

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



Analisi dei profili nutrizionali e valutazione degli indicatori di performance inerenti la shelf life di prodotti ittici freschi o minimamente processati.

Masullo T.^a, Bennici C.^a, Salamone M.^a, Tagliavia M.^a, Nicosia A., Mazzola S.^b, Cuttitta A.^a

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;

Sommario

1. Introduzione.....	3
2. Approvvigionamento dei campioni e pianificazione del processamento.....	4
3. Processamento degli organismi, prelievo del tessuto, separazione della componente proteica da quella lipidica.....	4
4. Analisi della componente proteica.....	6
4.1 Analisi in TCA e stima dell'attività proteolitica.....	6
5. Analisi del pattern proteico e valutazione delle proteine contrattili.....	7
6. Analisi dell'attività proteolitica a carico di gelatinasi.....	8
7. Analisi su enzimi lisosomiali (catepsine).....	9
8. Analisi di transaminasi.....	10
9. Ringraziamenti	10
10. Bibliografia	11

1. Introduzione

Negli ultimi anni è notevolmente cresciuta la rilevanza economica, commerciale e nutrizionale del consumo di pesce fresco o commercializzato sotto forma di prodotto minimamente trasformato, oltre che del consumo di prodotti crudi, con ovviamente tutta una serie di criticità legate al mantenimento del pescato il più possibile integro e sicuro per il consumatore. I prodotti del pescato devono infatti soddisfare determinate caratteristiche di qualità, tra cui la sicurezza, freschezza, caratteristiche nutrizionali, il sapore, la consistenza, il colore (Haard, 1992). La velocità dei processi di degradazione e la conservabilità variano con la specie e sono influenzate da numerosi parametri relativi alla filiera produttiva. Esistono inoltre, rischi connessi a contaminanti biologici (batteri, virus, tossine algali per i molluschi bivalvi, parassiti, ecc.) o chimici (metalli pesanti, mercurio, piombo, cadmio, policlorobifenili, PCB, diossine, ecc.). Il livello di contaminazione dipende inoltre dall'età dell'animale, dall'alimentazione e dal contenuto in lipidi. Nondimeno, una non adeguata manipolazione e conservazione del prodotto, può influire in modo negativo sulla qualità e sicurezza d'uso del prodotto. In fase di post-mortem, le specie ittiche, vanno incontro ad una serie di alterazioni come ad esempio la rottura di strutture cellulari e l'instaurarsi di flore microbiche sulla cute, branchie ed intestino dovute a microrganismi (Jiang et al. 1990, Koohmaraie M., 1996, Koutsoumanis& Nychas, 1999). Questi ultimi, risolto il rigor mortis, potranno moltiplicarsi penetrando nei tessuti e rilasciando enzimi proteolitici (come le calpaine) e autocatalitici (Aoki et al, 1997). Tali enzimi a loro volta, causeranno un rapido decadimento delle caratteristiche organolettiche dei prodotti con conseguente riduzione della shelf-life degli stessi. Un altro effetto è quello connesso all'idrolisi delle sostanze proteiche strutturali, lipidiche e fosfolipidiche e alla loro successiva ossidazione, il cui risultato finale è l'alterazione di colore, lo sviluppo di off-flavours, la perdita di consistenza del prodotto. Al momento della conservazione, subito dopo il prelievo/cattura, molte specie di pesci mostrano cambiamenti nelle proprietà della tessitura (Bremner, 1992) come l'ammorbidimento e la perdita di consistenza della carne con conseguente riduzione in peso del filetto, ciò con ricadute sul piano commerciale ed economico. L'obiettivo del presente studio è mirato all'individuazione di indicatori di performance inerenti la shelf life di prodotti ittici, tramite l'analisi di parametri biochimici utili alla valutazione delle caratteristiche nutrizionali dei prodotti stessi.

2. Approvvigionamento dei campioni e pianificazione del processamento.

I campioni di tonno pinna gialla, cernia e pesce spada congelati e di tonno pinna gialla, cernia e pesce spada affumicati forniti dalla società AltaMarea in regime di temperatura controllata, una volta pervenuti in laboratorio sono stati sottoposti ad analisi biochimiche.

I campioni congelati sono stati mantenuti alla temperatura di -20°C per poi essere scongelati al momento del processamento, mentre i campioni affumicati sono stati conservati alla temperatura di 4°C . Relativamente alla pianificazione del processamento delle specie ittiche, per simulare inadeguate condizioni di conservazione del pesce fresco o congelato in ghiaccio, si è proceduto a pianificare un esperimento finalizzato a valutare l'attività proteolitica in funzione della modificazione di parametri sperimentali, prendendo come spunto quanto presente in letteratura (Hultmann and Rustad, 2004; Yamashita & Konagaya, 1990). Ovvero si è proceduto a conservare i campioni (eliminato il sottovuoto) a 4°C per 7g, al fine di accelerare l'eventuale proteolisi a carico delle proteine e quindi ridurre la shelf life.

3. Processamento degli organismi, prelievo del tessuto, separazione della componente proteica da quella lipidica.

In accordo con quanto presente in letteratura (Hultmann and Rustad, 2004; Hultmann et al., 2003; Duun and Rustad, 2008; Yamashita and Konagaya, 1990; Cheret et al., 2005; Lund and Nielsen, 2001) e al fine di standardizzare il protocollo per tutti i campioni, si è proceduto al prelievo di una porzione di 20g di tessuto da ciascuna specie (Fig. 1A, B).



Figura 1 – Sezione del tessuto su campioni di cernia affumicata e congelata (A); particolare della sezione (B).

E' stato effettuato un taglio centrale rispetto al filetto e ventrale in modo da recuperare sia componenti fibrose rosse che bianche.

Il tessuto una volta tagliato è stato sospeso in 50 ml di tampone (20 mM TRIS pH 7,5) ed omogenato attraverso Turrax (Sigma-Aldrich) a regime di temperatura controllato (in ghiaccio) (Fig. 2A, B).

In seguito, ciascun campione è stato centrifugato a 10000 g per 15 min a 4 C° e separata la frazione solubile (componente proteica) da quella insolubile (frazione lipidica) (Fig. 3A, B). Un secondo ciclo di centrifugazione nelle medesime condizioni si è reso necessario al fine di eliminare eventuali residui non solubili presenti nella frazione proteica precedentemente ottenuta. Le frazioni raccolte quindi sono state conservate a -80 °C per le successive analisi.

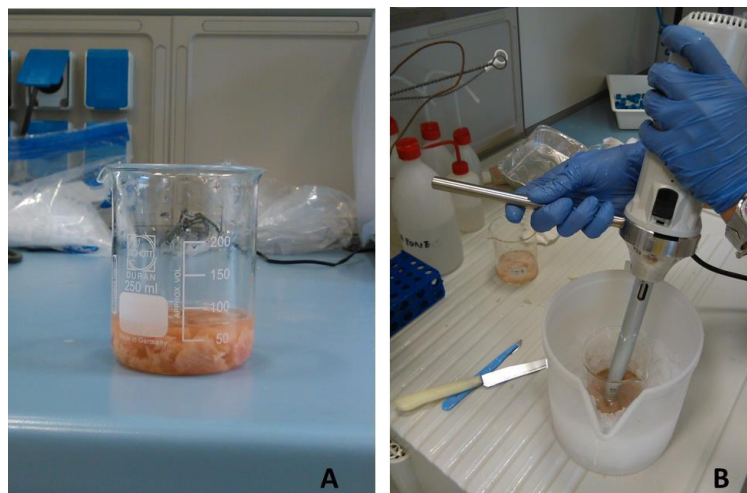


Figura 2 – Preparazione del tessuto per l'omogenizzazione (A); Omogenizzazione del campione (B).

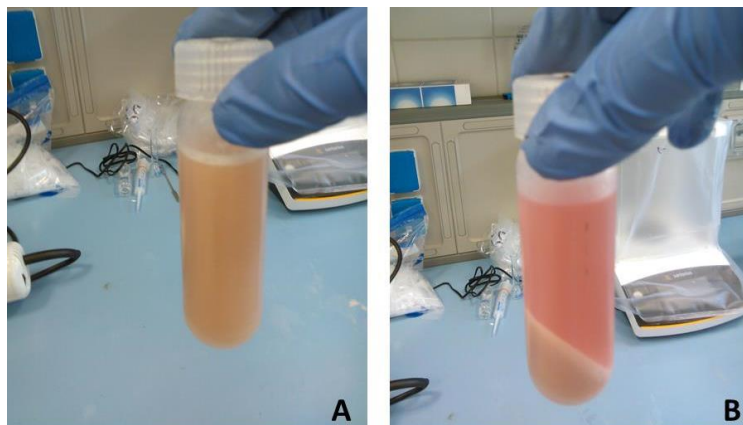


Figura 3 – Campione omogenato in fase di pre-centrifugazione (A); campione dopo la centrifugazione (B).

4. Analisi della componente proteica

4.1 Analisi in TCA e stima dell'attività proteolitica.

Ad 1ml di frazione solubile sono stati aggiunti 0,250 ml di 17,5% TCA. L'aggiunta dell'acido comportava la caratteristica formazione di un precipitato lattescente visibile nella figura 4B.

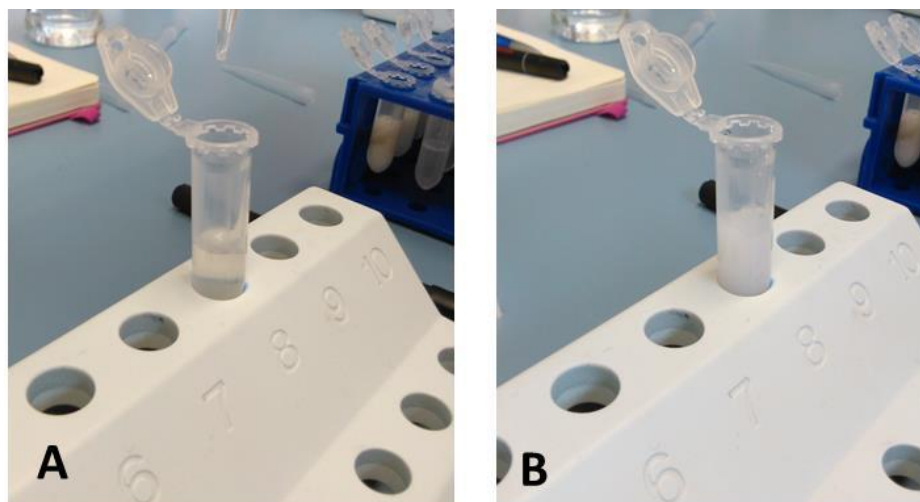


Figura 4 – A) Campione prima dell'aggiunta di TCA; B) Formazione del precipitato dopo l'aggiunta di TCA.

Dopo 30 minuti di reazione a temperatura ambiente (rt) i campioni sono stati centrifugati a 10.000xg per 15 min. e la frazione solubile, ovvero i peptidi rimasti solubili in acido sono stati quantizzati mediante lettura spettrofotometrica a 280nm utilizzando una curva standard appositamente generata. In parallelo si è proceduto a pesare i pellet insolubili ottenuti a seguito della precipitazione in TCA, al fine di valutare se esistesse una proporzionalità inversa tra i due parametri considerati. Infine, l'attività proteolitica è stata espressa come rapporto tra i mg di peptidi solubili in TCA ottenuti nel volume di tampone utilizzato e i grammi totali di tessuto umido analizzato.

Tutti i campioni analizzati mostravano un incremento dei peptidi solubili in TCA dopo 4 giorni dalla conservazione. Tale parametro quindi si dimostrava essere un buon indicatore di performance per la valutazione della shelf life.

5. *Analisi del pattern proteico e valutazione delle proteine contrattili.*

Al fine di valutare cambiamenti *post-mortem* nella composizione delle proteine contrattili nei pesci congelati ed affumicati, tramite SDS-PAGE (15%) sono state separate le proteine miofibrillari dei campioni sottoposti a regime di temperatura pari a 4 °C per 7 giorni.

Quella dell' SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) è una tecnica che permette di separare e stimare il peso molecolare delle proteine che sono fatte migrare su di un gel di acrilamide, in presenza di un detergente anionico (SDS). Il gel funziona da setaccio molecolare, separando le proteine in base al loro peso molecolare. L' SDS si lega alla parte idrofobica delle proteine, conferendo un rapporto costante tra carica negativa e massa molecolare. In questo modo le proteine migrano verso il polo positivo con una velocità che dipende dalle dimensioni. I campioni oltre che essere denaturati con l' SDS sono stati ridotti con β -mercaptoetanololo. Il gel è stato preparato al 15% di acrilamide al fine di diminuire la dimensione dei pori e permettere la separazione di proteine a più basso peso molecolare. In seguito alla corsa elettroforetica il gel è stato colorato con Comassie Brilliant Blue 250G e successivamente decolorato per la valutazione delle bande proteiche.

Relativamente alla separazione delle proteine miofibrillari nei campioni congelati sottoposti a regime di temperatura pari a 4 °C per 7 giorni, era possibile osservare soprattutto in quelli di spada e cernia a 7 g delle bande a basso peso molecolare (Fig. 5, frecce rosse) non presenti negli stessi campioni al tempo 0. Dalla figura 5 (frecce verdi), al giorno 7 si notano anche nel pattern proteico delle variazioni dovute probabilmente alla degradazione da parte di endopeptidasi soprattutto a carico delle bande di 90KDa e 75 KDa. Nessuna differenza a carico del profilo di tali proteine è stata riscontrata nei affumicati.

Pertanto come per la TCA, anche tale parametro si dimostrava essere un buon indicatore di performance per la valutazione della shelf life.

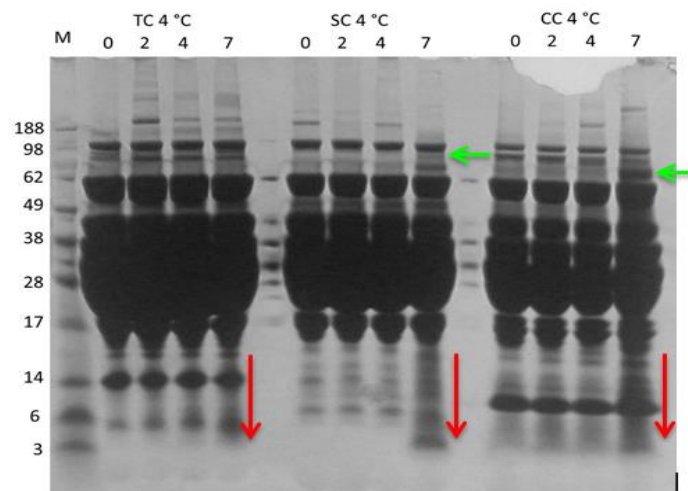


Figura 5 – SDS-PAGE campioni congelati (condizioni sperimentali: 4 °C, 0/2/4/7 giorni). Line 1: marker molecolare (3 – 260 KDa); line 2 - 5: tonno congelato; line 6: marker; line 7 - 10: spada congelato; line 11: marker; line 12 - 15: cernia congelata.

6. Analisi dell'attività proteolitica a carico di gelatinasi.

La presenza di attività proteolitica a carico di gelatinasi è stata valutata tramite zimografia sui campioni sia congelati che affumicati conservati per una settimana di conservazione a 4 °C.

Nel nostro caso, il substrato utilizzato era la gelatina. In base all'idrolisi del substrato incorporato nel gel, abbiamo visualizzato il numero e il peso molecolare approssimativo delle proteasi presenti nel campione. In seguito alla migrazione elettroforetica, il gel è stato incubato per 48 h ore a 37°C nell'apposito tampone di attivazione ovvero CaCl_2 , il quale crea l'ambiente ottimale per far avvenire la reazione enzimatica di proteolisi e di digestione della gelatina. Come controllo un gel analogo è stato incubato in EDTA, ovvero un agente chelante i cationi bivalenti. La degradazione si è resa visibile colorando il gel con Comassie Brilliant Blue R-250 per 1 h e, in seguito, decolorandolo attraverso ripetuti lavaggi in acqua distillata. Le aree del gel in cui sono localizzate le proteasi si presentavano come bande bianche sullo sfondo blu omogeneo del gel (quindi la gelatina digerita dalle metallo proteasi è identificata dal colorante non legato). Nel caso del gel controllo, se erano presenti metallo proteasi, nessuna banda dovrebbe essere visibile.

In figura 6 sono mostrati i risultati ottenuti sul set di campioni congelati, conservati a 4 °C per una settimana. Dallo zimogramma (gel al 15%) si riescono a distinguere bene sia le proteine contrattili che le bande di lisi. Il pattern delle proteine contrattili appare omogeneo per tutti i campioni,

inoltre si evidenziano delle modificazioni a carico delle bande, ovvero un decremento di alcune proteine contrattili ad alto peso molecolare ed un incremento dei peptidi a basso peso nel range da 17 KDa a 3 KDa (Fig. 6, freccia verde) dovuto all'azione delle endopeptidasi. Inoltre, si nota un incremento dell'attività delle gelatinasi (Fig. 6, frecce rosse) provando una degradazione tempo dipendente dovuta ad endopeptidasi. Per gli affumicati nessuna differenza a carico del pattern proteico era individuata in tutti i campioni.

L'analisi dell'attività proteolitica tramite valutazione delle gelatinasi risultava essere un buon indicatore di performance per la valutazione della shelf life.

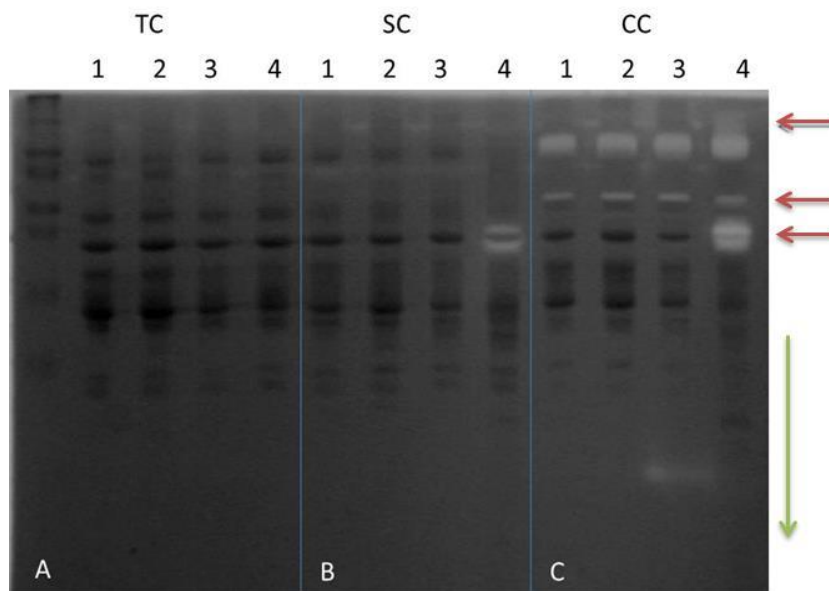


Figura 6 – Zimogramma (gel al 15%) dei campioni di tonno congelato (TC), spada congelato (SC) e cernia congelata (CC) conservati a 4 °C. (A) M: marker; line 1: TC a 4h; line 2: TC a 2g; line 3: TC a 4g; (B) Line 1: SC a 4h; line 2: SC a 2g; line 3: SC a 4g; line 4: SC a 7g; (C) line 1: CC a 4h; line 2: CC a 2g; line 3: CC a 4g; line 4: CC a 7g. Le frecce indicano le bande di lisi. Tempo di incubazione 48 ore

7. *Analisi su enzimi lisosomiali (catepsine).*

La catepsina B è una cisteino-proteasi lisosomale che idrolizza un ampio range di proteine e gioca un importante ruolo nell'idrolisi delle proteine tissutali (Barrett & Kirschke, 1981).

L'analisi dell'attività delle catepsine è stata condotta sui campioni di tonno, cernia e spada affumicati e congelati sottoposti a regime di temperatura pari a 4 °C per 7 giorni. In particolare l'attività della catepsina B è stata misurata contro un substrato fluorogenico sintetico, Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (Sigma). Gli estratti enzimatici al tempo 0 e dopo 7 giorni (0,150ml) sono stati incubati con 0,150ml di substrato (0.02mM in 0,1% di Brij 35 solution) a 4 °C. Dopo 30 minuti la reazione è stata bloccata tramite l'aggiunta di una soluzione di 1% SDS in 50mM Tris-HCl pH 7. Il bianco era preparato addizionando acqua distillata piuttosto che l'estratto enzimatico, alla mix di reazione. Quando l'enzima tagliava il substrato sintetico il cromoforo veniva liberato e la fluorescenza veniva misurata nel range da 290 nm a 500 nm con lunghezza d'onda di eccitazione a 290 nm (BW_{ex} 3, BW_{em} 3) (Shimadzu RF 5301PC). L'aumento dell'intensità della fluorescenza era usato per calcolare l'attività della catepsina B, misurata come incremento della fluorescenza per grammi di peso bagnato per minuti di incubazione. Dai risultati si denotava una variabilità tra le specie in termini di attività della catepsina, soprattutto a carico dei campioni affumicati.

Anche l'analisi dell'attività delle catepsine risultava essere un buon parametro di valutazione dello stato di conservazione e deperibilità del pesce.

8. *Analisi di transaminasi.*

Le misure dell'attività enzimatica di transaminasi quali il GOT (transaminasi glutamico-ossalacetica) o ASP (aspartato amino transferasi) e il GPT (transaminasi glutammico-piruvica) o ALT (alanina amino transferasi) risultano utili nella diagnostica di danni funzionali a tessuti ed organi dei pesci (Lavanya et al., 2011; Ozretic & Ozretic, 1987). Infatti in condizioni fisiologiche normali tali enzimi possono essere trovati nella membrana cellulare, nel citoplasma e nei mitocondri. Se invece, le cellule vengono danneggiate o vanno incontro a necrosi tali enzimi vengono rilasciati in elevata quantità nel circolo sanguigno, determinando un elevato incremento della loro attività

enzimatica nel siero. Generalmente l'attività di tali enzimi viene misurata oltre che nel siero anche in estratti di fegato, cuore, fibre muscolari bianche e rosse, branchie e reni. L'analisi dell'attività delle transaminasi in tale studio è stata condotta al fine di valutare se un incremento a carico delle GPT era registrato nei campioni di tonno, cernia e spada affumicati e congelati sottoposti a regime di temperatura pari a 4 °C per 7 giorni. L'incremento di tale attività darebbe indicazione, infatti, di un danno a livello tissutale causato dalle prolungate condizioni di conservazione. L'analisi dell'attività della GPT è stata determinata tramite saggio colorimetrico su omogenati totali di tessuto.

Relativamente all'attività della transaminasi, i valori misurati per i campioni provenienti dalle differenti specie nelle due condizioni esaminate, ovvero affumicato/congelato conservati per 7 giorni in regime di temperatura controllato (4 °C) rispecchiavano quanto misurato sui campioni controllo. La costanza del trend misurato non consente di prendere in considerazione l'attività della GPT come indicatore di performance della shelflife dei prodotti ittici.

9. 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

10. Bibliografia

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

Barrett, A. J., Kirschke, H. (1981). Cathepsin-B, Cathepsin-H and cathepsin-L. *Methods in Enzymology*, 80, 535-561.

Bremner, H. A. (1992). Fish flesh structure and the role of collagen - its post-mortem aspects and implications for fish processing. In H. H. Huss, M. Jacobsen & J. Liston (Eds.), *Quality Assurance in the Fish Industry* (pp. 39-62). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.

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

Duun A. S. and Rustad T., 2008 – Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1.4 °C and -3.6 °C. *Food chemistry*, 106: 122-131.

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

Hultmann, L., Rør, A. M. B., Steinsland, I., Skara, T., Rustad, T. (2003). Proteolytic activity and properties of proteins in smoked salmon (*Salmo salar*) – effects of smoking temperature. *Food Chemistry*.

Hultmann, L., Rustad, T. (2004). Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) – effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food chemistry*. 11 p.

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

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

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

Lavanya, S., Ramesh, M., Kavitha, C., Malarvizhi A. (2011). Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. *Chemosphere*, 82: 977-985.

Lund, K. E., & Nielsen, H. H. (2001). Proteolysis in salmon (*Salmo salar*) during cold storage; Effects of storage time and smoking process. *Journal of Food Biochemistry*, 25(5), 379-395.

Ozretic, M.K., Ozretic B. (1987). Estimation of the enzymes LDH, GOT and GPT in plasma of grey mullet *Mugil auratus* and their significance in liver intoxication. *Diseases of aquatic organisms*, 3: 187-193.

Yamashita, M., & Konagaya, S. (1990). Purification and characterization of cathepsin B from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96B(4), 733-737.