

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in *Produzioni Animali, Biotecnologie
Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti*

Ciclo 22° (VET 04)

*Valorizzazione e qualificazione di prodotti della pesca ed
acquacoltura*

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Primo Mariani

Tutor:
Chiar.mo Prof. Adriana Ianieri

Dottorando: Dott. Vincenzo Olivieri

*Nella testa di un naturalista, una mosca
non deve occupare più posto
di quanto ne occupi in natura.*
Georges Louis Leclerc, conte di Buffon

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 5
CAPITOLO 1:	
CARATTERISTICHE DEI PRODOTTI DELLA PESCA	pag. 6
1.1 Valutazione dello stato di conservazione (freschezza) : caratteri sensoriali di valutazione	pag. 8
1.2 Valutazione dello stato di conservazione (freschezza) : parametri chimici di valutazione	pag. 15
CAPITOLO 2:	
CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE DEI PRODOTTI DELLA PESCA	pag. 19
2.1 Flora microbica dei prodotti ittici	pag. 19
2.2 Fattori che possono influenzare la qualità del pescato come materia prima	pag. 23
2.2.a Fattori intrinseci	pag. 23
2.2.b Fattori estrinseci	pag. 26
CAPITOLO 3:	

MICROBIOLOGIA DEI PRODOTTI ITTICI REFRIGERATI	pag. 28
3.1 Spoilage association e Specific Spoilage Organisms (SSOs)	pag. 28
3.2 Prodotti ittici freschi conservati a temperatura di refrigerazione	pag. 30
3.3 Prodotti ittici freschi confezionati sottovuoto e conservati a temperatura di Refrigerazione	pag. 32
3.4 Prodotti ittici freschi confezionati in atmosfera protettiva e conservati a temperatura di refrigerazione	pag. 33
3.5 Prodotti ittici “lightly preserved”	pag. 36
CAPITOLO 4:	
L’ATMOSFERA PROTETTIVA E I PRODOTTI ITTICI	pag. 38
4.1 Premessa	pag. 38
4.2 I GAS	pag. 41
4.3 I materiali di confezionamento più adatti	pag. 48
4.4 Attuale diffusione del condizionamento in atmosfera protettiva degli alimenti	pag. 50
4.5 AP e Legislazione	pag. 52
4.6 Pericoli microbiologici connessi al confezionamento in atmosfera protettiva	pag. 53

CAPITOLO 5:

SPARUS AURATA (LINNAEUS, 1758) pag. 56

5.1 Biologia pag. 56

5.2 Pesca ed allevamento pag. 59

5.3 Produzione e Trends dei consumi pag. 61

CAPITOLO 6:

Tracciabilità ed etichettatura dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura pag. 65

SCOPO DELLA TESI pag. 76

MATERIALI E METODI pag. 77

Discussione (parte chimica) pag. 98

RISULTATI E CONSIDERAZIONI pag. 100

CONCLUSIONI pag. 111

BIBLIOGRAFIA pag. 114

INTRODUZIONE

L'incremento dei consumi di pesce fresco e dei prodotti derivati, ha determinato un progressivo depauperamento delle risorse ittiche dei nostri mari (overfishing) inducendo, per reazione, un fortissimo incremento del comparto di *acquacoltura marina* (Fao, 2002) ed in particolare delle specie spigola (*Dicentrarchus labrax*) e orata (*Sparus aurata*), per le quali l'Italia rappresenta il più importante mercato europeo (www.ceom.it).

La crescente richiesta di pesce fresco e dei prodotti derivati va anche inquadrata nell'ottica di una "prevedibile reazione" dei consumatori alla progressiva disaffezione per le carni rosse o quelle avicole, sull'onda dei problemi e dei dubbi di ordine sanitario che queste ultime hanno suscitato negli ultimi anni (Giaccone, 2001).

Alla luce di quanto detto si comprende la necessità per l'industria alimentare di sviluppare tecnologie di conservazione innovative atte a prolungare la vita commerciale (*shelf-life*) di tali derrate, la cui materia prima fresca è caratterizzata non solo dal possedere specifici pregi nutrizionali ed un elevato valore economico ma anche una **elevata deperibilità**.

L'attività di ricerca e sviluppo ha portato al perfezionamento delle tecniche di *packaging* sia in termine di involucri sia, nel caso delle atmosfere protettive, in termini di miscele di gas utilizzate, cogliendo così le esigenze di un mercato in grande trasformazione che richiede prodotti ovviamente salubri, ma anche pronti all'uso, con caratteristiche organolettiche ineccepibili, di rapida consegna, e con tutte quelle caratteristiche di *naturalità* attese dal prodotto fresco.

CAPITOLO 1:

CARATTERISTICHE DEI PRODOTTI DELLA PESCA

I fenomeni post mortali che si verificano nel muscolo del pesce successivamente alla cattura/raccolta possono essere paragonati a quelli degli altri animali produttori di derrate alimentari: si esauriscono le riserve di ATP, si instaura il rigor mortis con formazione di legami irreversibili tra le proteine contrattili del tessuto muscolare (actina e miosina), c'è acidificazione dei tessuti e liberazione di enzimi tissutali che danno inizio ai processi degradativi.

Tali fenomeni nel pesce sono molto più rapidi a causa di fattori intrinseci legati alle caratteristiche chimiche e strutturali dei suoi tessuti e a causa di fattori estrinseci.

I fattori intrinseci sono principalmente:

1) Elevato tenore in acqua che nei pesci può arrivare all'80-85%.

2) Scarso contenuto in glicogeno muscolare, per cui il pH dei tessuti post mortem è scarsamente acido. La maggioranza dei microrganismi alteranti crescono bene intorno a valori di pH prossimi alla neutralità (pH 6,6-6,8): per questo motivo si può avere notevole sviluppo di microrganismi soprattutto a livello di cute, branchie ed intestino con conseguente decadimento della qualità del pesce.

3) Prevalenza di acidi grassi insaturi che vanno incontro più facilmente a fenomeni di irrancidimento sia di tipo aldeidico, di origine chimica, favorito dall'esposizione a luce, ossigeno, raggi UVA, sia chetonico, di origine enzimatica.

L'attività lipolitica enzimatica è particolarmente importante in quanto continua anche a temperature di congelamento (-18°C), e si deve arrivare a temperature di -25°C per rallentarne l'azione.

Dall'ossidazione degli acidi grassi che si liberano in seguito alla scissione dei trigliceridi si sviluppano sostanze come aldeidi e chetoni responsabili di odore e sapore di rancido.

4) Elevato tenore in sostanze azotate non proteiche (TMAO, urea, ammoniaca, amminoacidi liberi come creatina, creatinina e triptofano); i microrganismi proteolitici (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Shewanella putrefaciens*,

Brochothrix thermosphacta), prima di arrivare alla scissione delle sostanze proteiche, demoliscono l'azoto non proteico.

All'inizio l'attività litica batterica porta allo sviluppo di "odori di frutta", gradevoli, ma con il progredire dei processi demolitivi si arriva alla formazione di metaboliti volatili dall'odore decisamente sgradevole o nauseabondo come mercaptani, ammine, ammoniaca, acidi grassi a catena corta ed idrogeno solforato responsabili di odori detti "fecaloidi-ammoniacali" e di "uovo".

5) Attività degli enzimi endogeni: enzimi litici liberati dai lisosomi in seguito alla loro alterazione strutturale per mancanza di ATP (che fornisce l'energia necessaria al mantenimento dell'integrità strutturale).

Questi enzimi sono responsabili della maturazione delle carni (azione positiva), ma alla fine la loro azione si associa a quella degli enzimi esogeni, partecipando ai processi alterativi del pesce.

Questo vale anche per gli enzimi del tratto digerente (enzimi pepsino-simili di origine gastrica ed endopeptidasi tripsino-simili provenienti dai ciechi pilorici).

6) Percentuale di tessuto connettivo nelle masse muscolari: minore è la quantità di connettivo presente nelle carni, maggiore è la velocità di penetrazione dei batteri.

I fattori estrinseci sono:

1) modalità di cattura:

- stress, che determina minore acidificazione delle carni post mortem;
- lesioni;
- possibile imbrattamento del pescato;

2) habitat, acqua di raccolta:

- tenore salino dell'acqua. Molti batteri marini adattatisi alla salinità media dell'acqua di mare (circa 3,5% di NaCl) sono molto sensibili a cambiamenti anche minimi di salinità. I batteri alotolleranti sono pochi (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), mentre la maggior parte dei microrganismi estrinseci del pescato non lo sono;

- T° dell'acqua di raccolta del pescato;
- presenza di fonti di contaminazione batterica (acque costiere, rotta di navi, ecc.).

1.1 Valutazione dello stato di conservazione (freschezza) : caratteri sensoriali di valutazione

Nel comparto dei prodotti della pesca la “Qualità” è strettamente connessa allo stato di “Freschezza”, correlata alla valutazione sensoriale dei caratteri organolettici.

L'analisi sensoriale è uno strumento che, grazie all'utilizzo di tecniche e procedure normative consente di misurare e valutare tutte le caratteristiche di un prodotto alimentare percepite dai 5 sensi umani. La sua sistematica applicazione, unita ad analisi chimiche (es. determinazione istamina, ABVT, TMA), fisiche (es. determinazione pH) e microbiologiche, consente di individuare un prodotto di qualità che, incontrando i gusti del consumatore, concorre a determinarne la sorte commerciale.

Attualmente in Europa il metodo ufficiale per la valutazione sensoriale dello stato di freschezza dei prodotti ittici (applicabile però solo per il pesce bianco, il pesce azzurro, alcuni crostacei e la seppia) è lo schema a tre classi disciplinato dal Regolamento CE 2406/96. Nelle tabelle del Regolamento n.2406/96/CEE i caratteri di freschezza sono classificati per i crostacei ed i molluschi cefalopodi, per i pesci cartilaginei (gattuccio, razza, cinguarola) e quelli ossei suddivisi a loro volta in pesce bianco sogliole, naselli, cefali, merluzzi) e pesce azzurro (tonni, alici, sardine, aringhe).

Le tabelle fissano 3 categorie di freschezza per il pesce edibile, più una con le caratteristiche di quello non ammesso al consumo umano:

- categoria EXTRA per il prodotto definito FRESCHISSIMO;
- categoria A per il prodotto definito FRESCO;
- categoria B per il prodotto ancora idoneo al consumo umano.

Gli elementi considerati per suddividere il pesce nelle diverse categorie sono:

- stato di contrattilità del pesce o “rigor mortis”, parametro variabile a seconda della specie e delle condizioni ambientali che può anche mancare (pesce stressato);
- aspetto della pelle, del muco cutaneo, dell’occhio, delle branchie, degli opercoli, della carne, degli organi e del peritoneo;

- stato della carne, della colonna vertebrale, del peritoneo;
- odore delle branchie, della pelle, della cavità addominale.

Il pesce bianco e azzurro che rientra nella categoria EXTRA, quindi FRESCHISSIMO presenta:

- pigmentazione senza tracce di decolorazione, iridescenza con differenza tra superficie dorsale e ventrale (pesce azzurro);
- muco cutaneo acquoso, trasparente;
- branchie color rosso vivo, senza muco;
- consistenza molto soda della carne;
- odore di mare, di alghe e salsedine;

Solo per la Passera l'odore è definito di olio fresco, di terra.

Il pesce bianco e azzurro che rientra nella categoria A, quindi FRESCO, presenta:

- pelle priva di lucentezza;
- muco leggermente torbido;
- occhio leggermente infossato, leggermente opaco, pupilla ovale (pesce azzurro);
- branchie meno colorate con presenza di muco trasparente anche sulla bocca;
- consistenza soda delle carni;
- odore neutro, non più di alghe marine.

Nella Passera l'odore è leggermente dolciastro.

Il pesce bianco e azzurro che rientra nella categoria B, quindi ancora idoneo al consumo umano, presenta:

- pelle spenta, in via di decolorazione e che forma delle pieghe se il pesce viene incurvato (pesce azzurro);
- muco lattiginoso;
- occhio spento, opaco;
- branchie grigie con muco opaco, spesso;
- consistenza leggermente molle delle carni;
- odore leggermente acre, di fermentazione (pesce bianco), leggermente solforoso, di frutta marcia (pesce azzurro).

Per i Selacei i parametri di valutazione sono occhio, aspetto e odore.

Per la categoria EXTRA:

- l'occhio è convesso, molto brillante ed iridato con pupille piccole;
- rigor mortis totale o parziale, muco chiaro sulla pelle;
- odore di alghe marine.

Per la categoria A:

- occhio convesso e meno brillante, pupille ovali;
- aspetto: rigor mortis assente, assenza di muco sulla pelle;
- odore leggermente stantio ma non ammoniacale;

Per la categoria B:

- occhio piatto, opaco;
- presenza di muco sulla bocca ed alle branchie;
- odore ammoniacale, aspro.

Nella Razza si valutano come criteri aggiuntivi anche pelle, struttura della carne, aspetto di pinne e stomaco.

Il pesce di qualsiasi categoria deve essere privo di sudiciume e di forte decolorazione.

È possibile valutare la freschezza del prodotto basandosi solo su alcuni dei parametri riportati dalla tabella:

a) per il pesce fresco intero o eviscerato si effettua:

- esame esterno della pelle, dell'occhio, delle branchie, della consistenza del muscolo e della parete addominale;
- esame interno dello stato del peritoneo e della colonna vertebrale (aderenza della muscolatura e colore);
- eventuale esame dopo cottura, valutando odore e sapore;

b) per il pesce fresco, ma decapitato ed eviscerato si effettua:

- esame della pelle, del muco, della pigmentazione, della consistenza muscolare, della parete addominale e del peritoneo;
- eventuale esame dopo cottura, valutando odore e sapore;

c) per i pesci in tranci si effettua:

- esame della pelle (se non è stata asportata), della consistenza muscolare, della condizione del peritoneo (se ancora presente), del colore della muscolatura in vicinanza della colonna vertebrale;

- eventuale esame dopo cottura, valutando odore e sapore;

d) nel caso di filetti si effettua:

- esame come per il pesce in tranci, ad eccezione delle condizioni del peritoneo e della pelle, sovente assenti;

- eventuale esame dopo cottura valutando odore e sapore.

I limiti di tale classificazione si potrebbero identificare nel “valore assoluto” e nella “mancanza di specificità” dei parametri giudicabili, vale a dire che una intera partita di pesce potrebbe essere classificata o declassata dal giudizio, talvolta troppo soggettivo, di un singolo parametro (es. odore), magari tipico per una specie e non valido per un'altra (per esempio l'odore di fango apprezzabile nei pleuronettiformi di qualità extra potrebbe essere discriminante per un loro rifiuto). Una valutazione sulla base di questo schema risulta così troppo generico non tenendo conto delle differenze inter- ed intraspecifiche (Alasalvar C. et Al., 2001).

Per far fronte ai problemi citati, negli ultimi anni è stato messo a punto un innovativo quanto interessante metodo per la determinazione di qualità della freschezza del pesce, il Quality Index Method (QIM).

Il QIM è un attendibile metodo descrittivo, non distruttivo, semplice e veloce proposto a partire dalla metà degli anni ottanta dai ricercatori della Tasmanian Food Research Unit. Tale metodo è, tuttora, in continua evoluzione grazie anche ad importanti progetti di ricerca come quelli condotti dal Netherlands Institute for Fisheries Research, dal Danish Institute for Fisheries Research e dall'Icelandic Fisheries Laboratories (Church N. et Al., 1998).

Esso è basato sulla valutazione obiettiva di alcuni attributi del pesce crudo (la pelle, gli occhi, le branchie, ecc.), utilizzando un sistema di punteggio a demerito (da 0 a 3) (Tab 1.), tanto più basso è il punteggio dei singoli attributi tanto migliori saranno le caratteristiche di freschezza del pesce.

	Parametri	Attributi	Articolo I. Punti demerito	
Articolo II.	Aspetto	Pelle	Molto brillante	0
			Brillante	1
			Opaca	2
	Muco	Chiaro-trasparente	0	
		Leggermente torbido/torbido	1	
Articolo III.	Muscolatura	Elasticità	Elastica	0
			Fovea alla pressione	1
Articolo IV.	Odore	-	Di fresco	0
			Neutro	1
			Di pesce	2
			Cattivi odori	3
Articolo V.	Occhi	Limpidezza	Chiaro-traslucido	0
			Leggermente opaco	1
			Opaco/insanguinato	2
	Forma	Convessa	0	
		Piatta	1	
		Concava	2	
Articolo VI.	Branchie	Colore	Brillante/rosso scuro	0
			Rosso tendente al marrone/scolorito	1
		Odore	Fresco/d'alga	0
			Neutro	1
	Di pesce		2	
	Cattivi odori		3	
	PUNTEGGIO TOTALE			

Tab. 1. Quality Index Method (QIM) per l'Orata (Huidobro *et al.*, 2000).

La somma dei punti attribuiti ai singoli parametri darà un punteggio totale (c.d. Quality Index) che sarà quindi correlato linearmente (c.d. curva QIM di calibrazione) allo stato di conservazione del pesce al momento della valutazione (Fig.1).

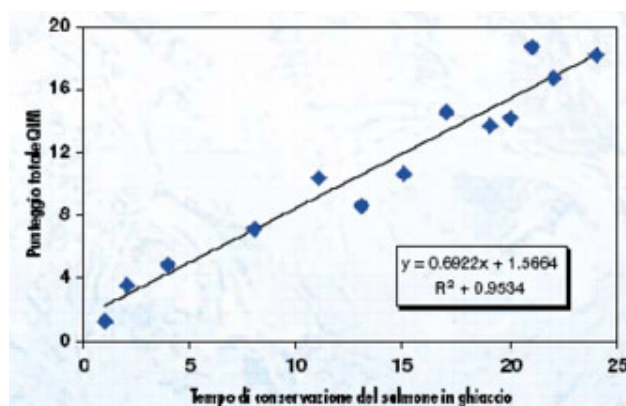


Fig. 1. Curva di calibrazione per il salmone (www. qim-eurofish.com).

1. Alla luce di ciò gli sforzi dei ricercatori sull'implementazione di questo sistema potrebbe portare a breve ad una attendibile predizione della shelf-life residua. Questo sistema è stato finora applicato, con buoni risultati, ad alcune specie ittiche (Tab. 2) ed altre sono in via di sviluppo (Alasalvar C. et Al., 2001). Barbosa A., Vaz-Pires P. (2004), *Quality index method (QIM): development of a sensorial scheme for common octopus (Octopus vulgaris)*. Food Control, 15: 161-168.

Denominazione in lingua italiana	Nome scientifico
Acciuga o Alice	<i>Engraulis encrasicolus</i>
Sgombro	<i>Scomber scombrus</i>
Rombo Liscio	<i>Scophthalmus rhombus</i>
Merluzzo nordico	<i>Gadus morhua</i>
Limanda	<i>Limanda limanda</i>
Passera	<i>Platichthys flesus</i>
Orata	<i>Sparus aurata</i>
Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
Aringa	<i>Clupea harengus</i>
Suro o sugarello	<i>Trachurus trachurus</i>
Platessa	<i>Pleuronectes platessa</i>
Merluzzo carbonaro	<i>Pollachius virens</i>
Scorfano atlantico	<i>Sebastes mentella/marinus</i>
Salmone	<i>Salmo salar</i>
Trota iridea	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>
Gamberetto boreale	<i>Pandalus borealis</i>
Amberjack	<i>Seriola punctata</i>

Rombo chiodato
Sogliola

Scophthalmus maximus
Solea vulgaris

Tab. 2. Specie per le quali è stato sviluppato il QIM

2. Il sistema QIM risulta quindi utile poiché valuta quei parametri e attributi sensoriali significativi per ogni singola specie e li correla ai giorni di conservazione in ghiaccio; inoltre il sistema permette di non dare importanza eccessiva ai singoli attributi, evitando che un campione possa venire scartato sulla base di una singola caratteristica negativa. Piccole differenze nei risultati di qualsiasi criterio, infatti, non influenzano eccessivamente il punteggio totale (Church N. et Al., 1998). www.qim-eurofish.com

Per facilitarne l'applicazione è anche stato sviluppato un software (Wisefresh) per la gestione informatica del sistema. Usando terminali portatili idonei (Fig.2), la valutazione QIM risulta, quindi, veloce e attendibile. Il programma guida l'ispettore attraverso l'ispezione e ne facilita il giudizio anche attraverso disegni e illustrazioni dei parametri presi in esame (Fig.3).



Fig. 2. Dispositivo palmare per l'utilizzo del QIM (www.qim-eurofish.com).

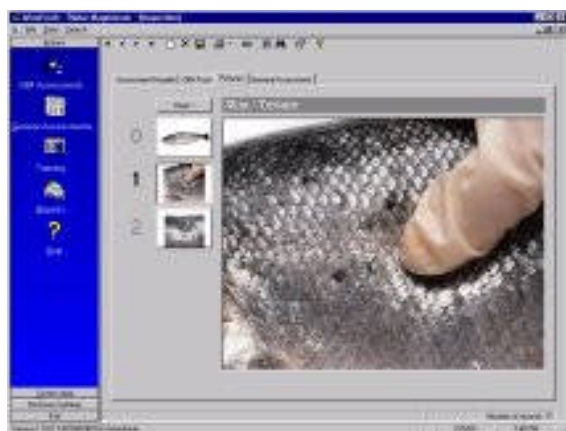


Fig. 3. Visualizzazione grafica su dispositivo palmare ([www. qim-eurofish.com](http://www.qim-eurofish.com))

Veloce e più accurato dei metodi precedenti, il vantaggio chiave del QIM è che il metodo fornisce agli utilizzatori (produttori, grossisti, venditori e dettaglianti) una misura attendibile ma soprattutto standardizzata della freschezza di un prodotto. Inoltre le misurazioni possono essere effettuate non solo in qualunque momento (per esempio all'arrivo del prodotto negli impianti, in magazzino o durante la vendita all'asta), ma anche durante le prime fasi di conservazione dove altre metodiche sarebbero inappropriate (Alasalvar C. et Al., 2001).

Si tenga infine presente che il potenziale di un sistema QIM computerizzato, legato alle ultime tecnologie di telecomunicazione, creerebbe possibilità più performanti rispetto a quelle della tradizionale documentazione cartacea.

1.2 Valutazione dello stato di conservazione (freschezza) : parametri chimici di valutazione

La freschezza per i prodotti ittici rappresenta il requisito più importante e ne condiziona anche la valutazione di mercato e la commercializzazione.

Le caratteristiche organolettiche, da un punto di vista pratico, rappresentano un metodo valido per stabilire la freschezza del pescato, in quanto sistema immediato, di facile applicazione che consente un'analisi del prodotto senza la necessità di prelievo e distruzione di parte di esso.

Tuttavia l'analisi sensoriale, per quanto attenta, presenta dei fattori limitanti, ad esempio soggettività di giudizio, elevati costi per l'impiego di panels debitamente addestrati ed anche fattori di rischio per il consumatore.

È necessario quindi applicare, assieme alla valutazione sensoriale, anche metodi non-sensoriali, oggettivi, e cioè analisi fisiche, microbiologiche e chimiche.

Per quanto riguarda i parametri chimici uno dei più importanti è sicuramente l'Azoto Basico Totale Volatile (ABTV).

Si forma dalla degradazione dei composti azotati ad opera di enzimi tissutali e batterici per azione dei quali si sviluppano ammoniaca ed ammine volatili. L'ABTV può esprimere realtà biochimiche e batteriologiche differenti (ammine diverse, microrganismi diversi) responsabili di alterazioni organolettiche e della varietà di odori che si riscontrano nel pesce in via di decomposizione.

Nel muscolo e negli organi dei pesci ed invertebrati marini è presente l'ossido di Trimetilammina (TMAO) in quantità variabile in funzione di specie, età, habitat e stagione.

TMAO è un'alchilammina quaternaria neutra che ad opera di batteri viene ridotta a TMA. Questi batteri sono H₂S-produttori e sono responsabili di alterazione del prodotto. Si tratta soprattutto di *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Vibrio* (Dainty R., Machey B.M., 1992). Molti di essi sono anaerobi facoltativi. Quando nei tessuti il tasso di ossigeno si abbassa, la TMAO entra a far parte della respirazione anaerobia (serve come elettrone terminale accettore) (Daalgard P., 1995) e viene ridotto a TMA.

La TMAO ad opera di enzimi tissutali può subire anche processi di demetilazione dando origine a dimetilammina e formaldeide.

La determinazione del valore del TMA è un buon indice di freschezza per molte specie marine perché questa sostanza, praticamente assente nei prodotti ittici dopo la cattura, aumenta progressivamente durante il periodo della conservazione.

La TMA è quindi tra i composti azotati volatili quello più valutato come indicatore di decomposizione dei prodotti della pesca e con l'azoto non proteico è responsabile del caratteristico "odore di pesce" dei prodotti ittici in decomposizione (Dixon N.M., 1989), (Church I.J., Parsons A., 1995). Varie pubblicazioni indicano l'ABTV e la TMA

come valori per misurare il deperimento di numerose specie di pesce : Dalgaard et al (1993) (25) per il merluzzo conservato a diverse concentrazioni di CO₂; Reddy et al (1994) (47) per i filetti di tilapia confezionati in N₂/CO₂; Rehbeim et al (1994) (127) per il redfish conservato in ghiaccio; Debevere et al (1996) (32) per i filetti di merluzzo conservati in atmosfera protettiva;

Ruiz Capillas et al (2000) (133) per il merluzzo conservato in ghiaccio; Grigorakis et al (2002) (72) per l'orata di allevamento conservata in ghiaccio.

Altro indice molto utilizzato per valutare l'indice di freschezza delle carni di pesce è il "valore K" (66). L'indice K si basa sul contenuto muscolare di ATP e dei prodotti della sua degradazione. In pratica valuta l'accumulo di inosina ed ipoxantina, cataboliti a valle della serie di degradazione dell'ATP, e lo rapporta alla quantità totale di ATP e di tutti i suoi cataboliti ((123), c):

$$K(\%) = (HxR+Hx)/(ATP+ADP+AMP+IMP+HxR+Hx) \times 100$$

Successivamente l'indice K è stato modificato in k1 da Karube e coll. (93) perché ATP, ADP e AMP vengono considerati scomparsi o ininfluenti a 24h dalla morte :

$$k1 (\%) = (HxR + Hx) / (IMP + HxR + Hx) \times 100 ((123), c)$$

C'è una relazione piuttosto precisa tra il valore K e le prove sensoriali: Alasalvar et al (2000) nell'orata di allevamento hanno rilevato che all'aumentare del valore K corrisponde uno scadimento delle qualità organolettiche del pesce (Alasalvar C.et Al., 2001).

Si sono studiati anche i singoli derivati dell' ATP come indicatori di freschezza e specialmente l'ipoxantina.

La conversione dell'ATP in IMP nel muscolo post mortem avviene in circa un giorno ed è su base autolitica (Hiltz D.F. et Al., 1972), (Jones N.R., 1958). Ad un giorno circa dalla morte si raggiungono i livelli più alti di IMP che successivamente diminuiscono. I valori di inosina ed ipoxantina invece aumentano durante il periodo di conservazione per azione di enzimi autolitici e microbiologici che determinano deperimento dell' alimento (Surette M.E. et Al., 1988). L'ipoxantina in particolar modo si può considerare un indicatore di freschezza piuttosto preciso in molte specie di pesce (Kyrana v.R. et Al., 1997), (Jacober L.F. & Rand J.A.G., 1982), (Zhang H.Z. & Lee T.C., 1997).

L'ipoxantina può essere ossidata in xantina e dopo in acido urico ed i suoi valori, nell'ultimo periodo di conservazione dei campioni, possono non essere precisi. Il contenuto di ipoxantina quindi durante la conservazione raggiunge un valore massimo e dopo comincia a diminuire (Jacobson L.F. & Rand J.A.G., 1982).

Altro importante prodotto della degradazione proteica sono le ammine biogene: sono basi organiche in cui due o tre atomi di idrogeno del gruppo amminico sono sostituite da gruppi alchilici, aromatici, alifatici o eterociclici.

Sono presenti in alimenti come frutta, vegetali, bevande alcoliche ed in quelli di origine animale come carne (stagionata e non), latte e derivati (formaggio, yogurt) e pesci, soprattutto *Clupeidi* (aringa, sardina), *Sgombridi* (sgombro, tonno, palamita), *Engraulidi* (alice) e *Coriphaenidi* (lampuga).

Negli alimenti di origine animale, a differenza dei vegetali in cui la produzione è soprattutto endogena, le ammine presenti derivano dall'attività aminoacido-decarbossilica di batteri durante lo stoccaggio o per invecchiamento dell'alimento stesso.

Le ammine presenti negli alimenti in base alla struttura chimica possono essere classificate in mono, di e poliammine. Diammine sono la putrescina, l'istamina e la cadaverina, mentre le poliammine sono la spermina, la spermidina e l'agmantina.

Le poliammine sono classificate anche come naturali e biogene:

le naturali sono prodotte nel corso di biosintesi ex novo;

quelle biogene sono prodotti di decarbossilazione non specifiche come le monoammine tiramina, serotonina, triptamina, fenilettilamina, ma anche istamina, putrescina, cadaverina ed agmantina che sono quelle presenti negli alimenti.

Nell'organismo sono catabolizzate per ossidazione da mono- (MAO) e diammino-ossidasi (DAO) ed il loro accumulo in eccesso negli alimenti sia crudi che trattati termicamente (le ammine biogene sono termostabili anche a temperature di sterilizzazione) può determinare nell'uomo gravi episodi di intossicazione.

Biochimicamente derivano dalla decarbossilazione di aminoacidi liberi: l'arginina è convertita in agmantina oppure degradata in ornitina e successivamente putrescina; dalla lisina origina la cadaverina, dall'istidina deriva l'istamina e dagli aminoacidi

tirosina, triptofano e feniletilalanina derivano rispettivamente tiramina, triptamina e β -feniletilammina.

La loro produzione è influenzata dalla presenza di batteri dotati di enzimi aminoacido-decarbossilasi, dalla disponibilità nel substrato di aminoacidi liberi e di condizioni favorevoli all'attività decarbossilasica ed allo sviluppo batterico.

Le specie batteriche dei prodotti della pesca che presentano enzimi aminoacido-decarbossilasi sono *Enterobacteriaceae*, *Clostridi*, *Pseudomonas*, *Cocchi*, *Vibrio*, *Aeromonas*.

L'attività di questi batteri può essere valutata quantificando nel muscolo del pesce la produzione di ammine biogene che possono essere quindi usate come indici di alterazione microbica.

Le ammine che si producono nel muscolo sono infatti legate al tipo ed alla quantità di contaminazione batterica del pesce.

Poiché il comportamento delle ammine non è sempre uniforme nel corso del processo di decadimento dei prodotti ittici è stato proposto come indice di deterioramento "l'indice di ammine biogene" o "indice di Karmas" che per stabilire la qualità dei prodotti ittici prende in considerazione i valori di cinque ammine biogene:

$$\text{BAI} = \frac{\text{HSM} + \text{PUT} + \text{CAD}}{1 + \text{SPM} + \text{SPD}} \quad \text{tutto in mg/kg}$$

HSM= istamina PUT= putrescina CAD= cadaverina
SPM= spermina SPD= spermidina

Questo indice è espresso in punteggio da 1 a 10 ed ha buone correlazioni con l'esame organolettico: punteggio fino a 10 prodotto accettabile; oltre 10 prodotto decomposto.

CAPITOLO 2:

CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE DEI PRODOTTI DELLA PESCA

2.1 Flora microbica dei prodotti ittici

Premesso che la flora microbica che caratterizza ciascun prodotto della pesca (fresco o preparato che sia) può subire cambiamenti più o meno sostanziali a seconda delle modalità di deposito, refrigerazione e manipolazione che la derrata subisce per arrivare sui banchi di vendita, è opportuno sottolineare che la presenza e/o l'eccessiva proliferazione di microrganismi nei prodotti ittici può avere due conseguenze negative (Marcilene *et al.*, 2003)

- Se sono in gioco microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo, si configura la perdita dei requisiti igienico-sanitari fondamentali che fanno di un pesce o di un crostaceo o mollusco un alimento idoneo al consumo alimentare umano.
- Se si tratta di microrganismi saprofiti, si può rischiare che con la loro proliferazione si inneschino processi enzimatici degradativi che porteranno in tempi più o meno brevi alla comparsa di modificazioni sgradevoli delle caratteristiche organolettiche del prodotto (Tabella 3).

Attività microbica	Modificazione delle caratteristiche sensoriali
Scissione dei componenti del substrato	Sviluppo di odori e/o sapori anomali
Produzione di polisaccaridi extracellulari	Formazione di patine vischiose superficiali
Sviluppo di batteri, muffe o lieviti	Formazione di colonie microbiche incolori o pigmentate
Produzione di anidride carbonica da carboidrati o aminoacidi	Gonfiore del prodotto o della confezione
Produzione di pigmenti	Variazioni di colore

T

ab. 3. Cambiamenti delle caratteristiche organolettiche in dipendenza dell'attività microbica.

Va rilevato che nel pesce si distinguono due gruppi di microrganismi, la microflora *indigena* o *autoctona* e quella *esogena* o *alloctona*. La prima è quella presente nel pesce in natura e si concentra soprattutto in branchie, superficie cutanea e intestino dell'animale. La sua composizione risente dell'habitat naturale e delle abitudini di vita dei pesci (di acqua dolce o salmastra, di acque fredde, temperate o calde). Alcuni pesci tipicamente pelagici, vivendo in acque profonde, possono presentare una carica batterica totale inferiore a 10^3 ufc/g, rispetto ad altri che, vivendo sotto costa, presentano cariche più elevate. Altri pesci ancora trascorrono buona parte della loro esistenza sul fondo di fiumi, laghi e mari dove il limo può contenere cariche microbiche prossime o superiori a 10^6 ufc/g.

Nei pesci di acque temperate o calde la flora microbica autoctona è formata per lo più da specie batteriche mesofile Gram negative aerobie strette o aerobio-anaerobio facoltative (*Pseudomonas* spp., *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Vibrio* marini) e Gram positive (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* e altre coccacee, lattobacilli) (Gram and Huss, 1996).

Nei pesci pescati in acque fredde, invece, sembra che la microflora predominante sia costituita da specie Gram negative psicrotrofe nel muco superficiale (essenzialmente *Pseudomonas*, *Alteromonas* e *Shewanella*) e da Gram positive nel contenuto intestinale (*Clostridium* spp.) (Gram and Huss, 1996).

Da questa composizione può dipendere la maggiore o minore conservabilità del pescato venduto fresco, conservato soltanto sotto ghiaccio. Secondo le conclusioni ricavabili di diversi studi sperimentali condotti in proposito (Castell, 1971; Gram and Huss, 1996; Huss, 1995; Orban, 1996; Tiecco, 2000a, 2000b), si può arguire che un filetto di pesce pescato in acque calde (e quindi con una microflora tendenzialmente mesofila), messo sotto ghiaccio tenderà a conservarsi più a lungo di un pesce proveniente da acque temperate o fredde, nel quale la flora microbica è composta per lo più da specie batteriche psicrotrofe che non risentono più di tanto dell'azione frenante del ghiaccio sulla loro proliferazione.

La microflora esogena del pesce è formata dalle quelle specie microbiche tipiche della sfera terrestre (contenuto gastroenterico di uomo e animali terrestri, humus del terreno, acque dolci superficiali) con i quali i pesci possono venire a contatto perché

vivono troppo vicino alle coste che risentono dell'immissione in acque salmastre di foci di fiumi e scarichi fognari di grandi agglomerati urbani (Tiecco, 2000a, 2000b).

Una seconda, variegata serie di inquinamenti microbici attende poi i pesci al varco quando, dopo essere tratti a bordo, vengono manipolati, sbarcati e ulteriormente manipolati, per esempio per operazioni di decapitazione, filettatura, ecc...(Galli, 1999; Tiecco, 2000a, 2000b), tutte fasi operative queste in cui è impossibile evitare un, seppur minimo, inquinamento del prodotto da una flora microbica che è tipicamente terrestre, in cui possiamo rinvenire:

- Microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* enteropatogeni, *Clostridium botulinum*, virus enterici, *E. coli* enteropatogeni, *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*).
- Microrganismi alteranti o indicatori di inquinamento fecale, quali enterobatteriacee in genere, coliformi totali e fecali, *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., *Photobacterium* spp., enterococchi.

In generale, si può ritenere che le masse muscolari di un pesce marino appena catturato siano praticamente sterili in profondità, specialmente se si tratta di soggetti di taglia medio-grande (tonno, pesce spada).

Nel pesce vivo ed in quello appena catturato o raccolto, la flora microbica tende a concentrarsi in branchie, muco superficiale e contenuto intestinale, con variazioni di carica estremamente forti da un soggetto all'altro, condizionate, come precedentemente detto, da una serie di fattori legati all'habitat del pesce e al suo ciclo biologico, (Gram and Huss, 2000; Shewan, 1977).

Si può ammettere che in un pesce appena catturato si possono rilevare le seguenti cariche microbiche totali:

- **Muco superficiale:** da 10^2 fino a 10^6 ufc/cm² (Gram and Huss, 2000). In genere le cariche superficiali sono molto basse nei pesci pelagici, abituati a nuotare in acque fredde e a grande profondità. Sono, invece, tendenzialmente molto elevate sin dall'inizio nei pesci che vivono in acque temperate o calde o

in prossimità di foci di fiumi o grandi agglomerati urbani (ad es., pesci piatti come le sogliole ed i rombi).

- **Branchie:** si possono registrare cariche batteriche totali comprese tra 10^3 e 10^7 ufc/cm² (Giaccone, 2001).

- **Contenuto intestinale:** in questa sede le cariche microbiche possono oscillare tra 10^3 e 10^9 ufc/g (Gram and Huss, 2000), a seconda del pesce, delle sue abitudini alimentari e della fase di ciclo biologico in cui si trova. Tuttavia si noti come la carica batterica totale di salmoni e merluzzi, che durante le migrazioni per raggiungere i siti di riproduzione non si nutrono, può ridursi a poche centinaia di ufc/g in questo periodo.

2.2 Fattori che possono influenzare la qualità del pescato come materia prima

Dato per scontato che il pescato, quando viene tratto in barca e poi sbarcato e ulteriormente manipolato, veicola una flora microbica che in parte è tipica del pesce in vita e in parte si è accumulata sull'animale nelle successive fasi della catena commerciale, vediamo ora quali sono i fattori che influenzano lo sviluppo di questa microflora, condizionando, di conseguenza, la comparsa di quelle modificazioni biochimiche che portano allo scadimento delle caratteristiche organolettiche del prodotto.

2.2.a Fattori intrinseci

- **Percentuale di tessuto connettivo nelle masse muscolari**

In linea generale si può affermare che il connettivo presente nelle masse muscolari rappresenta una vera e propria barriera fisica alla penetrazione batterica.

Nei pesci ossei la percentuale è relativamente ridotta (0,3-3%) mentre tende ad essere più cospicua nei selacei. La penetrazione dei batteri da cute, branchie ed intestino verso la profondità delle masse muscolari sarà tanto più rapida quanto minore è il connettivo presente nelle carni.

- Elevato valore di pH post mortem delle masse muscolari (in genere > 6,0)

La maggior parte dei pesci ha una percentuale di carboidrati molto bassa nelle proprie carni (<0,5%) per cui dopo la morte dell'animale, con la glicolisi anaerobia, si formano ridotte quantità di acido lattico; nel pesce non si registra, quindi, quella acidificazione delle masse muscolari tipica, invece, dei vertebrati a sangue caldo. Le masse muscolari presentando, quindi, valori di pH sempre superiori a 6,0 o di poco inferiori non riescono a contrastare per nulla lo sviluppo microbico. A titolo indicativo si può ricordare che quasi tutti i batteri potenzialmente patogeni e buona parte degli alteranti si sviluppano bene a pH compresi 6,0 e 7,5 e che occorre scendere al di sotto di pH 5,0-4,5 per ottenere un completo arresto della proliferazione microbica.

- Elevate concentrazioni di azoto solubile non proteico (NPN) nelle carni

Com'è noto, le carni dei pesci, oltre ad essere ricche di proteine così come lo sono le carni rosse e quelle avicole, contengono rispetto a quelle una maggiore quantità di composti azotati non proteici, di solito di basso peso molecolare (creatina, creatinina, ipoxantina, ecc.) che sono attaccati molto velocemente dai batteri, con produzione di idrogeno solforato, metilmercaptano ed altri composti che sono una delle componenti fondamentali dell'odore di stantio che è tipico del pesce non più fresco.

- Modificazioni del rapporto lipidi/proteine/acqua connessa al periodo riproduttivo

Più questo rapporto è alto, maggiore è la conservabilità del pesce. Sappiamo che nel periodo della riproduzione il contenuto di proteine totali delle carni si abbassa considerevolmente, facendo, quindi, diminuire la conservabilità del prodotto.

- Quantità di ossido di trimetilamina (TMAO) presente nelle masse muscolari

Il TMAO è un composto presente, in quantità variabile, in tutte le specie ittiche marine e in alcune di acqua dolce. E' uno dei componenti azotati non proteici del muscolo che impone alle carni un potenziale di ossido-riduzione tendenzialmente positivo. Ciò significa che in substrati del genere (tendenzialmente più ricchi di ossigeno) è favorita la moltiplicazione dei microrganismi aerobi stretti o aerobi-anaerobi facoltativi, mentre è ostacolato lo sviluppo degli anaerobi più o meno stretti (ad es., *Clostridium* spp. e *Lactobacillus* spp.). Lo scadimento delle caratteristiche sensoriali del pesce è influenzato dall'attività di alcune delle specie microbiche alteranti (*Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum* e *Vibrio* spp.) che riducono il TMAO. Queste specie sono, infatti, in grado di scindere il composto liberando trimetilamina (TMA) e dimetilamina (DMA), componenti responsabili della comparsa di "odore di pesce vecchio".

Questo meccanismo è favorito dall'anaerobiosi e non viene rallentato dalle basse temperature di conservazione del prodotto.

- Stress ante-mortem

è noto infatti che durante la fase preagonica, quando il pesce è sottoposto a forti strapazzi (come si verifica al momento in cui cade nella rete o per l'asfissia quando questa viene tolta dall'acqua), si instaura uno stato batteriemico che, associato al collasso del sistema immunitario, favorisce il passaggio dei germi nelle carni.

- Conformazione anatomica

A seconda della conformazione del corpo del pesce e dello spessore della pelle, ai fini dell'invasione microbica delle masse muscolari, assumono un'importanza diversa i germi delle superfici esterne o quelli intestinali; infatti nei pesci piatti e soprattutto con pelle sottile questa invasione si verifica a partire dalle superfici esterne, mentre in quelli con corpo rotondo essa si verifica a partire dall'intestino.

I principali fattori intrinseci che condizionano la velocità di deterioramento del pesce sono illustrati in Tabella 4.

Fattori intrinseci	Velocità di deterioramento	
	rapida	lenta
Taglia	piccola	grande
Contenuto di lipidi	specie grasse	specie magre
Spessore pelle	pelle sottile	pelle spessa
Percentuale di connettivo	minore	maggiore
PH <i>post mortem</i>	alto	basso

Tab. 4. Principali fattori intrinseci condizionanti la velocità di deterioramento del pesce conservato sotto ghiaccio.

2.2.b Fattori estrinseci

- Metodi di pesca

Il livello di inquinamento microbico superficiale del pesce può variare sensibilmente a seconda delle modalità di cattura e del tempo che il pesce è rimasto morto in acqua prima di essere caricato a bordo. E' facile arguire che saranno più a rischio di inquinamento quelle partite di pesce catturate a strascico, dovuto alle cariche microbiche elevate del fondale e issate a bordo in grandi ammassi, poiché nelle reti la pressione è tale da provocare sovente fuoriuscita di materiale fecale dalla cloaca con imbrattamento superficiale del prodotto.

- Tenore salino dell'acqua

Molti batteri marini, adattatisi con il tempo alla salinità del mare (circa 3,5% di NaCl), sono molto sensibili a cambiamenti anche minimi della salinità.

I microrganismi alotolleranti od alofili sono piuttosto rari (tra i patogeni si segnalano soprattutto *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e, in parte, la stessa *Salmonella* spp.) mentre la maggior parte dei componenti della microflora estrinseca del pescato non lo sono. Il fattore da considerare, quindi, è quello della

percentuale di acqua libera del mezzo (a_w). In generale, si può affermare che la maggior parte dei batteri potenzialmente patogeni per l'uomo per consumo di alimenti e molti dei microrganismi saprofiti alteranti non si sviluppano sotto valori di $a_w < 0,95-0,94$; soltanto gli alotolleranti e gli alofili continuano a moltiplicarsi fino ad $a_w < 0,91$ e fino a 0,83.

- **Stagione e temperatura dell'acqua**

Stagione e temperatura influenzano i movimenti o i rimescolamenti dell'acqua e quindi la maggiore o minore distribuzione dei germi che si rinvergono nei fondali; quando la temperatura dell'acqua aumenta, infatti, anche l'incidenza delle specie mesofile nell'acqua e sui pesci aumenta, mentre nei mesi invernali tali germi si isolano solamente dai fondali (Tiecco, 2000 b).

- **Grado di inquinamento delle acque e zona di pesca**

L'inquinamento delle acque risente molto della vicinanza delle coste poichè l'immissione in mare di foci di fiumi e scarichi fognari di grandi agglomerati urbani condiziona non solo l'entità dell'inquinamento ma anche il tipo di flora, formata dalle quelle specie microbiche tipiche della sfera terrestre (contenuto gastroenterico di uomo e animali terrestri, humus del terreno, acque dolci superficiali).

- **Contaminazioni secondarie**

Una variegata serie di inquinamenti microbici attende poi i pesci quando, dopo essere tratti a bordo, vengono manipolati, sbarcati e ulteriormente manipolati, per esempio per operazioni di decapitazione, filettatura, ecc., tutte fasi operative queste in cui è impossibile evitare un seppur minimo inquinamento del prodotto da parte di microrganismi di origine terrestre (Galli, 1999; Tiecco, 2000a, 2000b).

CAPITOLO 3:

MICROBIOLOGIA DEI PRODOTTI ITTICI REFRIGERATI (Ianieri *et al.*, 2005)

3.1 Spoilage association e Specific Spoilage Organisms (SSOs)

I prodotti ittici freschi e “lightly preserved” refrigerati sono sistemi dinamici le cui caratteristiche microbiologiche variano nel tempo in funzione di diversi fattori intrinseci ed estrinseci. Tra quelli intrinseci, legati cioè alla materia prima ricordiamo la poichilotermia, l'elevato pH post mortem, la rilevante frazione di azoto non proteico e, nell'ambito di questa, di ossido di trimetilamina (TMAO). I parametri di processo, le modalità di confezionamento e le condizioni di stoccaggio sono invece sicuramente tra i principali fattori estrinseci (Austin, 2002; Gram and Dalgaard, 2002). Le materie prime risultano inizialmente contaminate da una grande varietà di specie microbiche, sebbene soltanto alcune di queste siano effettivamente in grado di colonizzare il substrato aumentando considerevolmente di numero.

Il termine anglosassone di *spoilage association*, traducibile come “associazione di microrganismi alteranti”, è stato coniato proprio per indicare queste comunità microbiche.

Il meccanismo in virtù del quale un determinato gruppo di batteri prende il sopravvento su altri, anche strettamente correlati, non è attualmente sempre ben chiaro; è d'altro canto noto, invece, come anche minime variazioni del processo produttivo o delle modalità di confezionamento provochino considerevoli cambiamenti nello sviluppo e nella composizione della *spoilage association*, con comparsa di fenomeni alterativi anche assolutamente peculiari.

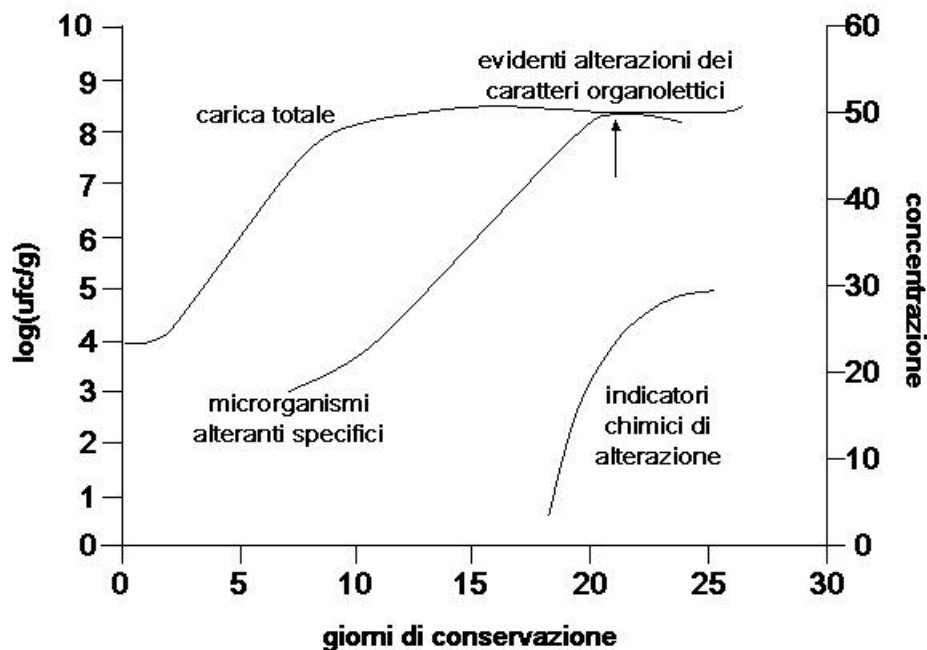
La stessa tipologia di prodotto può andare incontro a fenomeni alterativi diversi, in relazione alla origine geografica ed a fattori non sempre noti, in grado di interferire con lo sviluppo microbico (Gram and Huss, 1996).

La comparsa dei fenomeni alterativi può essere legata sia alla crescita, sia alla attività metabolica dei microrganismi che compongono la *spoilage association*. Mentre nel primo caso esiste sempre una correlazione diretta tra grado di

deterioramento e la Carica Batterica Totale (CBT) del prodotto, nel secondo invece, tale correlazione non sussiste (Huss *et al.*, 1974).

Solo una frazione della spoilage association è infatti responsabile dello scadimento delle caratteristiche del prodotto. In tali casi sarebbe più opportuno distinguere, in seno alla “associazione di microrganismi alteranti” (popolazioni microbiche presenti sul prodotto al momento della comparsa dei fenomeni alterativi), il gruppo dei “microrganismi alteranti” (Specific Spoilage Organisms – SSOs), specificatamente coinvolti, attraverso le loro attività metaboliche, nella comparsa di quelle modificazioni tipiche dello stato di deterioramento (Grafico 1).

Determinare quali dei microrganismi isolati da prodotti ittici deteriorati siano quelli effettivamente responsabili del processo alterativo non è compito facile, e richiede accurate indagini di tipo sensoriale, chimico e microbiologico. In primo luogo è necessario uno studio, in termini sia qualitativi sia quantitativi, di tutte le modificazioni (organolettiche, microbiologiche e chimiche) che si verificano nel prodotto durante la conservazione, compresa la determinazione delle diverse concentrazioni di un determinato composto chimico, preso come indicatore del processo alterativo. In secondo luogo occorre isolare ed identificare le specie microbiche presenti nel prodotto allo stadio di alterazione corrispondente al rifiuto sensoriale, saggiandone in specifici substrati (Gram *et al.*, 1987; Dalgaard, 1995) le specifiche capacità alteranti, legate ad es. alla possibilità di produrre composti volatili tipici e modificazioni chimiche peculiari (Herbert *et al.*, 1976; Gram *et al.*, 1987) (Tabella 6). I ceppi così selezionati vanno infine testati sul prodotto per la valutazione della loro azione deteriorante, comprendente ad es. lo studio delle cinetiche di crescita e la produzione quali-quantitativa di composti volatili responsabili di odori sgradevoli (Gram *et al.*, 2002; Dalgaard, 1995); questa fase risulta di estrema importanza dal momento che alcuni batteri, pur avendo dimostrato capacità di produrre composti chimici associati al processo alterativo, non lo fanno in quantità significativa nelle normali condizioni che si verificano in un determinato prodotto; essi non sono pertanto da considerarsi alteranti specifici per quel determinato prodotto.



Modificato da Gram e Huss, 1996

Grafico 1. Concentrazioni e rapporti tra Carica Batterica Totale (CBT), Microrganismi Alteranti Specifici (SSOs) e alterazioni dei caratteri organolettici.

3.2 Prodotti ittici freschi conservati a temperatura di refrigerazione

La *spoilage association* che si sviluppa in prodotti ittici conservati in presenza di ossigeno è costituita tipicamente da microrganismi Gram-negativi, bastoncellari, psicrotrofi e non fermentanti. *Shewanella putrefaciens* e *Pseudomonas* spp. sono quelli specialmente coinvolti nel deterioramento di prodotti ittici freschi conservati in ghiaccio, a prescindere dalla loro zona di provenienza (Gram *et al.*, 1987, 1990; Shamshad *et al.*, 1990). A temperatura ambiente (+25° C) invece il quadro microbiologico appare dominato da mesofili della famiglia delle *Vibrionaceae* (Gram *et al.*, 1990; Tiecco, 2000) e, nel caso di prodotti ittici provenienti da acque con elevata inquinazione, delle *Enterobacteriaceae* (Gram, 1992).

Shewanella putrefaciens è l'agente specificatamente responsabile del deterioramento di prodotti ittici refrigerati in ghiaccio provenienti da acque marine temperate. I diversi ceppi di volta in volta isolati hanno mostrato, a fronte di una certa

eterogeneità fenotipica (Stenstrom e Molin, 1990), equivalenti capacità alteranti (Jorgensen e Huss, 1989; Dalgaard, 1995). *S. putrefaciens* è un microrganismo particolarmente acido-sensibile, che trova nei prodotti ittici un ambiente favorevole al suo sviluppo. L'azione deteriorante è legata alla capacità di attacco di aminoacidi contenenti zolfo, come la L-cisteina, con produzione di composti volatili maleodoranti quali l'idrogeno solforato (H₂S) (Gram *et al.*, 1987; Stenstrom e Molin, 1990).

Pseudomonas spp. sono invece specificatamente responsabili del deterioramento di prodotti ittici refrigerati in ghiaccio provenienti da zone tropicali sia di acqua dolce (Lima dos Santos, 1978; Gram *et al.*, 1990) sia, unitamente a *Shewanella putrefaciens*, di acqua salata (Gram, 1992). Quest'ultima infatti, sebbene isolata più volte da acque dolci tropicali, non sembra avere un ruolo determinante nel deterioramento dei prodotti provenienti da queste zone sia per le basse cariche, sia per la competizione subita da *Pseudomonas* spp., presente in elevate concentrazioni (Gram, 1993; Gram e Melchiorsen, 1996) (Grafico 2).

I fenomeni alterativi provocati da *Pseudomonas* spp. sono caratterizzati dall'assenza di H₂S tipico del metabolismo di *Shewanella putrefaciens* (Gram *et al.*, 1989, 1990) e dalla presenza di altri composti volatili come aldeidi, chetoni, esteri e solfridili (Edwards *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1973).

A temperatura ambiente i prodotti ittici di acqua dolce subiscono l'attacco degradativo essenzialmente ad opera di *Aeromonas* spp. mobili (Gorczyca e Pek Poh Len, 1985; Gram *et al.*, 1990).

A prescindere da quale sia la specie o il gruppo microbico di volta in volta implicato nella comparsa dei fenomeni alterativi, i prodotti ittici freschi conservati a temperatura di refrigerazione presentano segni visibili di deterioramento in presenza di cariche dell'ordine di 10⁸-10⁹ ufc/g (Tiecco, 2000).

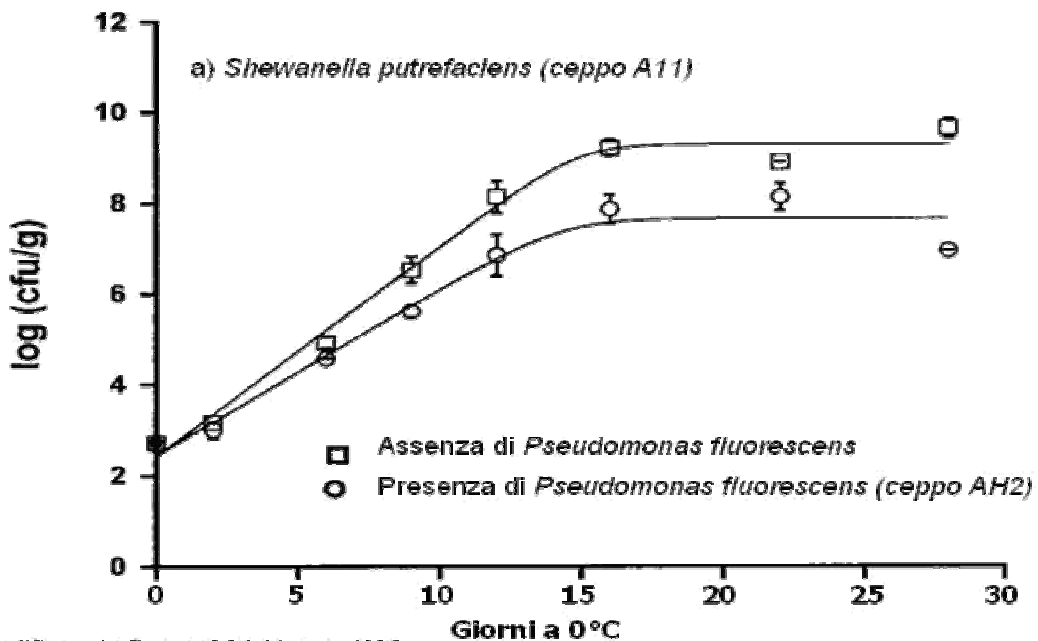


Grafico 2. Interazioni *Pseudomonas fluorescens* vs *Shewanella putrefaciens*.

3.3 Prodotti ittici freschi confezionati sottovuoto e conservati a temperatura di refrigerazione

I prodotti ittici confezionati sottovuoto e conservati a temperatura di refrigerazione non mostrano apprezzabili aumenti della *shelf-life* se comparati a quelli non confezionati e mantenuti nelle stesse condizioni. Differenze sono invece apprezzabili per quanto attiene la composizione della *spoilage association*; la mancanza di ossigeno, infatti, arresta lo sviluppo di microrganismi estremamente competitivi ma aerobi stretti, come *Pseudomonas* spp., a favore di quei deterioranti (tra cui *Shewanella putrefaciens* e *Photobacterium phosphoreum*) in grado di utilizzare l'ossido di trimetilamina (TMAO) come accettore terminale di elettroni nel processo di respirazione anaerobia. Risultato finale del processo è la formazione di trimetilamina (TMA), il cui accumulo è tipico in questa tipologia di prodotti. *Photobacterium*

phosphoreum produce quantitativi di TMA 10-100 volte superiori rispetto a *Shewanella putrefaciens* (Dalgaard, 1995). Tale riscontro è da mettere in relazione alle notevoli dimensioni della sua cellula batterica e quindi alla maggiore capacità di accumulo del metabolita nel citoplasma (Gram *et al.*, 2002). *Shewanella putrefaciens*, tuttavia, è maggiormente responsabile della comparsa di odori sgradevoli per la sua capacità di produrre composti volatili contenenti zolfo (Dalgaard *et al.*, 1993; Dalgaard, 1995).

Secondo Gram e Huss (1996), in corso di alterazione, la specie dominante è funzione unicamente della carica iniziale.

Le conoscenze relative agli alteranti delle specie di acqua dolce confezionate sottovuoto e conservate a temperature di refrigerazione sono a tutt'oggi, molto limitate; sicuramente il ruolo di *Photobacterium phosphoreum* è marginale, stante le sue particolari esigenze di crescita legate alla presenza di cloruro di sodio.

3.4 Prodotti ittici freschi confezionati in atmosfera protettiva e conservati a temperatura di refrigerazione

Prodotti ittici provenienti da acque marine temperate, conservati in atmosfera protettiva, riconoscono quale agente alterante dominante il *Photobacterium phosphoreum*, particolarmente resistente alla azione della CO₂ (Grafico 3).

Questo sistema di confezionamento non assicura tuttavia i sensibili aumenti della *shelf-life* riscontrati ad esempio nel campo delle carni e prodotti derivati (Cann *et al.*, 1984; Farber, 1991; Dainty e Mackey, 1992; Dalgaard *et al.*, 1993; Giaccone *et al.*, 2000). La moltiplicazione di *Photobacterium phosphoreum* fino a cariche di 10⁷-10⁸ ufc/g, determina, infatti, un notevole accumulo di TMA, paragonabile o solo di poco inferiore a quello osservato nel confezionamento sottovuoto e comunque sempre decisamente maggiore che nella conservazione in presenza di ossigeno (Grafico 4 e Tabella 5). La TMA, in combinazione poi con altri composti ancora non ben identificati, sarebbe responsabile del decadimento delle caratteristiche organolettiche del prodotto.

In prodotti ittici provenienti da acque dolci o marine tropicali il quadro microbiologico appare invece dominato da diversi Gram-positivi, soprattutto batteri lattici (Lannelongue *et al.*, 1982; Oberlender *et al.*, 1983; Pedersen e Snabe, 1995).

La presenza di TMA in questa tipologia di prodotti, tuttavia, lascia comunque supporre la presenza di microrganismi in grado di ridurre il TMAO (Reddy *et al.*, 1995).

<u>Atmosfera</u>	<u>Acque temperate</u>		<u>Acque tropicali</u>	
	Acqua marina	Acqua dolce	Acqua marina	Acqua dolce
Aerobia	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. putrefaciens</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
Sottovuoto	<i>S. putrefaciens</i> <i>P.phosphoreum</i>	Gram-positivi	Lattici Altri (?)	Lattici (?)
CO ₂	<i>P.phosphoreum</i>	Lattici	Lattici Batteri riducenti TMAO	Lattici (?) Batteri riducenti TMAO

* Modificato da: Gram et al., 2002

Tab. 5. Microrganismi alteranti specifici.

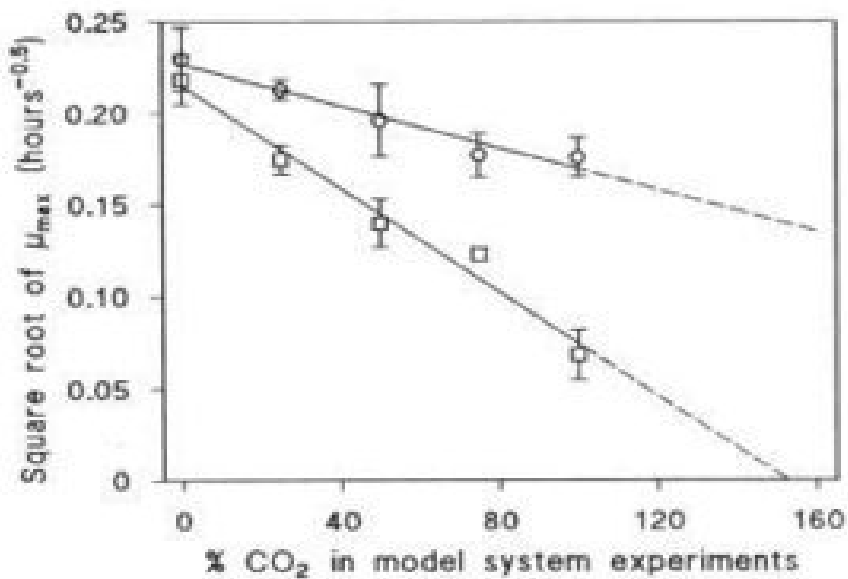
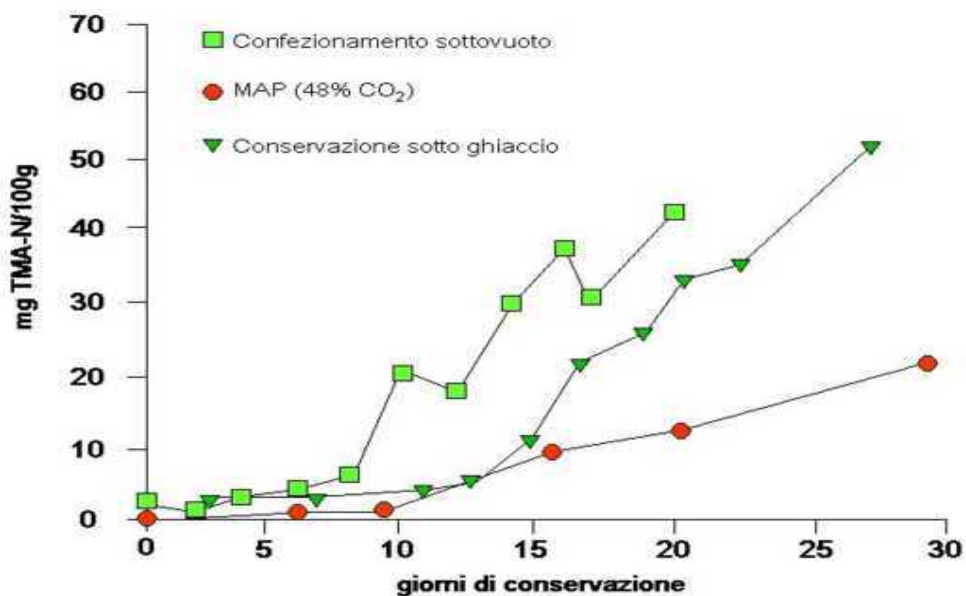


Grafico 3. Effetti della CO_2 sul massimo grado di crescita specifico (μ_{max}) di *Photobacterium phosphoreum* (cerchi) e di *Shewanella putrefaciens* (quadrati). Esperimenti condotti su merluzzi a 0°C (Dalgaard, 1994 b).



Modificato da Gram e Huss 1996

Grafico 4. Sviluppo di trimetilamina (TMA) in merluzzo mantenuto a 0°C in aria, sottovuoto e in atmosfera protettiva (48% CO_2).

3.5 Prodotti ittici trasformati

Prodotti ittici “lightly preserved”: Comprendono specialità gastronomiche di elevato pregio (quali ad esempio salmone affumicato, alici marinate, ecc.), generalmente consumate senza ulteriori processi di cottura (“*ready to eat*”). Le dinamiche ed i microrganismi responsabili dei fenomeni alterativi in questa tipologia di prodotti non sono ancora sufficientemente noti, anche se alcune *Enterobacteriaceae* (*Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*), *Brochotrix thermosphacta*, *Photobacterium phosphoreum*, ed i batteri lattici (LAB) sembrerebbero avere un ruolo in tal senso (Civera *et al.*, 1995; Ianieri *et al.*, 1999; Truelstrup Hansen *et al.*, 1995; Leisner *et al.*, 1994). I LAB, agenti di contaminazione secondaria, sono riscontrabili in alte cariche (10^7 - 10^8 ufc/g) anche molte settimane prima che il prodotto mostri i segni evidenti di alterazione (Vergara *et al.*, 2001), a dimostrazione di come la determinazione della Conta Batterica Totale non rappresenti un buon indice per la valutazione del grado di deterioramento di questi prodotti.

Com'è noto, lo sviluppo dei LAB condiziona il quadro microbiologico del prodotto attraverso tre meccanismi fondamentali: l'acidificazione del mezzo, l'azione competitiva per l'utilizzazione del substrato e l'eventuale produzione di batteriocine.

L'identificazione dei LAB psicotrofi deterioranti mediante un approccio di tipo molecolare ha rilevato la presenza prevalentemente di tre specie: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Carnobacterium piscicula* (Gram *et al.*, 2002).

Sebbene la maggior parte degli studi concordi sul fatto che i batteri lattici dominino il quadro microbiologico, le modificazioni chimiche che subentrano nel corso della conservazione sono invece piuttosto variabili, e strettamente correlate alla componente della microflora restante. A tale proposito ricordiamo l'interazione tra i LAB ed *Enterobacteriaceae*: i LAB degradano l'arginina ad ornitina che è a sua volta degradata dalle *Enterobacteriaceae* in putrescina. Studi condotti da Jorgensen *et al.* (2000) hanno evidenziato livelli di putrescina fino a 15 volte superiore con questo meccanismo sinergico (Tabella 6).

Valutazione sensoriale	Metabolita	Substrato	Microrganismo specifico
Odore di "pesce"	TMA	TMAO	<i>S. putrefaciens</i> , <i>P. phosphoreum</i> , <i>Aeromonas spp.</i>
Odore ammoniacale, putrido	NH ₃	Aminoacidi	<i>Enterobacteriaceae</i> , LAB, <i>P. phosphoreum</i>
Odore di zolfo	H ₂ S	Cisteina	<i>S. putrefaciens</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i>
Odore solfidrilico	(CH ₃) ₂ S ₂	Metionina	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , LAB
Odore dolciastro	Esteri		<i>P. fragi</i>

* Modificato da: Gram. et al., 2002

Tab. 6. Esempi di metabolici presenti nei prodotti ittici alterati e microrganismi responsabili.

Da quanto sin qui considerato, è evidente come il quadro degli SSOs dei prodotti ittici necessiti di ulteriori approfondimenti per ottimizzare le strategie di conservazione e prolungarne la *shelf-life*.

Particolarmente interessanti ed all'avanguardia sono gli studi condotti dai Ricercatori del Danish Institute for Fisheries Research sulle "*Metabiotic Spoilage Associations*", gruppi di microrganismi interdipendenti responsabili dell'alterazione del prodotto, attraverso scambi di metabolici e nutrienti, basati su specifici meccanismi di comunicazione ("Quorum Sensing").

CAPITOLO 4:

L'ATMOSFERA PROTETTIVA E I PRODOTTI ITTICI

4.1 Premessa

La necessità di avere un prodotto alimentare, che possa essere conservato sempre più a lungo e trasportato per lunghe distanze, arrivando a destinazione senza che avvengano nel tempo modifiche strutturali ed organolettiche all'interno dello stesso, ha portato l'industria alimentare, da sempre settore trainante dell'economia italiana, a ricercare soluzioni sempre più tecnologicamente avanzate tra cui innovativi sistemi di *packaging*.

Il confezionamento in atmosfera protettiva (AP) 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 sottovuoto (*Vacuum Packaging* - VP). Le pellicole plastiche fornirono un ottimo ausilio allo scopo, infatti poiché buona parte dei microrganismi responsabili del deperimento degli alimenti hanno bisogno di ossigeno per crescere, fu facile pensare di mettere gli alimenti in un sacchetto di plastica e togliere dal suo interno quasi tutta l'aria presente.

In questo modo si riesce a creare a ridosso dell'alimento una condizione di assenza di ossigeno (anaerobiosi) che limita lo sviluppo delle specie microbiche più putrefattive e favorisce, invece, la crescita di altre che hanno un effetto benefico o quanto meno non sfavorevole sull'alimento.

Il sottovuoto, tuttavia, pur risolvendo una serie di problematiche legate alla conservazione degli alimenti (in specie riguardo gli ittici) presenta ancora oggi qualche svantaggio. La mancanza di ossigeno può a volte creare problemi di inscurimento delle carni (specialmente quelle rosse, che tendono ad assumere un colore rosso mattone spento). Inoltre, il vuoto fa collabire strettamente la pellicola plastica al prodotto, lo schiaccia e lo rende a volte commercialmente poco presentabile.

Per risolvere queste ed altre problematiche conseguenti ai formati delle nuove preparazioni alimentari, gli istituti di ricerca e le aziende produttrici hanno ritenuto

necessario ricercare sistemi alternativi capaci di elevare le “*performances*” delle pellicole e nel contempo di ottimizzare il livello di conservazione degli alimenti.

Gli studi approdarono ad una tecnica che consente quindi di estrarre l’aria normale dal contenitore e di sostituirla con uno o più gas scelti appositamente, da soli o in miscela fra di loro.

Per AP si intende il confezionamento di un prodotto deperibile in un’atmosfera modificata di modo che la sua composizione risulti essere diversa da quella dell’aria. 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, così da soddisfare le nuove esigenze di marketing derivanti dalle nuove esigenze del consumatore che, oggi rispetto al passato, è orientato sempre più ad acquistare e consumare prodotti trattati il meno possibile e che diano la sensazione di “naturale”, di “fresco” (Gould, 1996).

Il termine *shelf-life* esprime, in determinate condizioni di conservazione, il tempo limite entro il quale il progredire dei singoli eventi reattivi determini modificazioni impercettibili di tipo sensoriale e comunque accettabile per quanto concerne la sicurezza d’uso. Le modificazioni che possono alterare definitivamente le caratteristiche qualitative di un prodotto sono di tipo chimico e biochimico (imbrunimento non enzimatico ed enzimatico, idrolisi ed ossidazione dei lipidi, idrolisi e denaturazione delle proteine, agglomerazione delle proteine, idrolisi e sintesi di polisaccaridi, glicolisi, degradazione dei pigmenti naturali, inattivazione delle vitamine, modificazioni della biodisponibilità di vitamine e sali minerali), naturale e chimico-fisico (cristallizzazione degli zuccheri, retrogradazione dell’amido, perdita di sostanze volatili, adsorbimento o desorbimento di umidità, modificazioni della compartimentazione dei componenti), biologico (Grafico 5).

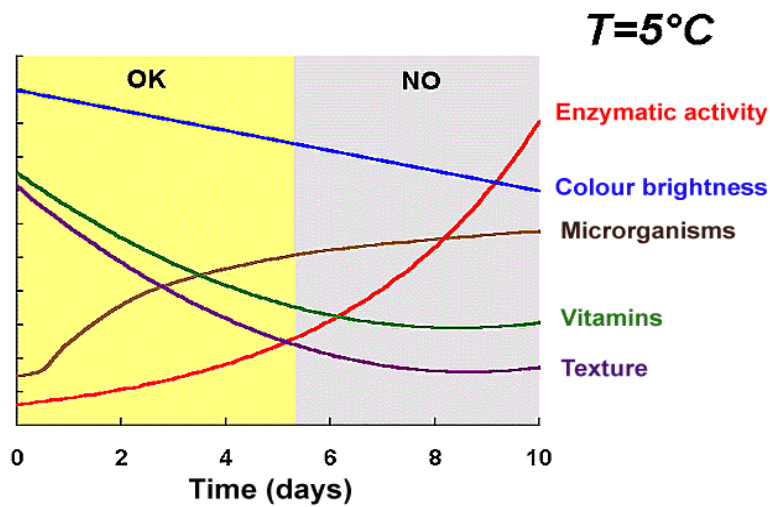


Grafico 5. Cambiamenti delle caratteristiche di prodotto mantenuto in AP
(Modificato da Liani).

Le tecniche di confezionamento in atmosfera protettiva agiscono contrastando le alterazioni causate dall'atmosfera e dai 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.

Ci sono diverse tecniche per creare una "nuova atmosfera" diversa dall'aria a ridosso dell'alimento e spesso potrebbe esserci confusione circa la terminologia usata; la tabella che segue mostra alcune varianti sul tema (Tabella 7).

Terminologia	Descrizione
Confezionamento in atmosfera protettiva (AP)	Aria sostituita da uno o più gas in miscela. Nessun ulteriore controllo sulla composizione della miscela dopo il confezionamento.
Confezionamento in atmosfera controllata (CAP)	La proporzione e il tipo di gas sono tenuti sotto controllo per l'intero periodo di conservazione del prodotto
Confezionamento sottovuoto (VP)	L'aria viene aspirata quasi tutta dalla confezione; l'ossigeno residuo viene consumato dal metabolismo batterico ancora attivo

Tab. 7. Terminologia in uso per definire il confezionamento in atmosfera protettiva.

Secondo Silliker e Wolf (1980), le due maggiori tecnologie applicabili ai prodotti ittici sono l'Atmosfera Protettiva (AP) e il Sottovuoto (VP).

4.2 I GAS

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 in vista dell'aumento della richiesta di tali derrate da parte del mercato per motivi di ordine sociale ed economico, oltre che per le loro specifiche caratteristiche nutrizionali. È opportuno osservare che la tecnica del confezionamento in atmosfera protettiva è stata messa a punto in particolare sulle carni, mentre quella del confezionamento in atmosfera controllata è stata ed è studiata e applicata soprattutto a frutta e verdura. In ogni caso, tali tecnologie

innovative sono state poi “trasposte” ai prodotti della pesca e i risultati che si sono ottenuti non sono sempre del tutto soddisfacenti, infatti i prodotti ittici pongono ai ricercatori problemi che le carni non hanno. Ciò è logico se si considera quanto detto sulle caratteristiche chimico-fisiche di composizione di pesci, molluschi e crostacei.

La matrice organica cui ci si trova di fronte è:

- molto più varia di quanto non sia nel caso delle carni fresche
- ha una composizione chimica alquanto differente da quelle e ciò condiziona la loro conservabilità.

Rispetto alle carni dei mammiferi terrestri, il pesce confezionato sottovuoto o in atmosfera protettiva sembra conservarsi meno a lungo a causa dei processi chimici che portano alla progressiva degradazione della componente azotata non proteica delle loro carni. Questo aspetto deve essere tenuto presente nel valutare l'effettiva conservabilità di un prodotto ittico condizionato in questo modo.

Nel pensare di utilizzare il confezionamento in atmosfera protettiva per i prodotti ittici, quindi, non basta pensare di adattare al pesce una tecnica che è stata messa a punto per le carni, perché “il pesce non è carne”. Occorre, piuttosto, avere ben presenti le caratteristiche chimiche e organolettiche del prodotto che si intende conservare e in base a quelle cercare la soluzione più adatta.

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 AP dei prodotti ittici non può prescindere dalla composizione chimica della materia prima e dalle condizioni microbiologiche di partenza. A questo proposito, si rimanda a quanto ampiamente illustrato nelle relazioni introduttive, sulla chimica e la microbiologia dei prodotti ittici. Ricordiamo, per inciso, che la normale aria che respiriamo ha la seguente composizione: 20,95% ossigeno, 78,09% azoto, 0,03% anidride carbonica, vapore acqueo in percentuali variabili. Per confezionare pesci, molluschi, crostacei e tutta la serie dei prodotti alimentari da essi derivati in atmosfera protettiva, in pratica,

si avvolge l'alimento in una pellicola plastica per lo più trasparente alla luce, ma comunque dotata di sufficiente impermeabilità agli scambi gassosi, e si sostituisce la normale aria contenuta nella confezione (78% di azoto, 20% circa di ossigeno e il restante da vapore acqueo, anidride carbonica e gas rari) con uno o più tipi di gas (da soli o in miscela tra di loro) in concentrazioni appositamente studiate per tenere sotto controllo lo sviluppo della flora microbica sull'alimento e stabilizzarne al massimo le caratteristiche sensoriali.

I gas maggiormente utilizzati per il confezionamento in atmosfera protettiva dei prodotti ittici sono il diossido di carbonio (**CO₂**), l'azoto (**N₂**) e l'ossigeno (**O₂**), tuttavia l'effettiva azione preservante è data da dalla CO₂, in associazione binaria o ternaria con gli altri gas (Wolfe, 1980).

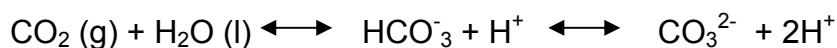
IL DIOSSIDO DI CARBONIO (CO₂)

L' anidride carbonica è un gas incolore dall'odore pungente soprattutto se usato ad elevate concentrazioni; solubile non solo in acqua ma anche nei lipidi ed è responsabile del maggior effetto batteriostatico e fungistatico dell'*atmosfera protettiva*. Agisce sui microrganismi nelle primissime fasi di crescita allungando il periodo di adattamento al substrato (*lag fase*) e successivamente inibendo la loro crescita logaritmica (*log fase*) (Farber, 1991).

L'effetto batteriostatico è influenzato dalla sua concentrazione all'interno della confezione, dalla carica batterica iniziale, dalle caratteristiche intrinseche della materia prima da confezionare (il pH elevato, come negli ittici, ne favorisce l'assorbimento sul prodotto) e soprattutto dalla temperatura di conservazione (Reddy *et al.*, 1992). È infatti dimostrato che la CO₂ è altamente solubile sia nella componente acquosa che in quella lipidica e codesta solubilità risulta essere inversamente proporzionale alla temperatura applicata* , quindi tanto più bassa è la temperatura tanto meglio si diffonderà la CO₂ nel prodotto e maggiore sarà il suo effetto inibente la crescita batterica (Haines, 1933; Gill and Tan, 1980; Ogrydziak and Brown, 1982).

* La solubilità della CO₂ in H₂O a 0 ° C e a 1 atm è 3,38 g CO₂/Kg H₂O; a 20 ° C è ridotta a 1,73 g CO₂/Kg H₂O (Knoche, 1980).

La solubilità della CO₂ porta la sua dissociazione nel prodotto alimentare (Knoche, 1980), secondo l'equazione:



Oppure per valori di pH < 8, tipici dei prodotti ittici, la concentrazione degli ioni carbonato potrebbe essere trascurata (Dixon and Kell, 1989):



La concentrazione della CO₂ nel prodotto alimentare dipende quindi dal contenuto in acqua e lipidi dell'alimento, dalla temperatura di conservazione applicata ma anche dalla pressione parziale di codesto gas nella "nuova atmosfera" secondo la legge di Henry (Ho *et al.*, 1987).

Devlieghere *et al.* (1998, 1998b) dimostrarono come la concentrazione della CO₂ nel prodotto alimentare influisse sull'inibizione della crescita batterica. L'azione antimicrobica, di tipo batteriostatico e/o battericida è quindi strettamente correlata ai suddetti fattori, ma anche alla flora su cui è chiamata ad agire. Gran parte delle muffe, molti lieviti e i batteri aerobi-stretti sono molto sensibili e vengono rapidamente inattivati. I batteri aerobi-anaerobi facoltativi (enterobatteriaceae) si comportano in modo variabile a seconda della specie. Alcuni lieviti e i batteri anaerobi più o meno stretti (lattobacilli, micrococchi, lattococchi, streptococchi, stafilococchi, *Clostridium* spp.) non vengono inibiti dall'anidride carbonica, anzi la condizione di anaerobiosi che si crea nella confezione ne favorisce lo sviluppo (se la temperatura ambiente lo permette) (Giaccone, 2000).

La crescita di un'abbondante microflora lattica nei prodotti confezionati sottovuoto e in atmosfera protettiva è valida sotto il profilo microbiologico, perché rallenta ed inibisce la proliferazione di microrganismi potenzialmente patogeni e/o alteranti. Non sempre, però, l'esisto complessivo è favorevole. Recenti studi hanno dimostrato che

nei filetti di gadiformi (merluzzi) confezionati sottovuoto, l'eccessivo sviluppo di batteri lattici proteolitici agisce sui composti azotati non proteici del pesce dando origine ad odori anormali e può far aumentare sensibilmente l'indice di TVB-N (azoto basico volatile totale).

Una volta aperta la confezione la CO₂ comincia ad essere rilasciata nell'ambiente esterno, tuttavia per un certo tempo persisterà sul prodotto l'azione antimicrobica dovuta al cosiddetto "effetto residuo" della CO₂ (Stammen *et al.*, 1990). La crescita microbica risulta infatti rallentata ancora per qualche tempo, sia per l'azione dell'acido carbonico indissociato, formatosi a seguito dell'assorbimento della CO₂ in superficie, sia per l'inibizione di alcuni enzimi batterici decarbossilanti (Silliker, 1981).

Numerosi esperimenti condotti in passato cercarono di spiegare come la CO₂ potesse esercitare il suo effetto conservante su i cibi ma, sia l'ipotesi della "non disponibilità" di O₂ (perché sostituita con altri gas), necessaria per il metabolismo batterico, sia l'abbassamento del pH dovuta alla dissociazione della CO₂ non furono esaustivi (Daniels *et al.*, 1985; Callow, 1932; Coyne 1932, 1933).

Studi più recenti attribuiscono alla CO₂ quattro meccanismi attivi sui microrganismi (Parkin and Brown, 1982; Daniels *et al.*, 1985; Dixon and Kell, 1989; Farber, 1991):

- Alterazione della membrana cellulare nelle funzioni di uptake e assorbimento delle sostanze nutritive
- Inibizione delle attività enzimatiche e delle reazioni da loro mediate
- Penetrazione nelle membrane batteriche e conseguenti critici cambi di pH
- Alterazione delle proprietà chimico-fisiche delle proteine

È ipotizzabile quindi, che l'azione antimicrobica derivi dalla una combinazione di queste attività.

Una certa quota (dipende dall'alimento) di CO₂ deve dissolversi nel prodotto per inibire la crescita batterica (Gill and Penney, 1988). Il rapporto (c.d. *G/P ratio*), tra il volume del gas e il volume del prodotto deve essere 2 : 1 o 3 : 1 (volume del gas due

o tre volte il volume del prodotto). Questo alto G/P ratio è anche necessario per prevenire un fenomeno noto come “collasso della confezione” (Parry,1993), dovuto alla quota di gas che si dissolve sull’alimento e che finisce per sottrarsi al volume di gas iniziale dando luogo ad una vera e propria implosione della confezione.

Un altro possibile inconveniente nell’uso di alte concentrazioni di CO₂ (>60%) è il “collo” che si può riscontrare all’interno della confezione poichè la dissoluzione del gas sulla superficie del muscolo riducendo il pH riduce anche la capacità delle proteine a basso peso molecolare di trattenere liquidi (Parry, 1993; Randell *et al.*, 1995; Davis, 1998).

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.

Non sempre un prodotto ittico può essere conservato in maniera valida confezionandolo sottovuoto o in atmosfera protettiva perché nell’intento di prolungarne il più possibile la vita commerciale, si rischia di conferirgli caratteristiche sensoriali più o meno sgradevoli.

Innanzitutto, bisogna ricordare che le carni di pesci, molluschi e crostacei possono presentare un colore molto variabile:

- molti pesci, crostacei, molluschi hanno carni relativamente chiare, per cui è meno evidente il pericolo della formazione di metamioglobina che porta al tipico inscurimento delle carni rosse confezionate sottovuoto. Un rischio del genere si configura per quei pesci che hanno carni piuttosto scure (come i tonni). Un confezionamento sottovuoto o in assenza di ossigeno si presterà bene alla conservazione dei primi, meno bene per i secondi.

- Il problema dell’imbrunimento dei pesci a carni rosse potrebbe essere ovviato con atmosfere protettive che prevedano anche una certa percentuale di O₂ (Cann *et al.*, 1983) ma, se da un lato ciò permette effettivamente di ottenere buoni risultati, dall’altro può dare problemi per quanto riguarda l’ossidazione dei lipidi in pesci particolarmente grassi (irrancidimento).

L'AZOTO (N₂)

L'azoto (N₂) è un gas quasi del tutto inerte che non interagisce con la sostanza organica con cui viene a contatto, è meno denso dell' aria e non è infiammabile, inodore e insapore non altera le caratteristiche sensoriali dell'alimento, inoltre la sua bassa solubilità in acqua e nei lipidi e lo scarso grado di permeare film e pellicole ne rendono ideale l'impiego come "gas di riempimento" così da prevenire il già citato collasso della confezione (Church and Parsons, 1995). Questo influirà positivamente sulla presentazione commerciale del prodotto assicurando un gradevole aspetto rigonfio della confezione.

Un'importante caratteristica dell' azoto è quella di esercitare un' azione inibitrice sugli enzimi proteolitici, prevenendo così la perdita di essudato 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.

L' N₂ viene anche utilizzata, come alternativa al sottovuoto, per sostituire l' O₂ nel confezionamento in atmosfera protettiva, al fine di ritardare l'irrancidimento ossidativo e inibire la crescita di microrganismi aerobi-stretti.

L'OSSIGENO (O₂)

L' ossigeno, che è un gas incolore ed inodore. Ha bassa solubilità in acqua (0.040 g/kg a 100 kPa e a 20° C); generalmente favorisce la crescita dei microrganismi aerobi stretti e anaerobi-facoltativi e nella A.P inibirebbe esclusivamente la crescita dei batteri anaerobi-stretti, sebbene i microrganismi anaerobi mostrano livelli di sensibilità diversi all'O₂ (Farber, 1991).

La presenza dell'ossigeno favorisce i processi di ossidazione dei lipidi; specificamente gli acidi grassi poliinsaturi sono molto instabili per via dei doppi legami e, a seguito di ossidazione, originano radicali liberi che, come è noto, attivano reazioni a catena che terminano con la produzione di composti a basso peso

molecolare come aldeidi, chetoni, alcoli e acidi carbossilici che conferiscono sapore sgradevole (Chen *et al.*, 1984); poiché i pesci hanno lipidi ricchi di acidi grassi mono e poliinsaturi, si sconsiglia l'uso dell'ossigeno nei prodotti ittici semigrassi e grassi (pesce azzurro, sgombri, tonni e anguille) per minimizzare i suddetti effetti.

L'utilizzo dell'O₂ nel confezionamento in atmosfera protettiva dei prodotti ittici è sostenuto da Davis (1995), che ne incentiva l'uso a fronte di prove che evidenziano una riduzione dell'essudazione durante la conservazione. L'autore suggerisce che l'O₂ può essere utilizzata nel confezionamento in MAP di pesci non grassi.

Per alcuni alimenti, comunque, l'ossigeno potrebbe o dovrebbe essere usato. Elevate quantità di O₂ (> 20%) sono utilizzate nella carni rosse e in alcuni pesci (tonni ad esempio) per mantenere il colore rosso della muscolatura e quindi per inibire la riduzione della ossimioglobina a metamioglobina che conferirebbe un colore scuro alle carni (Oka, 1989).

4.3 I materiali di confezionamento più adatti

Per confezionare un alimento sottovuoto o in atmosfera protettiva si impiegano quasi sempre pellicole e vaschette plastiche multistrati e/o metallizzate che, per la loro flessibilità, si adattano bene a seguire i contorni del prodotto alimentare da conservare. Per ottenere buoni risultati di conservazione, bisogna però che il materiale di confezionamento, qualunque esso sia, possieda determinati requisiti che assicurino la "tenuta" nel tempo dei requisiti di qualità e sicurezza; non sia cioè un semplice involucro passivo, bensì un elemento capace di interagire col prodotto condizionando la sua shelf life.

Buona resistenza alle sollecitazioni fisiche e meccaniche.

Dipende sia dai materiali che formano la pellicola sia dal suo spessore complessivo. In genere, i materiali più validi hanno anche una buona resistenza alle

escursioni termiche cui vengono esposti, ossia non devono accartocciarsi o diventare fragili con il congelamento né sciogliersi se esposti ad alte temperature.

Buona impermeabilità ai gas ed al vapore acqueo.

Forse è il requisito più importante di ogni buona pellicola plastica. Un materiale qualsiasi può, infatti, essere estremamente resistente alle sollecitazioni meccaniche, ma se non è sufficientemente impermeabile ai gas non è possibile utilizzarlo per mettere un alimento sottovuoto o in atmosfera protettiva. Questa impermeabilità (misurata in mm³ di ossigeno che filtrano attraverso 1 m² di pellicola in 24 ore, a temperatura di 22° C a pressione ambiente) dipende sia dalla porosità del materiale che dalle condizioni di temperatura, umidità e pressione atmosferica presenti nei locali di conservazione. Specialmente nel caso dei prodotti ittici è importante che la confezione ceda poco vapore acqueo, perché ciò comporterebbe un'eccessiva disidratazione dell'alimento. Anche la scarsa permeabilità ad ossigeno e anidride carbonica sono utili, specialmente nel caso del sottovuoto, dove la pressione esterna sulla confezione non è controbilanciata dalla presenza di gas all'interno della busta.

Azione "antifog"

Un'ulteriore proprietà che dovrebbero possedere i film plastici impiegati per il confezionamento in atmosfera protettiva è l'azione "antifog". Questa diminuendo la tensione superficiale delle goccioline che si creano nella confezione a seguito di sbalzi di temperatura, le aggregano in gocce più grosse impedendo l'appannamento della pellicola. Tale azione risulta essenziale al fine di garantire al consumatore una sempre nitida visibilità del prodotto attraverso il film plastico della confezione.

Innocuità per il consumatore.

È implicito che tutti i materiali destinati a venire a contatto con sostanze alimentari non devono cedere al substrato composti potenzialmente pericolosi per il

consumatore e neppure odori o sapori impropri. Quelle trasparenti ed incolore possono favorire fenomeni di ossidazione dei lipidi, catalizzati dalla luce e di ciò bisognerà tenere conto in base al tipo di prodotto ittico che viene confezionato. Anche in questo caso, esistono ormai moltissime industrie che possono fornire pellicole plastiche e altri materiali di confezionamento esplicitamente ideati per le atmosfere protettive.

4.4 Attuale diffusione del condizionamento in atmosfera protettiva degli alimenti

Attualmente si può condizionare in atmosfera protettiva qualunque tipo di prodotto alimentare, senza alcuna limitazione (se non quelle di tipo tecnico connesse al singolo alimento). L'industria usa questa metodica per prolungare la vita commerciale di carni di tutti i tipi (sia fresche sia trasformate), formaggi freschi e stagionati, caffè, pizze e altri prodotti da forno, paste con ripieno (tortellini, ravioli e simili), ortaggi di vario tipo e frutta, olive, sottaceti e tutta la gamma dei prodotti di gastronomia. Da ultimo, si stanno facendo strada, appunto, anche i prodotti della pesca confezionati in atmosfera protettiva.

A titolo puramente indicativo si riportano in Tabella 7 alcuni dati relativi all'aumento di *shelf-life* che questa tecnica consente di ottenere nei vari alimenti. Sono dati riassuntivi che mirano a sottolineare il fatto che in questo modo è possibile raddoppiare, se non triplicare, la conservabilità di prodotti che in genere associano ad un alto pregio commerciale una notevole deperibilità.

Tipologia di prodotto	Temperatura di conservazione	Shelf life (settimane)		
		Air	VP ^a	AP ^b
Carne (bovina, suina, pollame)	1,0 – 4,4° C	1 - 3	1 - 12	3 - 21

Pesce magro (merluzzo, scorpena, gadidi, carangidi)	0,0 – 4,0° C	1 - 2	1 - 2	1 - 3
Pesce grasso (sgombro, salmone, trota)	0,0 – 4,0° C	1 - 2	1 - 2	1 - 3
Crostacei e molluschi bivalvi (granchi, scampi, pettine)	0,0 – 4,0° C	½ - 2	-	½ - 3
Pesci tropicali (Pesce spada, tilapia)	2,0 – 4,0° C	½ - 2	-	2 - 4

a) VP: sottovuoto.

b) AP: Atmosfera Protettiva (Alte concentrazioni di CO₂ , 25 - 100%).

Tab. 7. Effetti dell'Atmosfera Protettiva su carne e pesce refrigerati.

I costi causati dal prezzo dei gas utilizzati, dal volume dell'imballaggio, chiaramente più grande del normale per via del fatto che deve contenere l'atmosfera modificata, il prezzo del materiale di cui è costituito l'imballaggio in funzione delle sue proprietà di barriera, i costi delle macchine, i controlli operati lungo la linea di produzione, le remore di carattere igienico-sanitario potrebbero rappresentare il rovescio della medaglia nella MAP dei prodotti ittici; tuttavia, l'estensione della *shelf-life*, la possibilità di scambi con mercati più lontani, la riduzione delle perdite nella grande distribuzione, la praticità del formato con la possibilità che il consumatore possa vedere il prodotto attraverso la confezione e lo possa manipolare più agevolmente inducendolo all'acquisto, porterebbe a ottimizzazioni nel marketing del prodotto fresco confezionato in atmosfera protettiva e ne stabilizzerebbe i prezzi.

4.5 AP e Legislazione

È opportuno ricordare che il confezionamento degli alimenti in atmosfere prodotte artificialmente dall'uomo e che hanno una composizione differente da quella dell'aria è regolamentato dal Decreto del Ministro della Sanità 16 marzo 1994, n. 266 ("Regolamento concernente le norme igienico-sanitarie relative al confezionamento in atmosfera modificata di determinati prodotti alimentari").

La dicitura "atmosfera modificata" è stata poi sostituita da quella di "atmosfera protettiva" in forza di quanto disposto dal Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 28 luglio 1997, n.311 che ha in parte modificato il D. Lgs. n.109/92 sull'etichettatura degli alimenti.

Il predetto D.M. n. 266/94, nella sua veste originale faceva esplicito divieto di confezionare in MAP tutti i prodotti della pesca. Con l'affinarsi delle tecniche di condizionamento e l'acquisizione di dati più aggiornati in merito, sono state verosimilmente superate quelle remore di tipo igienico-sanitario che il legislatore poteva avere avuto a suo tempo per proibire l'applicazione delle atmosfere protettive ai prodotti ittici. Ciò ha portato all'abrogazione degli artt. 1, 2 e 3 del citato Decreto MINISAN n. 266/94 (l'abrogazione si trova all'art. 20, comma 1, *lett. e*) dal D.M. 27.2.1996, n. 209 sull'impiego di additivi alimentari e coloranti).

Di conseguenza, dal punto di vista normativo possiamo concludere che:

- Attualmente è possibile confezionare senza alcun limite anche i prodotti della pesca in atmosfera protettiva.
- In forza di quanto previsto dagli articoli rimasti in vigore del predetto decreto e dal D. Lgs. n.109/92, sulle confezioni va comunque riportata la dicitura "Confezionato in atmosfera protettiva".
- I gas il cui uso è attualmente consentito sono:
l'*anidride carbonica* (E290), l'*argon* (E938), l'*elio* (E939), l'*azoto* (E941), il *protossido d'azoto* (E942), e l'*ossigeno* (E948).

4.6 Pericoli microbiologici connessi al confezionamento in atmosfera protettiva

Data per scontata la variabilità della flora microbica che può essere presente su un qualsiasi prodotto ittico che debba essere condizionato in atmosfera protettiva, si possono fare alcune puntualizzazioni in merito.

Nel caso dei prodotti della pesca si tende quasi sempre a portare il pesce in condizioni di anaerobiosi più o meno spinta, per frenare lo sviluppo della flora batterica Gram-negativa aerobia di cui è ricco il pesce fresco e che è responsabile della sua rapida degradazione, anche a temperatura di refrigerazione. Non bisogna, però, dimenticare che i prodotti della pesca possono veicolare facilmente microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo. Tali microrganismi potevano essere presenti in origine nella materia prima oppure arrivano ad inquinare la materia prima nelle varie fasi della lavorazione. Batteri quali *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* enterotossico e *Listeria monocytogenes* non vengono inibiti dal sottovuoto né dalla presenza nelle confezioni di elevate concentrazioni di CO₂, considerato anche che sovente siamo di fronte a ceppi psicotrofi, in grado di moltiplicare e di produrre tossine anche al disotto di 4° C.

La prevenzione di simili pericoli dovrà tenere conto di tutti questi aspetti e dei fattori di pH, tenore di acqua libera (a_w) e potenziale di ossido-riduzione che possono condizionare lo sviluppo di ogni singola specie microbica. In linea di massima, si può considerare che:

- la temperatura di conservazione del prodotto finito gioca un ruolo essenziale nel prevenire lo sviluppo dei predetti microrganismi. Mantenendo il più possibile l'alimento al disotto di 3° C abbiamo forti probabilità che nessuno dei patogeni citati sia in grado di moltiplicare attivamente.
- nel caso dell'atmosfera protettiva, non è mai opportuno programmare una miscela formata per il 100% da anidride carbonica, ma è consigliabile utilizzare in ogni caso anche basse percentuali di ossigeno (1-3%), possono prevenire la crescita di *Clostridium botulinum*.

- la microflora lattica che si sviluppa nei prodotti conservati in questo modo può contribuire a limitare la crescita di eventuali patogeni, producendo sia sostanze inibenti aspecifiche (batteriocine), efficaci proprio nei confronti dei clostridi e di *Listeria monocytogenes*, che acidi organici. Sono proprio questi ultimi, verosimilmente, che frenano la germinazione delle spore clostridiche e limitano lo sviluppo delle loro forme vegetative.

Si consideri l'importanza nella determinazione della differenza tra deperimento biologico di un prodotto, inteso come modificazione delle caratteristiche sensoriali tipiche dell'alimento legato alla proliferazione di microrganismi che rendono il prodotto non commerciabile, e lo sviluppo di patogenicità intesa come crescita della popolazione di una specie patogena che implica il rischio di malattie in caso di ingestione del prodotto. I due fenomeni possono verificarsi contemporaneamente oppure singolarmente. Siccome spesso il superamento della soglia di deperimento biologico precede lo sviluppo di patogenicità, si deve prestare molta attenzione a quei casi in cui l'atmosfera modificata determini l'inibizione dei microrganismi causanti deperimento prima dei patogeni; a questo proposito è molto importante il controllo della temperatura nella catena del freddo, onde evitare lo sviluppo di determinati microrganismi e per favorire la solubilizzazione dell'anidride carbonica (Cortesi and Visciano, 2001).

Vi sono alcune valutazioni da effettuare prima della realizzazione delle MAP. E' necessario scegliere l'atmosfera con la composizione più adatta per il prodotto che si vuole conservare, anche effettuando sperimentazioni che analizzino l'effetto dell'atmosfera sull'aroma del prodotto, oltre che sulle sue specifiche caratteristiche igieniche. Si testeranno atmosfere diverse finché si identificherà la composizione più adatta.

Chiaramente delle scelte vanno fatte anche per quanto riguarda il tipo di materiale con cui produrre la confezione. Sono importanti la permeabilità del materiale flessibile ai gas, la resistenza della confezione e la modalità con cui è stata effettuata la chiusura. Si deve chiaramente valutare la durata di conservazione garantita dalla confezione. Vi sono molti fattori che influenzano tale durata, come ad esempio la

natura del prodotto, la sua freschezza al momento del confezionamento e la temperatura a cui viene conservato, l'igiene dell' impianto di confezionamento, il mantenimento della catena del freddo, la qualità dei materiali usati per confezionare il prodotto, la precisione e l' efficienza delle macchine nel realizzare l' atmosfera voluta, la qualità della sigillatura della confezione.

CAPITOLO 5:

Sparus aurata (Linnaeus, 1758)

1.1 Biologia

L'orata (Linneo, 1758), specie molto importante dal punto di vista commerciale, appartiene alla famiglia Sparidae. Nella stessa famiglia rientrano molte altre specie (appartenenti ad 8 diversi generi), tra cui le più note sono il dentice (*Dentex dentex*), il pagro (*Pagrus pagrus*), la mormora (*Lithognathus mormyrus*), l'occhiata (*Oblada melanura*), diversi saraghi (*Diplodus* spp.) che notoriamente sono considerate pregiate dal punto di vista organolettico.

Le specie comprese in questa famiglia presentano molti caratteri in comune – corpo fusiforme, compresso, squame grandi, una sola pinna dorsale, pinna caudale bilobata, opercolo privo di spine, bocca piccola dotata di denti forti – tanto che la loro distinzione, soprattutto in età giovanile, è abbastanza difficoltosa e solo un occhio esperto riesce a identificarle immediatamente. L'orata è l'unica specie del genere *Sparus* presente in Mediterraneo. È comune nel Mediterraneo occidentale e settentrionale, ma è rara nella parte orientale e nel Mar Nero, dove non si riproduce; è presente anche nell'Atlantico orientale dalla Gran Bretagna a Capo Verde.

L'orata presenta un corpo ovale ma molto elevato e compresso ai lati con un peduncolo caudale relativamente sottile (Tortonese, 1975); la testa è robusta e il profilo anteriore del muso è accentuato (figura 4).

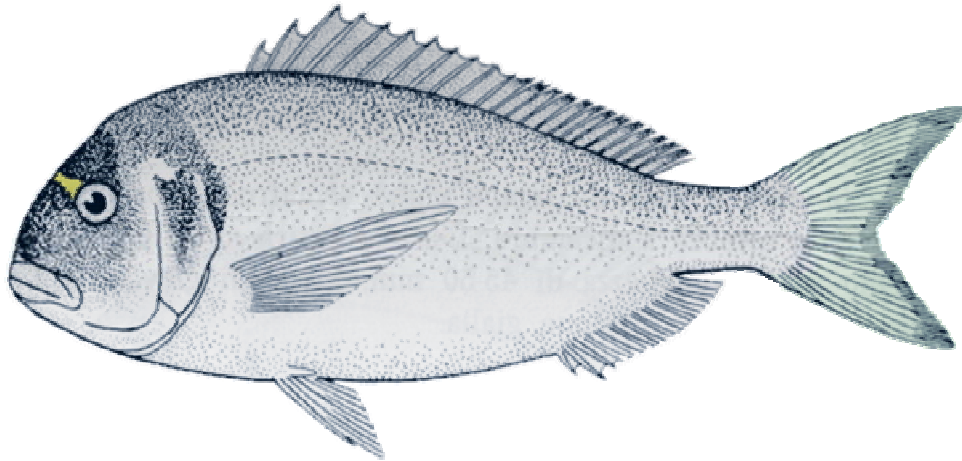


Figura 4. Esemplare adulto di *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758).

Tavola tratta da: Olivieri V. "Gli animali acquatici di interesse veterinario"

La bocca, dotata di labbra carnose, è piccola e la parte superiore (mascella) è leggermente prominente rispetto all'inferiore (mandibola); è dotata di 4-6 denti caniniformi nella parte anteriore, mentre nella parte posteriore della bocca sono presenti da 2 a 4 file di denti molariformi molto forti e adatti a frantumare il carapace di crostacei e le conchiglie dei molluschi. Negli individui oltre i 20 cm un molare della serie posteriore di entrambe le mascelle diviene molto grande (Fischer *et al.*, 1987).

Nella pinna dorsale sono presenti 11 raggi spinosi anteriormente e 12 o 13 molli nella parte posteriore. Nell'anale invece sono spinosi solo i primi tre raggi, mentre i restanti (11 o 12) sono molli (Fischer *et al.* 1987).

Le pinne pettorali sono abbastanza lunghe e acute, mentre le ventrali piuttosto corte. Le squame, presenti su tutto il corpo ad eccezione del muso, del preorbitale e dell'orbitale (Tortonese, 1975), sono ben evidenti così come la linea laterale.

La colorazione è tipica dei pesci che frequentano i fondali, con fianchi grigio-argentati (spesso sono presenti anche sottili linee nere), dorso grigio con riflessi azzurro-dorati; la pinna dorsale presenta riflessi grigio-azzurri ed è solcata nel mezzo da una linea nera, mentre la caudale, il cui margine posteriore è scuro, mostra una colorazione grigio-verdastra. Sulla parte superiore dell'opercolo, in corrispondenza della linea laterale, è presente un'evidente macchia nera leggermente orlata di rosso.

Caratteristica che conferisce il nome alla specie è la fascia dorata presente tra gli occhi, interposta fra due sottili bande nere, che è molto più evidente negli esemplari adulti.

Sparus aurata è specie abbastanza longeva che può raggiungere i 20 anni di età, la taglia di 70 cm e il peso di 5-6 kg, anche se in genere è comune tra 20 cm e 50 cm (Fischer *et al.*, 1987).

L'orata è un pesce demersale sedentario che vive solitario o in piccoli gruppi sotto costa, preferibilmente su fondali sabbiosi o su praterie di posidonia (i giovani si rinvergono fino a 40 m di profondità, gli adulti anche fino a 150 m (Froese *et al.* 2004), nutrendosi di crostacei e molluschi, ma anche di policheti e oloturie. In realtà, la dieta di questa specie varia molto con la taglia; infatti in età giovanile le prede preferite fanno parte dello zooplancton e sono rappresentate principalmente da piccoli crostacei, come copepodi e anfipodi (Martinelli *et al.*, 1994); con l'aumentare delle dimensioni le preferenze alimentari si indirizzano verso prede bentoniche come anfipodi e policheti; infine gli adulti sono carnivori predatori e si nutrono di molluschi e crostacei (Bini, 1968). In rari casi di scarsità di cibo, la specie può deviare verso una dieta a base di vegetali (Froese *et al.* 2004). La sua forte dentatura e la sua predilezione verso i molluschi rendono l'orata molto temuta dai mitilicoltori, per i danni che può provocare negli allevamenti.

Sparus auratus è una specie eurialina, che tollera cioè notevoli sbalzi di salinità, per cui, in genere all'inizio della primavera, migra all'interno delle lagune e degli stagni costieri, che abbandona invece al sopraggiungere della stagione fredda; l'orata infatti ha una scarsa resistenza alle basse temperature (temperature inferiori ai 5° C possono risultarle fatali) per cui d'inverno migra verso acque più profonde dove trova condizioni ambientali più favorevoli.

Nel periodo compreso fra ottobre e dicembre, a temperature che oscillano tra i 14° e i 16° C, avviene la riproduzione (Bini, 1968). L'orata è una specie ermafrodita proterandrica; questa complicata definizione indica che *Sparus auratus* durante la prima fase della vita, in particolare fino a circa due anni di età, presenta caratteristiche sessuali maschili, dopo di che avviene un'inversione sessuale che conferisce alla specie caratteristiche femminili. Nei maschi la maturità sessuale si

presenta intorno ai 20-30 cm mentre nelle femmine intorno ai 35-40 cm. Le uova fecondate hanno un diametro di 1 mm, sono pelagiche e dotate di una goccia oleosa per favorirne il galleggiamento (Alessio e Gandolfi, 1975). Dopo la schiusa, i giovani presentano una transitoria colorazione giallastra, fino alla lunghezza di 45-50 mm e migrano in acque lagunari o negli estuari dove trovano condizioni trofiche ideali per accrescersi velocemente.

1.2 Pesca ed allevamento

L'orata è pescata principalmente con attrezzi fissi come reti da posta (tremagli), nasse, palangari e lenze in genere; una frazione consistente proviene anche dalla pesca a strascico dove la specie rappresenta però una cattura occasionale.

In Italia la maggior parte delle catture realizzate in mare proviene dal Tirreno, dalla Sicilia, dalla Sardegna, dall'Alto e Medio Adriatico.

In base al Reg. CE 1626/94 la taglia minima pescabile è pari a 20 cm, in alcuni periodi dell'anno è tuttavia consentita, su autorizzazione, la cattura del novellame ai fini dell'allevamento, per mezzo di sciabiche e reti a circuizione. Le catture in mare, comunque, rappresentano una porzione via via sempre più piccola del totale.

Attualmente, infatti, gran parte delle orate reperibili sui mercati proviene dagli allevamenti realizzati nelle valli lagunari dell'Alto Adriatico e negli stagni costieri di Sardegna e Toscana (soprattutto per mezzo di lavorieri) o dalle gabbie in mare aperto (Sicilia). In particolare, è a partire dagli anni '80 che si è assistito ad un progressivo incremento della produzione proveniente da impianti di allevamento, soprattutto grazie alla grande diffusione, in tutto il bacino del Mediterraneo, di impianti di riproduzione artificiale, che hanno messo a disposizione degli allevatori milioni di avannotti di ottima qualità e a prezzi convenienti.

Le pratiche di allevamento dell'orata sembrano però avere origini antichissime, risalenti addirittura ai tempi dell'impero romano, durante il quale venivano realizzate delle vasche ad hoc alimentate con acqua di mare. Le tipologie di allevamento

possono essere ricondotte a 3 tipi fondamentali: allevamento estensivo, semi-estensivo e intensivo.

L'allevamento estensivo (vallicoltura, lagune costiere, stagni salati) si basa sul comportamento migratorio dei giovanili che entrano nelle lagune per accrescersi e le abbandonano per riprodursi; gli individui vengono catturati semplicemente per mezzo di attrezzi fissi posti al confine tra laguna e mare. In questo tipo di allevamento, in genere, l'uomo non deve intervenire con contributi energetici esterni, sotto forma di nutrimento, per ottenere l'accrescimento del prodotto, in quanto l'apporto trofico è totalmente a carico dell'ambiente.

L'allevamento semi-estensivo rappresenta uno sviluppo di quello estensivo; in questo caso la gestione dell'ambiente è in qualche modo pilotata e l'uomo interviene con apporti energetici esterni al sistema. L'accrescimento degli individui dipende perciò sia dalla disponibilità trofica in ambiente naturale sia dall'alimento somministrato dall'uomo. Questo tipo di allevamento può prevedere anche l'utilizzo di fertilizzanti per favorire la proliferazione fitoplanctonica e quindi l'aumento di biomassa zooplanctonica e bentonica, con conseguente maggior disponibilità di cibo in ambiente naturale. Spesso, l'allevamento semi-estensivo implica anche l'utilizzo di peschiere da sverno, che fungono da rifugio per i pesci nei periodi di raffreddamento eccessivo e dove viene fornito il cibo necessario per la crescita. Questo tipo di attività richiede superfici di allevamento inferiori rispetto al precedente.

L'allevamento intensivo, infine, ha lo scopo ultimo di riprodurre alte quantità in vasche ad alta densità (oltre 100 kg/mc); può realizzarsi sia in mare aperto, con gabbie galleggianti o sommerse (maricoltura), sia in vasche a terra e, in questo caso, a differenza dei precedenti, l'ambiente è totalmente controllato dall'uomo come pure la somministrazione di alimento e richiede notevoli apporti idrici, impianti di ossigenazione e aerazione per mantenere alto il livello di ossigeno disciolto. Un allevamento di tal genere prevede diverse componenti: gli schiuditoi per la deposizione delle uova, schiusa e prime fasi di crescita (fino a 2 g), avannotterie per le successive fasi di sviluppo, allevamenti per l'ingrasso costituiti, come accennato, da vasche in terra o gabbie in mare aperto, dove gli esemplari vengono nutriti fino a raggiungere la taglia commerciale di 300-500 grammi.

Uno dei maggiori produttori europei di pesci di allevamento resta la Grecia, che proponendo prezzi molto bassi entra in diretta competizione con i produttori italiani.

Negli ultimi anni lo sviluppo delle pratiche di acquacoltura in Mediterraneo ha alimentato sempre di più un notevole interesse alla diversificazione delle specie da allevare; questo deriva principalmente da una assuefazione dei consumatori al prodotto tradizionale e da una eccessiva produzione di quest'ultimo, che, superando la richiesta dei consumatori, determina il crollo dei prezzi. Tuttavia, grosse limitazioni all'allevamento di specie diverse da quelle tradizionali derivano dalle scarse conoscenze sulla biologia di riproduzione e dalla mancata messa a punto di metodi di allevamento larvale e di ingrasso. Attualmente, le specie autoctone oggetto di valutazione del potenziale di allevamento sono praticamente quasi tutti gli sparidi tra cui i pagelli (*Pagellus acarne*, *Pagellus bogaraveo*, *Pagellus erythrinus*), il dentice (*Dentex dentex*), il sarago maggiore (*Diplodus sargus*), sarago pizzuto (*Diplodus puntazzo*), sarago fasciato (*Diplodus vulgaris*), ma anche la ricciola (*Seriola dumerili*), il rombo chiodato (*Psetta maxima*).

1.3 Produzione e trends di consumo

L'orata viene commercializzata sia fresca (rientra fra le prime 10 specie di pesce fresco consumate in Italia) che allo stato congelato. Come già accennato, esemplari selvatici, catturati nel loro ambiente naturale, sono sempre più rari e attualmente circa il 90% delle orate acquistate proviene da allevamenti. In una prospettiva storica, l'allevamento di specie eurialine è in continua crescita seppur con tassi inferiori a quelli di altri paesi mediterranei; la produzione da allevamento intensivo è cresciuta al ritmo del 23% annuo nell'intervallo di tempo qui riportato (Tabella 7) e la maricoltura addirittura del 49% annuo. In confronto, l'aumento del raccolto da allevamento estensivo, con il 8% annuo, sembrerebbe addirittura in crisi. Le catture della pesca invece si sono mantenute pressoché stabili e nel 1995 per la prima volta sono state inferiori all'output dell'allevamento.

L'orata viene di preferenza acquistata allo stato fresco e ormai è facilmente reperibile in tutti i punti di vendita al dettaglio e nei ristoranti in cui viene preparato il pesce. L'orata ha maggiore seguito al Centro (30%) ed al Sud (45%).

	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	tvma
intensivo	700	600	700	1.250	1.428	1.605	3.100	3.050	23,4%
estensivo	850	1.000	950	1.088	1.058	1.145	1.450	1.500	8,5%
maricoltura	130	350	250	165	410	550	900	2.150	49,3%
ACQUACOLTURA	1.680	1.950	1.900	2.503	2.896	3.300	5.450	6.700	21,8%
PESCA	5.389	5.295	4.799	5.515	5.741	5.425	6.406	5.659	0,7%
PRODUZIONE	7.069	7.245	6.699	8.018	8.637	8.725	11.856	12.359	8,3%

Fonte: elaborazione su dati FAO (1997), ISTAT (Statistiche della pesca e della caccia).

Tab. 7. Andamento di produzione e pesca di orate e branzini in Italia (quantità espressa in tonnellate)

Dati più recenti che delineano meglio l'attuale situazione su produzione, esportazioni e consumi è riportata dalla Tabella 8.

VARIABILI	2000	2001	2002	2003	2004
Produzione	95.3	91.6	86.7	97.5	
mondiale (1)	89	82	80	51	-
Pesca	8.10	9.53	9.43	8.13	
	1	0	7	6	-
Acquacoltura	87.2	82.1	77.3	89.4	
	88	52	43	15	-
Produzione Ue	62.7	69.2	64.8	69.5	
(1)	23	43	14	98	-
Pesca	3.97	5.63	5.16	4.84	
	6	8	8	7	-
Acquacoltura	58.7	63.6	59.6	64.7	
	47	05	46	51	-

ITALIA					
Produzione (1)	7.93	10.4	7.96	11.9	-
	9	75	3	99	
Pesca	1.93	2.67	3.00	2.99	-
	9	5	4	9	
Acquacoltura	6.00	7.80	4.95	9.00	-
	0	0	9	0	
Importazioni (2)	10.9	12.4	12.2	12.0	12.7
	75	04	03	13	53
Esportazioni (2)	1.18	1.79	1.31		
	1	3	2	889	897

Note:

(1) La produzione mondiale, Ue ed italiana, suddivisa tra pesca e acquacoltura, è fonte FAO e si riferisce alla denominazione scientifica presa in esame.

(2) Le importazioni e le esportazioni sono fonte ISTAT e si riferiscono al prodotto "orate" fresche, congelate, conservate, secche, salate e affumicate.

Tab. 8. Produzione, importazioni, esportazioni, consumi (quantità espressa in tonnellate).

All'interno dell'Unione Europea, il consumo medio pro capite dei prodotti ittici è molto elevato: la media mondiale è pari a 13 kg, contro i 22,5 kg dell'UE.

Analizzando la situazione a livello di ogni singolo Paese vediamo che il primo posto è occupato dal Portogallo (58,6 kg), seguito dalla Spagna (38,4 kg) e dalla Francia (29 kg).

L'Italia si trova in una posizione intermedia, avendo registrato un consumo pro capite di 23 kg (Tabella 9).

Paesi	Consumo pro capite annuo
Portogallo	58,6 kg
Spagna	38,4 kg
Francia	29,0 kg
Italia	23,0 kg
Grecia	22,5 kg
Danimarca	20,5 kg
Belgio, Lussemburgo	18,6 kg
Regno Unito	18,5 kg
Irlanda	15,1 kg
Germania	12,5 kg
Olanda	11,4 kg
UE	22,6kg

Fonte: FAO (2002).

Tab. 9. Consumo pro capite di pesce nei paesi dell'Unione Europea.

Circa la metà delle famiglie italiane (51%) consuma i pesci almeno una volta la settimana, con il 55% che preferisce i pesci “freschi” e scongelati; gli altri reparti mostrano un trend medio come segue: pesci congelati 23%, pesci conservati 18% ed il reparto di gastronomia ittica (salati ed affumicati) il 4%.

Prima il consumatore era influenzato nelle scelte dei prodotti esclusivamente dal prezzo; oggi, altri parametri assumono un peso sempre più rilevante: qualità, freschezza, valore nutrizionale primariamente, novità e praticità nella preparazione in secondo luogo, che al giorno d’oggi sono elementi che determinano il mercato di sbocco dei singoli prodotti. In generale, i consumatori italiani preferiscono le referenze ad alto contenuto di servizi, già pulite e facili alla preparazione

Secondo la banca dati dell'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) dal punto di vista nutrizionale le carni dell'orata risultano ricche di proteine (19,7 g/100 g di parte edibile) e povere di grassi (8,4 g/100 g).

Queste caratteristiche fanno dell'orata un pesce magro e facilmente digeribile con un contenuto calorico molto basso, pari a circa 80 calorie per 100 grammi di prodotto. Fra i sali minerali risultano degni di nota il fosforo (1050 mg/100g) e il calcio (30 mg/100g).

CAPITOLO 6:

Tracciabilità ed etichettatura dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura

L'elevato numero di specie di interesse commerciale da identificare con precisione ed univocità, le problematiche legate alla complessità dell'ambiente marino e delle acque interne ed inoltre le particolarità dei sistemi di pesca e di allevamento, rendono il settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura tra i più complessi tra i settori alimentari.

Inoltre, se in passato la commercializzazione dei prodotti ittici avveniva solo nelle pescherie e riguardava quasi esclusivamente specie "locali" ben conosciute dal consumatore, allo stato attuale più della metà del prodotto ittico ha le più svariate provenienze ed i luoghi di commercializzazione sono i più vari fino a coinvolgere il commercio elettronico effettuato via internet.

Appare necessario all'Unione Europea ed ai singoli Stati membri fornire al consumatore, attraverso un sistema di etichettatura e rintracciabilità, indicazioni precise che forniscano elementi di trasparenza nella identificazione del prodotto oggetto di compravendita anche in assenza di un rapporto diretto con il commerciante.

Il REGOLAMENTO (CE) N. 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 procedure nel campo della sicurezza alimentare, *Articolo 3 - Altre definizioni -*

fornisce la definizione di «rintracciabilità», definendola come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale

destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione.

Lo stesso regolamento all' *Articolo 18* – Rintracciabilità – sancisce che:

1. È disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime.

2. Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. A tal fine detti operatori devono disporre di sistemi e di procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, che le richiedano, le informazioni al riguardo.

3. Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono disporre di sistemi e procedure per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti. Le informazioni al riguardo sono messe a disposizione delle autorità competenti che le richiedano.

4. Gli alimenti o i mangimi che sono immessi sul mercato della Comunità o che probabilmente lo saranno devono essere adeguatamente etichettati o identificati per agevolarne la rintracciabilità, mediante documentazione o informazioni pertinenti secondo i requisiti previsti in materia da disposizioni più specifiche.

Le informazioni obbligatorie in ogni stadio della commercializzazione dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, in conformità all'art. 8 del regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione - Applicativo del REGOLAMENTO (CE) N. 104/2000- sono elencate all'art. 2 del Decreto Ministero Politiche agricole e forestali 27.03.2002 "Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo" che testualmente recita:

1. In conformità all'art. 8 del regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione le informazioni obbligatorie in ogni stadio della commercializzazione, ai fini della tracciabilità, sono le seguenti:

- a) la denominazione commerciale, secondo l'elenco richiamato nel successivo art. 3 del presente decreto;
- b) la denominazione scientifica della specie interessata;
- c) il metodo di produzione come definito dall'art. 4 del regolamento (CE) n. 2065/2001;
- d) la zona di cattura come definita dall'art. 5 del regolamento (CE) n. 2065/2001.

Denominazione commerciale e denominazione scientifica sono riportate in un elenco allegato al decreto ministeriale 27 marzo 2002. Tab. n. 10

Nr.	Ordine	Famiglia	Genere e specie	Denominazione in lingua italiana
270	Perciformes	Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	Orata

Tab. n. 10 Struttura della tabella allegata al D.M. 27.03.2002

L'elenco è stato sostituito dal D.M. 14 gennaio 2005 - Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale, ai sensi del regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001., a sua volta successivamente modificato da D.M. 25 Luglio 2005 "in considerazione della necessità di apportare alcune modifiche e di integrare l'elenco di cui al decreto ministeriale 14 gennaio 2005 in base ad alcune segnalazioni degli operatori del settore". Tab. n. 11

Nr.	Ordine	Famiglia	Genere e specie	Demonimazione in lingua italiana
66	Gadiformes	Gadidae	<i>Gadus macrocephalus</i>	Merluzzo nordico Merluzzo del Pacifico
67	Gadiformes	Gadidae	<i>Gadus morhua</i>	Merluzzo nordico Merluzzo

90	Gadiformes	Merluccidae	<i>Merluccius hubbsi</i>	Nasello atlantico o merluzzo atlantico
91	Gadiformes	Merluccidae	<i>Merluccius merluccius</i>	Nasello o merluzzo
92	Gadiformes	Merluccidae	<i>Merluccius paradoxus</i>	Nasello dell'Oceano Indiano o merluzzo dell'Oceano Indiano
93	Gadiformes	Merluccidae	<i>Merluccius polli</i>	Nasello atlantico o merluzzo atlantico
94	Gadiformes	Merluccidae	<i>Merluccius productus</i>	Nasello del Pacifico o merluzzo del Pacifico

Tab. n. 11 Modifiche di una certa rilevanza apportate dal D.M. 25 Luglio 2005

Il metodo di produzione è definito dall'art. 4 del regolamento (CE) n. 2065/2001 di seguito riportato:

L'indicazione del metodo di produzione, conformemente all'articolo 4, paragrafo 1, lettera b), del regolamento (CE) n.104/2000 comporta una delle seguenti menzioni, a

seconda che si tratti di prodotti della pesca in mare, o in acque interne o di acquacoltura:

...omissis

— in lingua italiana:

«... prodotto della pesca ...», oppure «... prodotto della pesca in acque dolci ...», oppure «... prodotto di acquacoltura...»

Le suddette menzioni risultano attualmente modificate con Nota n. 21229 del 21.12.2001 del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali avente per Oggetto: Regolamento 2065/01 – Informazioni ai consumatori – Rettifica del testo in lingua italiana di seguito riportata:

...omissis...

Nelle more che tale procedura sia finalizzata ed in accordo con la Commissione Europea, le suddette diciture dei “metodi di produzione” da utilizzare nell’etichettatura dei prodotti della pesca, sono le seguenti:

- 1) "Pescato" in luogo di "prodotto della pesca"
- 2) "Pescato in acque dolci" in luogo di "prodotto della pesca in acque dolci"
- 3) "Allevato" in luogo di "prodotto di acquacoltura"

Ai sensi dell'art. 4 del Regolamento (CE) n. 2065/2001 della Commissione del 22 ottobre 2001, "Per le specie pescate in mare lo Stato membro può autorizzare l'omissione del metodo di produzione nella vendita al consumatore finale, a condizione che risulti chiaramente dalla denominazione commerciale e dalla zona di cattura che si tratta di una specie pescata in mare. Tale autorizzazione non è concessa in caso di dubbi sul metodo di produzione". Tale autorizzazione, in Italia è concessa dalla CIRCOLARE 27 MAGGIO 2002, N. 1329 METODO DI PRODUZIONE che testualmente recita:

...omissis

Quando non vi sono dubbi circa la provenienza del prodotto dalla pesca in mare, è consentito omettere, nella vendita al consumatore finale, il metodo di produzione.

Ciò vale, in particolare, per quelle specie che sicuramente sono catturate in mare (es.: sardine, acciughe, sgombri, ecc...).

L'indicazione della zona di cattura, conformemente all'articolo 4, paragrafo 1, lettera c), del regolamento (CE) n. 104/2000, comporta le seguenti menzioni:

a) per i prodotti pescati in mare, la menzione di una delle zone di cui all'allegato; Tab. n. 12 , Fig. n. 4

b) per i prodotti pescati in acque dolci, la menzione dello Stato membro o del paese terzo di origine del prodotto;

c) per i prodotti di allevamento, la menzione dello Stato membro o del paese terzo di allevamento in cui si è svolta la fase finale di sviluppo del prodotto. Quando l'allevamento è avvenuto in più Stati membri o paesi terzi, lo Stato membro in cui si effettua la vendita al consumatore finale può autorizzare, al momento di tale vendita, l'indicazione dei diversi Stati membri o paesi terzi di allevamento.

2. Gli operatori possono menzionare una zona di cattura più precisa.

<i>ALLEGATO</i> Zone di cattura	Definizione della zona (1)
Atlantico nord-occidentale	Zona FAO n. 21
Atlantico nord-orientale (2)	Zona FAO n. 27
Mar Baltico	Zona FAO n. 27.IIIId
Atlantico centro-occidentale	Zona FAO n. 31
Atlantico centro-orientale	Zona FAO n. 34
Atlantico sud-occidentale	Zona FAO n. 41
Atlantico sud-orientale	Zona FAO n. 47
Mar Mediterraneo	Zona FAO n. 37.1, 37.2 e 37.3
Mar Nero	Zona FAO n. 37.4
Oceano Indiano	Zona FAO n. 51 e 57
Oceano Pacifico	Zona FAO n. 61, 67, 71, 77, 81 e 87
Antartico	Zona FAO n. 48, 58 e 88

(1) *Annuario FAO. Statistiche di pesca. Catture, Vol. 86/1. 2000*
(2) *Mar Baltico escluso.*

Tab. n. 12 Zone di cattura per i prodotti pescati in mare. Allegato al Regolamento (CE) n. 2065/2001

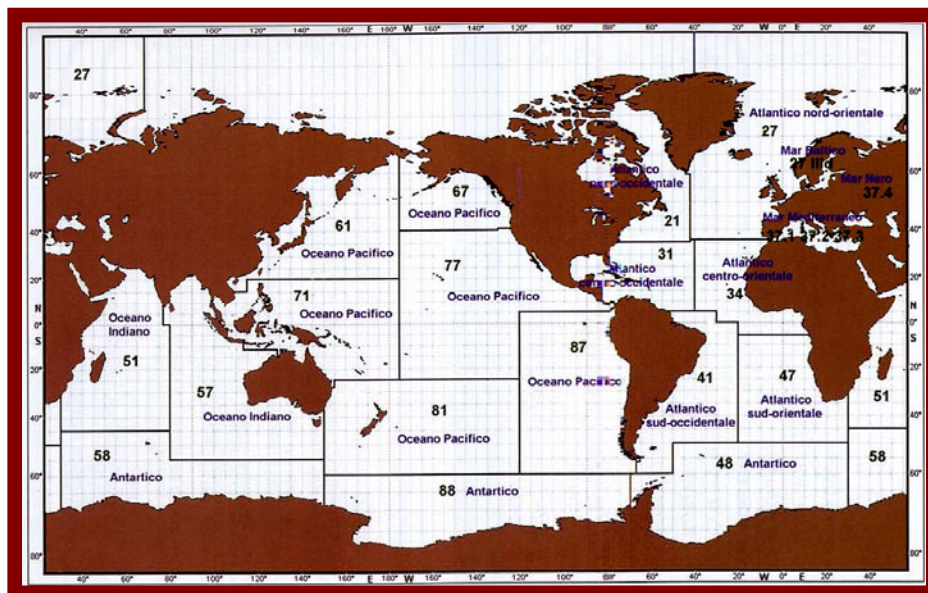


Fig. n. 4 Zone FAO

Da quanto sin qui esposto, le informazioni obbligatorie da rendere al consumatore nel caso di vendita al dettaglio di orate fresche sarà la seguente. Fig. n. 5



Fig. n. 5 Esempi di corretta etichettatura dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura commercializzati al dettaglio allo stato sfuso

Per i prodotti confezionati vanno riportate in etichetta le indicazioni obbligatorie comuni a tutti gli alimenti confezionati di cui all'art.3 del D.L.vo n. 109\92 sull'etichettatura dei prodotti alimentari come modificato dal DECRETO LEGISLATIVO 23 giugno 2003, n.181 Attuazione della direttiva 2000/13/CE

concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità di seguito riportate:

«Art. 3 (Elenco delle indicazioni dei prodotti preconfezionati).

- 1. Salvo quanto disposto dagli articoli successivi, i prodotti alimentari preconfezionati destinati al consumatore devono riportare le seguenti indicazioni:

- a) la denominazione di vendita;
- b) l'elenco degli ingredienti;
- c) la quantità netta o, nel caso di prodotti preconfezionati in quantità unitarie costanti, la quantità nominale;
- d) il termine minimo di conservazione o, nel caso di prodotti molto deperibili dal punto di vista microbiologico, la data di scadenza;
- e) il nome o la ragione sociale o il marchio depositato e la sede o del fabbricante o del confezionatore o di un venditore stabilito nella Comunità economica europea;
- f) la sede dello stabilimento di produzione o di confezionamento;
- g) il titolo alcolometrico volumico effettivo per le bevande aventi un contenuto alcolico superiore a 1,2% in volume;
- h) una dicitura che consenta di identificare il lotto di appartenenza del prodotto;
- i) le modalità di conservazione e di utilizzazione qualora sia necessaria l'adozione di particolari accorgimenti in funzione della natura del prodotto;
- l) le istruzioni per l'uso, ove necessario;
- m) il luogo di origine o di provenienza, nel caso in cui l'omissione possa indurre in errore l'acquirente circa l'origine o la provenienza del prodotto;
- m-bis) la quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti come previsto dall'art.8.

2. Le indicazioni di cui al comma 1 devono essere riportate in lingua italiana; e' consentito riportarle anche in più lingue. Nel caso di menzioni che non abbiano corrispondenti termini italiani, e' consentito riportare le menzioni originarie.

3. Salvo quanto prescritto da norme specifiche, le indicazioni di cui al comma 1 devono figurare sulle confezioni o sulle etichette dei prodotti alimentari nel momento in cui questi sono posti in vendita al consumatore.

4. Il presente decreto non pregiudica l'applicazione delle norme metrologiche, fiscali e ambientali che impongono ulteriori obblighi di etichettatura.

5. Per sede si intende la località ove e' ubicata l'azienda o lo stabilimento.

5-bis. Con decreto del Ministro delle attività produttive e del Ministro delle politiche agricole e forestali sono definite le modalità ed i requisiti per l'indicazione obbligatoria della dicitura di cui al comma 1, lettera m).».

E', inoltre obbligatoria l'indicazione del Termine minimo di conservazione di cui all'art. 10 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109 come modificato dall' art.8 del D. L.vo 23 giugno 2003, n.181 o della data di scadenza di cui all'art. 10 bis inserito dopo l'art 10 del D.L.vo 109\92 dall'art. 9 del D.L.vo 181\2003.

Art. 10. (Termine minimo di conservazione).

- 1. Il termine minimo di conservazione e' la data fino alla quale il prodotto alimentare conserva le sue proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione; esso va indicato con la dicitura "da consumarsi preferibilmente entro" quando la data contiene l'indicazione del giorno o con la dicitura "da consumarsi preferibilmente entro la fine" negli altri casi, seguita dalla data oppure dalla indicazione del punto della confezione in cui essa figura.

2. Il termine minimo di conservazione, che non si applica ai prodotti di cui all'articolo 10-bis, e' determinato dal produttore o dal confezionatore o, nel caso di prodotti importati, dal primo venditore stabilito nell'Unione europea, ed e' apposto sotto la loro diretta responsabilità.

3. Il termine minimo di conservazione si compone dell'indicazione in chiaro e nell'ordine, del giorno, del mese e dell'anno e può essere espresso:

- a) con l'indicazione del giorno e del mese per i prodotti alimentari conservabili per meno di tre mesi;
- b) con l'indicazione del mese e dell'anno per i prodotti alimentari conservabili per più di tre mesi ma per meno di diciotto mesi;
- c) con la sola indicazione dell'anno per i prodotti alimentari conservabili per più di diciotto mesi.

4. Qualora sia necessario adottare, in funzione della natura del prodotto, particolari accorgimenti per garantire la conservazione del prodotto stesso sino al termine di cui al comma 1 ovvero nei casi in cui tali accorgimenti siano espressamente richiesti da norme specifiche, le indicazioni di cui al comma 1 completano l'enunciazione delle condizioni di conservazione.

Art. 9. Data di scadenza

1. Dopo l'articolo 10 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n.109, e' inserito il seguente:

Art. 10-bis (Data di scadenza).

- 1. Sui prodotti preconfezionati rapidamente deperibili dal punto di vista microbiologico e che possono costituire, dopo breve tempo, un pericolo per la salute

umana, il termine minimo di conservazione e' sostituito dalla data di scadenza; essa deve essere preceduta dalla dicitura "da consumarsi entro" seguita dalla data stessa o dalla menzione del punto della confezione in cui figura.

2. La data di scadenza comprende, nell'ordine ed in forma chiara, il giorno, il mese ed eventualmente l'anno e comporta la enunciazione delle condizioni di conservazione, e, qualora prescritto, un riferimento alla temperatura in funzione della quale e' stato determinato il periodo di validità.

3. Per i prodotti lattieri freschi, per i formaggi freschi, per la pasta fresca, nonché per le carni fresche ed i prodotti della pesca e dell'acquacoltura freschi, la data di scadenza può essere determinata con decreti dei Ministri delle attività produttive, delle politiche agricole e forestali e della salute, sulla base della evoluzione tecnologica e scientifica.

4. Per il latte, escluso il latte UHT e sterilizzato a lunga conservazione, la data di scadenza e' determinata con decreto dei Ministri delle attività produttive, delle politiche agricole e forestali e della salute, sulla base della

evoluzione tecnologica e

scientifica. Con l'entrata in vigore del presente decreto cessa di avere efficacia ogni diversa disposizione relativa alla durabilità del latte.

5. E' vietata la vendita dei prodotti che riportano la data di scadenza a partire dal giorno successivo a quello indicato sulla confezione.».

La data di scadenza differisce dal “Tmc” (“da consumarsi preferibilmente entro”) oltre il quale è ancora possibile consumare il prodotto. Il Tmc infatti si riferisce alle caratteristiche organolettiche e di appeal piuttosto che ai requisiti di sicurezza. Per i prodotti preconfezionati che riportano la bollatura sanitaria, L'indicazione della sede dello stabilimento di fabbricazione o di confezionamento, di cui all'articolo 3, comma 1, lettera f), può essere omessa ai sensi del comma 1 dell'art. 11 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, sostituito dall'art. 10 del D. L.vo 23 giugno 2003, n.181.

Art. 10.

Sede dello stabilimento

1. Il comma 1 dell'articolo 11 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, e' sostituito dal seguente:

«1. L'indicazione della sede dello stabilimento di fabbricazione o di confezionamento, di cui all'articolo 3, comma 1, lettera f), può essere omessa nel caso di:

a) stabilimento ubicato nello stesso luogo della sede già indicata in etichetta, ai sensi dell'articolo 3, comma 1, lettera e);

b) prodotti preconfezionati provenienti da altri Paesi per la vendita tal quali in Italia;

c) prodotti preconfezionati che riportano la bollatura sanitaria.». Fig. n. 6



Fig. n. 6 Esempio di bollatura sanitaria

È opportuno ricordare che il confezionamento degli alimenti in atmosfere prodotte artificialmente dall'uomo e che hanno una composizione differente da quella dell'aria è regolamentato dal decreto del Ministro della sanità 16 marzo 1994, n. 266 ("Regolamento concernente le norme igienico-sanitarie relative al confezionamento in atmosfera modificata di determinati prodotti alimentari"). La dicitura "atmosfera modificata" è stata poi sostituita da quella di "atmosfera protettiva" in forza di quanto disposto dal Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 28 luglio 1997, n.311 che ha in parte modificato il D. Lgs. n. 109/92 sull'etichettatura degli alimenti. Il predetto D.M n.266/94, nella sua veste originale faceva esplicito divieto di confezionare in MAP tutti i prodotti della pesca. Con l'affinarsi delle tecniche di condizionamento e l'acquisizione di dati più aggiornati in merito, sono state verosimilmente superate quelle remore di tipo igienico-sanitario che il legislatore poteva avere avuto a suo tempo per proibire l'applicazione delle atmosfere protettive ai prodotti ittici. Ciò ha portato all'abrogazione degli artt. 1, 2 e 3 del citato decreto n. 266/94 (l'abrogazione si trova all'art. 20, comma 1, *lett. e*) del D.M. 27.2.1996, n. 209 sull'impiego di additivi alimentari e coloranti). Di conseguenza, dal punto di vista normativo possiamo concludere che:

- Attualmente è possibile confezionare senza alcun limite anche i prodotti della

pesca in atmosfera protettiva.

· In forza di quanto previsto dagli articoli rimasti in vigore del predetto decreto e dal D. Lgs. n.109/92, sulle confezioni va comunque riportata la dicitura “Confezionato in atmosfera protettiva”.



Fig. n. 5a Esempi di corretta etichettatura dei prodotti della pesca e della acquacoltura commercializzati al dettaglio confezionati in atmosfera protettiva

SCOPO DELLA TESI

Sparus aurata, in relazione alle considerazioni precedentemente fatte, è sicuramente una delle specie più apprezzate e commercializzate nel nostro paese.

È evidente, di conseguenza, l'attenzione dell'industria alimentare e dei ricercatori a perfezionare modalità atte a prolungare la vita conservativa del prodotto fresco.

Obiettivo del presente programma di ricerca è studiare e caratterizzare aspetti relativi alla qualità, all'igiene e sanità, alla conservabilità ed alla tracciabilità dei prodotti ittici variamente preparati e confezionati e di stimare l'eventuale prolungamento della shelf-life del prodotto fresco conservato a temperature di refrigerazione, adottando due diverse atmosfere protettive.

Ai sensi dell'art. 2, punto f) del Regolamento 2073/2005, per shelf-life si può intendere il periodo che precede il:

- ✓ Termine minimo di conservazione
- ✓ Data di scadenza

DS e TMC sono definiti entrambi dal produttore.

In questo modo sarà possibile conferire ai prodotti ittici un valore aggiunto derivante dalla possibilità di certificarne l'origine ed attestarne la sicurezza in un'ottica di filiera.

I parametri presi in esame per valutare l'andamento della *shelf-life* e contestualmente la *consumabilità* del prodotto sono stati: caratteristiche sensoriali, fisiche, chimiche e microbiologiche.

MATERIALI E METODI

Preparazione dei campioni

N° 6 lotti per un totale di 216 orate fresche (*Sparus aurata*) sono state raccolte, in tempi diversi, in due impianti di maricoltura italiani situati in aree marine situati rispettivamente: nel Tirreno settentrionale e nel Tirreno meridionale

I pesci, del peso medio di 254,76g (max 310,00g min 196,00g) e di lunghezza media di 23,56cm (max 26,0cm min 21cm) subito dopo la raccolta sono stati posti in vasche con acqua salata e ghiaccio fino al sopraggiungimento della morte per shock termico. Il trasporto fino al laboratorio è stato effettuato utilizzando cassette di polistirolo contenente ghiaccio a scaglie in rapporto di 2:1.

Giunti in laboratorio, i campioni, identificati con le sigle del tratto di mare di provenienza (TS, TM), sono stati confezionati in due diverse atmosfere da noi elaborate, entro 24-48 h dalla pesca, utilizzando film plastici di poliammide laminato estruso (spessore 25 μ).

Le atmosfere denominate ApA ed ApB erano come di seguito composte:

- Atmosfera protettiva A (ApA) 60% CO₂ 40% N₂;
- Atmosfera protettiva B (ApB) 60% CO₂ 20% O₂ 20% N₂;

La composizione di queste due miscele è stata frutto di una attenta elaborazione della bibliografia in nostro possesso.

Ricerche condotte da Parry *et al.* (1993) e da Randell *et al.* (1995) hanno, infatti, evidenziato che atmosfere con percentuali di CO₂ superiori al 60% non solo non manifestano un incremento dell'attività antimicrobica, ma, riducendo il pH, abbassano la capacità delle proteine a trattenere l'acqua con conseguente comparsa di perdite per colio. La scelta nella seconda tesi (ApB) di utilizzare O₂ è da mettere in relazione agli studi condotti da Davis *et al.* (1995), i quali hanno dimostrato quanto questo gas riduca l'essudazione del pesce durante lo stoccaggio ed inibisca la crescita potenziale di microrganismi anaerobi stretti (*Clostridium botulinum* tipo E).

Ogni confezione contenente due soggetti è stata, quindi, identificata con la sigla del tratto di mare di provenienza (TS, TM), e del tipo di miscela utilizzata così come illustrato in tabella 13.

TM ApA	TM ApB	TS ApA	TS ApB
Provenienza: Tirreno meridionale atmosfera A	Provenienza: Tirreno meridionale atmosfera B	Provenienza Tirreno settentrionale atmosfera A	Provenienza: Tirreno settentrionale atmosfera B

Tab. 13. Sigle di identificazione dei campioni oggetto della sperimentazione.

Ogni confezione, contenente due orate è stata analizzata agli intervalli riportati nella tabella 14.

Giorni di confezionamento	1°	5°	7°	12°	15°	19°
Atmosfera A	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS
Atmosfera B	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS	TM TS

TM = campioni provenienti dal Tirreno meridionale

TS = campioni provenienti dal Tirreno settentrionale

Tab. 14 – Schema degli intervalli delle analisi effettuate.

Le indagini hanno riguardato analisi di tipo sensoriale, fisiche, chimico e microbiologico.

Analisi sensoriale

Allo scopo di assicurare l'oggettività del giudizio, l'analisi sensoriale è stata condotta mediante il Quality Index Method (QIM), secondo le indicazioni di Huidobro *et al.* (2000), su tutti i soggetti per ciascuno degli intervalli di tempo stabiliti.

Questo metodo descrittivo, semplice e veloce, elaborato dai Ricercatori del Tasmanian Food Research Unit, consiste nell'attribuire a determinati parametri del pesce crudo (pelle, occhi, branchie, ecc.) un punteggio (da 0 a 3).

Il sistema permette di non dare importanza eccessiva ai singoli attributi, evitando che un campione possa venire scartato sulla base di una singola caratteristica negativa.

La somma dei punti di ciascun parametro dà un punteggio QIM totale, linearmente correlato alla freschezza del prodotto rispetto ai giorni di conservazione. Punteggi vicini allo 0 attestano un miglior stato di freschezza del prodotto. In questo modo è possibile ottenere una stima accurata della *shelf-life* rimanente.

Negli ultimi anni sono state sviluppate metodiche QIM per molte specie ittiche e tra le più recenti, date le esigenze di mercato, quelle per *Sparus Aurata* (Huidobro *et al.*, 2000).

Il QIM sviluppato per l'orata include 8 parametri da valutare e si assegneranno fino ad un totale di 15 punti di demerito come mostra la tabella 15.

	parametri	Attributi	Articolo VII. Punti demerito	
Articolo VIII.	Aspetto	Pelle	Molto brillante	0
			Brillante	1
			Opaca	2
	Muco	Chiaro-trasparente	0	
		Leggermente torbido/torbido	1	
Articolo IX. Muscolatura	Elasticità	Elastica	0	
		Fovea alla pressione	1	
Articolo X. Odore	-	Di fresco	0	
		Neutro	1	
		Di pesce	2	
		Cattivi odori	3	
Articolo XI. Occhi	Limpidezza	Chiaro-traslucido	0	
		Leggermente opaco	1	
		Opaco/insanguinato	2	
	Forma	Convessa	0	
		Piatta	1	
Concava		2		

Articolo XII. Branchie	Colore	Brillante/rosso scuro	0
		Rosso tendente al marrone/scolorito	1
	Odore	Fresco/d'alga	0
		Neutro	1
		Di pesce	2
		Cattivi odori	3

Tab. 15. Quality Index Method (QIM) per l'Orata (Huidobro *et al.*, 2000).

Tutti i test sensoriali sono stati effettuati da un panel di 3 persone precedentemente formate*

Analisi fisiche

Le indagini fisiche sono state condotte attraverso la misurazione del pH dei muscoli epiaissiali, immediatamente dopo il prelievo batteriologico, tramite pHmetro con elettrodo ad infissione (mod. HD 8705, Delta Ohm).

Analisi microbiologiche

Le indagini microbiologiche effettuate ai tempi programmati sono state eseguite nel seguente modo:

un campione (25 g) di cute prelevato dalle regioni antero-dorsali destra e sinistra di ciascun pesce (figura 4) è stato posto in busta sterile (Baglight, Interscience - Bag System) contenente 225 ml di soluzione sterile di MRD (Maximum Recovery Diluent, Oxoid) ed omogenato per 60'' con stomacher (Mix 1 - AES Laboratoire) a temperatura ambiente;

un campione (25 g) di muscolo è stato prelevato dalla regione antero-dorsale di ciascun pesce previa asportazione della cute sovrastante. Il campione posto in busta sterile contenente 225 ml di MRD è stato poi omogenato per 60'' con stomacher a temperatura ambiente.

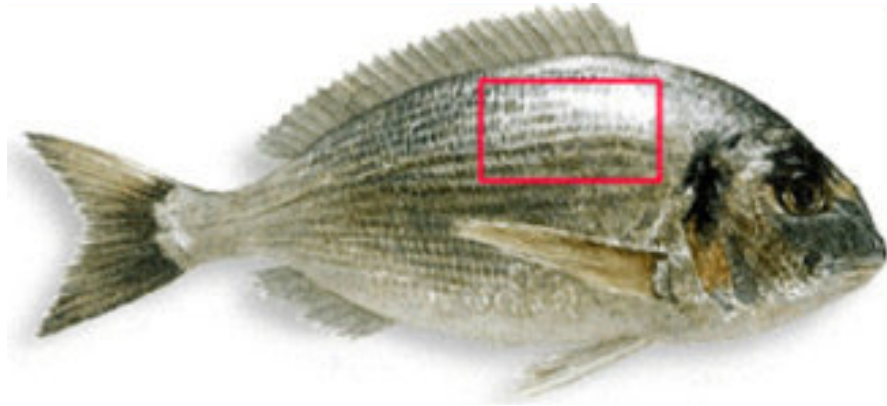


Figura 7. Area di prelievo.

Dalla sospensione così ottenuta sono state effettuate diluizioni decimali in 9 ml di MRD per la determinazione di:

- **Conta Mesofila Totale (CMT):** 1 ml di omogenato di muscolo di ciascuna diluizione allestita è stato seminato per inclusione su piastre Petri sterili di PCA (Standard Plate Count Agar, Oxoid), incubate a 30° C per 72 h;
- **Conta Psicofila Totale (CPT):** 1 ml di omogenato di muscolo di ciascuna diluizione allestita è stato seminato per inclusione su piastre Petri sterili di PCA (Standard Plate Count Agar, Oxoid), incubate a 4° C per 7 giorni;
- **Lattobacilli (LAB):** 1 ml di omogenato di muscolo ed 1 ml di omogenato di cute di ciascuna diluizione allestita sono stati, separatamente, seminati per inclusione su piastre Petri sterili di MRS Agar (deMan Rogosa Sharpe Agar, Oxoid) da noi modificato con Ac. Acetico glaciale (Sigma) a pH 5,5 ed incubate a 25° C per 7 giorni (Pournis *et al.*, 2005);
- **Batteri produttori di H₂S:** 1 ml di omogenato di muscolo di ciascuna diluizione allestita è stato seminato per inclusione su piastre Petri sterili di IA (Iron Agar, Oxoid), incubate a 25° C per 2 - 5 giorni.

Successivamente tutte le colonie nere ed alcune colonie bianche (figura 5) sono state sottoposte a test di screening quali la colorazione Gram, la prova della catalasi e dell'ossidasi e, quindi, identificate in micrometodo con API 20

NE (bioMérieux) ed in micrometodo automatizzato con il sistema Vitek Jr. (bioMérieux).



Figura 8. Piastra di Iron Agar, si possono osservare le colonie nere (produttrici di H₂S) e le colonie bianche.

I dati ottenuti dalle conte batteriche sono stati espressi in Log ufc/g.

I dati batteriologici sono stati sottoposti successivamente ad analisi della varianza (ANOVA), per mezzo del software Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation.).

L'analisi statistica è stata condotta su campioni di confezioni di diversa provenienza ma uguale atmosfera (A e B) e su campioni con uguale provenienza confezionati nelle due atmosfere. Il valore di significatività era posto con $P \leq 0,05$.

In seguito i campioni sono stati eviscerati e quelli appartenenti alla stessa confezione sono stati riuniti in un unico pool ed analizzati in doppio.

Sono state effettuate le seguenti analisi utilizzando le metodiche riportate di seguito:

- A) Umidità
- B) Ceneri
- C) Proteine
- D) Grassi
- E) Acidi grassi volatili (FFA)

- F) IDF (International dairy federation)
- G) ABVT e TMA
- H) TBA
- I) pH
- J) Ammine

Determinazione dell'umidità (2)

Una capsula è posta in stufa a 110°C, raffreddata poi in essiccatore e pesata. Nella capsula così trattata è pesato il campione (circa 10 g) e previa pesatura (capsula + campione) si è trasferito il tutto in stufa a 110 °C per una notte, trascorsa la quale, dopo raffreddamento in essiccatore, si determina il peso.

Il contenuto in umidità, espresso in percentuale (%) riferito alla massa, è uguale a

$$U \% = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$$

dove

m_0 = massa in g della capsula;

m_1 = massa in g della capsula contenente il campione prima dell'essiccamento in stufa

m_2 = massa in g della capsula contenente il campione dopo l'essiccamento.

Determinazione delle ceneri (2)

Per la determinazione delle ceneri si è essiccata in muffola a 600 °C per una notte la capsula, precedentemente portata a peso costante, con una quantità di campione di circa 10g.; si brucia il campione servendosi di un becco Bunsen e si ripone la capsula in muffola a 450 °C fino a che il campione non assume una colorazione bianca o debolmente grigia; si lascia raffreddare la capsula in essiccatore e quindi si ripesa il tutto.

Il contenuto in ceneri espresso in % riferito alla massa è uguale a:

$$C \% = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100$$

dove

m_0 = massa in g della capsula

m_1 = massa in g della capsula contenente il campione prima dell'incenerimento

m_2 = massa in g della capsula contenente le ceneri.

Determinazione delle proteine (2)

Per la determinazione delle proteine si mettono 2 g del campione, 20 ml di acido solforico, 0,7 g di solfato di rame e 5,6 g di solfato di potassio in un provettone che viene poi posto in un digestore e portato a 410 °C fino allo sviluppo di un colore verde chiaro. Il prodotto della digestione è fatto raffreddare a T° ambiente, successivamente posto in Kjeldhal dove viene distillato mediante l'aggiunta di 50 ml di acqua distillata e 70 ml di idrossido di sodio al 40 %.

Il distillato è raccolto in beuta nella quale precedentemente erano stati aggiunti 25 ml di acido solforico 0,1N e 0,1 ml di indicatore così costituito: 0,1g di blu di metilene e 0,2g di rosso metile sciolti in 100 ml di alcool etilico. La titolazione è quindi effettuata con NaOH 0,1 N fino al viraggio del distillato dal colore viola a quello grigio.

La percentuale delle proteine è ottenuta con la seguente formula:

$$\text{ml H}_2\text{SO}_4 - \text{ml NaOH} \cdot K / m$$

dove:

ml H₂SO₄ = ml H₂SO₄ posti nella beuta

ml NaOH = ml NaOH utilizzati per titolare il campione

K = 0.873

m = peso del campione.

Determinazione del grasso (74)

A 15g di campione omogeneizzato sono aggiunti 100ml di una soluzione di esano: isopropanolo (3:2) (HIP). Il tutto è omogeneizzato con un mixer (Omni mixer 17106 – Du Pont Instruments) per 30 secondi.

La sospensione è filtrata con un imbuto Buchner a media porosità utilizzando una leggera pressione. L'omogeneizzatore è lavato con due porzioni di HIP le quali sono aggiunte al campione.

Al filtrato sono aggiunti 12ml di una soluzione acquosa di sodio solfato anidro (1g ogni 15 ml di acqua) e si agita vigorosamente il tutto.

Dopo decantazione il surnatante è posto in un pallone da vuoto il quale precedentemente è stato posto in stufa a 110°C per portarlo a peso costante, poi in essiccatore per farlo raffreddare ed infine pesato. Il campione è portato a secco mediante rotavapor (Büchi 461) utilizzando una temperatura di 45°C.

Il pallone successivamente è posto in stufa a 110°C per mezz'ora, poi in essiccatore per raffreddarlo ed infine pesato.

La percentuale di grasso è data dalla seguente formula:

$$PP - PV \cdot 100 / m$$

dove:

PP = peso del pallone pieno

PV = peso del pallone vuoto

m = peso del campione.

Determinazione dell'FFA (120)

Si pongono 30g del campione omogeneizzato in un mixer, vengono aggiunti 100ml di cloroformio ed il tutto è mescolato per 2-3 minuti. Il campione viene immediatamente filtrato su carta bibula. Il filtrato viene di nuovo filtrato su carta bibula contenente una piccola quantità di sodio solfato anidro.

A 25ml del filtrato sono aggiunti 25ml di alcol etilico al 95% e 5 gocce di fenoltaleina. Si titola con idrossido di sodio 0.1N fino ad ottenere un colore rosa persistente.

La percentuale di FFA, espressa come percentuale di acido oleico, è calcolata con la seguente formula:

$$V \times 0.0282 \times 100 / W$$

dove

V = ml di idrossido di sodio usati per la titolazione

W = peso del campione.

Determinazione dell'IDF (51)

Preparare una soluzione di cloruro ferroso sciogliendo in 50ml di acqua 0.4g di cloruro di bario diidrato. A questa soluzione si aggiunge mescolando velocemente e continuamente una soluzione acquosa di solfato di ferro ottenuta sciogliendo 0.5g di solfato di ferro eptaidrato in 50ml di acqua. Aggiungere 2 ml di acido cloridrico 10N. Quando il bario è precipitato filtrare la soluzione fino a quando non è chiara. Conservare in una bottiglia scura al buio.

Preparare una soluzione di tiocianato di ammonio sciogliendo 30g di tiocianato di ammonio in 100ml di acqua.

A 0.01-0.30g di grasso del campione sono aggiunti 9.8ml di una soluzione cloroformio-metanolo(7+3), si agita su vortex per 2-4 secondi. Si aggiungono 50 μ l della soluzione di tiocianato di ammonio e si mescola di nuovo su vortex per 2-4 secondi. Si aggiunge 50 μ l della soluzione di cloruro ferroso e si mescola di nuovo su vortex per 2-4 secondi. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, si legge l'assorbanza del campione a 500nm contro il bianco costituito da tutti i reagenti eccetto il campione.

Si prepara la curva di calibrazione preparando una soluzione cloruro di ferro contenente 10 μ g Fe/ml.

Sciogliere 0.5g di polvere di ferro in 50ml di acido cloridrico 10N, aggiungere 1-2ml di perossido di ossigeno al 30%. L'eccesso di ossigeno è rimosso facendo bollire la soluzione per 5 minuti. La soluzione viene raffreddata a temperatura ambiente e diluita con acqua a 500ml. Diluire 1ml della soluzione a 100 con la soluzione cloroformio-metanolo. Soluzioni standard contenenti da 1 a 40 μ g di ferro sono analizzate con il metodo IDF per ottenere la curva di calibrazione.

Il valore di perossidi, espresso in milliequivalenti di perossidi per chilogrammo di campione è calcolato con la seguente formula:

$$\text{meqO}_2/\text{kg} = (A_s - A_b) \times m / 55.84 \times m_0$$

dove:

A_s = assorbanza del campione;

A_b = assorbanza del bianco;

m = pendenza della retta ottenuta dalla curva di calibrazione in questo caso 43.06;

m_0 = peso del campione in grammi

55.84 = peso atomico del ferro.

Determinazione dell'ABVT e del TMA (120)

Queste determinazioni sono state eseguite con la metodica di Conway.

100g di muscolo di pesce è omogeneizzato con 50ml di soluzione al 20% di acido tricloroacetico. Si aggiungono 50ml di acqua e si omogeneizza di nuovo il campione.

Dopo la centrifugazione a 2000 giri al minuto per cinque minuti, si filtra il surnatante. La microdiffusione è realizzata nelle celle di Conway.

Si pone nella corolla esterna 1.5ml di acqua distillata e 1 ml di filtrato. Si pone nella corolla centrale 1 ml di acido borico all'1%, preparato come segue: si sciolgono 10gr di acido borico in 200ml di alcol etilico al 95% e 700ml di acqua; si aggiunge 10ml di una miscela di verde bromocresolo al 0.033% e di rosso di metile a 0.066% (16.5mg di verde di bromocresolo e 33mg di rosso di metile in 50ml di alcol etilico al 95 %); si porta a volume ad un 1 litro di soluzione e si corregge il pH a 5.

Si pone rapidamente nella corolla esterna 1 ml di soluzione satura di carbonato di potassio a 112% e si poggia immediatamente il coperchio ricoperto di vasellina.

Con un movimento di rotazione si mescola il contenuto nella cella. L'incubazione si esegue a 35°C per due ore, oppure a temperatura ambiente per una notte.

La soluzione di acido borico divenuta verde è neutralizzata dall'acido cloridrico 0.001N, utilizzando una microburetta graduata a 0.01ml. Si titola fino a che non ritorna di colore rosa. Il valore di ABVT è uguale al numero di ml di acido cloridrico utilizzato, moltiplicato per 27,67mg di azoto per 100gr di pesce.

Dosaggio di TMA con il metodo di Conway.

Si utilizza la stessa metodica riportata per la determinazione dell'ABVT con l'unica differenza che nella corolla esterna si pongono 1ml di filtrato, 1ml di acqua distillata e 0.5ml di formalina neutralizzante.

Determinazione del numero di acido tiobarbiturico (TBA) (120)

Preparazione del reagente TBA: sciogliere 0.2883 g di TBA in acido acetico al 90 % con riscaldamento delicato e portare a volume di 100 ml con acido acetico al 90 %.

Preparazione del campione:

Mescolare 10 g di pesce con 50 ml di acqua distillata in un mixer (B-400 Büchi). Il campione omogeneizzato è posto in un provettone. Si lava il bicchiere del mixer con 47.5 ml di acqua e si aggiunge al provettone contenente il campione. Si aggiungono 2.5 ml di acido cloridrico 4 N per portare il PH a 1.5. Si connette il pallone con l'apparecchio di distillazione (UDK130A VELP). Si distilla il campione fino ad ottenere 50 ml di distillato.

Si pipettano 5 ml di distillato in una provetta a vite, si aggiungono 5 ml di reagente TBA, si tappa la provetta, si agita e si pone a bagnomaria bollente per 35 minuti esatti. Si prepara il bianco allo stesso tempo ponendo nella provetta 5 ml di acqua e 5 ml di reagente. Si raffreddano le provette in acqua per 10 minuti e si misura la densità ottica rispetto al bianco a 538 nm.

$$\text{Numero di TBA} = 7,8 \times \text{densità ottica (mg aldeide malonica/kg)}.$$

Determinazione delle ammine (57)

L'estrazione prevede l'omogeneizzazione di una quota di 5 g di campione in acido perclorico 0.2 M in bagno ghiacciato, incubazione per 30 minuti, successiva centrifugazione a 20.000 g e ultracentrifugazione di un'aliquota di 1 ml del campione a 12.000 g.

Successivamente 100 µl di campione sono derivatizzati con dansilcloride previa aggiunta di carbonato di sodio. Per rimuovere l'eccesso di dansile il campione è incubato overnight a temperatura ambiente (secondo la metodica di Smith e Davies modificata). Le ammine sono, infine, estratte con dietiletere, successivamente allontanato previa evaporazione a secco sotto azoto. L'estratto è stato quindi ricostituito in metanolo ed un aliquota di 20 µl è stata iniettata nel sistema cromatografico.

L'identificazione e la valutazione del contenuto delle ammine è avvenuta mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico. E' stato utilizzato uno standard contenente una miscela delle cinque ammine, in cui la quantità di ciascuna ammina era pari a 10 mg/Kg.

La colonna utilizzata è stata una C 18 Symmetry .Temperatura della colonna (Tcol) = 22 ° C; flusso = 0.8 ml/min; volume d'iniezione 20 µg ;

Fp : EX 365 nm; EM 510 nm. La fase mobile, costituita da una miscela di acqua (solvente A) e metanolo (solvente B), ha seguito un programma di eluizione a gradiente secondo lo schema Tab. 16:

Programma di eluizione secondo gradiente		
Tempo (min)	% A	% B
0.0	25	75
1.0	25	75
15.0	0	100
2.0	0	100

Tabella 16: Programma di eluizione secondo gradiente

Ciascuna corsa HPLC dura circa 18 minuti, seguiti da 2 minuti di riequilibrio della colonna con 25 % di solvente A e 75 % di solvente B.

5.2 Analisi chimiche

I risultati relativi ai parametri analizzati sono riportati nelle Tabelle 17 e 18.

Nei campioni confezionati, indipendentemente dalla provenienza e dal tipo di atmosfera utilizzata, il pH profondo si è mantenuto sostanzialmente costante (6,18 – 6,20).

L'umidità si è mantenuta pressoché costante durante tutto il periodo di stoccaggio presentando valori più elevati nelle orate confezionate con la miscela B (73,5% - 73,7% vs 75,2%).

Il contenuto proteico si è mantenuto costante nei campioni confezionati con l'atmosfera B (19%). Nelle orate confezionate con la miscela A si è osservato un andamento diverso a seconda della provenienza. Infatti nei campioni provenienti dal Tirreno meridionale la percentuale del contenuto proteico è diminuita (da 20% a 17%) in quelli provenienti dal Tirreno settentrionale si è mantenuta costante (19%).

Giorni di conf.	Umidità (%)		Proteine (%)		Grasso (%)	
	A	B	A	B	A	B
1	74,26	68,00	19,85	20,37	0,50	0,70
5	71,57	76,64	20,25	18,29	0,33	0,42
7	73,87	73,08	18,07	18,00	0,78	0,50
12	74,00	78,00	19,66	18,09	0,33	0,46
15	68,27	73,68	17,41	17,98	0,62	0,26
19	77,45	74,00	17,33	19,75	0,13	0,94

Tab. 17 : Composizione centesimale di orate confezionate in atmosfera protettiva provenienti dal Tirreno meridionale.

Giorni di conf.	Umidità (%)		Proteine (%)		Grasso (%)	
	A	B	A	B	A	B
1	62,50	68,00	18,26	20,37	0,26	0,70
5	71,57	74,77	20,25	18,71	0,23	0,48
7	74,49	73,08	15,09	18,00	0,44	0,50
12	74,00	74,26	19,66	18,07	0,33	0,37
15	71,29	73,68	19,77	17,98	0,62	0,26
19	77,45	77,00	17,33	20,20	0,13	0,27

Tab. 18 : Composizione centesimale di orate confezionate in atmosfera protettiva provenienti dal Tirreno settentrionale.

Il contenuto di ABVT in tutti i campioni analizzati è aumentato con un tasso costante (coefficiente di regressione > 0.9 per tutte le tipologie). Le concentrazioni massime sono state di 29.65 e di 26,95 mg/100g rispettivamente per l'atmosfera A e B (Grafico 6 e 7.) nelle orate provenienti da Tirreno meridionale e di 30,01 e di 24,45 mg/100g in quelle provenienti da Tirreno settentrionale.

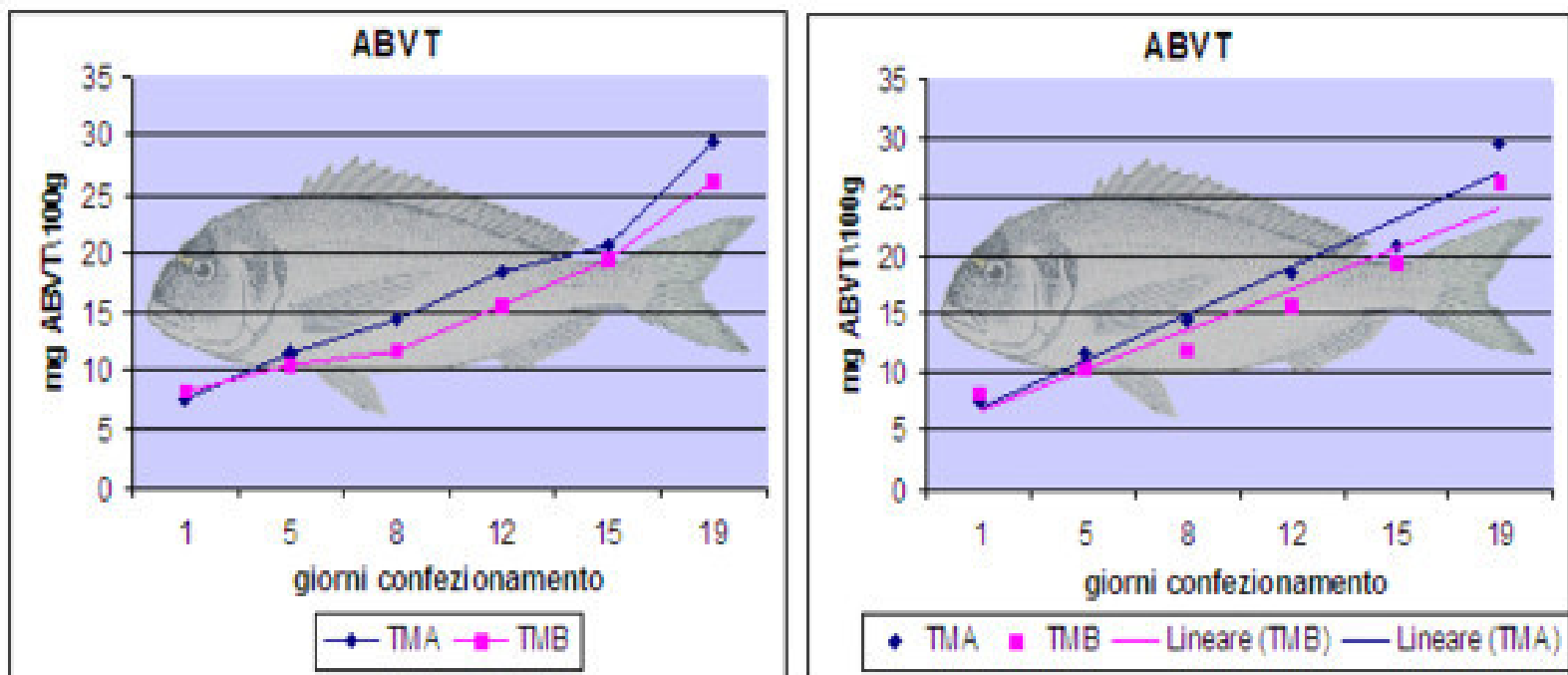


Grafico 6: Modificazioni nel contenuto di ABVT di orate provenienti dall'allevamento di Tirreno meridionale, confezionate in atmosfera protettiva

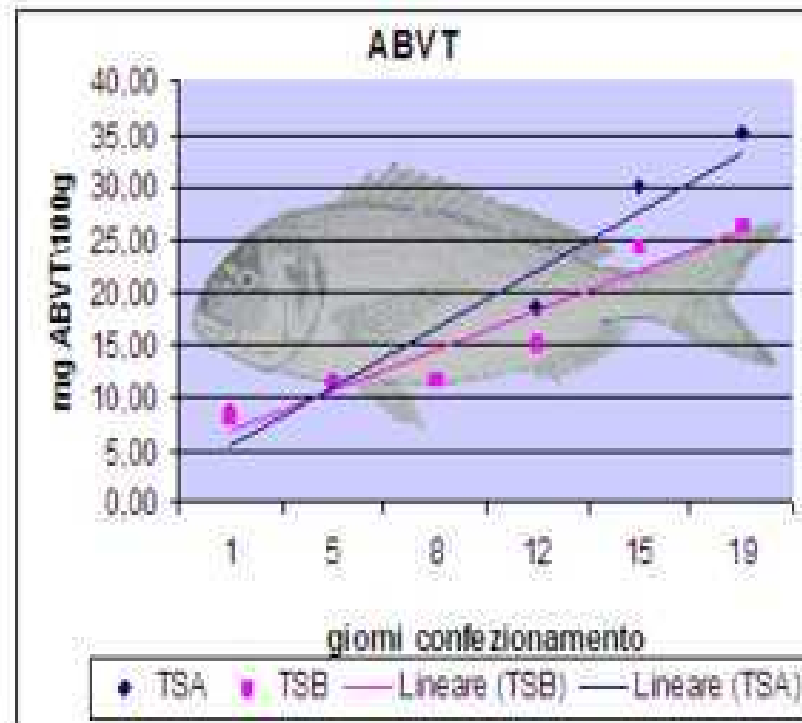
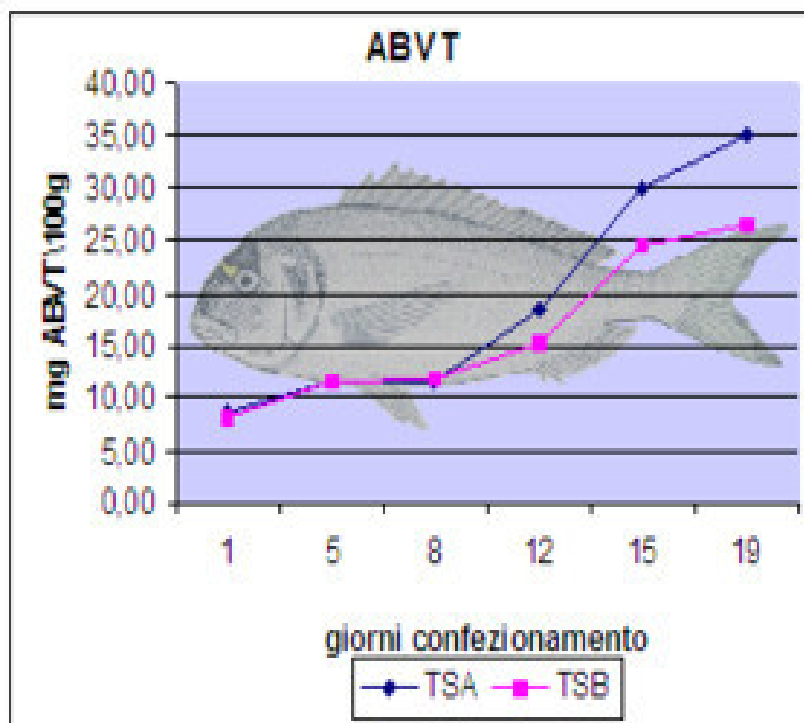


Grafico 7: Modificazioni nel contenuto di ABVT di orate provenienti dall'allevamento di Tirreno settentrionale, confezionate in atmosfera protettiva

Per quanto riguarda il contenuto in TMA, i livelli riscontrati sono stati significativamente bassi (Grafico 8 e 9).

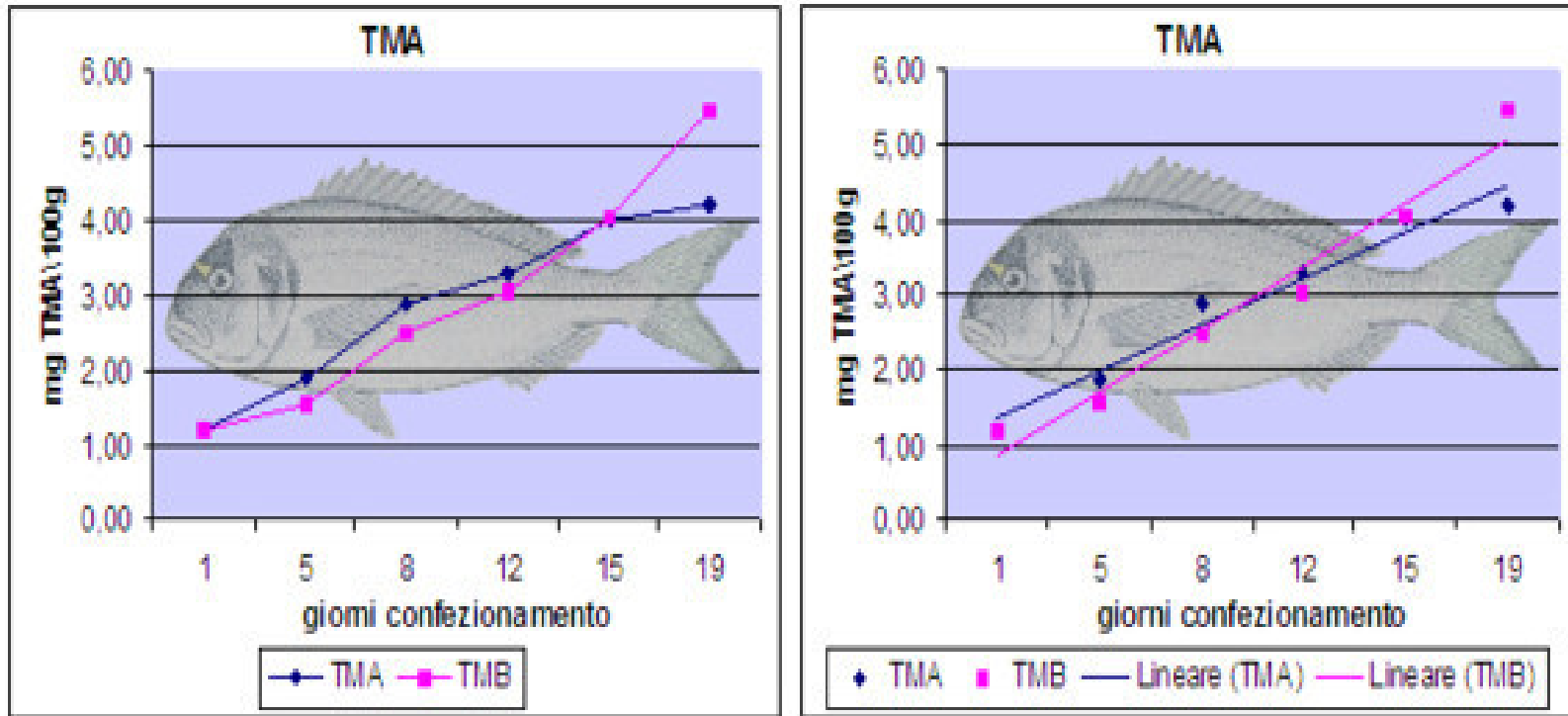


Grafico 8: Modificazioni nel contenuto di TMA di orate provenienti dall'allevamento di Tirreno meridionale, confezionate in atmosfera protettiva

Infatti pur partendo da valori di 1,2 mg/100g, si sono evidenziate concentrazioni di 4,2 mg/100g nei pesci trattati con la miscela A indipendentemente dalla loro provenienza. Nelle orate confezionate con la miscela B i livelli riscontrati sono stati di 2,7 mg/100g e di 5,5 mg/100g per quelle provenienti dal Tirreno settentrionale e dal Tirreno meridionale rispettivamente.

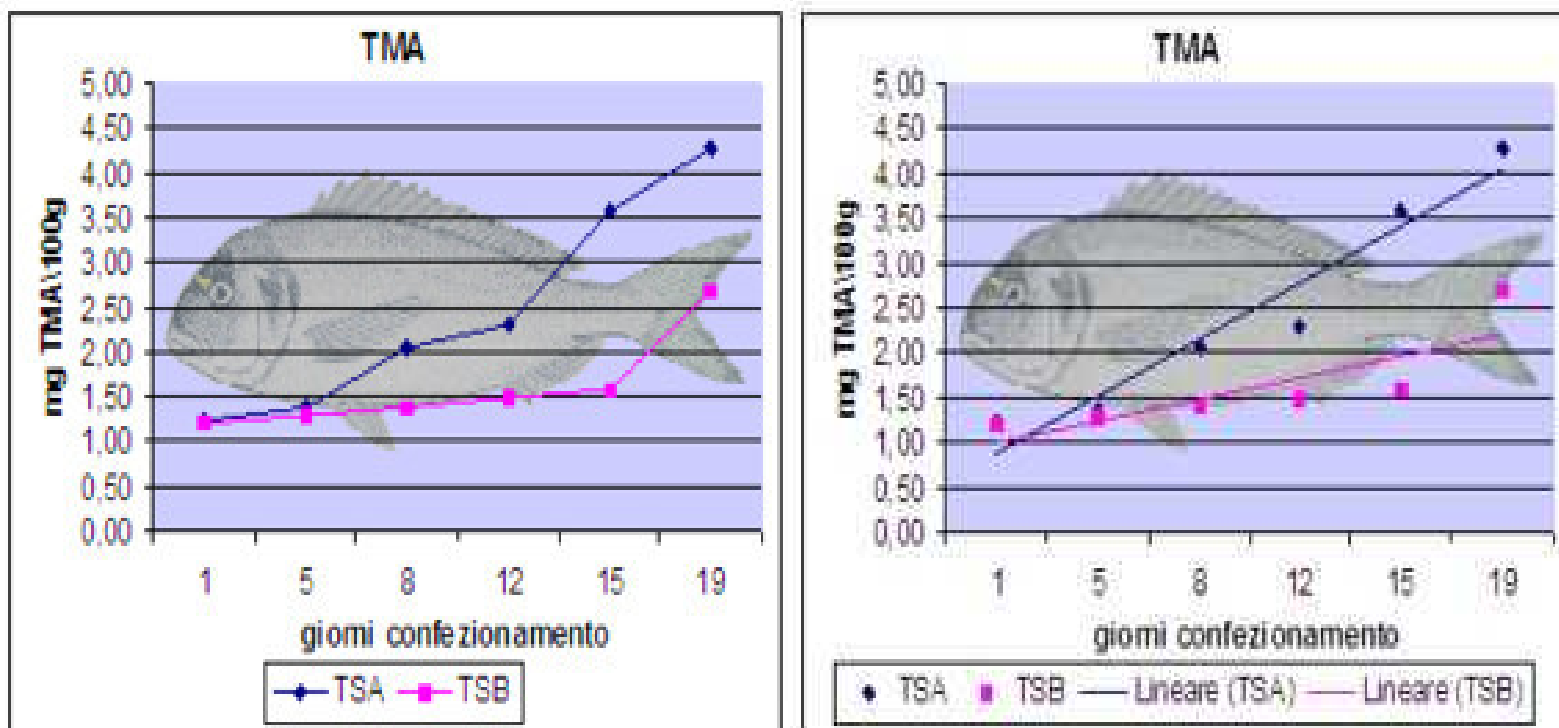


Grafico 9: Modificazioni nel contenuto di TMA di orate provenienti dall'allevamento di Tirreno settentrionale, confezionate in atmosfera protettiva

L'andamento delle concentrazioni delle cinque ammine che vanno a costituire l'indice BAI, in funzione del tempo di campionamento, è riportato nelle tabelle 19 e 20.

La putrescina e la cadaverina aumentano in maniera lineare durante la conservazione. L'istamina mostra un'iniziale diminuzione seguita da un aumento.

Spermina e spermidina mostrano infine una diminuzione lineare.

GG. CONS.	PUT. TMA	CAD. TMA	IST. TMA	SPD. TMA	SPR. TMA
1	0,19	0,30	0,85	4	6,1
5	0,36	0,52	0,62	3,85	5,4
7	0,45	0,67	1,80	3,7	4,2
12	0,68	1,05	1,84	3,25	4,1
15	1,02	1,67	1,90	2,8	4
19	1,67	1,89	2,10	2,3	3,5

Tab. 19 : Modificazioni nel contenuto delle ammine di orate provenienti da allevamento di Tirreno meridionale, confezionate in atmosfera protettiva tipo A

GG. CONS.	PUT. TSB	CAD. TSB	IST. TSB	SPD. TSB	SPR. TSB
1	0,01	0,2	0,90	5,3	8,01
5	0,18	0,5	1,20	4,9	7,20
7	0,48	0,68	1,44	4,5	5,40
12	0,68	1,1	1,57	4,1	4,10
15	1,22	1,4	1,78	3,7	3,67
19	1,50	1,9	1,90	3,2	3,20

Tab. 20 : Modificazioni nel contenuto delle ammine di orate provenienti da allevamento di Tirreno settentrionale, confezionate in atmosfera protettiva tipo B

Gli indici di rancidità hanno avuto un andamento simile fino all'7° giorno di conservazione. Nei campioni confezionati con la miscela A si è avuto un andamento più costante con valori massimi di 1,8 e 2,0 mEqO•/kg grasso nelle orate provenienti da Tirreno meridionale e da Tirreno settentrionale rispettivamente. In quelle confezionate con l'atmosfera B si è invece osservato un valore finale decisamente più alto nei campioni provenienti da Tirreno settentrionale (3,2 mEqO•/kg grasso) rispetto a quelli di Tirreno meridionale (2,2 mEqO•/kg grasso).

DISCUSSIONE (parte chimica)

Sebbene l'orata sia un pesce tipico dell'acquacoltura mediterranea ampiamente commercializzato nell'Europa mediterranea dati bibliografici sulle modificazioni inerenti le caratteristiche chimiche che si verificano in tali prodotti confezionati in atmosfera protettiva sono piuttosto scarsi.

Il D. L.gvo 531/92 raccomandava analisi chimiche e microbiologiche del pesce, quando i risultati dell'ispezione visiva è incerta. In particolare sottolinea che i parametri chimici a cui fare riferimento sono l'ABVT e la TMA. L'ABVT è un parametro aspecifico composto da tutte le frazioni azotate che si formano durante lo stoccaggio per azione di enzimi endogeni e batterici. Trattandosi di un indice generico, fornisce indicazioni di massima, che risentono di numerose variabili (specie, tipo di muscolatura, sistema di conservazione).

In riferimento a ciò la Decisione CE 149/95 ha stabilito valori precisi di ABVT solo per determinate specie e precisamente: *Sebastes spp.*, *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis* (25 mg/100 g), *Pleuronectidae* (30 mg/100g) con l'eccezione del *Hippoglossus spp.*, *Salmo salar*, *Merluccidae* e *Gadidae* (35 mg/100g).

Attualmente, il Regolamento 2074\2005 Allegato II modificato dal Regolamento (CE) N. 1022/2008 DELLA COMMISSIONE del 17 ottobre 2008 - OBBLIGHI DELLE AUTORITÀ COMPETENTI prevede che:

I prodotti della pesca non trasformati appartenenti alle categorie di specie di cui al capitolo II sono considerati impropri al consumo umano qualora risulti dubbia la loro

freschezza dal controllo organolettico e il controllo chimico dimostri che i seguenti valori limite di ABVT sono superati:

- a) 25 mg di azoto/100 g di carne, per le specie di cui al capitolo II, punto 1;
(*Sebastes spp.*, *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis*)
- b) 30 mg di azoto/100 g di carne, per le specie di cui al capitolo II, punto 2;
(*Specie appartenenti alla famiglia dei Pleuronettidi con esclusione dell'halibut: Hippoglossus spp.*)
- c) 35 mg di azoto/100 g di carne, per le specie di cui al capitolo II, punto 3.
(*Salmo salar*, *specie appartenenti alla famiglia dei Merluccidi*,
specie appartenenti alla famiglia dei Gadidi. (Gadidi ndr))
- d) 60 mg di azoto/100 g dei prodotti della pesca interi utilizzati direttamente

per la preparazione di olio di pesce destinato al consumo umano di cui all'allegato III, sezione VIII, capitolo IV, parte B, punto 1, secondo comma del regolamento (CE) n. 853/2004; tuttavia, se la materia prima è conforme alla parte B, punto 1, lettere a), b) e c), di detto capitolo, gli Stati membri possono fissare limiti più elevati per talune specie finché non saranno state emanate norme comunitarie specifiche.

I valori di ABVT ritrovati sono risultati superiori ai limiti di accettabilità previsti per la spigola europea riportati in letteratura e presi come riferimento in quanto la specie analizzata non è contemplata dalla suddetta Decisione ben oltre il 15° giorno per ambedue le atmosfere utilizzate quando i caratteri organolettici indicavano un rifiuto del prodotto.

La TMA è considerato un parametro molto attendibile nella valutazione della qualità del pesce refrigerato. Essa si forma prevalentemente per riduzione del TMAO ad opera di enzimi riducenti presenti soprattutto nei batteri GRAM-.

Il basso contenuto iniziale di TMA (0.10 ± 0.14 mg TMA/100g) è indicativo di pesce di eccellente qualità. In bibliografia sono riportati per varie specie di pesci valori fino 1 mg/100g indicativi di pesce fresco.

Nel nostro studio sono stati ritrovati livelli costantemente inferiori a 14 mg/100 g valore correlato ad un deterioramento precoce del pesce (39). Questi valori bassi potrebbero essere correlati alla composizione della flora microbica ed al pH

relativamente basso che si è registrato durante l'esperimento. Infatti il pH ottimale per l'attività degli enzimi riducenti il TMAO è di circa 7,2-7,4. D'altra parte *Pseudomonas spp.*, che è uno dei principali microrganismi coinvolti nello spoilage del pesce, non riduce il TMAO quindi in queste specie ittiche lo spoilage può verificarsi anche con scarsa produzione di TMA.

Per quanto riguarda infine gli effetti delle diverse concentrazioni di gas utilizzate, diversamente da quanto evidenziato da Debevere et al., (1996) (32) in filetti di merluzzo, i livelli di TMA evidenziati nel nostro studio, peraltro notevolmente inferiori a quelli riscontrati dagli autori sopra citati, non sono diminuiti nella miscela B. Secondo questi autori infatti la disponibilità di ossigeno in una miscela porterebbe ad una bassa utilizzazione del TMAO come accettore secondario di elettroni. È altrettanto vero che se alte percentuali di ossigeno portano ad una diminuzione dei livelli di TMA questo avviene a spese della percentuale di CO₂ con una conseguente diminuzione dell'attività antimicrobica di quest'ultimo gas.

La formazione di ammine biogene è la primaria conseguenza dell'azione della decarbossilazione enzimatica di specifici amminoacidi dovuta ad enzimi batterici o tissutali. La quantità di ammine prodotta in corso di stoccaggio è ritenuta indice del livello di contaminazione anche se non va considerata come criterio assoluto perché potrebbe rappresentare il prodotto di specifici organismi. L'andamento del profilo amminico mostra che solo la cadaverina e la putrescina sembrano avere un'importanza quali indici di spoilage essendo le uniche significativamente correlate alla durata dello stoccaggio.

Infine, per quanto riguarda i fenomeni ossidativi, la autoossidazione lipidica sembra essere insignificante. Infatti i valori degli idroperossidi si sono mantenuti costantemente inferiori a quelli riportati in letteratura per pesci con evidente odore di rancido.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Analisi sensoriale: I controlli organolettici hanno evidenziato nella materia prima caratteri ineccepibili (Figg. 9 e 10).

Odore, colore, consistenza erano infatti tipici di un prodotto di eccellente qualità.



Fig. 9 : Campione proveniente dal Tirreno meridionale confezionato in atmosfera protettiva miscela A al 1° giorno di confezionamento.



Fig. 10 : Campione proveniente da Tirreno settentrionale confezionato in atmosfera protettiva miscela B al 1° giorno di confezionamento.

L'andamento del punteggio QIM da giorno 1 a giorno 19, per *Sparus aurata* proveniente dai 2 diversi allevamenti e mantenute nelle due differenti atmosfere, è riportato nel grafico n. 10.

Il grafico n. 10 mostra lo scadimento dei caratteri organolettici durante lo stoccaggio con raggiungimento del punteggio massimo (Daalgard P., 1995) a 19 giorni. Le modifiche più precoci e più pronunciate dei caratteri organolettici sono state il colore e l'odore delle branchie e la forma dell'occhio, che hanno presentato il punteggio massimo a 12 giorni di confezionamento.

L'andamento dei valori medi mostra come le due atmosfere adottate abbiano comportato un incremento della *shelf-life*. Altri Autori, infatti, su orate fresche conservate in ghiaccio hanno rilevato valori massimi (Daalgard P., 1995) a 13 ed a 6 giorni di conservazione (Huidobro *et al.*, 2000; Giuffrida *et al.*, 2005)

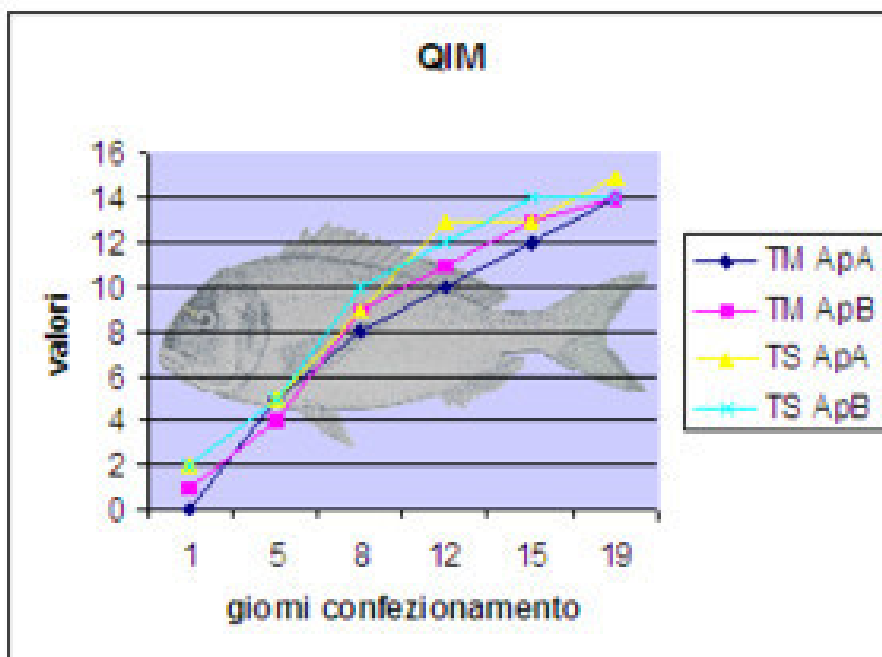


Grafico 10 : Andamento dei punteggi medi di valutazione organolettica ottenuti mediante QIM, nel corso dello stoccaggio.

Valutazione del pH: i valori di pH nel corso della conservazione sono illustrati nel grafico X. Come si può vedere i campioni mostravano nei primi giorni di

conservazione una grande variabilità nei valori, mostrando un minimo di 5,85 (nel campione TS ApB) fino ad un massimo di 6,3 (TS ApA). Tale situazione si è andata attenuando, a partire dal giorno 8, per poi raggiungere valori finali molto più uniformi. Un tale comportamento potrebbe essere ricondotto all'attività della CO₂.

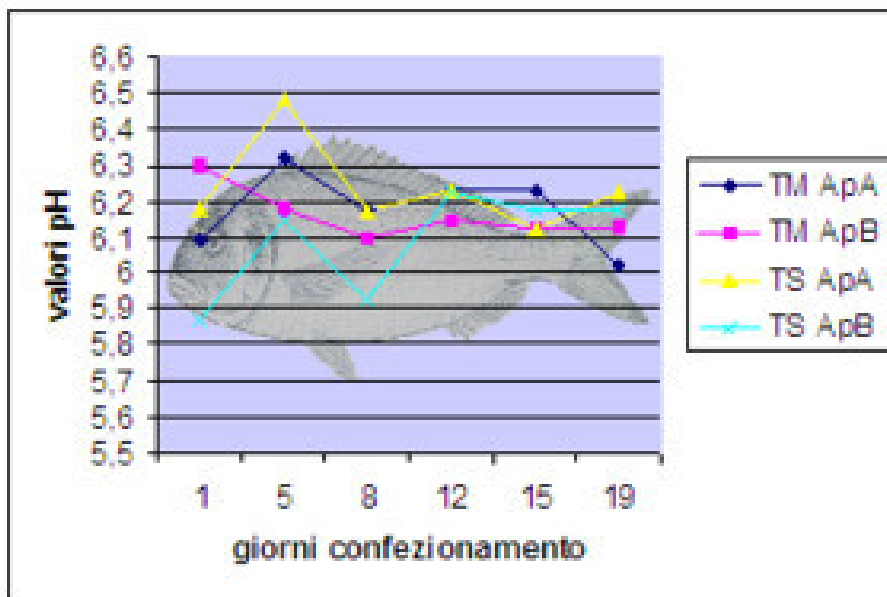


Grafico 11 : Andamento dei valori medi di pH in corso di conservazione.

Parametri microbiologici: gli andamenti delle cariche microbiche durante il periodo di conservazione sono illustrati nella tabella 21 e nei grafici 12, 13, 14, 15 e 16.

Giorni di confezionamento	TM ApA	TM ApB	TS ApA	TS ApB
CMT				
1	1,81	1,00	1,57	1,80
5	1,50	1,80	2,78	3,20
8	1,74	2,16	2,05	2,71
12	2,35	2,59	2,46	3,35
15	2,63	3,37	4,13	4,36

19	3,65	4,23	2,95	4,04
CPT				
1	1,21	0,50	0,98	1,24
5	1,09	1,34	1,98	2,49
8	1,31	2,03	2,59	2,94
12	1,45	1,69	2,64	3,18
15	1,57	2,39	3,89	4,76
19	3,86	5,01	3,09	3,90
H₂S-producing				
1	0,00	0,00	0,92	0,50
5	0,80	1,12	2,57	3,00
8	1,30	1,85	2,63	2,87
12	1,76	1,45	2,08	4,03
15	2,89	2,23	4,53	5,10
19	4,75	5,00	2,52	3,63
LAB muscolo				
1	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
8	1,10	1,82	0,74	0,50
12	0,00	0,00	0,00	0,00
15	2,80	0,00	2,80	2,65
19	1,00	2,70	0,00	2,48
LAB cute				

1	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00
8	1,95	2,81	1,48	2,88
12	1,39	0,00	2,20	3,80
15	0,00	0,65	0,00	0,00
19	3,76	5,13	2,00	3,38

* i valori sono espressi in log ufc/g.

Tab. 21. Valori medi di CMT, CPT, batteri produttori di H₂S e LAB in Orata (*Sparus aurata*) mantenuta in atmosfera A (60% CO₂ 40% N₂) e B (60% CO₂ 20% N₂ 20% O₂) a +2° C*.

La carica iniziale (giorno 1) di CMT era compresa tra valori di 1,00 log ufc/g. e 1,81 log ufc/g. per raggiungere valori finali, al giorno 19, compresi tra 2,59 e 4,23 log ufc/g.

Per quanto riguarda la CPT, la carica iniziale oscillava tra 0,50 ed 1,24 log ufc/g. per presentare a giorno 19 valori medi compresi tra 1,95 log ufc/g. e 5,01 log ufc/g.

Come si può vedere dai risultati espressi in tabella, le atmosfere A, indipendentemente dalla provenienza, hanno mostrato valori di poco più bassi rispetto alle atmosfere B. Comunque nessuno dei campioni alla fine dei giorni di analisi ha mai mostrato valori di 7,00 log ufc/g., che è considerato, per la CMT e CPT, il limite massimo di accettabilità per le specie marine e di acqua dolce, così come stabilito dall'ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods, 1986).

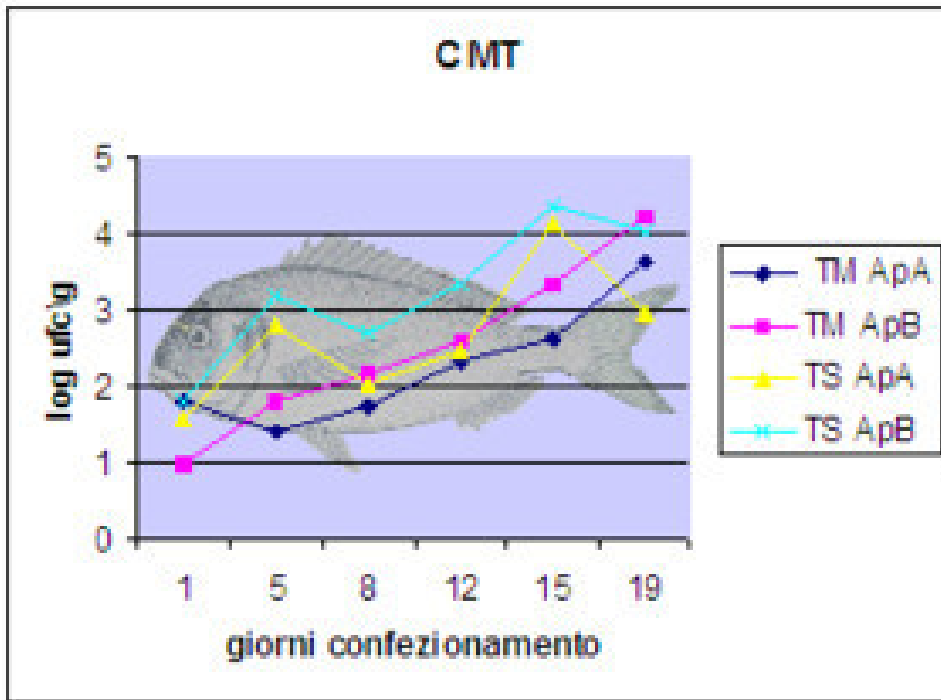


Grafico n. 12 : Andamento dei valori batteriologici medi della Conta Mesofila Totale in corso di conservazione.

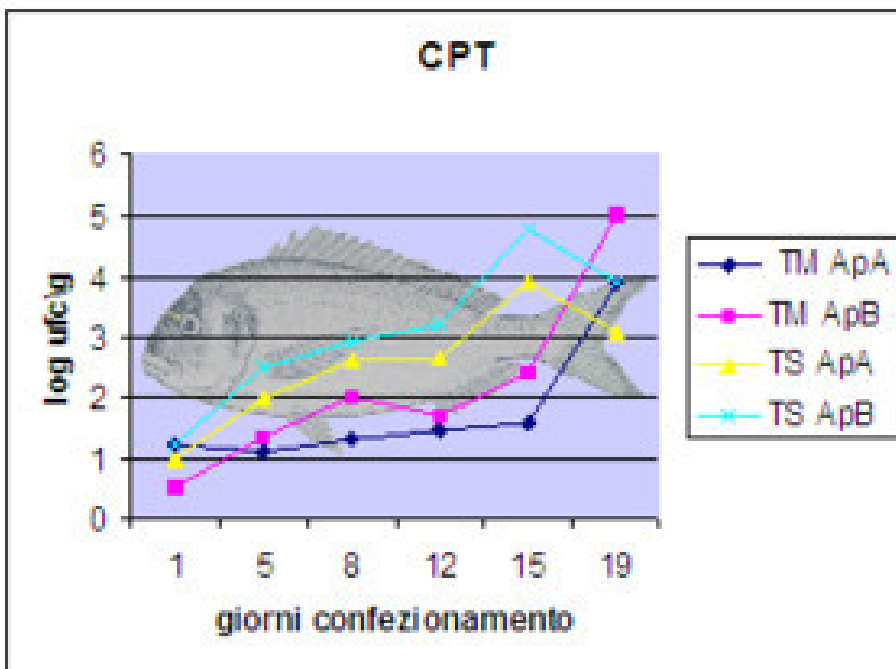


Grafico n. 13 : Andamento dei valori batteriologici medi della Conta Psicofila Totale in corso di conservazione.

L'iniziale popolazione dei batteri produttori di H₂S del muscolo (colonie nere) era oscillante tra valori di 0,00 e 0,92 log ufc/g. fino a raggiungere, a 19 giorni di confezionamento valori compresi tra 2,52 e 5,00 log ufc/g.

Così come riportato da altri Autori (Gram *et al.*, 1987; Dalgaard, 1995) le colonie nere isolate dalle piastre di Iron Agar sono state identificate tutte come *Shewanella putrefaciens*, invece le colonie bianche sono state identificate come *Pseudomonas* spp. e *Shewanella putrefaciens*, mostrando, quindi, come già sostenuto da Dalgaard (1995), che non tutti i microrganismi produttori di H₂S portano alla formazione di colonie nere su Iron Agar.

Tali risultati sono concordi con quanto riportato in bibliografia, infatti è abbastanza noto come *Pseudomonas* spp. e *Shewanella putrefaciens*, siano tra i maggiori responsabili di alterazione nei pesci marini e d'acqua dolce (Molin, 2000; Gram *et al.*, 2002; Sivertsvik *et al.*, 2002).

La costante presenza di ceppi di *Shewanella putrefaciens* in entrambe le atmosfere conferma come questo microrganismo, rispetto a *Pseudomonas* spp., sia relativamente più resistente agli effetti della CO₂ e, anzi, la capacità alterante ne risulterebbe aumentata, in linea con quanto affermato da altri Autori (Jorgensen *et al.*, 1988; Molin, 2000).

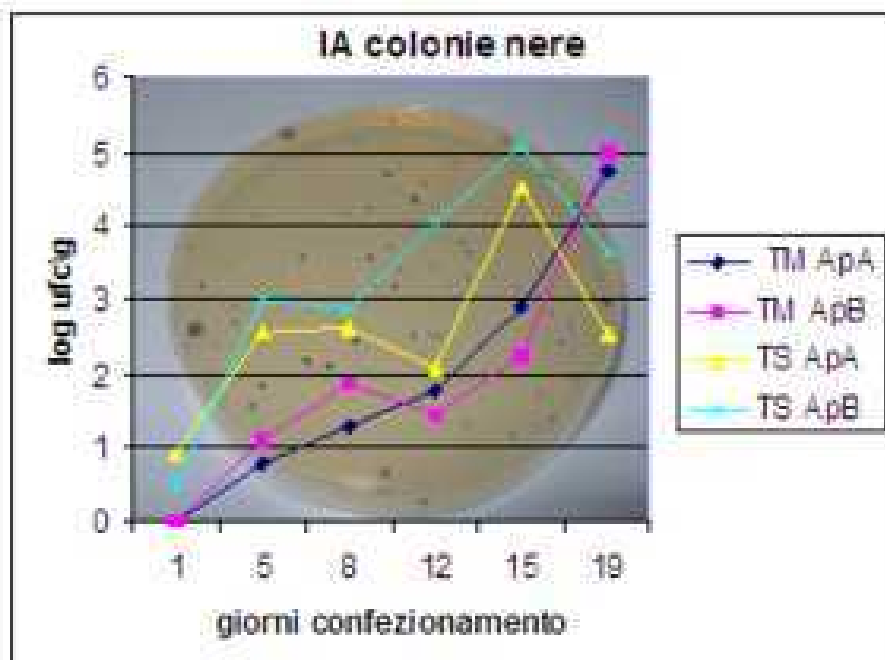


Grafico n. 14 : Andamento dei valori batteriologici medi dei batteri produttori di H₂S in corso di conservazione.

I valori medi iniziali dei lattobacilli della cute e del muscolo erano sempre di 0,00 log ufc/g. Alla fine del periodo di conservazione la cute ha mostrato valori di contaminazione pari a quasi il doppio (5,13 log ufc/g.) rispetto a quelli della muscolatura (2,70 log ufc/g.).

Il ruolo di questi microrganismi nella comparsa dei fenomeni alterativi tuttavia sembra che sia stato marginale, infatti è noto che nei prodotti ittici conservati in atmosfera protettiva, l'attività alterante ad opera di questi batteri è apprezzabile solo a cariche di 7 – 8 log ufc/g. (Paludan-Muller *et al.*, 1998).

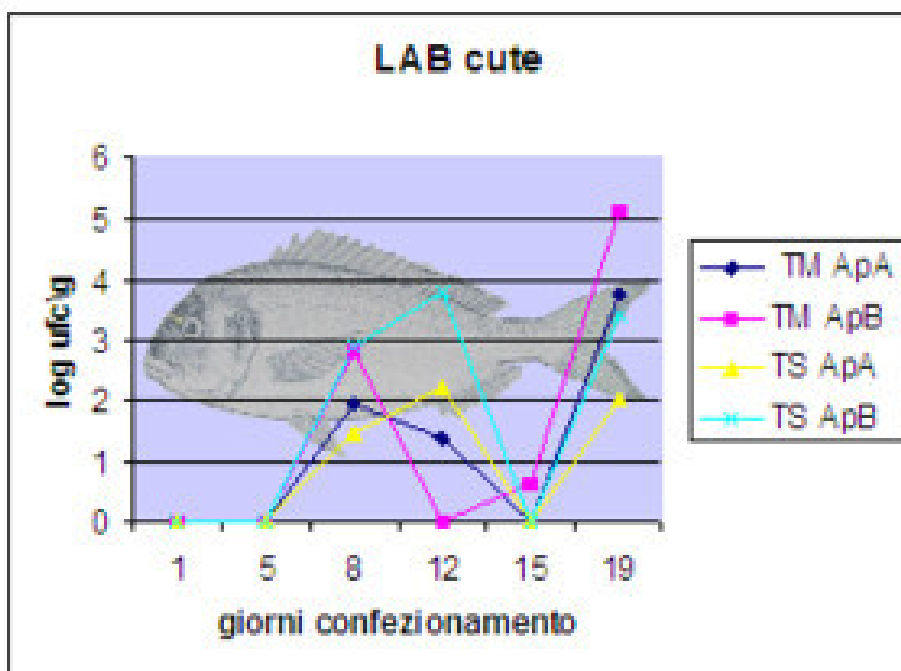


Grafico n. 15 : Andamento dei valori batteriologici medi dei lattobacilli della cute in corso di conservazione.

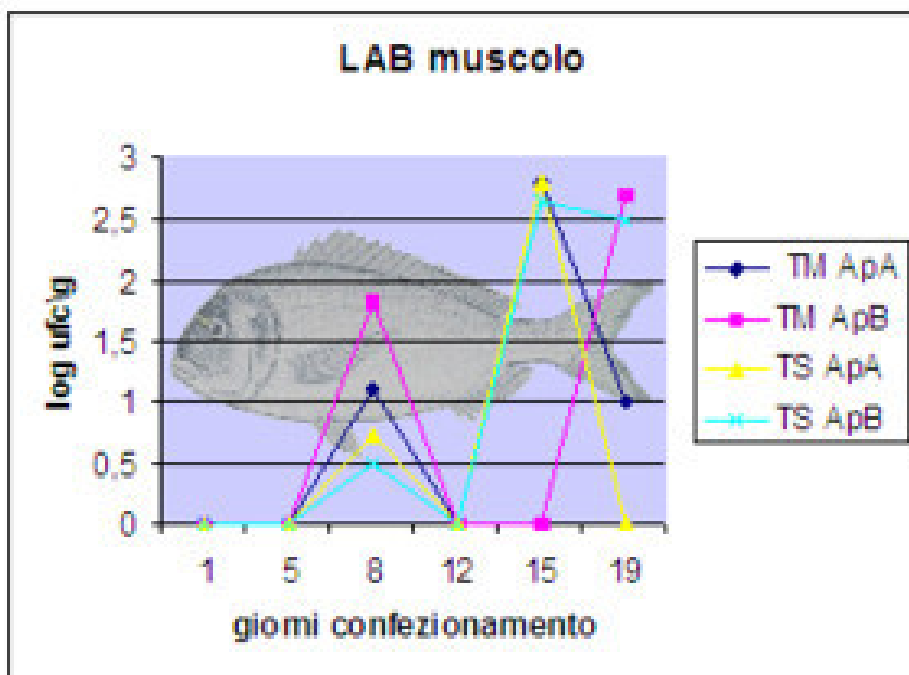


Grafico n. 16 : Andamento dei valori batteriologici medi dei lattobacilli della muscolatura in corso di conservazione.

Dall'andamento delle cariche batteriche, in particolare della Flora Mesofila Totale, della Flora Psicofila Totale e dei batteri produttori di H₂S, possiamo notare che i campioni mantenuti in atmosfera B presentavano cariche più elevate rispetto agli stessi campioni conservati in atmosfera A.

Se, tuttavia, prendiamo in esame le provenienze, indipendentemente dall'atmosfera utilizzata, i campioni provenienti dal Tirreno settentrionale presentavano cariche batteriche superiori a circa 1 log ufc/g. rispetto a tutte le altre. Un simile comportamento da parte di questi campioni potrebbe essere ricondotto ad una non ottimale gestione delle fasi di allevamento, infatti, alcuni dei soggetti provenienti dal Tirreno settentrionale hanno presentato diverse malformazioni riferibili, probabilmente, a carenze nutrizionali con conseguente stress indotto.

Se rapportiamo il punteggio del QIM alla carica microbica totale, si osservano alcune discrasie con quanto riportato in letteratura. Confrontando, infatti, i nostri dati con quelli ad esempio, di Lougovois *et al.*, (2003), si vede che a concentrazioni batteriche muscolari di 3,7 log ufc/g., dopo 8 giorni di stoccaggio in ghiaccio, corrispondevano punteggi di QIM pari a 6-7, mentre nel nostro caso, a cariche molto più basse (<3 log ufc/g.), dopo 12 giorni di stoccaggio, corrispondevano punteggi di QIM compresi tra 11 e 13.

Se, invece, osserviamo i microrganismi produttori di H₂S, possiamo vedere come allo stesso periodo di conservazione la carica era compresa tra valori di 1,45 e 4,04 log ufc/g.

Questa osservazione rafforzerebbe ulteriormente quanto già sostenuto da Ianieri *et al.*, (2005), cioè che solo una piccola parte della microflora totale partecipa al processo di alterazione dei prodotti della pesca, cioè quei microrganismi definiti come SSOs (Specific Spoilage Organisms). A tale riguardo non va, infatti, dimenticato che la moltiplicazione batterica post-mortale può realizzarsi a livello di cute, branchie ed intestino, prima ancora di condizionare la contaminazione muscolare, con ciò compromettendo alcuni dei caratteri previsti dal QIM.

Ciò, in ogni caso, indurrebbe a ritenere non sempre utilizzabile il conteggio dei batteri muscolari per una corretta valutazione della conservabilità dei pesci, anche laddove si prendano in considerazione solo i ben noti SSOs, considerato che, per i

motivi suddetti, i pesci hanno mostrato caratteri organolettici alterati prima che questi abbiano raggiunto un eventuale “limite di accettabilità” microbico.

L'analisi statistica non ha mostrato correlazione significativa tra i valori medi delle cariche microbiche sia in relazione alla provenienza sia in relazione all'atmosfera utilizzata. La mancata correlazione potrebbe essere attribuita a numerose variabili occorse, quali, ad esempio, la stagione di pesca, il management delle fasi di allevamento, pesca, trasporto e confezionamento.

CONCLUSIONI:

I risultati ottenuti evidenziano come il confezionamento in atmosfera protettiva sia stato in grado di prolungare la vita conservativa delle orate fresche conservate a temperatura di refrigerazione raddoppiandone o triplicandone la *shelf-life* (da 3-5 a 12-15 giorni).

Il prolungamento della conservabilità, di un prodotto deperibile come il pesce fresco, è di estrema utilità sia ai produttori sia ai distributori, che potrebbero rispettivamente razionalizzare l'aspetto logistico e gestire con maggiore tranquillità il prodotto nel punto vendita.

Restano, nel contempo, importanti problemi da risolvere quali i costi di gestione ancora troppo alti, eventuali remore da parte dei consumatori ed i rischi sanitari che potrebbero derivare da abusi termici lungo la catena di produzione, distribuzione e consumo del prodotto.

I dati in nostro possesso ci permettono di ipotizzare che l'atmosfera protettiva composta dalla miscela gassosa 60% CO₂ e 40% N₂ (ApA) risulti più efficace ai fini della preservazione del prodotto.

Utilizzando, quindi, idonee miscele di gas e materiali di confezionamento validi, si potrebbe teoricamente contare su un prolungamento della *shelf-life* fino a 25-30 giorni, adottando come parametro di conservabilità soltanto la Conta Batterica Totale (CBT). Da quanto dimostrato, tuttavia, già al volgere dei primi 8-12 giorni possono manifestarsi modificazioni delle caratteristiche organolettiche, quali odore e consistenza, dovuti all'azione proteolitica di enzimi muscolari ed alla flora alterante

specifica (SSOs - Specific Spoilage Organisms) presente nelle masse muscolari dei pesci.

Si dovrebbe pertanto incentivare lo sviluppo di metodiche di controllo “*target*” mirate specificatamente verso questa tipologia di microrganismi superando il concetto che vede legate le caratteristiche microbiologiche di un prodotto alimentare alla semplice “conta totale” od alla presenza/assenza di un particolare patogeno.

Concludendo possiamo affermare che il successo del confezionamento in atmosfera protettiva, come tecnologia di conservazione innovativa dei prodotti ittici, non può prescindere da fattori come:

- ✓ elevati standard qualitativi della materia prima;
- ✓ attuazione e controllo delle GMP (Good Manufacturing Practices) durante tutte le fasi del ciclo produttivo;
- ✓ scelta delle miscele e del G/P ratio (rapporto quantità gas: prodotto), valutando attentamente i già discussi fattori intrinseci ed estrinseci della specie (contenuto in grassi, carica batterica iniziale, provenienza ecc.);
- ✓ assoluto mantenimento e controllo della temperatura di conservazione, prossime a 0/+2° C, in modo da rallentare ulteriormente la proliferazione dei ceppi più psicrotrofi e non perdere i benefici apportati dalla AP. L’aumento della temperatura, infatti, diminuirebbe la percentuale di CO₂ dissociata nel prodotto e, di conseguenza, la perdita dell’effetto antimicrobico.
- ✓ ottimizzazione delle strategie di conservazione attraverso ulteriori approfondimenti relativi agli SSOs (specie, attività metaboliche, condizioni ottimali di crescita, ecc.) e soprattutto alle loro relative

interrelazioni. Da qui il nuovo concetto di “*Metabiotic Spoilage Associations*” inteso come gruppi di microrganismi interdipendenti, responsabili dell’alterazione del prodotto attraverso scambi di metaboliti e nutrienti basati su specifici meccanismi di comunicazione (“*Quorum Sensing*”).

Solo così potremo cercare di comprendere e gestire il complesso “sistema dinamico” che caratterizza l’ecologia microbica di un alimento (Ianieri *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAFIA:

1. Alasalvar C., Taylor K.D.A., Öksüz A., Garthwaite T., Alexis M.N., Grigorakis K (2000). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry* 72 (2001), 33-40.

2. A.O.A.C., (1984); *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 14th ed., Ed. Ass. Off. Analyt. Chemist, Washington; 2)*

3. Alessio G., Gandolfi G. (1975) *Riproduzione artificiale di orata, Sparus auratus (Linneo, 1758) (Osteichthyes, Sparidae), IV: Sviluppo embrionale e postatale*. Mem. Ist. Lombardo Sci. Lett., **26**: 95-132.

4. Arashisar Şükriye, Olcay Hisar, Mükerrerem Kaya, Telat Yanik (2004). *Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fillets*. *International Journal of Food Microbiology* 97 (2004) 209-214.

5. Austin B. (2002) *The bacterial microflora of fish*. *The Scientific World Journal*, **2**: 558-572.

6. Bini G. (1968-1970) *Atlante dei pesci delle coste italiane*, Mondo sommerso, pp. 1-10, Roma.

7. Callow E. H. (1932) *Gas storage of pork and bacon. Part 1. Preliminary experiments*. *Journal of the Society of Chemical Industry*, **51**: 116T-119T.

8. Cann D. C., Houston N. C., Taylor L. Y., Smith G. L., Thomson A. B., Craig A. (1984) *Studies of salmonids packed and stored under a modified atmosphere*. Torry Research Station, Aberdeen, Scotland.

9. Cann D. C., Smith G. L. and Huston N. C. (1983) *Further studies on marine fish stored under modified atmosphere packaging*. Torry Research Station. Aberdeen pp.61.

10. Cann D.C., Smith G.L., Houston N.C., 1983 *Further studies of the Packaging of Marine Fish Products Under Modified Atmospheres*. Torry Research Station, Aberdeen, U.K.

11. Castell C. H. (1971), *Some fundamental problems in the quality assessment of fishery products*, in "Fish inspection and quality control", Fishery News, Londra, pp. 9-13.

12. Chen H. M., Meyers S. P., Hardy R. W. and Biede S. L., 1984 *Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions*. Journal of Food Science, **49**: 1337-1340.

13. Church I. J., Parsons A. L. (1995) *Modified atmosphere packaging technology: a review*. Journal of Science of Food and Agriculture, **67**: 143-152.

14. Church N., 1998. *MAP fish and crustaceans-sensory enhancement*. *Food Science and Technology Today* 12 (2), 73-83.

15. Chytiri S., I. Chouliara, I.N. Savvaidis, M.G. Kontominas (2003). *Microbiological, chemical, and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout*. *Food Microbiology* 21 (2004) 157-165.

16. Civera T., Parisi E., Amerio G.P., Giaccone V. (1995) *Shelf-life of vacuum-packed smoked salmon: microbiological and chemical changes during storage*. Arch. Lebensmittelhyg, **46**: 13-17.

17. Connel J. J. (1975). *Control of fish quality*. London: Fishing News Books Ltd.

18. Cortesi M. L., Visciano P. (2001) *Prodotti ittici freschi confezionati sottovuoto o in atmosfera protettiva. Conservabilità e sicurezza sanitaria*. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, anno XXII, aprile, n. 4, pp. 17-25.

19. Cortesi M. L., Visciano P. *Prodotti ittici freschi confezionati sottovuoto o in atmosfera protettiva. Obiettivi & Documenti Veterinari 4 (2000) 17-25.*

20. Coyne F. P. (1932) *The effects of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish*. Part 1. *Journal of the Society of Chemical Industry*, **51**: 119T-121T.

21. Coyne F. P. (1933) *The effects of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish*. Part 2. *Journal of the Society of Chemical Industry*, **52**: 19T-24T.

22. Dainty R. H. *Chemical/biochemical detection of spoilage. International Journal of Food Microbiology 33 (1996) 19-33.*

23. Dainty R. H., Mackey B.M. (1992) *The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chilled stored meat and spoilage processes*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, **21**: 103S-114S.

24. Dalgaard P. (1995) *Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish*. *Int. J. Food Microbiol.* **26**: 319-333.

25. Dalgaard P., Gram L., Huss H. (1993). *Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. International Journal of Food Microbiology. 19,283-294. 10)*

26. 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.

27. Daniels J. A., Krishnamurthi R and Rizvi S. S. H 1985 *A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality*. Journal of Food Protection, **48**: 532-537.

28. Davis A. R. and Slade A., (1995) *Fate Aeromonas and Yersinia on modified-atmosphere-packaged (MAP) cod and trout*. Letters in Appl. Microbiol., **21**: 354-358.

29. Davis H. K. (1993). *Chapter 9 : Fish*. In : R. T. Parry (editor), *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*, Blackie, Glasgow. 11)

30. Davis H. K. (1998) *Fish and shellfish*. In: Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food (edited by B. A. Blakistone), 2nd edn. Chapter 9, pp.194-239. Glasgow: Blakie Accademy and Professional.

31. Debevere J. M. And Voets J. P. (1974). *A rapid selective medium for the determination of trimethylamineoxide-reducing bacteria*. Zeitschrift fur Allg. Microbiol. **14**, 655-658.

32. Debevere J., Boskou G. (1996). *Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets*. International Journal of Food Microbiology **31** (1996) 221-229. 13)

33. Decreto del Ministro della Sanità del 16/3/94, n. 266.

34. Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 28/7/97, n. 311.
35. Decreto Legislativo del 27/1/92, n. 109.
36. Dixon N. M. (1989) *The inhibition of CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms*. Journal of Applied Bacteriology, **67**: 109-136.
37. Donald B. And Gibson D. M. (1992). *Preliminary observations on the flora of fish vacuum packed salmon steaks*. In: H. H. Huss et al. (editors), *Quality Assurance in the Fish Industry, Conference Proceedings*, Elsevier, Amsterdam.
38. Easter M. C., Gibson D. M. and Ward F. B. (1983). *The induction and location of trimethylamine-N-oxide reductase in Alteromonas sp. NCMB 400*. J. Gen. Microbiol. 129, 3689-3696.
39. Edwards R. A., Dainty R. H., Hibbard C. M. (1987) *Volatile compounds produced by meat pseudomonads and related reference strain during growth on beef stored in air at chill temperatures*. J. Appl. Bacteriol., **62**: 403-412.
40. Einarsson Hjörleifur. *Evaluation of a predictive model for the shelf life of cod (Gadus morhua) fillets stored in two different atmospheres at varying temperatures*. International Journal of Food Microbiology 24 (1994) 93-102.
41. El Marrakchi A., Bennour M., Bouchriti N., Hamama A. & Tagafait H. 1990. *Sensory, chemical and microbiological assessments of Moroccan sardines (Sardina pilchardus) stored in ice*. Journal of Food Protection 53(7), 600-605.
42. Emborg J., Laursen B. G., Rathjen T. and Dalgaard P. (2001). *Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (Salmo salar) at 2°C*. Journal of Applied Microbiology 92 (2002) 790-799.

43. Fao (2002) *The state of world fisheries and aquaculture*. Rome.
44. Farber J. M. (1991) *Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review*. J. Food Prot., **54**: 58-70.
45. Farber J. M. (1991) *Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology – a review*. Journal of Food Protection, **54**: 58-70.
46. Farber J. M., Warburton D. W., Gour L. And Milling M. (1990). *Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres*. Food Microbiol. 7, 327-334.
47. Farber J.M., 1991. *Microbial aspects of modified-atmospheres packaging technology : a review*. Journal of Food Protection 54, 58-70.
48. Fischer W., Bauchot M. L., Schneider M. (1987) *Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37, 1. Vegetaux et Invertébrés*, Publication préparée par la FAO (Project GCP/INT/422/EEC). Roma, FAO, pp.760.
49. Froese R., Pauly D., Editors (2004) FishBase. World Wide Web electronic publication, indirizzo web <http://www.fishbase.org/>, version 11/2004.

50. Galli A. (1999), *Microbiologia degli Alimenti*, Paravia, Torino, pp. 233-236.

51. Genigeorgis C. (1985). *Review: Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. International Journal of Food Microbiology 1, 237-251.*

52. Ghazala S. (1994). *New packaging technology for seafood preservation-shelf life extension and pathogen control. In: Fisheries Processing: Biotechnological applications. Ed., A. M. Martin, Chapman & Hall, London.*

53. Giaccone V. (2001), *Il confezionamento dei prodotti ittici sottovuoto e in atmosfera protettiva*, atti convegno "Metodologie avanzate di ricerca e tematiche strategiche per lo sviluppo del settore agroalimentare" tenutosi a Mosciano Stazione (TE) il 6 e 7 dicembre 2000, Media edizioni, Selva Piana di Mosciano S.A. (TE), pp. 20-23.

54. Giaccone V., Bertoia G. (2000) *Il pesce si conserva... in un soffio!*. Il Nuovo Progresso Veterinario, **55** (19): 896-905.

55. Gill C. O. and Penney N. (1988) *The effects of initial gas volume to meat weight ratio on the storage life of chilled beef packaged under carbon dioxide*. Meat Science, **22**: 53-63.

56. Gill C. O. and Tan K. H. (1980) *Effect of carbonate dioxide on growth of meat spoilage bacteria*. Appl. and Envir. Microbiol., **39**: 317-319.

57. Gill T. A. (1992). *Chemical and biochemical indices in seafood quality*. In: Huss H. H., Jacobsen M., Liston J. (Eds.), *Quality Assurance in the Fish Industry*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 377-387.

58. Giordano L. (2004) *Il confezionamento dei prodotti ittici in atmosfera modificata*. *Il Pesce*, **5**: 79-84.

59. Gorczyca E., Pek Poh Len (1985) *Mesophilic spoilage of bai trout (Arripis trutta), bream (Acanthopagrus butciri) and mullet (Aldrichetta forsteri)*. In A. Reilly (editor), *Spoilage of Tropical Fish and Product Development*, FAO fish. Rep. 317 Suppl. FAO, Rome, Italy, 123-132.

60. Gould Grahame W. *Methods for preservation and extension of shelf life*. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1996) 51-64.

61. Gram L. (1992) *Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice at ambiente temperature*. In: E. H. Bligh (editor), *Seafood Sci. and Tech.* Fishing News Books, Blackwell, Oxford 225-233.

62. Gram L. (1993) *Inibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of Pseudomonas strains isolated from spoiled and fresh fish*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2197-2203.

63. Gram L., Dalgaard P. (2002) *Fish spoilage bacteria – problems and solution*. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**: 262-266.

64. Gram L., Huss H. H. (1996), *Microbiological spoilage of fish and fish products*. International Journal of Food Microbiology, **33**: 121-137.

65. Gram L., Huss H. H. (2000) *Fresh and Processed Fish and Shellfish*. Microbial Ecology of Different Types of Food, **21**: 472-497.

66. Gram L., Melchiorsen J. (1996) *Interaction of two fish spoilage bacteria, Shewanella putrefaciens and Pseudomonas sp. In fish model system*. J. Appl. Bacteriol., **80**: 589-595.

67. Gram L., Oundo J., Bon J. (1989) *Storage life of Nile perch (Lates niloticus) dependent on storage temperature and initial bacterial load*. Trop. Sci., **29**: 221-236.

68. Gram L., Trolle G. and Husse H. H. (1987). *Detection of specific spoilage bacteria from fish at low (0°C) and high (+20°C) temperatures*. Int. J. Food Microbiol. **4**, 65-72.

69. Gram L., Trolle G., Huss H. H. (1987) *Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0° C) and high (20° C) temperatures*. Int. J. Food Microbiol., **4**: 65-72.

70. Gram L., Wedell-Neergaard C., Huss H. H. (1990) *The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (Lates niloticus)*. Int. J. Food Microbiol., **10**: 303-316.

71. Gram. L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J. B., Christensen A. B., Givskov M. (2002) *Food – interaction between food spoilage bacteria*. Int. J. Food Microbiol., **78**: 79-97.

72. Grigorakis K., K.D.A. Taylor, M.N. Alexis (2002). *Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (Sparus aurata)*. Food Chemistry 81 (2003) 263-268. 26)

73. Haines R. B. (1933) *The influence of carbon dioxide on the rate of multiplication of certain bacteria, as judged by viable counts*. Journal of the Society of Chemical Industry, **52**: 13T-17T.

74. Hara A., Radin N. S. (1978): *Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent*. Anal. Biochem. , 90, 420-429. 27)

75. Hattula T., Kiesvaara M. & Moran M. (1993). *Freshness evaluation in european whitefish (Coregonus wartmanni) during chill storage*. Journal of Food Science 58(6), 477-488.

76. Hebard C.E., Flick J. & Martin R.E. 1982. *Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shell fish*. In R.E. Martin, G.J. Flick, C.E. Hebard & D.R. Ward, *Chemistry and biochemistry of marine food products* (pp. 149-304). Westport, Connecticut: Avi.

77. Herbert R. A., Shewan J. M. (1976) *Roles played by bacterial and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling northsea cod (Gadus morhua)*. J. Sci. Food Agric., **27**: 89-94.

78. Hielmland, K., M. Christie and J. Raa (1983). *Skin mucous protease from rainbow trout (Salmo gairdneri, Richardson)*. 1. Biological significance. *J. Fish Biol.*, **23**: 13-22.

79. Hiltz D. F., Dyer W. J., Nowlan S., & Dingle J. R. (1972). *Variation of biochemical quality indices by biological and technical factors*. In R. Kreuzer, *Fish inspection and quality control* (pp. 191-195). London : Fishing News Books Ltd.

80. Ho C. S., Smith M. D. and Shanahan J. F. (1987) *Carbon dioxide transfer in biochemical reactors*. *Advances in Biochemical Engineering*, **35**: 83-125.

81. Huidobro A., Pastor A., Tejada M. (2000) *Quality Index Method Developed for Raw Gilthead Seabream (Sparus Aurata)*. *Journal of Food Science*, Vol. 65, **7**: 1202-1205.

82. Huss H. H. (1995), *Post mortem changes in fish*, in "Quality and quality changes in fresh fish", FAO, Roma, pp. 35-92.

83. Huss H. H., Dalgaard D., Hansen L., Ladefoged H., Pedersen A., Zittan L. (1974) *The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice*. *J. Food Technol.*, **9**: 213-221.

84. Huss H.H. (1988). *Fresh fish-quality and quality changes*. Rome: FAO Fisheries Series No. 29.

85. Ianieri A., Francioso E., Martino G., Ricci G., Riecco G. (1999) *Valutazioni microbiologiche e fisico-chimiche in un industria di trasformazione di salmone affumicato: nota preliminare*. Atti LIII Convegno S.I.S.Vet., pp. 353-354.

86. Ianieri A., Vergara A., Colavita G. (2005) *Microbiologia dei prodotti ittici refrigerati*. Atti Conferenza Nazionale OXOID, pp. 47-54.

87. International Commission on Microbiological Specification for Food. (1996) *Sampling planes for fish and shellfish*. Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and scientific application, 2nd ed., Vol. 2. Pp. 181-196. University of Toronto Press, Toronto.

88. Jacober L. F., & Rand J. A. G. (1982). *Biochemical evaluation of seafood*. In R. E. Martin, G. J. Flick C. E., C. E. Hebard, & D. R. Ward, *Chemistry & biochemistry of marine food products* (pp. 347-366). Westport CT: AVI Publishing Company.

89. Jensen M. H., Petersen A., Røge E.H. and Jepsen A. (1980). *Chilled and frozen storage. Storage of chilled cod under vacuum and various concentrations of carbon dioxide*. In: J. J. Conell and staff of Torry Research Station (editors), *Advances in Fish Science and Technology*, Fishing News Books, London.

90. Jones N. R. (1958). *Hypoxanthine and other purine-containing fractions in fish muscle as indices of freshness*. In: R. Kreuzer, *The technology of fish utilization* (pp. 179-183). London: Fishing News Books Ltd.

91. Jorgensen L. V., Huss H. H. (1989) *Growth and activity of Shewanella putrefaciens isolated from spoiling fish*. Int. J. Food Microbiol., **9**: 51-62.

92. Jorgensen L. V., Huss H. H., Dalgaard P. (2000) *The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon*. J. Appl. Microbiol., **89**: 920-934.

93. Karube I., Matsuoka H., Suzuki S., Watanabe E. & Toyama K. (1984). *Determination of fish freshness with an enzyme sensor system*. Journal of the Agricultural and Food Chemistry, **32**, 314-319.

94. Knoche W. (1980) *Chemical reactions of CO₂ in water*. In: Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide (edited by C. Bauer, G. Gros and H. Batels), pp. 3-11. Berlin: Springer-Verlag.

95. Kyrana V.R., Lougovois P., & Valsamis D. S. (1997). *Assessment of shelf life of maricultured gilthead sea bream (Sparus aurata) stored in ice*. International Journal of Food Science and Technology, **32**, 339-347.

96. Kyrana V.R., & Vladimirov P. Lougovois (2001). *Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (Dicentrarchus labrax) stored in melting ice*. International Journal of Food Science and Technology **37** (2002) 319-328.

97. Laneloungue M., Hanna M. O., Finne G., Nickelson R., Vanderzant C. (1982) *Storage characteristics of fish fillets (Archosargus probatocephalus) packaged in modified gas atmospheres containing carbon dioxide*. J. Food Prot., **45**: 440-444.

98. Learson R.J. & Licciardello J.J., 2000. *Processing and Preservation of North Atlantic Groundfish*. Marine and freshwater products handbook (pp. 291-298). Lancaster USA: Technomic Publishing.

99. Leisner J. J., Millan J. C., Huss H. H., Larsen L. M. (1994) *Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish*. J. Appl. Bacteriol., **76**: 417-423.

100. Lima dos Santos C. A. M. (1978) *Bacteriological spoilage of iced Amazonian freshwater catfish (Brachyplatistoma vaillanti valenciennes)*. M. Sc. Thesis. Loughborough University of Technology, England.

101. Liston J. (1980), Microbiology in fishery science. *Advances in Fishery Science and Tecnology* (ed. Connell, J. J.), Fishing News Books, Farnham, England, pp.138-157.

102. Love R.M. 1992. *Biochemical dynamics and the quality of fresh and frozen fish*. In G.M. Hall (Ed.), *Fish processing technology* (pp. 1-30). New York: Blackie Academic Professional.

103. Lucchetti A. (2005) *L'orata*. Il Pesce n.2 aprile 2005, pp. 71-75.

104. Malle P., Poumeyrol M., 1989. *A new chemical criterion for the quality of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen (%)*. *J. Food Prot.* 50, 419-423.

105. Marcilene C., Heidmann S., and Oetterer M. (2003) *Use of Modified Atmosphere in Seafood Preservation*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.46, n. 4: pp. 569-580.

106. Martinelli M., Mocchi A., Pagliata T.M. (1992) *Differenti abitudini alimentari di stadi giovanili di Diplodus puntazzo (Cetti, 1777), Sparus aurata (Linneo, 1758) e Dicentrarchus labrax (Linneo, 1758) nella laguna di Casaraccio (Sardegna nord-occidentale)*, Biol. Mar. suppl. al Notiziario SIBM., 1: 177-178.

107. Miller III A., Scanlan R. A., Lee J. S., Libbey L.M. (1973) *Identification of volatile compounds produced in sterile fish muscle (Sebastes melanops) by Pseudomonas putrefaciens, Pseudomonas fluorescens and an Achromobacter species.* Appl. Microbiol., **26**: 18-21.
108. Moral A., (1987). *Métodos físico quimicos de control de calidad de pescados. Alimentación Equipos y Tecnología*, 5-6, 115-122.
109. Murray, C.K. and T.C. Fletcher (1976). *The immunohistochemical location of lysozyme in plaice (Pleuronectes platessa L.) tissues.* J. Fish Biol., **9**: 329-334.
110. N. C. Shantha, E. A. Decker (1994): *Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide value of food lipids.* J. A. O. A. C. Int. **77**, 2, 421-424;
111. Nakayama T., Ooguchi N. & Ooi A. 1999. *Change in rigor mortis of red sea-bream dependent on season and killing method.* Fisheries Science. Tokyo, **65**(2), 284-290.
112. Oberlender V., Hanna M. O., Miget R., Vanderzant C., Finne G. (1983) *Storage characteristics of fresh swordfish steaks stored in carbon dioxide-enriched controlled (flow-through) atmosphere.* J. Food Prot., **46**: 434-440.
113. Ogrydziak D. M. and Brown W. D. (1982) *Temperature effects in modified-atmosphere storage of seafoods.* Food Technology, **36**: 86-96.
114. Oka H., (1989) *Packaging for freshness and the prevention of discoloration of fish fillets.* Packaging Technology and Science, **2**: 201-213.

115. OLIVIERI V. (1999) *Gli animali acquatici di interesse veterinario ; Opera multimediale Edizioni RDM Informatica, 1999*

116. Orban E. (1996), *Controllo igienico-sanitario nella filiera dei prodotti ittici*, Industrie Alimentari, 35(348): 531-537.

117. Paludan-Müller C., Dalgaard P., Huss H. H., Gram L. (1998) *Evaluation of the role of Carnobacterium piscicola in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5° C.* International Journal of Food Microbiology, 39: 155-166.

118. Parkin K. L. and Brown W. D. (1982) *Preservation of seafood with modified atmospheres*. In: Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products (edited by R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Herbard and D. R. Ward), pp. 453- 465. Westport, CT: AVI Publishing Cp.

119. Parry R. T. (1993) Introduction. In: Parry R. T. (ed.) *Principles and application of modified atmosphere packaging of food*. London: Blackie., pp. 1-18.

120. Pearson D. (1973): *Laboratori techniques is food analysis*.
London Butter Worths;

121. Pedersen L., Snabe L. (1995) *Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from chilled, vacuum-packaged temperate and tropical fish products*. M.Sc. Thesis Danish Institute for Fisheries Research, Lyngby, and the Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen, Denmark.

122. Philips O.C.A., 1996. *Review, modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. International Journal of Food Science and Technology*, 31, 463-479.

123. Poli B. M., Scappini F.. *La relazione tra metodi di uccisione e la qualità del pesce. Edizioni Pubblicità Italia; Il pesce* 6 (2004).

124. Poli Bianca M., Giuliana Parisi, Giulia Zampacavallo, Massimo Mecatti, Paola Lupi, Manuela Gualtieri, Oreste Franci. *Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. Aquaculture* 202 (2001) 303-315.

125. 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*, vol. 68, No. 10, pp. 2201-2207.

126. Randell K., Ahvenainen R. and Hattula T. (1995) *Effect of gas/product ratio and CO₂ concentration on the shelf-life of MA packed fish. Packaging Technology and Science*, 8: 205-218.

127. Rebein H., Marinsdottir E., Blomsterberg F., Valdimarsson G. & Oehlenschlaeger J. 1994. *Shelf life of ice-stored redfish, *Sebastes marinus* and *S. mentella*. International Journal of Food Science and Technology*, 29, 303-313.

128. Reddy N. R., Armstrong D. J., Rhodehamel E. J and Kauter D. A. (1992) *Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under atmospheres - a review. Journal of Food Safety*, 12: 87-118.

129. Reddy N. R., Villanueva M., Kauter D. A. (1995) *Shelf-life of modified atmosphere-packaged fresh tilapia fillets stored under refrigeration and temperature-abuse conditions*. *J. Food Prot.*, **58**: 908-914.

130. Reddy N.R., Shreiber C.L., Buzard K.S., Skinner G.E., Armstong D.J., 1994. *Shelf life of fresh tilapia fillets packaged in high barrier film with modified atmospheres*. *Journal of Food Science* 59, 260-264.

131. Reineccius G. (1990). *Off-flavours in foods*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29, 381-402.

132. Robertson G. L. (1993). *Food Packaging : Principles and Practice*, Marcel Dekker, New York.

133. Ruiz-Capillas C.,Moral A. (2000). *Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored ice*. *Food Research International* 34 (2001) 441-447.

134. Saito T., Arai T. &Mutsuyoshi M. (1959). *A new method for estimating the freshness of fish So cie*. *Bulletin of the Japanese ty of Scientific Fisheries*, 24, 759-750.

135. Shamshad S. I., Kher-un-Nisa, Riaz M., Zuberi R., Quadri R.B. (1990) *Shelf-life of shrimp (Penaeus merguensis) stored at different temperatures*. *J. Food Sci.*, **55**: 1201-1205.

136. Sharp Jr. W. F., Norbach. J. P. and Stuibler D. A. (1986). *Using a new measure to define shelf life of fresh whitefish*. *Journal Food Science*, **51**: 936-939.

137. Shewan J. M. (1962), *The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes*. Recent Advances in Food Science (eds. Hawthorn, J. and Muil Leitch, J.), **1**: 167-193.

138. Shewan J. M. (1977), *The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action*. Proceedings of the Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish, Tropical Products Institute, London, pp. 51-60.

139. Shewan J. M. (1950). *Improving the quality of "white" fish by the use of gas storage*. *Fishing News* 1946.

140. Shewan J. M., & Hobbs G. (1987). *The bacteriology of fish spoilage and preservation*. *Progressive Industrial Microbiology* 6, 169-208.

141. Sigholt T., Erikson U., Rustad T., Johansen S., Nordtvedt T. S., & Seland A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 62(4), 899-905.

142. Silliker J. H. (1981) *The influence of atmospheres containing elevated levels of CO₂ on growth of psychrotrophic organisms in meat and poultry*. In: *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity*. T. A. Roberts Ed., Academic Press, New York.

143. Silliker J. H. (1981). *The influence of atmospheres containing elevated levels of CO₂ on growth of psychrotrophic organisms in meat and poultry*. In: *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity*. T. A. Roberts Ed., Accademic Press, New York.

144. Simeonidou S., Govaris A., Vareltzis K. (1998). *Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice*. *Food Res. Int.* 30, 479-484.

145. Sivertsvik M., Jeksrud W. K., Rosnes J. (2002) *A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety*. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**: 107-127.
146. Smith W., Davies E.A. (1995). *Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods*. *Food Chemistry*, **52**, 367.
147. Stammen K., Gerdes D. and Caporaso F. (1990) *Modified atmosphere packaging of seafood*. *Critical Reviews in Food Science and Technology*, **29**: 301-331.
148. Stammen K., Gerdes D., Caporaso F., 1990. *Modified atmosphere packaging of sea food*. *Food Science and Nutrition* **29**, 301-331.
149. Statham J.A., 1984. *Modified atmosphere storage of fisheries products: the state of the art*. *Food Technology in Australia* **36** (5), 233-239.
150. Stenstrom I. M., Molin G. (1990) *Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to Shewanella putrefaciens*. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**: 601-618.
151. Stenström I.M., 1985. *Microbial flora of cod fillets (Gadus morhua) stored at 2°C in different mixtures of carbon dioxide and nitrogen/oxygen*. *Journal of Food Protection* **48**, 585-589.
152. Sumner J., Orejana F., & Cordial N. (1986). *Keeping quality in ice of tilapia from warm and cold water*. *Asean Food Journal* **2**(2), 71-73.
153. Surette M. E., Gill T. A., & LeBlanc P. J. (1988). *Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (Gadus morhua) and its relationship to spoilage*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **36**, 19-22.

154. Taoukis P. S., Koutsoumanis K., Nychas G. J. E. (1999). *Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. International Journal of Food Microbiology* 53 (1999) 21-31.
155. *The state of world fisheries and aquaculture*. Roma, Fao 2002
156. Tiecco G. (2000a), *Ispezione degli alimenti di origine animale*, Calderini Edagricole, Bologna, pp. 488-494.
157. Tiecco G. (2000b), *Microbiologia degli alimenti di origine animale*, Calderini Edagricole, Bologna, pp. 82-91.
158. Tiffney P. And Mills A. (1982). *Storage trials of controlled atmosphere packaged fish products. Tech. Rep. No. 191, Sea Fish Industry Authority, U.K.*
159. Tortonese E. (1975), *Fauna d'Italia: Osteichthyes*, Calderini ed., Bologna, 11: 636 pp.
160. Truelstrup Hansen L., Gill T., Huss H. H. (1995) *Effect of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon*. *Food. Res. Int.*, 28: 123-130.
161. Uniprom (Consorzio Promozione Prodotti Ittici), *Indagine internazionale per l'individuazione di tecnologie e tecniche innovative relative ai prodotti ittici*. www.uniprom.it

162. Wolfe S. K. (1980) *Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce*. Food Technology, **34**: 55-58.

163. Zhang H. Z. & Lee T. C. (1997). *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile flavour compounds in mackerel for assessment of fish quality*. In F. Shahidi & K. R. Cadwallader, *Flavour and lipid chemistry of seafoods*, (pp. 55-63) ACS Symposium Series 674. Washington DC: American Chemical Society.

SITI WEB CONSULTATI

- ✓ **www.albanesi.it**

- ✓ **www.assoittica.it**

- ✓ **www.pubblicitàitalia.com**

- ✓ **www.univ.trieste.it**

- ✓ **www.istitutoveneto.it**

- ✓ **www.fao.it**

- ✓ **www.fishbase.org**

- ✓ **www.inran.it**

✓ www.mipaf.it

✓ www.pesca.ismeait

✓ www.uniprom.it