

## I.A.M.C-CNR di Capo Granitola



### **Protocolli di pretrattamento sul prodotto agroalimentare fresco o minimamente processato e individuazione del processo ottimale.**

Masullo T.<sup>a</sup>, Bennici C.<sup>a</sup>, Salamone M.<sup>a</sup>, Tagliavia M.<sup>a</sup>, D'Agostino F.<sup>b</sup>, Nicosia A.<sup>a</sup>, Cuttitta A.<sup>a</sup>, Monastero C.<sup>b</sup>, Di Natale M.<sup>b</sup>, Ranalli M.<sup>b</sup>, Mirabello D.<sup>b</sup>, Stincone P.<sup>b</sup>, Abbate L.<sup>c</sup>, Motisi A.<sup>c</sup>, La Bella F.<sup>c</sup>, Fontana E.<sup>c</sup>, Carra A.<sup>c</sup>, Mercati F.<sup>c</sup>, Stampone G.<sup>d</sup>, Di Piero M.<sup>d</sup>, Ciancimino C.<sup>d</sup>, Di Noto A.M.<sup>e</sup>, Oliveri G.<sup>e</sup>, Alio V.<sup>e</sup>, Carimi F.<sup>e</sup>, Mazzola S.<sup>b</sup>

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

b - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

c - Istituto di Bioscienze e Biorisorse, IBBR-CNR, Corso Calatafimi 414, PA.

d - Bionat italia s.r.l. tech beyond via aquileia, 34 90144 Palermo, Italy.

e - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area di Microbiologia degli Alimenti Palermo.

## Sommario

1. Obiettivo.....	3
2. Tecnologie di trattamento e stoccaggio.....	3
3. Pianificazione dell'esperimento e processamento del tessuto .....	5
4. Valutazione sperimentale del pretrattamento.....	5
4.1 Analisi degli acidi grassi e valutazione del potere antiossidante.....	5
4.2 Studio della carica batterica totale su campioni ittici.....	6
4.2.1 Conteggio delle colonie.....	6
4.3 Determinazione della trimetilammina.....	8
5. Ringraziamenti .....	9
6. Bibliografia.....	9

## 1. Obiettivo

L'obiettivo di questo studio è la messa a punto dei protocolli di conservazione per le diverse tipologie di prodotti ittici mediante lo studio delle variazioni del profilo nutrizionale di questi ultimi forniti in relazione al tipo di trattamento subito nell'immediato post raccolta con lo scopo di acquisire informazioni utili sul prolungamento della *shelf life* del prodotto.

## 2. Tecnologie di trattamento e stoccaggio.

Il pesce fresco risulta essere un prodotto altamente deperibile, con un limite di conservazione abbastanza breve rispetto al surgelato. Il deterioramento del prodotto è causato dall'ossidazione lipidica, dall'attività enzimatica e dalle attività metaboliche dei microrganismi che si sviluppano nelle carni (Arashisara et al., 2004).

Le specie ittiche ricche in omega3, EPA e DHA sono più facilmente deteriorabili per effetto dell'ossidazione dei lipidi (Sánchez-Alonso & Borderias, 2008) che determina modifiche nelle caratteristiche organolettiche del prodotto, e quindi una diminuzione del valore nutrizionale e conseguente perdita economica (Amanatidou et al., 2000; Gramza et al., 2006).

La temperatura risulta essere uno dei parametri determinanti nella preservazione dei prodotti ittici. Tuttavia, la perdita della qualità anche durante lo stoccaggio refrigerato risulta inevitabile, fattore questo, determinante per il corretto consumo del prodotto.

Congelamento e stoccaggio a freddo sono tra i più convenzionali metodi impiegati per preservare le proprietà sensoriali e nutrizionali del pesce, prima che sia consumato come tale o che sia sottoposto ad altri processi tecnologici (Aubourg et al., 2004).

Tra i processi tecnologici più diffusi ricade l'affumicatura, la cui temperatura ed il periodo di stoccaggio hanno effetto sulle proprietà delle proteine e degli enzimi. La temperatura è importante infatti per la solubilità e la composizione delle miofibrille.

Ad oggi esistono anche informazioni inerenti la conservazione del pesce fresco tramite le sole tecniche di confezionamento (Lannelongue et al. 1982; Oberlender et al, 1983.; Pantazi et al., 2008) o in combinazione con processi quali l'affumicatura (Muratore e Licciardello, 2005), o ancora con l'ausilio di oli essenziali (EOs) come origano (Giatrakou et al., 2008) e timo (Kykkidou et al., 2009). A tale proposito, il confezionamento in atmosfera modificata (MAP) in combinazione con la refrigerazione ha dimostrato essere un efficace metodo di conservazione per l'estensione della *shelf-life* del pesce fresco e dei prodotti ittici in genere (Stammen et al., 1990; Sivertsvik et al., 2002).

Studi condotti sull'effetto della conservazione del pesce in ambiente refrigerato (4 °C), sottovuoto e in atmosfera modificata (MAP) hanno evidenziato come tra i tre trattamenti (vuoto, MAP e aria), sia MAP che confezionamento sottovuoto (VP) risultino i più efficaci nell'inibizione della crescita di

microflora aerobica fino a 9-10 giorni di stoccaggio refrigerato. Nelle stesse condizioni, i valori di azoto, Trimetilammina (TMA-N) e di l'azoto basico volatile totale (TVB-N) risultano invece superiori al valore limite indipendentemente dalla tipologia di stoccaggio (Pantazi et al., 2008).

Per molti prodotti alimentari, la tecnologia del "superchilling" ha mostrato un più efficiente mantenimento della qualità rispetto alla tradizionale refrigerazione (Einarsson, 1988). Il "superchilling" viene spesso utilizzato per descrivere un processo, in cui i prodotti alimentari sono stoccati tra il punto di congelamento e 1/2 °C al di sotto di questo. La shelf life degli alimenti superchilled è molto più breve di quella dei cibi congelati, ma la minore quantità di acqua congelata all'esterno determinerà minori cambiamenti nella microstruttura delle proteine, un minor grado di denaturazione dovuto al congelamento e un minore gocciolamento (Einarsson, 1988).

La combinazione dello stoccaggio (superchilled) a - 2 °C con il confezionamento in atmosfera modificata (MAP) ha mostrato un miglior mantenimento della qualità della carne e una crescita microbica trascurabile (Sivertsviket et al., 2003).

Recenti studi evidenziano sperimentalmente come per conservare il pesce refrigerato mantenendo inalterate le caratteristiche organolettiche dei prodotti, possano essere usati anziché additivi sintetici, antiossidanti e antimicrobici naturali. L'uso di antiossidanti è uno dei più efficaci mezzi per aumentare la shelf-life e preservare la qualità dei alimentare (Serdaroglu & Felekoglu, 2005). Gli antiossidanti sono sostanze che possono ritardare o prevenire l'ossidazione causata da ossigeno atmosferico nei grassi e negli oli (Benjakul et al., 2005; Sarkardei & Howel, 2008). Essi possono rallentare l'ossidazione e l'insorgere dell'irrancidimento reagendo con radicali liberi e idroperossidi stabilizzanti (Benjakul et al., 2005). Tra questi, ad esempio, gli acidi organici come l'acido citrico e l'acido ascorbico sono ben noti per il loro ruolo di chelanti e acidificanti (Oktar et al., 2001; Kim et al., 2006) e per avere attività antimicrobica (Theron & Lue, 2007). Quest'ultima, nel caso dell'acido citrico è dovuta alla sua forma non dissociata che può superare la membrana cellulare in modo semplice e acidificare il citoplasma (Brul & Coote, 1999).

Trattamenti con acido ascorbico hanno prodotto risultati migliori rispetto a quelli ottenuti esclusivamente con l'uso di acido citrico, mentre l'impiego di entrambi gli acidi combinanti ha dimostrato nella fase di pre-congelamento, una maggiore efficacia nel prevenire l'ossidazione dei lipidi nel pesce una volta congelato e opportunamente confezionato in atmosfera modificata e sottovuoto (Rostamzad et al., 2011). Dati di letteratura suggeriscono l'effetto sinergico di acido ascorbico e tocoferolo (integrati nella dieta di alcune specie ittiche) nell'incremento dell'attività antiossidante per alcuni prodotti. Infatti, il principale antiossidante utilizzato nei mangimi è la vitamina E liposolubile, normalmente aggiunta in forma di acetato di tocoferolo. Tuttavia studi hanno dimostrato che il tocoferolo mostra un maggiore effetto se somministrato all'animale vivo, mentre

l'acido ascorbico funziona meglio se aggiunto post mortem (Morrissey et al., 1998; Bou et al., 2001; Packer et al., 1979).

### **3. Pianificazione dell'esperimento e processamento del tessuto.**

Considerato che lo stoccaggio refrigerato, l'affumicatura ed il sottovuoto rappresentano tre delle principali tecniche di conservazione dei prodotti ittici per il mantenimento della shelflife, a scopo sperimentale come ulteriore metodologia di conservazione del pesce fresco è stato testato il trattamento con acido ascorbico e acido citrico.

A partire dallo stesso trancio di pesce spada fresco, 5g di tessuto sono stati immersi in 10 ml di una soluzione di 0,5% acido ascorbico, 2% acido citrico e 3% NaCl, pH 4. Dopo pochi secondi dall'immersione i campioni apparivano visivamente marinati, per effetto sia dell'osmosi che dell'aggressione acida che abbassando il pH della soluzione ossidava e denaturava irreversibilmente le proteine del tessuto.

Si è quindi focalizzata l'attenzione su un pretrattamento esclusivamente antiossidante, ovvero nella medesima maniera i campioni sono stati immersi in una soluzione di 0,5% acido ascorbico, 50mM citrato di sodio e 2% NaCl, pH 5/6. Dopo 3 minuti dall'immersione, avendo valutato che nessuna modifica a carico del tessuto era visibilmente apprezzabile, i campioni sono stati prelevati e conservati in tubi sterili a 4 °C per 6 giorni. Tutte le porzioni sono state processate con cadenza di 48 ore a partire dal tempo zero (per il quale un controllo negativo era predisposto), per un totale di 3 punti di recovery (2g, 4g, 6g). Per ciascun punto di prelievo era predisposto un controllo interno non trattato.

Su tali campioni è stata condotta l'analisi degli acidi grassi per la valutazione del potere antiossidante della soluzione testata, l'indagine microbiologica per la stima della carica batterica totale ed infine l'indagine chimico-fisica per la valutazione della trimetilammina.

Il tessuto è stato quindi diversamente processato in funzione del tipo di indagine da effettuare.

## **4. Valutazione sperimentale del pretrattamento**

### ***4.1 Analisi degli acidi grassi e valutazione del potere antiossidante.***

L'analisi sul contenuto degli acidi grassi nei campioni precedentemente descritti è stata condotta mediante il protocollo individuato da Folch e colleghi (1957). Ciascun campione in seguito all'aggiunta di un agente anidrificante e disperdente (silicato di calcio) è stato omogenato per circa 5'. Quindi i campioni sono stati posizionati all'interno delle opportune celle di estrazione per una Accelerated Solvent Extraction (ASE). Come miscela di estrazione si è utilizzato il DCM/Acetone (80:20v/v) ed una temperatura di 100°C. Dopo 15' si è proceduto ad una purificazione utilizzando

cartucce SPE, usando come fase stazionaria il gel di silice e come fase mobile il DCM/Acetone (80:20v/v). Prima dell'eluizione sotto vuoto, si è proceduto al condizionamento della colonna utilizzando circa 10-15 ml della suddetta fase mobile. Una volta condizionate le cartucce, si è introdotto al di sopra della fase stazionaria un agente anidrificante ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) quindi si è eluito sotto vuoto. Al termine dell'eluizione si è ottenuta una soluzione limpida in DCM/Acetone che è stata trasferita in appositi palloni (precedentemente pesati) per essicarli al rotavapor ( $T=40^\circ\text{C}$ ). Al termine del processo di rimozione del solvente si è aggiunto  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  per eliminare l'acqua estratta dal campione. Quindi si è ripreso l'essiccato con esano addizionando poi 500  $\mu\text{l}$  di soluzione metanolica di KOH. Dopo aver agitato per circa 30 secondi si ottenevano due differenti fasi. Il surnatante è stato usato per l'analisi in GC-MS.

I risultati ottenuti non mostravano alcuna differenza nel pattern qualitativo degli acidi grassi rilevati tra campioni controllo ed i trattati (con la soluzione antiossidante). Relativamente invece al profilo quantitativo i risultati complessivi mostravano come nei campioni controllo si avesse nel tempo una riduzione a carico degli acidi grassi insaturi rispetto ai saturi, mentre nei campioni trattati con l'acido ascorbico nell'arco dei 6 giorni i rapporti dei tre indici di alterazione della qualità del prodotto UFA/SFA, MUFA/SFA e PUFA/SFA, si mantenevano costanti.

#### ***4.2 Studio della carica batterica totale su campioni ittici***

La Carica Microbica Totale (CMT) a  $30^\circ\text{C}$  nei campioni esaminati è stata effettuata in riferimento al metodo **ISO 4833-1 :2013** Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la enumerazione dei microrganismi.

##### ***4.2.1 Conteggio delle colonie***

La valutazione della carica microbica è passata dal conteggio delle colonie ottenuto a  $30^\circ\text{C}$  mediante il metodo in inclusione. In particolare il metodo prevede la semina per inclusione in un terreno solido non selettivo, Plate Count Agar (PCA) di un volume definito di campione. 1 ml della sospensione iniziale, diluizione 1:10 del campione con il diluente Soluzione Salina Peptonata (SSP), e delle diluizioni successive in base 10, sono state dispensate in piastre Petri; in ciascuna piastra è stato versato 15 ml di PCA mantenuto a  $46^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Dopo avere mescolato accuratamente l'inoculum al terreno e dopo l'avvenuta solidificazione dello stesso, le piastre sono state incubate a  $30^\circ\text{C}$  per 72 ore in condizioni di aerobiosi. Terminato il periodo di incubazione, per effettuare il conteggio sono state scelte le piastre (almeno due diluizioni consecutive) che mostravano colonie in un range tra 10 e 300 colonie (Fig.1).

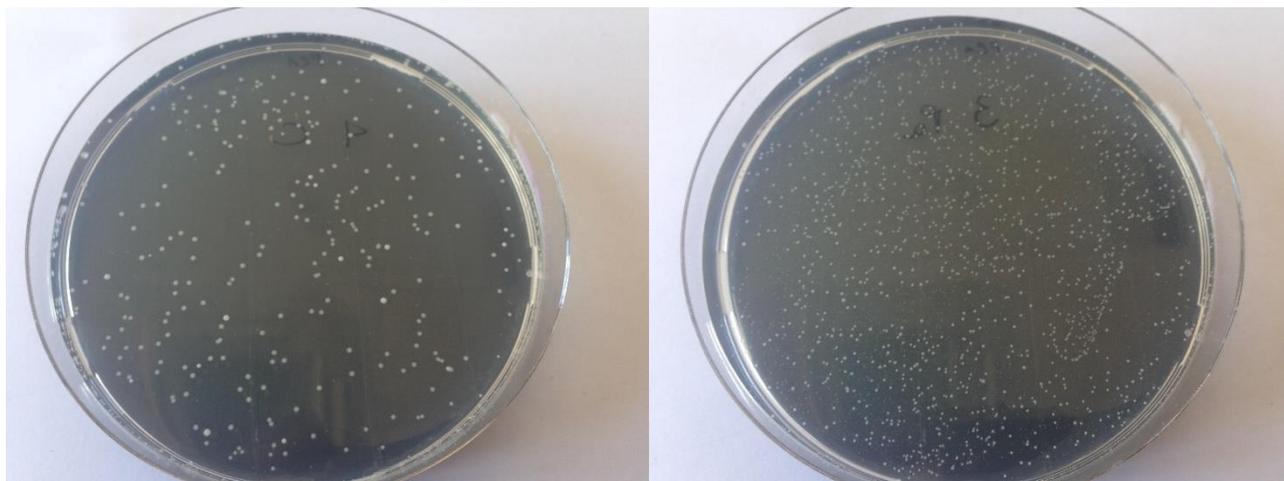


Figura 1: piastre incubate per 72 ore a 30°C

La formula matematica utilizzata per ottenere il numero di unità formanti colonie (ufc) per grammo è la seguente:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

dove:

$\Sigma C$  = somma delle colonie contate in tutte le piastre considerate di due diluizioni successive, ed almeno una delle piastre deve contenere un minimo di 10 colonie

$d$  = diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

[  $d=1$  quando viene utilizzato il prodotto liquido non diluito(campione test)]

$V$  = volume di inoculo utilizzato in ciascuna piastra, in millilitri

Inoltre, al fine di fornire un risultato quanto più possibile “*garantito*” per i metodi quantitativi è stato necessario calcolare l’incertezza di misura parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando. Questa deve essere calcolata, così come indicato dalla Norma Europea UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005- Requisiti

generali per la competenza dei laboratori di prove e di taratura, secondo determinate procedure. In particolare, per la stima dell'incertezza di misura nelle prove microbiologiche quantitative, la procedura a cui fare riferimento è riportata nella norma ISO/TS19036:2006 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

L'approccio della norma ISO/TS 19036:2006 prevede prioritariamente l'utilizzo dello scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio: quest'ultima vuole tener conto della massima variabilità nell'effettuazione delle prove all'interno di un laboratorio, con le componenti principali che contribuiscono all'incertezza. Nel nostro studio quindi ciascun risultato presenta il calcolo dell'incertezza di misura. Dall'analisi condotta non si sono evidenziate differenze tra i campioni soggetti a pretrattamento ed i campioni controllo.

#### ***4.3 Determinazione della trimetilammina***

La trimetilammina è stata estratta dal campione mediante una soluzione di acido tricloroacetico al 5% che ionizza la molecola. L'aggiunta di solventi organici consente la migrazione della TMA dalla fase acquosa a quella organica e, dopo trattamento con una soluzione acquosa basica di carbonato di potassio e una di acido picrico, la TMA viene analizzata tramite analisi spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 410 nm. Come riferimento sono state utilizzate soluzioni standard di TMA, la cui assorbanza viene valutata allo spettrofotometro e correlata alla concentrazione di TMA nel campione analizzato. La scelta dell'analisi della trimetilammina, è stata fatta in base all'importanza di questo parametro nella valutazione della shelf life dei prodotti ittici, in quanto è il tipico indicatore di freschezza soprattutto nei pesci marini.

La trimetilammina, infatti, è un'ammina terziaria volatile  $N(CH_3)_3$  responsabile del tipico odore sgradevole di pesce, derivante dalla riduzione del TMA ossido (TMAO) da parte dell'attività batterica ed in parte anche dagli enzimi intrinseci del pesce.

La formazione di TMA è favorita in condizione di anaerobiosi e non è rallentata dalla bassa temperatura di conservazione del prodotto. Con il passare del tempo, dopo la cattura del pesce, si verifica un aumento del contenuto di TMA, mentre la quantità di TMA ossido tende gradualmente a diminuire fino ad arrivare a valori pari a zero.

Relativamente all'analisi chimico-fisica condotta, i risultati inerenti la valutazione della trimetilammina mostrano un aumento di quest'ultima nel campione non trattato già dopo 2 giorni dalla conservazione mentre nel campione sottoposto a pretrattamento si evidenzia un aumento di tale parametro solo dopo 6 giorni di conservazione a 4 °C.

## 5. Ringraziamenti

Progetto: “Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l’uso di film edibili innovativi a base pectinica” (“PON FILM-EDIBILI”, Cod. PON01\_02286) - CUP: B68F12000360007

## 6. Bibliografia

Amanatidou, A., Schluter, O., Lemkau, K., Gorris, L.G.M., Smid, E.J., Knorr, D. (2000). Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. *J. Innov Food Sci & Emerg Tech.*, **1**, 87–98.

Arashisara, S., Hisara, O., Kayab, M., Yanik, T. (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*, 209–214.

Aubourg, S., Alenso, F., Gallardo M. (2004). Studies on rancidity inhibition in frozen horse mackerel (*Trichurus trachurus*) by citric and ascorbic acids. *European J. Lipid Sci & Tech.*, **106**, 232-240.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Phongkanpai, V., Tanaka, M. (2005). Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince. *Journal of Food Chemistry*, *90*, 231–239.

Bou, R., et al. (2001). Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat. *Poultry Science*, *80*(6): 800-807.

Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, *50*, 1–17.

Einarsson, H. (1988). Deep chilling (superchilling, partial freezing) A literature survey Ed. SIKs Service serie. Gothenburg, Sweden, SIK – The Swedish Food Institute, Chalmers University of Technology. 784, p. 30.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957 May;226(1):497-509.

Giatrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2008). Potential of oregano essential oil to extend the shelf-life of fresh swordfish. A comparative study with ice storage. Journal of Food Science, 73, 167–173.

Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swigli, A., Hes, M., Korczak, J. (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. J. Food Sci. & Tech., 108, 351-362.

ISO 4833-1 :2013 Microbiologia della catena alimentare – Metodo orizzontale per la enumerazione dei microrganismi. Parte 1 – Conteggio delle colonie ottenuto a 30°C mediante il metodo in inclusione.

ISO/TS19036:2006 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

Lannelongue, M., Finne, G., Hanna, M.O., Nickelson II, R., Vanderzant, C. (1982). Microbiological and chemical changes during storage of swordfish (*Xiphias gladius*) steaks in retail packages containing CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres. Journal of Food Protection, 45, 1197–1203 (1207).

Morrissey, P.A., et al. (1998). Lipid stability in meat and meat products. Meat Science, 49, S73-S86.

Muratore, G., Licciardello, F. (2005). Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf-life of liquid-smoked swordfish (*Xiphias gladius*) slices. Journal of Food Science, 70, 359–363.

Oberlender, V., Hanna, M.O., Miget, R., Vanderzant, C., Finne, G. (1983). Storage characteristics of fresh swordfish steaks stored in CO<sub>2</sub>-enriched controlled (flowthrough) atmospheres. *Journal of Food Protection*, 46, 434–440.

Oktar, G. L., Sinci, V., Kalaycioglu, S., Soncul, H., Gokgoz, L., Halit, V., Ersoz, A. (2001). Biochemical and hemodynamic effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol in coronary artery surgery. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 61:621–630.

Packer, J.E., Slater, T.F., Willson, R.L. (1979). Direct observations of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278: 737-739.

Pantazi, D., Papavergou, A., Pournis, N., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2008). Shelflife of chilled fresh Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*) stored in air, ice and under vacuum, modified atmosphere: microbiological, biochemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 25, 136–143.

Rostamzad, H., Shabanpour, B., Kashaninejad, M., Shabani, A. (2011). Antioxidative activity of citric and ascorbic acids and their preventive effect on lipid oxidation in frozen persian sturgeon fillets. *Latin American Applied Research*, 41:135-140.

Sánchez-Alonso, I., Borderias A. (2008). Technological effect of red grape antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *J. Food Sci. & Tech.*, 43, 1009-1018.

Sarkardei, S., Howell, N. (2008). Effect of natural antioxidants on stored freeze-dried food product formulated using horse mackerel (*trachurus trachurus*). *Journal of Food Science and Technology*, 43: 309-315.

Serdaroglu, M., Felekoglu, E. (2005). Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) mince. *Journal of Food Quality*, 28:109-120.

Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth activities and safety. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 107–127.

Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., Kleiberg, G. H. (2003). Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of Food Science*, 68(4), 1467–1472.

Stammen, K., Gerdes, D., Caporaso, F. (1990). Modified atmosphere packaging of seafood. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 29, 301–331.

Theron, M. M., Lues, J. F. R. (2007). Organic acids and meat preservation: A review. *Food Reviews International*, 23, 141–158.

Kim, S., Lee, K., Park, J., Lee, H., Hwang, I. (2006). Effect of natural antioxidants on stored freeze-dried food product formulated using horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of Science and Technology*, 41: 90-95.

Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, 115, 169–175.