ₁₀ ufc/g)	COL. FECALI (log ₁₀ ufc/g)	ENT. (log ₁₀ ufc/g)	STAF. (log ₁₀ ufc/g)	MICR. (log ₁₀ ufc/g)	STR. FEC. (log ₁₀ ufc/g)	P.P. (log ₁₀ ufc/g)	BAT. S.R. (log ₁₀ ufc/g)	PSEUD. (log ₁₀ ufc/g)	AERO. (log ₁₀ ufc/g)	LIEV. (log ₁₀ ufc/g)
GAMBERO CONTROLLO	0°	3,11	2,15	1,30	2,80	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	5,53	Ass.	2,47	3,76	Ass.
	2°	3,48	2,73	Ass.	3,12	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	8,66	Ass.	Ass.	2,30	1
	5°	3,42	3,82	1,84	2	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	3,57	Ass.	8,19	Ass.	3,17	Ass.	Ass.
	7°	4,62	5,02	1,30	2,17	Ass.	Ass.	1	Ass.	2,47	Ass.	8,81	2,30	4,05	3,68	Ass.
	9°	5,92	6,01	1,84	3,08	Ass.	Ass.	1	Ass.	Ass.	Ass.	7,77	Ass.	5	5,54	3,67
	11°	4,95	5,89	2,14	3,61	Ass.	Ass.	1,50	2,60	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	4,69	5,55	Ass.
GAMBERO OZONO	0°	3,11	2,15	1,30	2,80	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	5,53	Ass.	2,47	3,76	Ass.
	2°	3,61	Ass.	2,47	2,86	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	8,80	Ass.	2,69	4,04	1,30
	5°	3,22	1,77	2,54	2,30	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	8,51	Ass.	2	Ass.	Ass.
	7°	3,40	4,58	2,14	2,85	Ass.	Ass.	Ass.	3,04	Ass.	Ass.	8,80	2,07	3,66	2,47	Ass.
	9°	3,04	4,44	2,34	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	8,04	Ass.	4,47	2,60	1
	11°	3,18	4,92	1	2,61	Ass.	Ass.	Ass.	2,30	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	2,47	Ass.	Ass.

Tabella III.5 Cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) relative al gambero.

GRAFICO 1

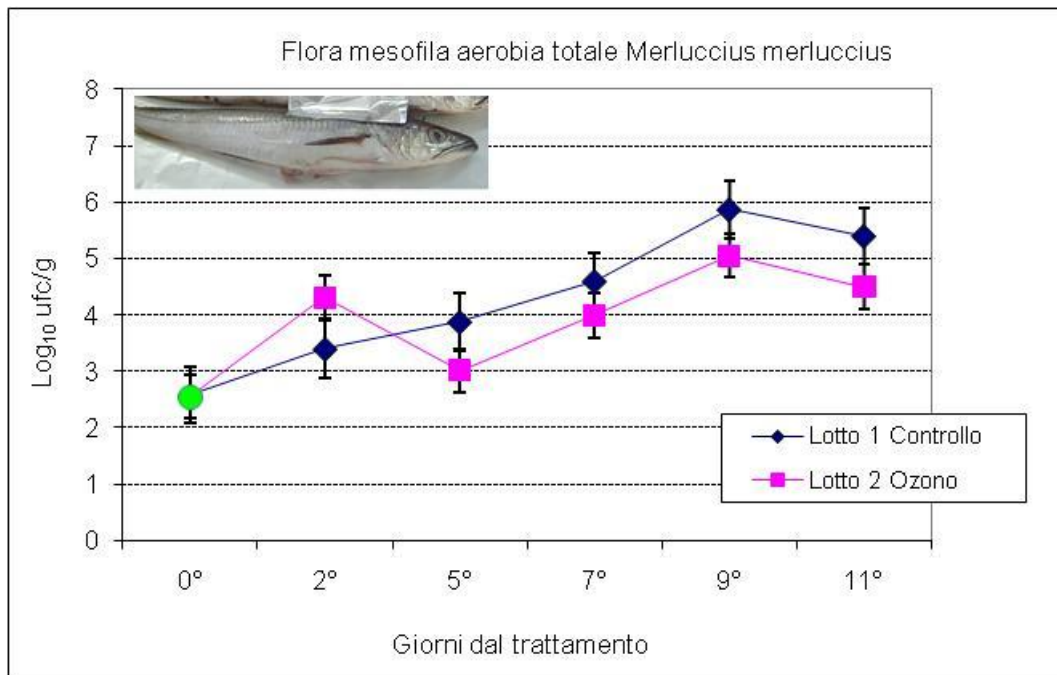


GRAFICO 2

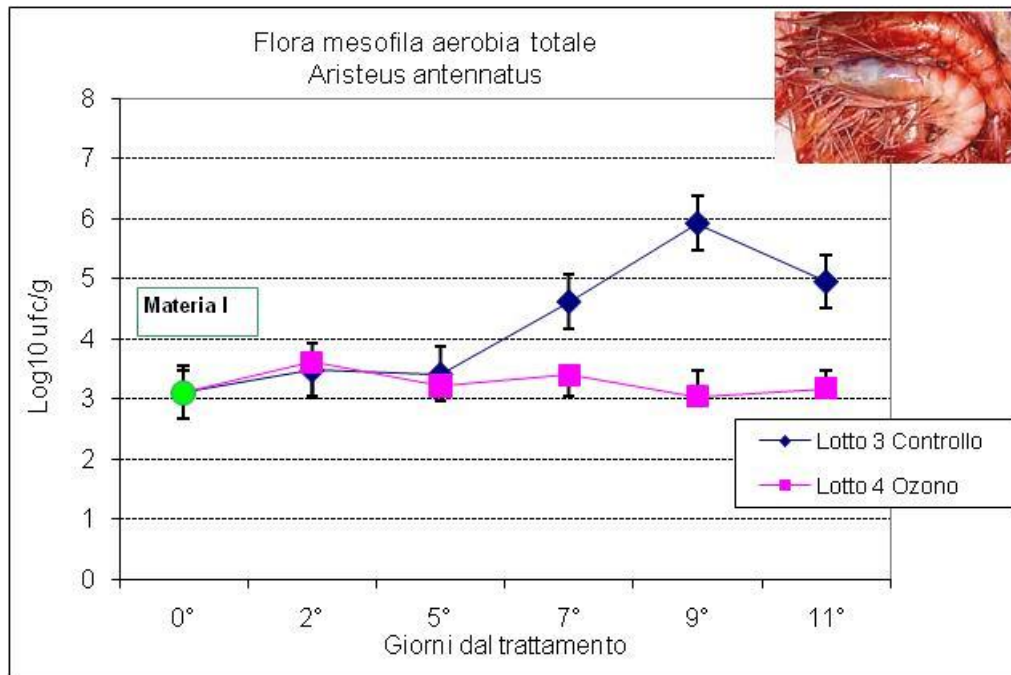


GRAFICO 3

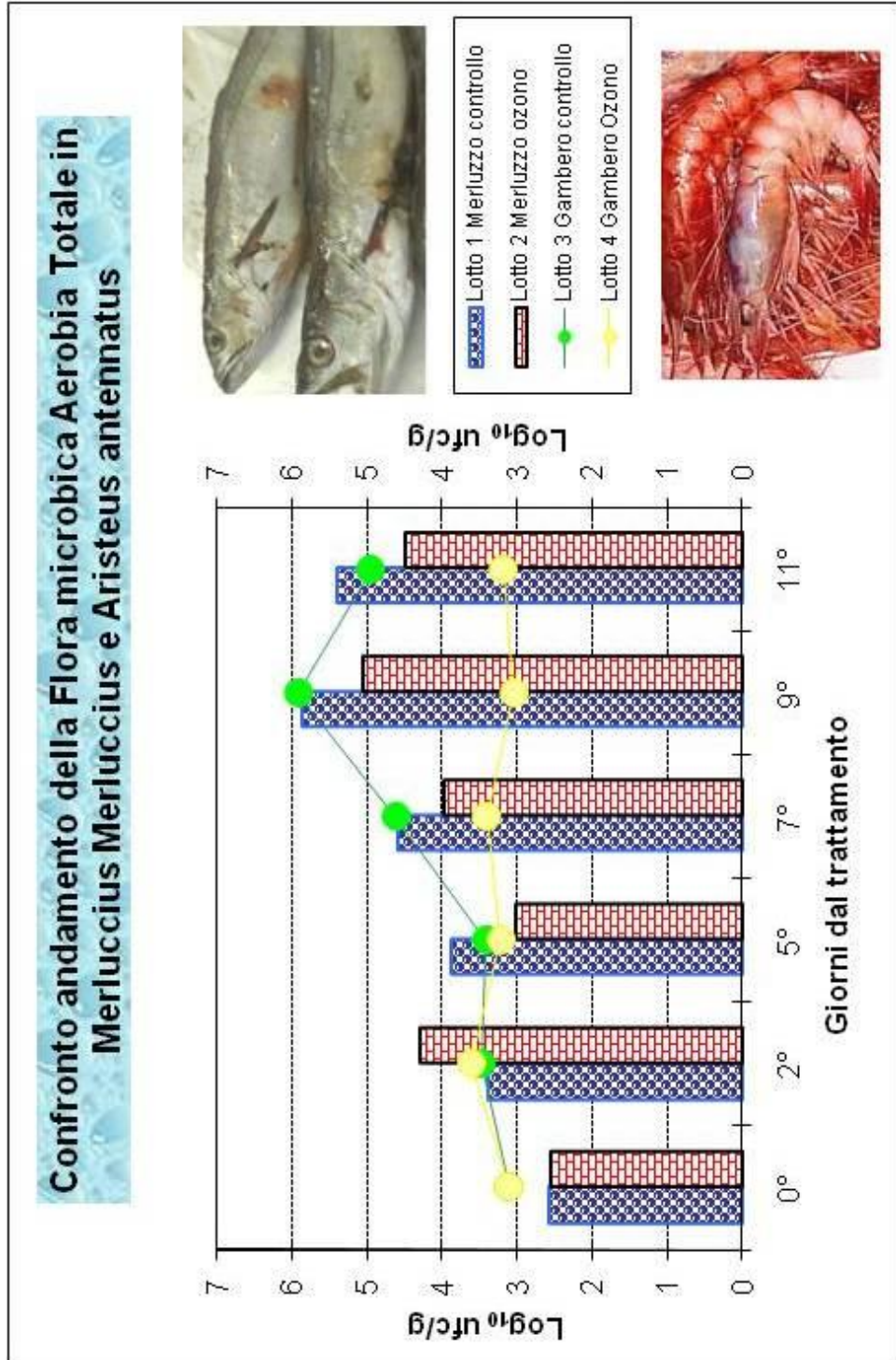


GRAFICO 4

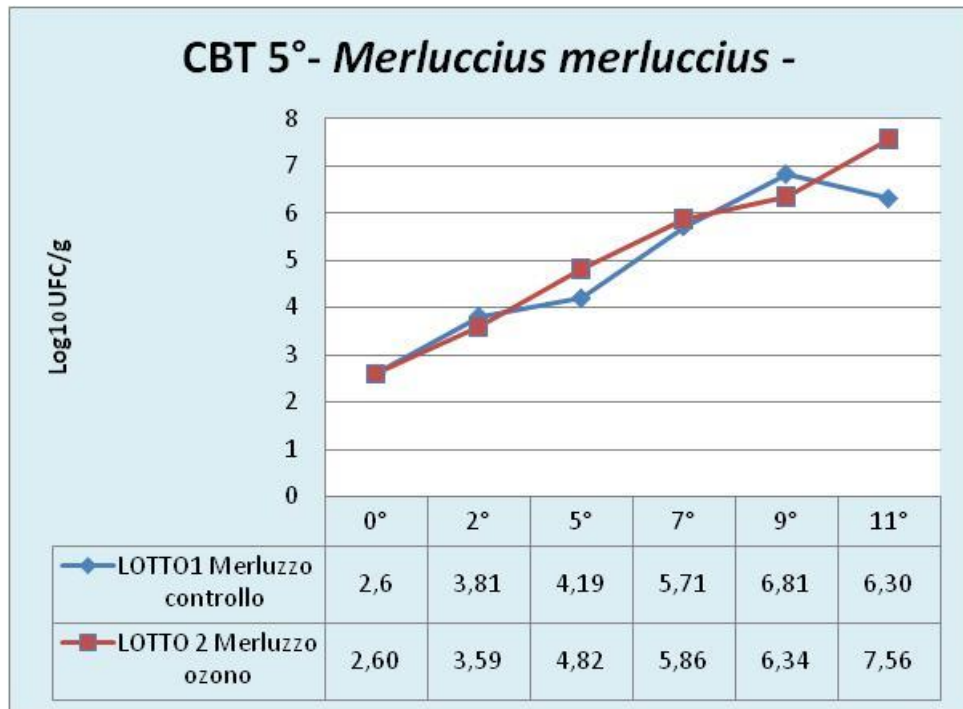


GRAFICO 5

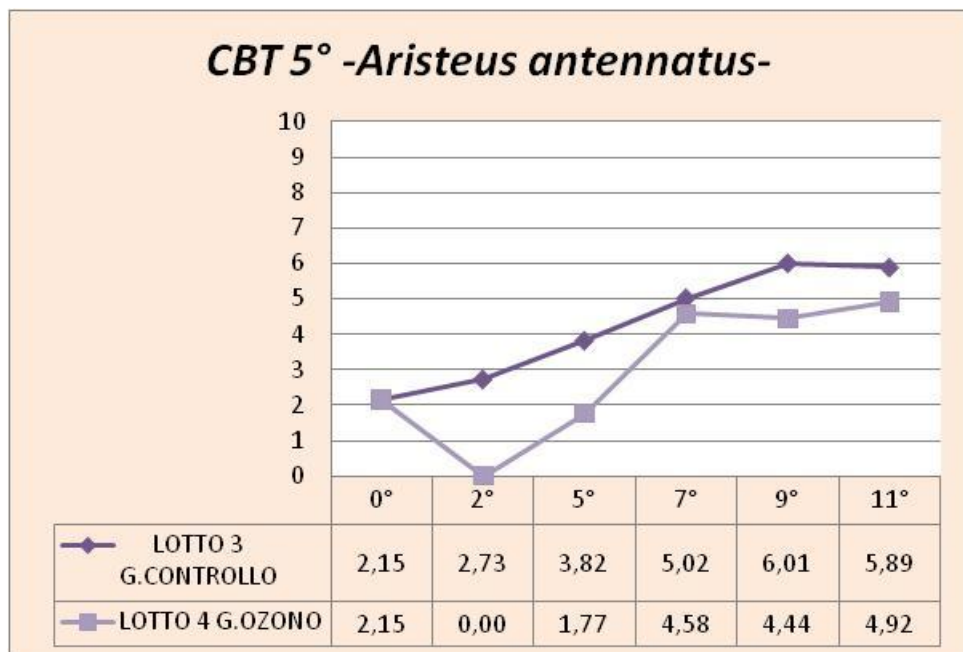


GRAFICO 6

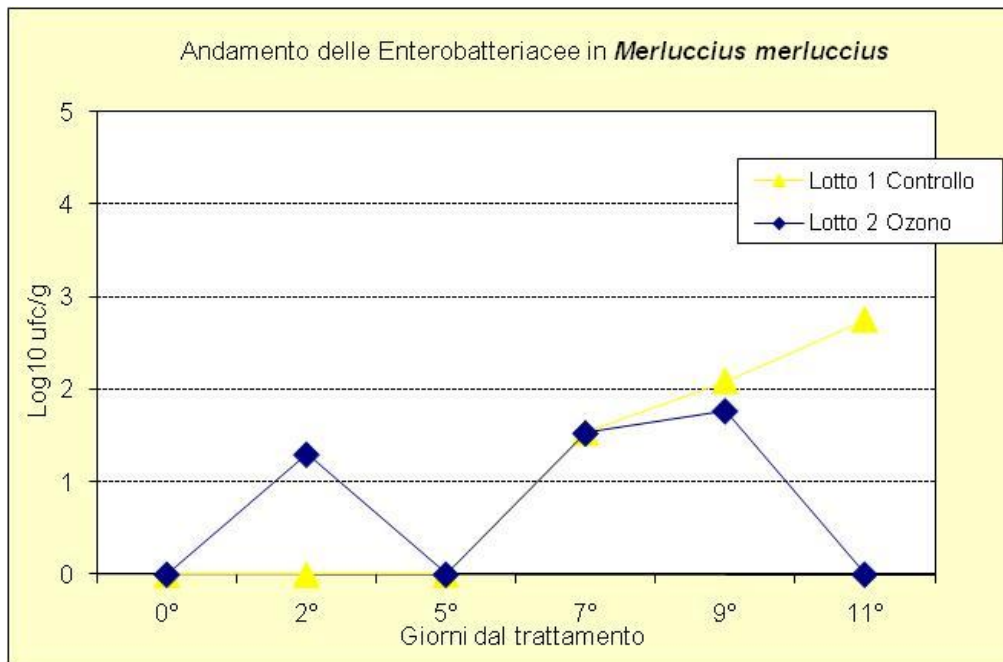


GRAFICO 7

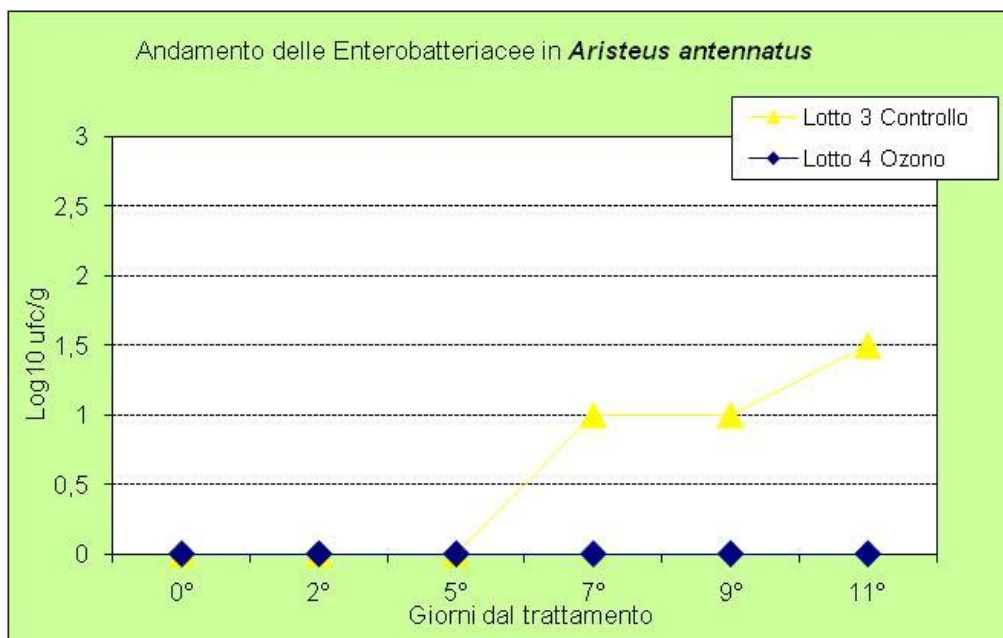


GRAFICO 8

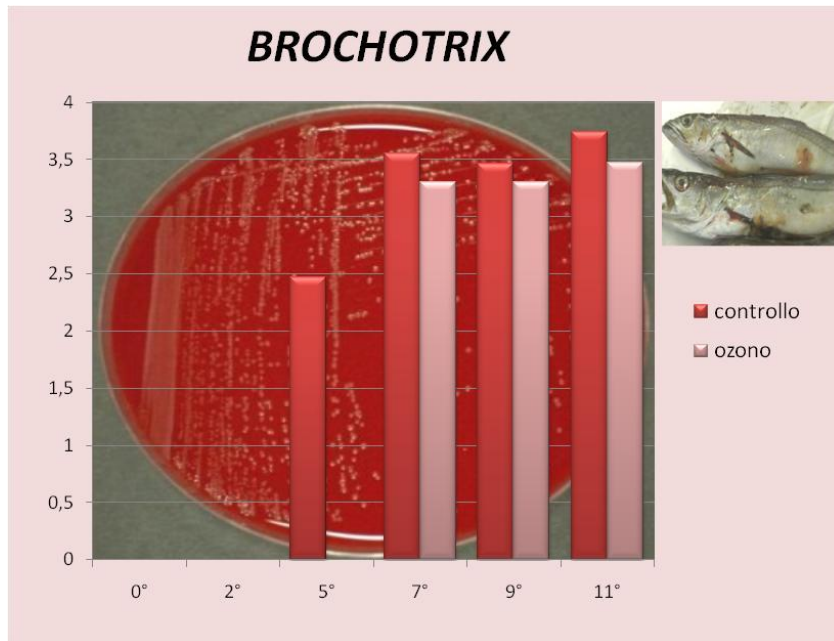


GRAFICO 9

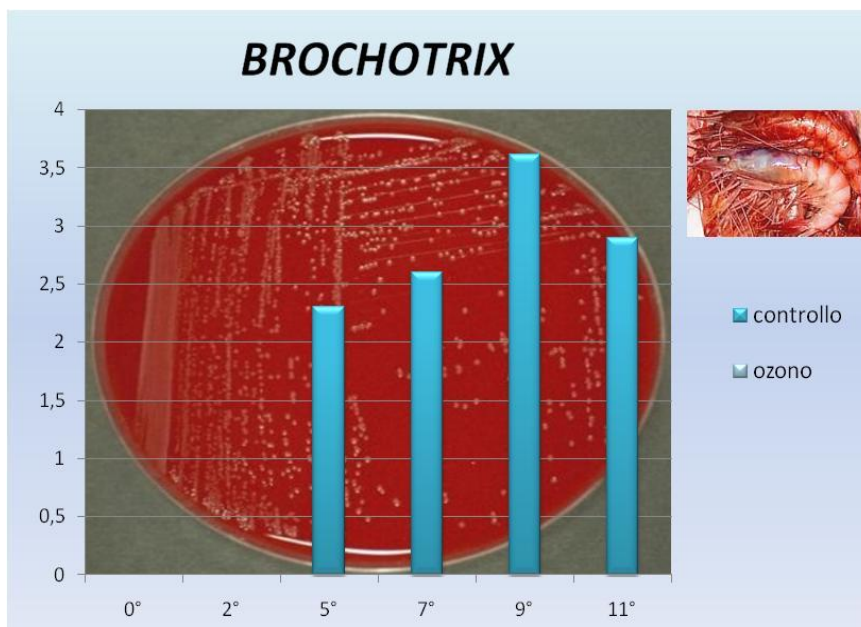


GRAFICO 10

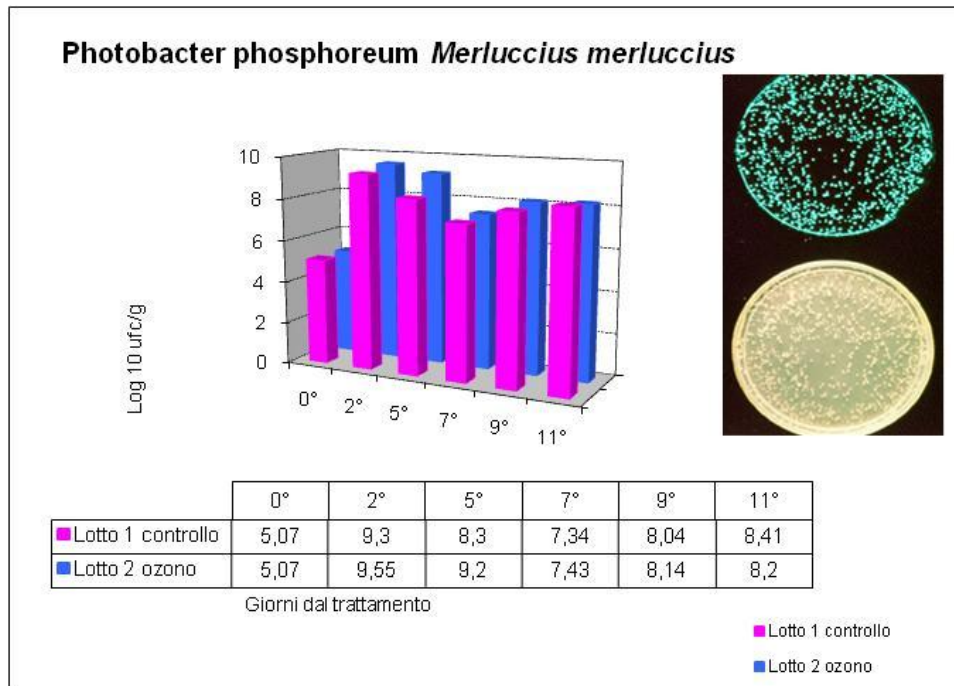


GRAFICO 11

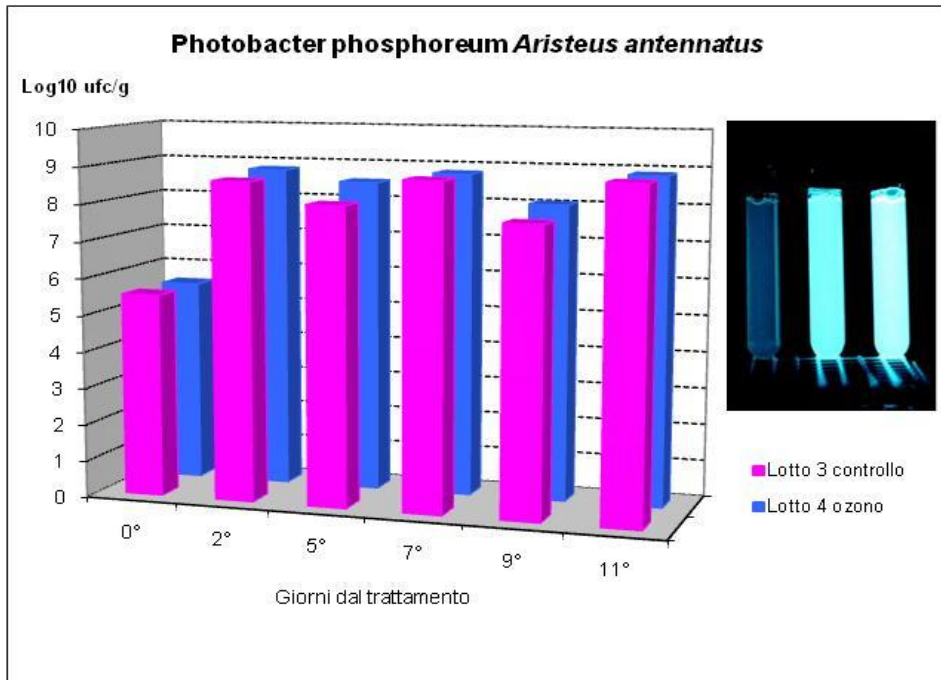
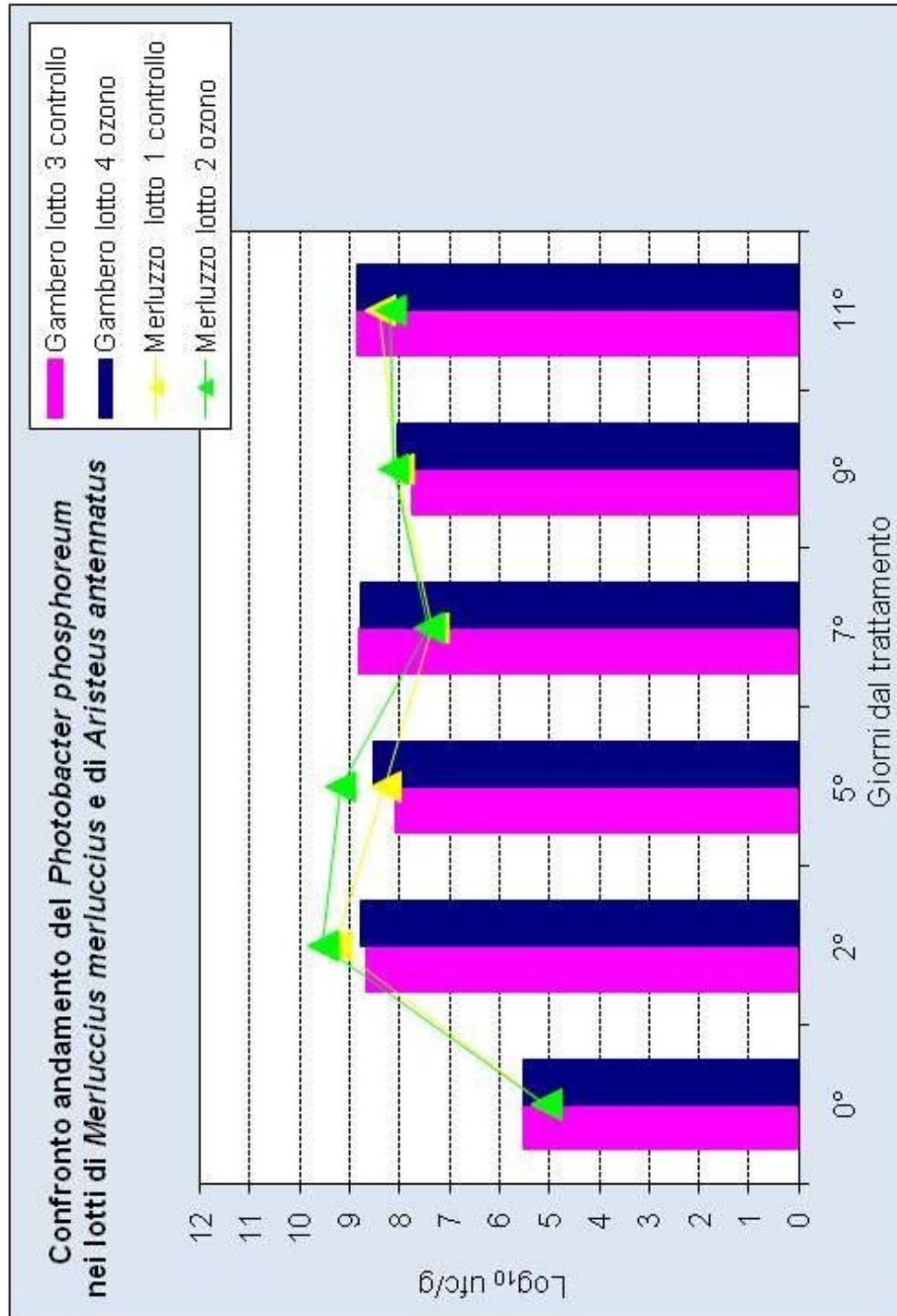


GRAFICO 12



b. Risultati dei controlli microbiologici sui tamponi

I risultati dei controlli microbiologici sui tamponi sono riportati nella tabella n.6 e nel grafico n.11.

La *Flora Aerobia Totale a 32°C (FAT)* è risultata sempre presente nel tampone del merluzzo a livelli compresi tra \log_{10} 1,50 e 4,25 ufc/g in media (grafico 13). Nel corso dello stoccaggio si è riscontrato un aumento crescente del valore della *FAT*. Dal 5° giorno si è assistito nel tampone dopo trattamento con ozono ad un abbassamento della carica batterica superficiale di circa 1 logaritmo.

La *Flora Aerobia Totale a 5°C (FAT)* è risultata sempre presente con valori sovrapponibili tra i tamponi sul campione controllo e quelli sul campione trattato.

I *Coliformi totali*, *Coliformi fecali* ed *E. coli* sono risultati sempre assenti.

Gli *Enterobatteri* sono presenti soltanto nei tamponi del merluzzo controllo ed in particolare in 2 u.c. con valori di \log_{10} 1,47 e 1,00 ufc/g.

I *lieviti e le muffe* sono risultati assenti nel tampone controllo se non nell'unità campionaria corrispondente all'ultimo giorno di stoccaggio, e in tre u.c. del tampone sui campioni ozonizzati in una percentuale molto bassa.

Brochothrix è risultato presente solo in 2 u.c. con valori per il tampone controllo di \log_{10} 3,54 e 3,41 ufc/g e negli stessi campioni (cioè appartenenti allo stesso giorno di stoccaggio, che sono

rispettivamente il 9° e l'11°) nel tampone di merluzzo trattato con valori inferiori e cioè rispettivamente di \log_{10} 2,69 e 2,77 ufc/g.

Pseudomonas spp per il tampone controllo è risultato presente in tre unità campionarie con valori di \log_{10} 1,00 5,19 e 4,04 ufc/g rispettivamente nel 5°, 7° e 9° giorno di refrigerazione. Per il tampone dopo il trattamento con valori di \log_{10} 4,51 3,81 e 5,63 ufc/g nei giorni 7°, 9° e 11°.

Aeromonas spp. è risultato presente nel tampone controllo in 3 u.c. con valori di \log_{10} 1 3 e 4,21 ufc/g rispettivamente nei giorni 5°, 7° e 11°, nel tampone dopo trattamento invece in un'unica unità campionaria con un valore di \log_{10} 3,69 ufc/g, nel 9° giorno.

Bacillus cereus è stato isolato da 1 u.c. campionaria del tampone dopo trattamento al 2° giorno di refrigerazione.

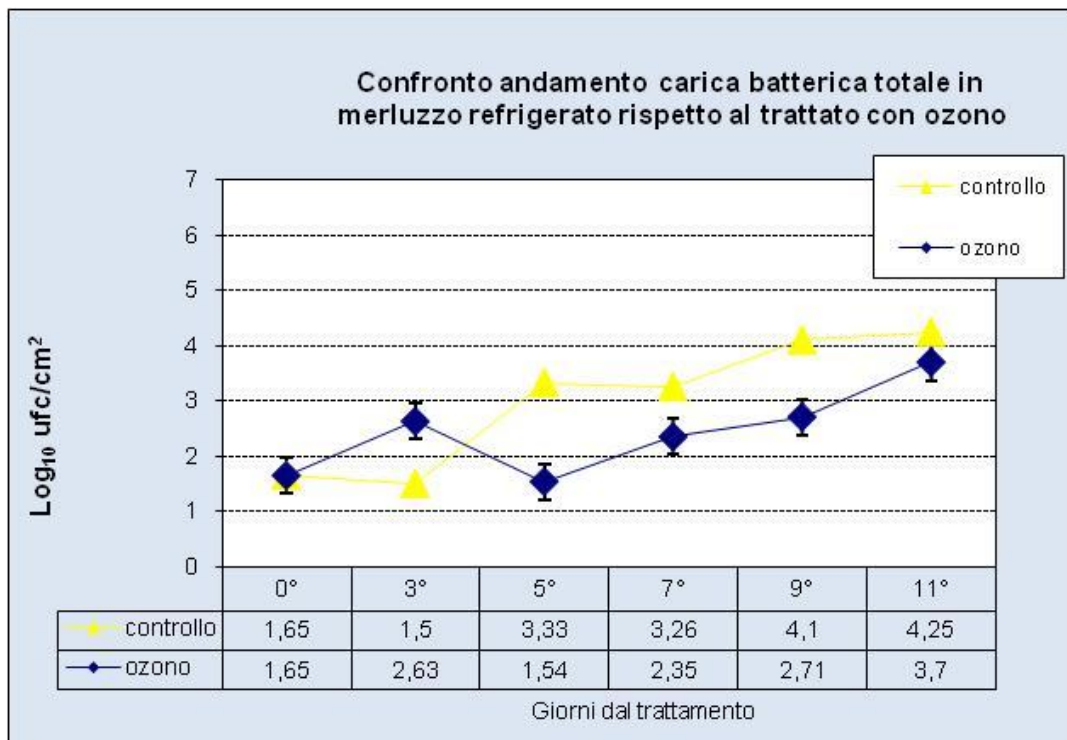
Stafilococchi potenzialmente patogeni sono stati isolati in 1 u.c. del tampone dopo trattamento con ozono con un valore di \log_{10} 2,30 ufc/g al 2° giorno di refrigerazione.

Salmonella spp., *Campylobacter spp.* e *Listeria monocytogenes*, e *Vibrio spp.* sono risultati sempre assenti.

TAMPONI	GIORNI DI REFRIGERAZIONE	FAT 3 (log ₁₀ ufc/g)	FAT (log ₁₀ ufc/g)	LAB (log ₁₀ ufc/g)	COL. (log ₁₀ ufc/g)	COL. FEC. (log ₁₀ ufc/g)	ENT. (log ₁₀ ufc/g)	STAF. (log ₁₀ ufc/g)	MICR. (log ₁₀ ufc/g)	STR. FEC. (log ₁₀ ufc/g)	BAT.S. R. (log ₁₀ ufc/g)	PSEUD. (log ₁₀ ufc/g)	AERO. (log ₁₀ ufc/g)	LIEV. (log ₁₀ ufc/g)
MERLUZZO CONTROLLO	0°	1,65	2,15	3,48	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
	3°	1,50	2,95	Ass.	Ass.	Ass.	1,47	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	2,69	Ass.	Ass.
	5°	3,33	2,91	1,47	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	1,60	1	1	Ass.
	7°	3,26	2,90	1	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	5,19	3	Ass.
	9°	4,10	4,54	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	4,07	Ass.	Ass.
	11°	4,25	4,30	3,26	Ass.	Ass.	1	Ass.	Ass.	5,64	Ass.	Ass.	4,21	2,60
MERLUZZO OZONO	0°	1,65	2,15	3,48	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
	3°	2,63	2,88	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
	5°	1,54	1,52	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	2,30	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.
	7°	2,35	3,04	2,14	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	4,51	Ass.	2
	9°	2,71	4,39	1,69	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	3,81	3,69	1
	11°	3,70	4,10	2,89	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	Ass.	5,63	Ass.	1

Tabella III.6 Cariche microbiche (log₁₀ ufc/g) al tampone superficiale del merluzzo.

GRAFICO 13



c. Risultati dei controlli organolettici

Il *Quality Index Method* (QIM), sviluppato dalla *Tasmanian Food Research Unit*, si basa sull'identificazione di alcuni parametri sensoriali significativi per la valutazione della freschezza del pesce (Bremner, 1985).

Lo schema da seguire per attribuire il punteggio varia a seconda della specie: viene dato un punteggio di demerito da 0 a 3 per ciascuno degli attributi indicati nello schema di valutazione ed i punteggi attribuiti ad ogni parametro sono sommati tra loro per ottenere un punteggio totale che rappresenta il cosiddetto *Quality Index*.

Nella nostra sperimentazione fino al 5° giorno di stoccaggio (entrambe le modalità), sono state valutate le caratteristiche organolettiche senza attribuire un punteggio di demerito ai campioni analizzati. In particolare per i seguenti giorni è stato evidenziato:

- ✓ Nel giorno 0°: odore, colore e consistenza sono risultati buoni. Il merluzzo si presentava di un colore con sfumature marrone-grigiaste, e il gambero di un colore rosa-violaceo e con un carapace croccante (Figura n.10). L'odore di mare si percepiva in entrambi i campioni.



Figura III.10 Campioni di *Merluccius merluccius* e *Aristeus antennatus* al giorno 0°.

- ✓ Nel giorno 2°: nel lotto 1 l'odore è leggermente pungente, la consistenza diminuita, e nei campioni si è verificata la rottura dell'addome rendendo visibile il contenuto celomatico (Figura n.11). Le caratteristiche si ripetono nel lotto 2 (merluzzo trattato con ozono) dove in più si evidenziava la presenza di un muco scuro in superficie. Allo stesso giorno di stoccaggio nel lotto 3 si evidenzia ancora un carapace croccante, ma la presenza di liquido di colore marrone nella confezione di trasporto, che diventava rosato nel lotto 4.



Figura III.11 Campioni di *Merluccius merluccius* al giorno 2°.

- ✓ Dal giorno 5° al giorno 11° abbiamo dato un punteggio alle caratteristiche organolettiche (QIM) come riportato nella seguente tabella:

	GIORNO DI REFRIGERAZIONE	MERLUZZO	MERLUZZO OZONO	GAMBERO	GAMBERO OZONO
<i>QIM</i>	5°	8	10	3	2
	7°	13	8	4	7
	9°	14	9	4	8
	11°	18	17	8	8

Tabella III.7 *QIM*

Per il merluzzo, dopo il 5° giorno, il trattamento con l'ozono sembra dare un esito positivo (grafico 14), che invece appare meno evidente nei campioni di gambero (grafico 15).

Tali affermazioni trovano riscontro anche nell'analisi sensoriale dei campioni. Infatti se prendiamo in esame l'11° giorno di stoccaggio vediamo che il gambero trattato con ozono appare in superficie decolorato (figura n. 12) rispetto al controllo nel quale anche il legamento toraco-addominale sembra tenere meglio, mentre il merluzzo controllo presenta un forte odore ammoniacale, la pelle appare gialla e grigia sul dorso, vi è inoltre presenza di muco in superficie (grafici 16-17-18-19)



Figura III.12 Campioni di *Merluccius merluccius* e *Aristeus antennatus* al giorno 11°.

GRAFICO 14

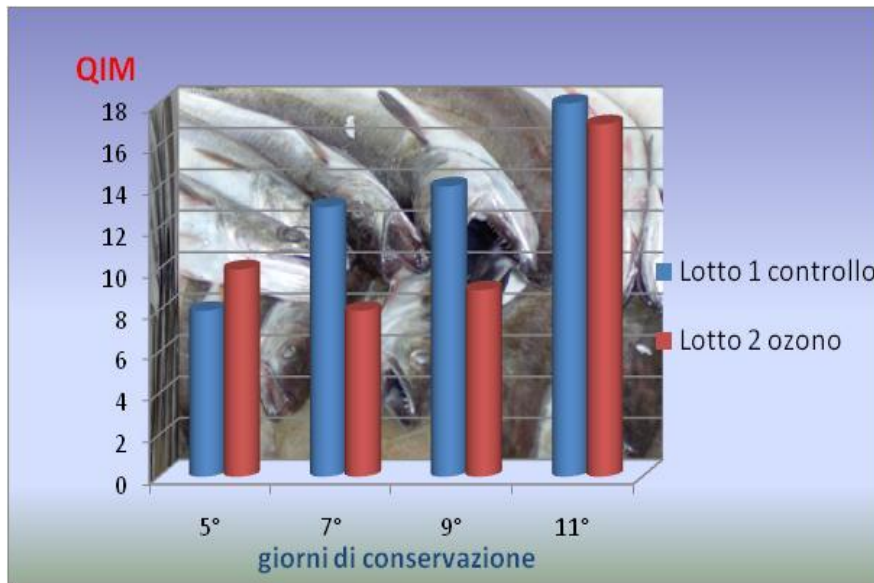


GRAFICO 15

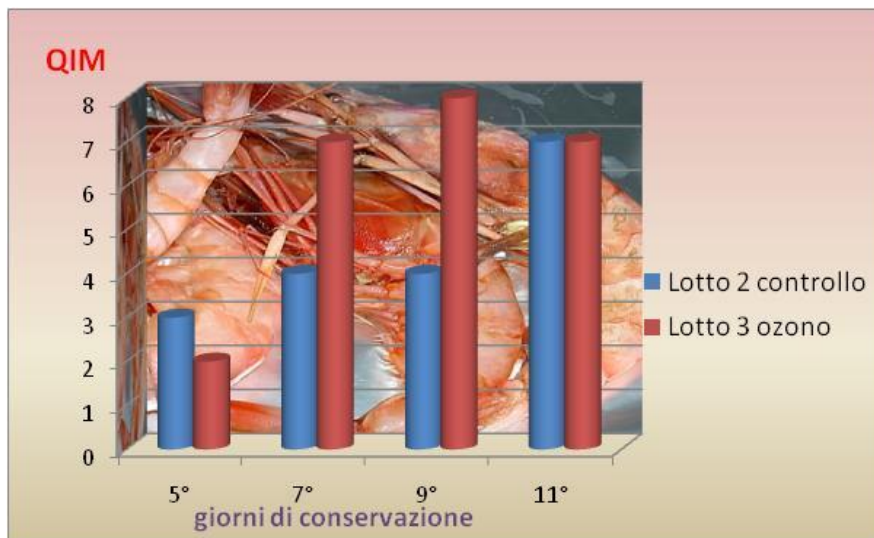


GRAFICO 16

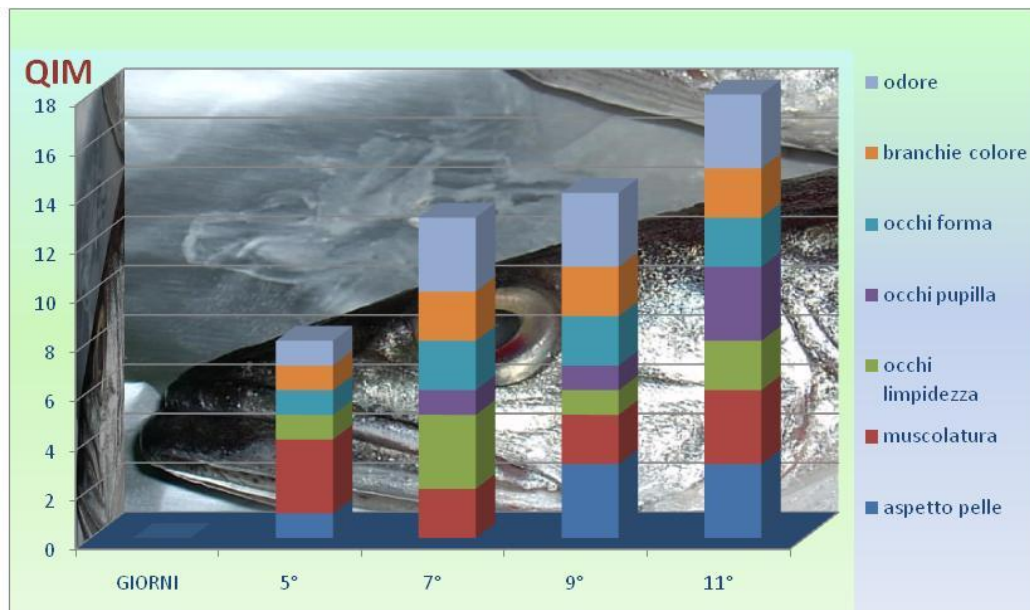


GRAFICO 17

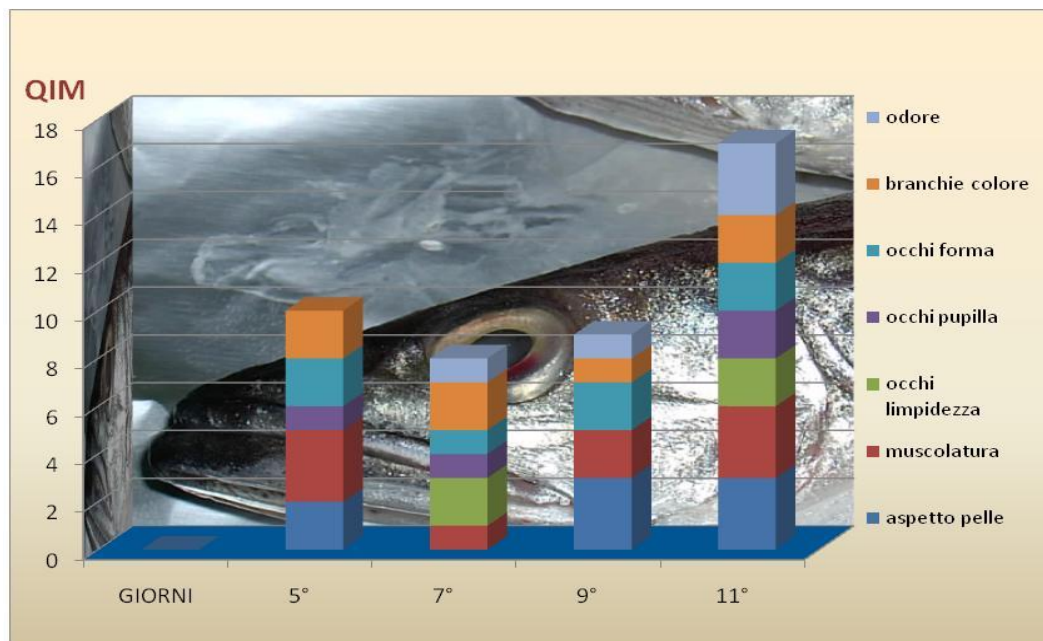


GRAFICO 18

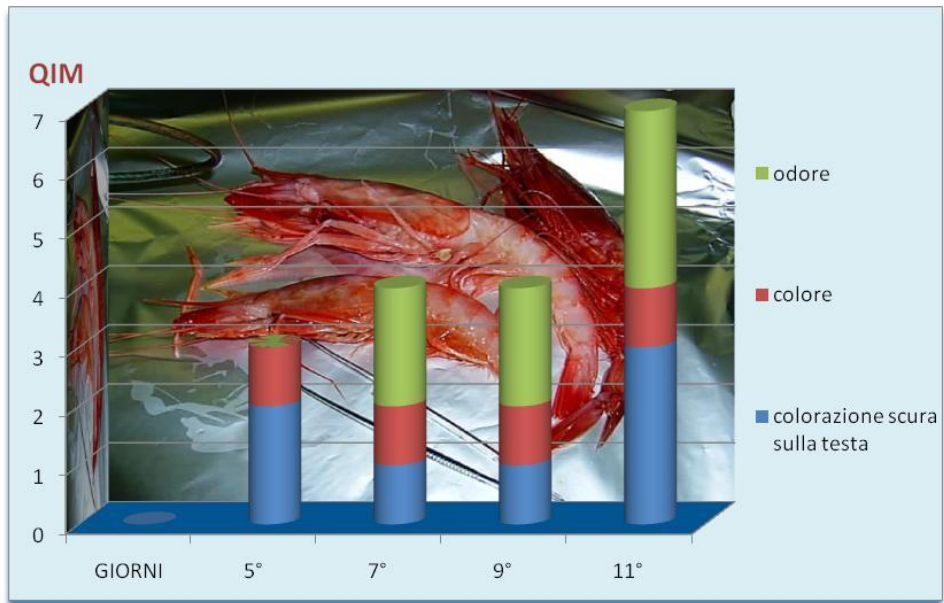
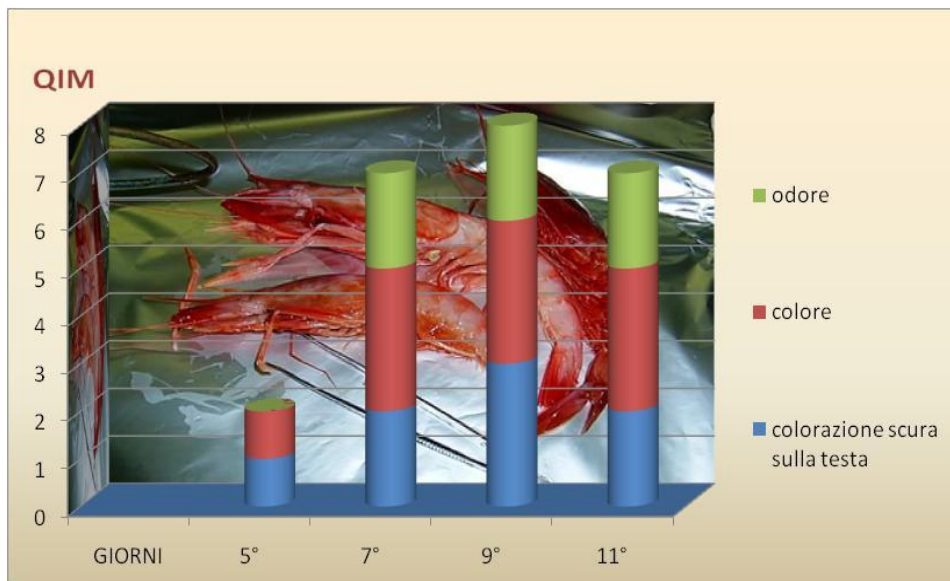


GRAFICO 19



d. Risultati della determinazione del pH e dell'a_w

Nelle tabelle 8-9 sono riportati i dati relativi all'andamento del pH e dell'attività dell'a_w.

CAMPIONI	GIORNI DI REFRIGERAZIONE	pH	a _w
MERLUZZO CONTROLLO	0°	6,70	0,98
	3°	6,67	0,82
	5°	6,63	0,97
	7°	6,90	0,95
	9°	6,81	0,96
	11°	7,23	0,96
MERLUZZO OZONO	0°	6,70	0,98
	3°	6,84	0,89
	5°	6,70	0,98
	7°	6,87	0,96
	9°	6,86	0,95
	11°	7,42	0,96

Tabella III.8 Risultati relativi ad a_w e pH nei campioni di merluzzo.

TAMPONI	GIORNI DI REFRIGERAZIONE	pH	a _w
GAMBERO CONTROLLO	0°	7,26	0,97
	3°	7,30	0,96
	5°	7,20	0,99
	7°	7,13	0,92
	9°	7,51	0,95
	11°	7,78	0,94
GAMBERO OZONO	0°	7,26	0,97
	3°	7,30	0,96
	5°	7,25	0,97
	7°	7,31	0,92
	9°	7,28	0,96
	11°	7,62	0,95

Tabella III.9 Risultati relativi ad a_w e pH nei campioni di gambero.

CONCLUSIONI

Nei campioni di *Merluccius merluccius*, la FAT a 32° aumenta nel corso della conservazione in modo esponenziale, sia nel caso dello stoccaggio secondo le usuali modalità (aliquota controllo), sia nell'aliquota sottoposta a refrigerazione passiva nella cui cella frigorifera l'aria viene ozonizzata. Dopo il 5° giorno, che coincide con il cambiamento dei cicli di ozonizzazione (prima 3 cicli da 5 minuti, poi 4 cicli da 10 minuti), l'andamento della FAT è crescente, ma con valori di circa 1 logaritmo inferiori. Tale abbassamento trova riscontro anche nell'analisi della carica batterica superficiale nel merluzzo trattato con ozono.

Nei campioni di *Aristeus antennatus* i valori di FAT si mantengono costanti fino al 5° giorno per entrambe le modalità di stoccaggio, ma aumentano in modo esponenziale fino al 9° giorno nell'aliquota controllo, mentre in quella sottoposta al trattamento con ozono i valori rimangono pressoché costanti per tutto il corso della sperimentazione con valori di circa 2 logaritmi inferiori rispetto all'aliquota controllo.

Lo stesso andamento si verifica anche nella CBT a 5° per entrambe le specie esaminate.

I valori più alti nei campioni di merluzzo della FAT possono essere attribuiti anche al fatto che si è verificata una rottura dell'addome al 2° giorno che ha comportato una fuoriuscita di materiale facale che potrebbe essere la causa di contaminazione dell'intero lotto.

In linea generale, in base a questi risultati, entrambe le specie ittiche rispondono in modo positivo al trattamento con l'ozono.

Infatti, sia dalle analisi sensoriali che dalla valutazione delle stesse caratteristiche tramite attribuzione di un punteggio di demerito (QIM), nel merluzzo dopo il 5° giorno di stoccaggio il trattamento con l'ozono sembra dare un esito positivo se lo paragoniamo all'aliquota controllo, rispecchiando dunque i risultati microbiologici.

Nei gamberi trattati con ozono, dal punto di vista organolettico, sebbene abbiamo visto che la carica batterica totale sia a livelli di circa due logaritmi inferiori rispetto al controllo, dopo il 5° giorno si rileva uno scadimento delle caratteristiche organolettiche, testimoniate anche dall'utilizzo del QIM.

Bisogna dunque considerare che nei prodotti della pesca, la shelf-life è influenzata non solo dal numero dei microrganismi ma anche dalle specie di appartenenza, con un ruolo fondamentale svolto da Specific Spoilage Organisms (SSOs) (Dalgaard, 1995), rappresentati prevalentemente da Gram-negativi come *Pseudomonas spp.*, *Photobacterium spp.*, *Alteromonas spp.* e *Shewanella spp.* (Shewan, 1979). Lo spoilage level (SL) è definito come il livello di SSOs in grado di determinare alterazioni sensoriali quali off-odours e off-flavours.

Tra gli SSO vi sono anche batteri gram-positivi come *Brochotrix thermosphacta*. Durante la conservazione gli SSO crescono più rapidamente della restante microflora e producono odori e sapori anomali associati con l'alterazione. Il numero di SSO alla

comparsa dell'alterazione può essere definito come il livello minimo di alterazione e i metaboliti prodotti potrebbero essere usati come un indice chimico di alterazione dell'alimento. Nella presente ricerca è stato seguito l'andamento della crescita di *Brochotrix thermosphacta*, batterio alterante in grado di moltiplicarsi a temperature di refrigerazione e in condizioni di anaerobiosi/microaerofilia.

I dati ottenuti dimostrano che i valori di tale microrganismo aumentano progressivamente nel corso della conservazione sia nel merluzzo che nel gambero. Nelle aliquote che combinano l'azione refrigerazione passiva-ozono nel merluzzo i valori di *Brochotrix thermosphacta* si riducono rispetto al controllo, nel gambero tale microrganismo è assente dopo il trattamento.

Tra i gram-negativi, invece, abbiamo rivolto particolare attenzione a *Photobacterium phosphoreum*.

I *Photobacterium spp.* sono dei batteri con forma bastoncellare rettilinea, Gram negativi, non sporulati, alofili, con inclusioni di poli-beta-idrossibutirrato (PHB). Sono mobili per mezzo di flagelli polari sprovvisti di guaina, con metabolismo fermentativo, ossidasi e catalasi positivi. Il genere *Photobacterium* fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae*, ordine *Vibrionales*, classe *Gamma Proteobacteria*, divisione o *phylum Proteobacteria*. Nel genere sono comprese 19 specie. *Photobacterium phosphoreum* e *Photobacterium kishitanii* sono germi luminosi.

P. phosphoreum ha come habitat le acque delle zone fredde e temperate e vive come simbionte in diverse specie. Colonizza, infatti,

pesce viventi in acque profonde ed è presente in soggetti appartenenti ai Teleostei, precisamente agli ordini *Osmeriformes*, *Aulopiformes*, *Gadiformes* e *Beryciformes* (J.C. Ast e coll., 2006). È interessante notare che *P.phosphoreum* secondo alcuni autori è considerato essere uno tra i maggiori produttori di istamina, anche rispetto a *M. morganii* in campioni di pesce conservati a temperature inferiori a 15°C (Lehane e Olley, 2000). Finora però, l'isolamento di *P.phosphoreum*, non è stato coinvolto in incidenti reali di HFP, nonostante, la sua capacità di produzione di istamina.

P. Phosphoreum è stato identificato come un organismo specifico del deterioramento (SSO), che limita la shelf-life di alcuni prodotti ittici freschi e può essere dunque utilizzato come indicatore di qualità, nonché come modello predittivo di shelf-life come suggerito da Dalgaard (1996).

Questo batterio produce una luce azzurro-verde a causa dell'attività catalitica della luciferasi. La luce, che *P. phosphoreum* produce, è conosciuta come la luce fredda, perché la reazione di produrre luce non richiede e genera molto calore (Wilson, 2009).

La sua grande importanza è dovuta anche al rapporto simbiotico con alcuni animali marini come pesci e calamari. Un altro ruolo che ha è la sua capacità di segnalare la tossicità relativa di una sostanza. Questo può accadere a causa della connessione del processo di produrre luce con il suo metabolismo cellulare. Se le tossine perturbano il metabolismo cellulare, la forza della luce diminuisce (Bunch, Joshua, 2009).

Nella nostra sperimentazione, tale microrganismo, raggiunge valori pari a 10^9 ufc/g, in tutti i lotti al 2° giorno di stoccaggio. Tali valori si mantengono costanti nel corso della sperimentazione nel gambero, mentre hanno un leggero calo nel merluzzo. Dobbiamo però sottolineare che la crescita del *P. Phosphoreum* non sembra essere influenzata dal trattamento con l'ozono in entrambe le matrici alimentari, ma si potrebbe attribuire ai valori più alti del gambero la responsabilità della perdita delle caratteristiche organolettiche più evidenti rispetto al merluzzo.

Nel *Merluccius merluccius* al giorno zero, nel campione controllo, è stato ritrovato anche *Pseudomonas fluorescens*, microrganismo Gram-negativo ambientale, causa comune del deterioramento di molti alimenti. Considerata una specie strettamente correlata al patogeno opportunisto *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* è ritenuto, oggi, nella famiglia delle *Pseudomonadaceae* un forte istaminogeno (Serpe L., 1999). Ciò nonostante non parrebbe in grado di esplicare un ruolo rilevante nell'istaminogenesi poiché, a temperatura di refrigerazione, circostanza nella quale le pseudomonadacee prevalgono sugli altri componenti della flora, la sintesi dell'enzima decarbossilante l'istidina, massima a 35-40°C, appare indubbiamente modesta, come pure scarsa è la sua attività che, peraltro, si annulla a 0°C (Barros-Velasquez J., 1998).

Un'altra specie microbica isolata, nel tampone superficiale del merluzzo ed nel secondo giorno di stoccaggio in un campione di gambero trattato con l'ozono, è *Shewanella putrefaciens* che, insieme a *Pseudomonas spp.*, è considerata tra le specie più frequentemente

coinvolte nel deterioramento di prodotti ittici freschi conservati in ghiaccio. (Gram et al., 1987 e 1990; Pedersen et al., 1995).

Tra i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas spp.*, al secondo giorno di stoccaggio nei campioni di merluzzo non trattati con ozono, è stata isolata una u.c. di *Aeromonas salmonicida* specie psicrofila non mobile e patogeno dei pesci responsabile di emorragie viscerali (Sartory D., 2002).

Infine tra le specie isolate da sottolineare, l'isolamento di *Hafnia alvei*. *H. alvei* è una Enterobatteriaceae, nel genere *Hafnia* è l'unica specie psicrotrofa. Con *M. morgani*, *Raoultella planticola* e *Photobacterium phosphoreum*, *Hafnia alvei* è stata isolata da campioni di pesce coinvolti in casi di sindrome sgombroide (HFP) (Masashi Kanki, Tomoko Yoda, Masanori Ishibashi, Teizo Tsukamoto 2004).

Queste considerazioni sulle specie isolate nel corso della sperimentazione non ci permettono di affermare di aver condotto uno studio specifico per i batteri produttori di istamina, ma ci permette di avere spunti per nuove ricerche atte non solo a conferire ai prodotti presi in esame un grado di "sicurezza" sempre maggiore, ma anche a costruire modelli predittivi per allungare la *shelf-life* di un prodotto.

Per ciò che concerne il trattamento con l'ozono possiamo dire che, secondo dati bibliografici (Chen e coll. 1999) l'uso dell'ozono sembra promettente per le acque di lavorazione degli alimenti, per i processi di scarico e di recupero delle acque, e soprattutto per la sanificazione degli ambienti destinati alla produzione alimentari, nel

nostro caso per esempio potrebbe essere usato come agente sanificante delle celle frigo. Vi è però ancora scarsità di dati relativi all'effetto della riduzione della contaminazione batterica sull'alimento, e il nostro lavoro fornisce dei dati a favore di tale tesi in quanto i nostri risultati implicano un'estensione della vita commerciale delle due specie ittiche analizzate ottenibile sia con la selezione della materia prima ineccepibile sia mediante il potenziale ruolo dell'ozono. Dunque in relazione a quanto osservato, l'ozono potrebbe avere una valida applicazione nella filiera ittica. Considerando anche che, i dati della nostra ricerca sono preliminari, in quanto si intende allargare il numero delle specie analizzate al fine di valutare l'influenza della tecnologia combinata ozono-refrigerazione passiva ed avere un quadro maggiormente rappresentativo.

BIBLIOGRAFIA

- Ababouch L., Afilal M.E., Rhafiri S., Busta F.F.: Identification of Histamine producing Bacteria isolated from Sardine (*Sardina pilchardus*) stored in Ice and at Ambient Temperature (25°C). *Food Microbiol.*, 8, 127-136, 1991.
- Ben-Gigirey B., De Sousa J.M.V.B., Villa T.G., Barros-Velasquez J.: Changes in Biogenic Amines and Microbiological Analysis in Albacore (*Thunnus alalunga*) Muscle during Frozen Storage. *J. Food Protect.*, 61, 5, 608-615, 1998.
- Bertrand, J., Gil de Sola, L., Papaconstatinou, C., Relini, G. and Souplet, A. (1997) An international bottom trawl survey in the Mediterranean: the MEDITS programme. ICES CM 1997-03: 16 pp.
- Budsberg, K.J.; C.F. Wimpee & J.F. Braddock (2003), "[Isolation and identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migrating ...](#)", *Applied and Environmental Microbiology* **69** (11): 6938–6942. Retrieved on 2009-04-29.
- Bunch, Joshua. [*Photobacterium phosphoreum: A Microbial Flashlight*](#). April 2009
- Cau A, Carbonell A, Follesa MC, Mannini A, Norrito G, Orsi-Relini L, Politou CY, Ragonese S, Rinelli P (2002) MEDITS – Based information on the deep-water red shrimps *Aristomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Crustacea: Decapoda: Aristeidae). *Scientia Marina*, **66** (suppl.2), 103-124.
- Coghlan, Andy. (June 1998) *Sentinels of the seas*. *New Scientist* v. 158 no. 2137 p. 21.
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life on packed fresh fish. *Int J Food Microbiol*, 19, 305-318.

- Dalgaard, P., L. G. Munoz, and O. Mejlholm. 1998. Specific inhibition of *Photobacterium phosphoreum* extends the shelf life of modified-atmosphere-packed cod fillets. *J. Food Prot.* 61:1191-1194.
- Eddleman, Harold, Ph. D. *Isolation of Pure Cultures Of Bacteria* April 2009.
- Gram L., Dalgaard P. (2002) Fish spoilage bacteria – problems and solution. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 262-266.
- Lee, Chan Yong, Dennis J. O'Kane and Edward A. Meighen. (April 1994) *Riboflavin synthesis genes are linked with the lux operon of Photobacterium phosphoreum.* *J Bacteriol* 176(7):2100-4.
- Masashi Kanki, Tomoko Yoda, Masanori Ishibashi, Teizo Tsukamoto *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident *International Journal of Food Microbiology* 92 (2004) 79– 87
- Relini M, Maiorano P, D'Onghia G, Orsi Relini L, Tursi A, Panza M (2000) A pilot experiment of tagging the deep shrimp *Aristeus antennatus* (Risso,1816). *Scientia Marina*, 64(3), 357-361
- Ryser E.T., Marth E.H., Taylor S.L.: *Histamine Production by Psychrotrophic Pseudomonads isolated from Tuna Fish.* *J. Food Protect.*, 47, 5, 378-380, 1984.
- Sardà F, Company JB, Maynou F (2003) Deep-sea Shrimp *Aristeus antennatus* (Risso 1816) in the Catalan Sea, a Review and Perspectives. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Scienc*, Vol. **31**, 1-10.
- Sartory D., L. Bonadonna, J.M. Delattre, P.Gosling, M. Janda, and D. van der Kooij. *Aeromonas*. In: *Guidelines for drinking-water quality. Addedum Microbiological agents in drinking water*, pp.1-17. World Health Organization, 2002.

- Shewan, J.M., Murray, C.K. (1979). The microbial spoilage of fish with special reference to the role of the psychrophiles. In: *Russel, A.D., Fuller, R. (Eds.), Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment. Academic Press, 117–136.*
- Skerman VBD et al. (1980) *Photobacterium phosphoreum* April 2009.
- Serpe L., Demasi D., Salzillo A., Scatola L.: *Il controllo dell'istamina nei prodotti della pesca. Risultati e considerazioni relativi agli anni 1990-1993. Industrie Alimentari, XXXIV, 334, 108-110, 1995.*
- Wilson, Tracy V. How Bioluminescence Works. How Stuff Work April 2009

CONSIDERAZIONI

La necessità da parte dell'industria alimentare di sviluppare nuove tecnologie di conservazione atte a prolungare la *shelf-life* di derrate alimentari quali i prodotti della pesca, che se da una parte sono caratterizzate da pregevoli requisiti nutrizionali, dall'altra sono contraddistinte da una notevole deperibilità, ci ha spinti a considerare nella nostra ricerca varie tecnologie di conservazione a partire da una tradizionale come la salatura, per arrivare alla messa a punto di soluzioni di *packaging* come il confezionamento in atmosfera modificata (*Modified Atmosphere Packaging*) e l'uso dell'ozonizzazione.

Lo scadimento della freschezza nei prodotti ittici è la conseguenza di fenomeni fisico-chimici, biochimici e microbiologici post-mortali, tipici di ogni specie, influenzati dalle modalità di pesca, dalle manipolazioni a bordo o negli stabilimenti a terra, nonché dalla temperatura di conservazione. È noto come lo stato di freschezza dei prodotti della pesca tenda progressivamente a diminuire nel tempo.

Dal momento in cui vengono pescati, infatti, essi subiscono una serie di trasformazioni che ne modificano le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche.

In un pesce trattato igienicamente dopo la cattura ed opportunamente conservato a temperature intorno a 0°C, queste trasformazioni si instaurano gradatamente, in un periodo che varia da specie a specie e che si riduce notevolmente qualora le condizioni

igieniche e la pronta refrigerazione vengano a mancare. La valutazione della freschezza può essere effettuata utilizzando diversi metodi: sensoriali, fisici, chimici e microbiologici. Tra questi il metodo sensoriale od organolettico è senza dubbio il più facilmente applicabile, pur presentando il limite di essere soggettivo nell'espressione dei risultati (Arcangeli et al., 2003). Per questo tale esame viene di solito integrato con altri, seguibili direttamente sul campo (esami fisici, elettrochimici) o in laboratorio (esami chimici, microbiologici). Tale procedura è sancita dal Reg. CE 854/2004, che prevede, tra i controlli ufficiali da effettuare nei prodotti della pesca, in primo luogo l'esame organolettico, seguito, in caso di dubbi sulla freschezza, da controlli chimici o microbiologici.

Come rilevato da numerosi Ricercatori, tutti gli schemi proposti, oltre a risultare piuttosto complicati e di non facile applicazione, presentano il difetto di non fornire informazioni, ricavabili direttamente dai gradi di freschezza, circa la *shelf-life* dei prodotti ittici. È stato suggerito un metodo sensoriale denominato *Quality Index Method* (QIM), messo a punto da alcuni Ricercatori australiani (Bremner, 1985).

Nel presente lavoro tale metodo è stato usato nella valutazione del trattamento dell'ozono su prodotti ittici dove però i risultati di tale esami non hanno dato sempre corrispondenza con la valutazione dei risultati microbiologici, o meglio con la flora microbica che normalmente viene indicata come corrispondente allo scadimento delle caratteristiche organolettiche (FAT, enterobatteriacee, SSO).

L'utilizzo di parametri microbiologici e la loro elaborazione per la previsione della *shelf-life* dei prodotti ittici lavorati si è rivelata molto più adeguata rispetto all'analisi organolettica, soprattutto quando abbiamo scelto di porre maggiore attenzione al ruolo fondamentale svolto da Specific Spoilage Organisms (SSOs). Questo tentativo, se pur con dei limiti (in quanto non tiene in considerazione per esempio di una specie microbica degradativa dominante), potrebbe servire a valutare meglio i microrganismi coinvolti nel processo di deterioramento del pesce e della possibilità di utilizzarli come parametri della qualità, soprattutto nel caso di nuovi prodotti, ma anche rispetto a prodotti quali la “*Colatura di alici di Cetara*”, che, abbiamo visto può rappresentare la possibilità di perpetuare le tradizioni nella storia pur adeguando e rispettando le opportune procedure di sicurezza che la legge impone ad ogni prodotto alimentare il quale necessita degli appellativi di “sanità” e “salubrità”.

Il nostro obiettivo, parlando di *shelf-life*, è stato dunque di considerare, in tutte le sperimentazioni, il tempo che corrisponde ad una tollerabile diminuzione di qualità e quindi della conservabilità. Diventa dunque necessario sapere che cosa intendere per qualità del prodotto, conoscere quale *qualità*, ad esempio se gli aspetti sensoriali sono predominanti rispetto a quelli microbiologici. Già a livello di impostazione il problema si presenta complesso; non è quasi mai facile definire compiutamente la qualità di un prodotto, o meglio, essa non dipende da un unico attributo ma più spesso da una serie di attributi. Quale scegliere come indice della *shelf-life*, quale determinazione analitica effettuare richiede applicazione e

sperimentazione, ma ci permette di avere spunti per nuove ricerche atte non solo a conferire ai prodotti presi in esame un grado di “sicurezza-qualità” sempre maggiore, ma anche a costruire modelli predittivi per allungare la *shelf-life* di un prodotto.

RIFERIMENTI LEGISLATIVI

REGOLAMENTO CE/178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare – Gazzetta ufficiale dell’Unione europea L 31 del 1.2.2002;

REGOLAMENTO CE/852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 sull’igiene dei prodotti alimentari – Gazzetta ufficiale dell’Unione europea L 226 del 25.6.2004;

REGOLAMENTO CE/853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO DELL’UE del 29 aprile 2004 che stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale – Gazzetta ufficiale dell’Unione europea L 226 del 25.6.2004;

REGOLAMENTO CE/854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano – Gazzetta ufficiale dell’Unione europea L 226 del 25.6.2004;

REGOLAMENTO CE/882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in

materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali – Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 191 del 28.5.2004;

REGOLAMENTO CE/2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari – Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 338 del 22.12.2005;

PROVVEDIMENTO 16 novembre 2006 Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano, relativa alle linee guida sui prodotti della pesca e la nuova regolamentazione comunitaria. (Repertorio atti n. 2674);

LA CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E DI BOLZANO

Denominazione ufficiale dei prodotti della pesca. Decreto del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali del 14 gennaio 2005 (G.U. n. 33 del 10 febbraio 2005), aggiornato con D.M. 25 luglio 2005 (G.U. n. 181 del 5 agosto 2005);

REGOLAMENTO (CE) N. 2074 /2005 DELLA COMMISSIONE Recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento 853/04 e dei regolamenti 854/04 e

882/04 ,deroga al regolamento 852/04 e modifica dei regolamenti 853/04 e 854/04;

REGOLAMENTO (CE) N. 2076/2005 DELLA COMMISSIONE Che fissa le disposizioni transitorie per l'attuazione dei regolamenti (CE)853-854-882/2004 che modifica i regolamenti n. 853-854(CE)/ 2004

REGOLAMENTO (CE) N. 2406/96 DEL CONSIGLIO del 26 novembre 1996 che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca