

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

IAMC - CNR - UOS Capo Granitola



Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Monastero, C¹., Masullo, T¹., Bennici, C¹., D'Agostino, F¹., Salamone, M¹., Tagliavia, M¹., Nicosia, A¹., Biondo G¹., Armeri, G.M¹., Maneiro, I¹., Musco, M¹., Maugeri, G¹., Carelli, M.L¹., Patti, C¹., Longo, V²., Longo, A²., Vlah, S²., Bonura, A²., Colombo, P²., Mazzola, S¹., Cuttitta, A¹.

¹Istituto 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

² Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBIM-CNR), Via Ugo La Malfa, 153, 90146 Palermo, Italia

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Introduzione	2
Finalità	2
Analisi tossicologiche	3
<i>Test d'irritazione cutanea</i>	3
<i>Test di corrosione cutanea</i>	4
<i>Test d'irritazione oculare</i>	4
<i>Test di sensibilizzazione cutanea</i>	5
<i>Test di mutagenicità</i>	5
<i>Test di ecotossicità</i>	6
<i>Test di biodegradabilità</i>	6
Risultati analisi tossicologiche	6
Analisi degli indicatori di performance	7
Analisi e sunto dei risultati ottenuti sui campioni di tonno	8
Analisi e sunto dei risultati ottenuti sui campioni di pesce spada	9
Ringraziamenti	11
Bibliografia	11

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Introduzione

Quando si parla di shelf life di un prodotto alimentare si fa riferimento al periodo di tempo durante il quale un prodotto mantiene le sue caratteristiche qualitative nelle normali condizioni di conservazione/utilizzo e di conseguenza può essere consumato in totale sicurezza. Gli alimenti, infatti, sono prodotti facilmente deperibili che subiscono modifiche a carico della loro composizione a causa dell'innescò di una serie di reazioni sia di tipo microbiologico che chimico-fisico, con i conseguenti rischi per la sicurezza igienico sanitaria del prodotto. Nei prodotti ittici la degradazione biologica risulta essere una delle prime cause di deterioramento dell'alimento ciò perché essi stessi sono caratterizzati dalla presenza di microrganismi provenienti principalmente dalle materie prime impiegate e dal processo di produzione/preparazione utilizzato. Durante la conservazione e lo stoccaggio del prodotto ittico, in particolare sono tre i meccanismi che determinano il deterioramento e quindi la riduzione della shelf life, ovvero: l'autolisi enzimatica (*post mortem* e che modifica la consistenza del tessuto muscolare favorendo inoltre la crescita microbica ed il rilascio di ammine biogene); l'ossidazione (che riduce le qualità organolettiche del prodotto alterando gli acidi grassi poliinsaturi); la crescita microbica (con produzione di metaboliti come ammine biogene, acidi organici, solfiti, alcool, aldeidi e chetoni che causano i cattivi odori) (Jiang et al. 1990, Koohmaraie M., 1996, Koutsoumanis& Nychas, 1999, Aoki et al., 1997; Bremner, 1992). Risulta quindi strategico, il poter determinare la conservabilità di un alimento verificando dal punto di vista quantitativo, come tutti i fattori che contribuiscono all'alterazione della qualità del prodotto e all'incremento del processo degradativo (popolazione microbica, attività enzimatiche, variazioni chimiche) varino nel tempo.

Finalità

L'obiettivo era quello di sperimentare e validare una miscela a base pectinica in grado di allungare la shelf life dei prodotti ittici, attraverso 1) lo studio e l'analisi della miscela in toto per la valutazione della sua eco-tossicità e 2) l'analisi degli indicatori di performance utili per la stima dei tempi di deterioramento del prodotto.

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Analisi tossicologiche

La miscela oggetto delle analisi tossicologiche era composta da EDTA 0,2g, Glicerolo 4g, Pectine 0,6g, H₂O fino a 100g, Chitosano 0,5% (quantità per la preparazione di 100g di film edibile) (D'Agostino et al., 2015).

Per la valutazione della tossicità sono stati utilizzati test in vitro ed in particolare:

- Test d'irritazione cutanea;
- Test di corrosione cutanea;
- Test d'irritazione oculare;
- Test di sensibilizzazione cutanea;
- Test di mutagenicità;
- Test di ecotossicità;
- Test di biodegradabilità.

Questi test hanno permesso di valutare la capacità irritante, corrosiva, sensibilizzante e mutagenica del film edibile per stimare l'eventuale danno arrecato all'operatore che dovrà preparare la miscela, oltre alla tossicità ambientale e la biodegradabilità per stimare l'eventuale danno ambientale degli scarti di lavorazione del film in un processo produttivo su larga scala.

Di seguito sono descritti brevemente i protocolli utilizzati per le analisi tossicologiche.

Test d'irritazione cutanea

Per valutare l'irritazione cutanea è stato effettuato il test su epidermide umana ricostituita (RhE) secondo le linee guida OCSE TG 439, in quanto tale tessuto presenta lo stesso meccanismo di azione e innesca la cascata di reazioni infiammatorie del processo di irritazione cutanea in vivo. La vitalità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo del sale tetrazolio di bromuro (MTT) che viene convertito enzimaticamente dalla succinato deidrogenasi delle cellule vive in formazano, con shift della colorazione da giallo a blu/rossastro. I test sono stati effettuati in duplicato, utilizzando come controllo negativo le cellule trattate con sola acqua e come controllo positivo una soluzione al 5% di SDS. Il campione è stato distribuito uniformemente sulla superficie del tessuto e sono stati valutati due diversi tempi d'incubazione (3-15 minuti). Al termine del periodo di esposizione il gel edibile è stato eliminato con una soluzione salina (PBS) e si è proceduto quindi con il test

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

colorimetrico MTT su piastra da 96 pozzetti e lettura tramite lettore di piastra automatico (Plate reader DAS).

Test di corrosione cutanea

Per valutare la corrosione cutanea è stato effettuato il test su epidermide umana ricostituita (RhE) secondo le linee guida OCSE TG 431, in quanto tale tessuto è altamente rappresentativo delle proprietà fisiologiche e biochimiche della pelle e questa tipologia di test è in grado di discriminare tra sostanze corrosive e non corrosive. Le sostanze corrosive, infatti, sono in grado di penetrare nello strato corneo per diffusione o erosione e sono tossiche per le cellule degli strati sottostanti.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo del sale tetrazolio di bromuro (MTT) che viene convertito enzimaticamente dalla succinato deidrogenasi in formazano con shift della colorazione da giallo a blu/viola. I test sono stati effettuati in duplicato, utilizzando come controllo negativo le cellule trattate con sola acqua e come controllo positivo una soluzione 8N di idrossido di potassio. Il campione è stato distribuito uniformemente sulla superficie del tessuto e sono stati valutati due diversi tempi d'incubazione (3-15 minuti). Al termine del periodo di esposizione il gel edibile è stato eliminato con una soluzione salina (PBS) e si è proceduto quindi con il test colorimetrico MTT (Plate reader DAS).

Test d'irritazione oculare

Per valutare l'irritazione oculare è stato effettuato il test su epitelio corneale umano ricostituito (HCE) secondo le linee guida OECD 492, in quanto tale tessuto presenta lo stesso meccanismo di azione e innesca la cascata di reazioni infiammatorie del processo di irritazione corneale in vivo. La vitalità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo del sale tetrazolio di bromuro (MTT) che viene convertito enzimaticamente dalla succinato deidrogenasi in formazano con shift della colorazione da giallo a blu/viola. I test sono stati effettuati in duplicato, utilizzando come controllo negativo le cellule trattate con sola acqua e come controllo positivo una soluzione al 5% di SDS. Il campione è stato distribuito uniformemente sulla superficie del tessuto e sono stati valutati due diversi tempi d'incubazione (3-15 minuti). Al termine del periodo di esposizione il gel edibile è stato eliminato con una soluzione salina (PBS) e si è proceduto quindi con il test colorimetrico MTT e lettura tramite lettore di piastra automatico (Plate reader DAS).

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

E' stato inoltre utilizzato un kit pronto all'uso e validato (Eskes et al., 2014), basato sul principio che una sostanza in grado di irritare la cornea è capace di distruggere e denaturare le proteine corneali, causando la comparsa di torbidità nella soluzione.

Test di sensibilizzazione cutanea

La valutazione della sensibilizzazione cutanea è stata effettuata, in accordo con le linee guida OECD, utilizzando una linea cellulare umana immortalizzata di cheratinociti aderenti (HaCaT) trasfettata con un plasmide che consente di quantificare l'induzione del gene della luciferasi per misurare l'attivazione del pathway Keap1-Nrf2-ARE. Questo pathway, infatti, è un importante regolatore nelle risposte citoprotettive dovute allo stress ossidativo o a composti elettrofili, noto anche per essere coinvolto nei processi cellulari di sensibilizzazione della pelle (Natsch et al. 2010). Il campione è stato aggiunto alla coltura cellulare in piastra da 24 pozzetti e, dopo contatto con il film edibile, la vitalità cellulare è stata valutata mediante l'utilizzo del sale tetrazolio di bromuro (MTT) che viene convertito enzimaticamente dalla succinato deidrogenasi in formazano con shift della colorazione da giallo a blu/viola. I test sono stati effettuati in duplicato. Al termine del periodo di esposizione il gel edibile è stato eliminato con una soluzione salina (PBS) e si è proceduto quindi con il test colorimetrico MTT e lettura tramite lettore di piastra automatico (Plate reader DAS).

Test di mutagenicità

La valutazione della mutagenicità del film edibile è stata effettuata mediante il test di Ames (Ames et al, 1975), che consente di misurare la capacità di una sostanza di indurre mutazioni geniche, secondo le linee guida OECD 471. Il test di base sulla valutazione della capacità di un sospetto mutageno di rendere nuovamente capace di sopravvivere in un terreno privo di istidina di ceppi mutati di *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) incapaci di sintetizzare istidina, ognuno recante una diversa mutazione nell'operone che codifica per questo aminoacido; in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi.

La reazione è stata eseguita su piastre già pronte all'uso contenenti i ceppi mutati rispetto ad un controllo positivo mutageno fornito nel kit utilizzato. Dopo incubazione della piastra a 37°C per 2-5 giorni, quando il ceppo subisce una mutazione inversa (capacità di risintetizzare l'istidina) a causa della presenza della sostanza analizzata, il pozzetto cambia colore (da viola a giallo).

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Test di ecotossicità

La valutazione dell'ecotossicità del film edibile è stata effettuata secondo quanto prescritto nella norma DIN EN ISO 11348-2, analizzando la tossicità acuta su batteri luminescenti disidratati. In particolare è stata misurata la bioluminescenza naturalmente emessa dal batterio marino Gram negativo *Vibrio fischeri* (ceppo NRRL B-11177), misurando l'effetto inibitorio della sostanza analizzata sull'emissione luminosa di questo batterio, dopo riattivazione della sospensione batterica congelata, rispetto al bianco (batterio non trattato) dopo incubazione a due diversi tempi (15 e 30 minuti). Questo batterio è infatti in grado di emettere una luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 430 nm in presenza di ossigeno.

Test di biodegradabilità

La valutazione della biodegradabilità, cioè la capacità di una sostanza organica di subire, ad opera di microrganismi, un processo di trasformazione in costituenti più semplici, è stata effettuata mediante l'utilizzo di enzimi con attività pectinolitica per simulare l'azione di alcuni microrganismi in grado di degradare la pectina come per esempio il batterio *Bacillus subtilis* e i funghi *Aspergillus* e *Penicillium*.

Il film è stato incubato in una soluzione acquosa contenente la miscela enzimatica e, dopo incubazione a tempi e temperatura secondo quanto indicato dalla ditta produttrice (Sigma Aldrich), sono stati analizzati i prodotti della degradazione enzimatica mediante cromatografia HPLC (Shimadzu), valutandone i picchi specifici.

Risultati analisi tossicologiche

I dati ottenuti dalle analisi effettuate rivelano che il film edibile composto dai componenti sopra indicati e nelle concentrazioni utilizzate non risulta tossico.

In particolare nei test colorimetrici MTT (test di irritazione cutanea, corrosione cutanea, irritazione oculare e sensibilizzazione cutanea) è stata osservata una colorazione rossastra nei pozzetti trattati con il film edibile esattamente come nel bianco (pozzetto non trattato) e questo sta ad indicare una permanenza della vitalità cellulare e quindi la non tossicità cutanea ed oculare. L'osservazione visiva è stata confermata anche dalle letture effettuate tramite lettore di piastra.

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Nel test di mutagenicità i pozzetti contenenti il campione trattato con film edibile presentano un colore viola, indicando che la miscela non ha causato la retromutazione del ceppo di *Salmonella typhimurium* e che quindi non è in grado di indurre mutazioni geniche. Nel test di ecotossicità il campione trattato con il film edibile non ha causato una riduzione della bioluminescenza emessa da *Vibrio fischeri* rispetto al campione non trattato (bianco), indicando quindi una mancanza di tossicità ambientale.

Il test di biodegradabilità, invece, ha evidenziato che l'utilizzo di una soluzione enzimatica acquosa di pectinasi può essere utilizzata come reagente per facilitare la degradazione del film edibile pectinico e quindi lo smaltimento degli scarti di lavorazione in un processo produttivo su larga scala.

Analisi degli indicatori di performance

L'obiettivo di tale analisi era mirato ad individuare quali degli indicatori di performance inerenti la shelf life dei prodotti ittici precedentemente selezionati (Masullo et al., 2015b), erano utili alla valutazione delle caratteristiche nutrizionali dei prodotti stessi. In particolare è stata effettuata: l'analisi dei peptidi solubili in acido tricloroacetico (TCA) per la stima dell'attività proteolitica, l'analisi del pattern proteico per la valutazione delle proteine contrattili, l'analisi dell'attività proteolitica a carico di gelatinasi, l'analisi su enzimi lisosomiali (catepsine), l'analisi sull'attività della trimetilammina, l'analisi qualitativa e quantitativa sugli acidi grassi, l'analisi sulla carica microbica totale.

Come precedentemente documentato (Masullo et al., 2015a, b) nell'ottica di valutare l'effetto del film edibile sull'allungamento della *shelf life* dei prodotti ittici, sono stati messi a punto degli esperimenti attraverso i quali si è stata valutata l'attività proteolitica su porzioni da 5 g di tessuto provenienti dallo stesso trancio di pesce (tonno e pesce spada), distinti in campioni controllo, campioni pretrattati e campioni immersi nel gel edibile e conservati a 4 °C per 8/10 giorni.

Volendo sintetizzare, per i campioni pretrattati si intendono quei campioni che sono stati immersi in una soluzione antiossidante costituita da acido ascorbico 0,5 %, citrato di sodio 50 mM, NaCl 2%, pH 6 (Masullo et al., 2015b). Mentre per campioni immersi nel film edibile si intendono quei campioni che oltre al pretrattamento con la soluzione antiossidante sono stati immersi nella soluzione edibile (3 min) a base di pectina e chitosano.

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

Le tre tipologie di campione ovvero: Controllo (C), Trattato (T) e immerso nel Film (F) sono stati mantenuti a 4 °C per 8/10 giorni e recuperati rispettivamente a 0, 2, 4, 6, 8, 10 giorni per poi essere processati.

Analisi e sunto dei risultati ottenuti sui campioni di tonno

Relativamente all'analisi dei peptidi solubili in TCA come stima dell'attività proteolitica a carico di eso ed endo peptidasi le repliche condotte sui campioni di tonno controllo, pretrattati e immersi nel film edibile rivelano un trend costante nell'arco temporale analizzato. Pertanto, tale indice non fornisce le informazioni necessarie per la valutazione sull'effetto che il film determina su eso ed endo proteasi. Anche l'analisi dell'attività gelatinolitica non ha evidenziato differenze nell'attività proteolitica tra le tre differenti tipologie di campione.

Dall'analisi del pattern proteico per la valutazione dei cambiamenti post mortem nella composizione delle proteine contrattili sui campioni di tonno, si evince invece, come esistano delle differenze tra campione controllo e immerso nel film in particolare nella composizione delle bande, a partire dal secondo giorno di conservazione del campione controllo e dopo il quarto nel campioni trattati (Fig. 1).

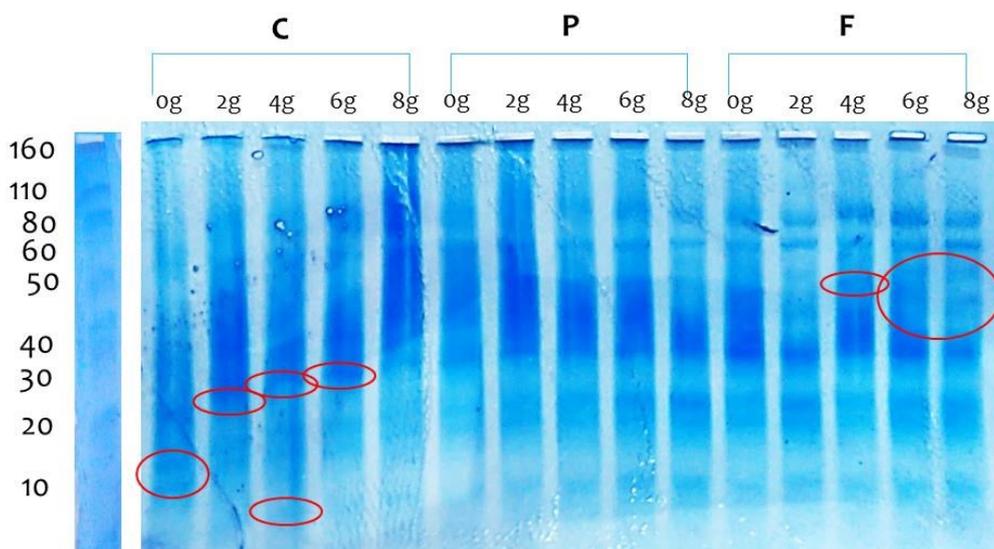


Figura 1. SDS-PAGE campioni di tonno (condizioni sperimentali: 4 °C, 0/2/4/6/8 giorni). Line 1-5: tonno controllo; line 6 - 10: tonno pre-trattato; line 11 - 15: tonno immerso nel film edibile.

L'analisi sull'attività di enzimi lisosomali ha evidenziato un differente comportamento tra i differenti campioni. In particolare mentre nel campione controllo al quarto giorno di

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

conservazione si osservava un aumento dell'attività imputabile alle catepsine nel campione trattato il trend rimaneva costante fino a sei giorni.

Dal punto microbiologico si è valutato l'effetto del pretrattamento e del film edibile sulla componente microbica, al fine di verificare se quest'ultimo potesse rallentare la crescita di microrganismi potenzialmente tossici. I saggi hanno evidenziato, come i campioni di tonno trattati col film edibile mantengano pressoché inalterata la Carica Microbica Totale (10^2 ufc/g) fino a 6 giorni, diversamente dai campioni controllo e pretrattati, nei quali questa aumenta di un ordine di grandezza già a partire dal secondo giorno di conservazione.

L'analisi e la valutazione del contenuto in acidi grassi saturi ed insaturi non hanno evidenziato sostanziali differenze relativamente al trend MUFA/SFA. Tuttavia nei campioni trattati il rapporto PUFA/SFA si manteneva costante a differenza di quanto osservato nel campione controllo ad indicare una parziale alterazione degli acidi grassi insaturi rispetto ai saturi.

Relativamente all'analisi della trimetilammina sui campioni di tonno confrontando i valori di TMA ottenuti nelle differenti tre condizioni rispetto al valore limite di 20mg/100g di campione, si notava che i campioni non trattati superano questo valore già dopo due giorni, mentre i campioni pretrattati o trattati con il film edibile superavano tale valore dopo i quattro giorni.

Analisi e sunto dei risultati ottenuti sui campioni di pesce spada

Relativamente all'analisi dei peptidi solubili in TCA come stima dell'attività proteolitica a carico di eso ed endo peptidasi le repliche condotte sui campioni di pesce spada controllo, pretrattati e immersi nel film edibile rivelano un trend costante nell'arco temporale analizzato. Pertanto, tale indice non fornisce le informazioni necessarie per la valutazione sull'effetto che il film determina su eso ed endo proteasi. Anche l'analisi dell'attività gelatinolitica non ha evidenziato differenze nell'attività proteolitica tra le tre differenti tipologie di campione.

Dall'analisi del pattern proteico per la valutazione dei cambiamenti post mortem nella composizione delle proteine contrattili sui campioni di spada, non si evince alcuna differenza tra campione controllo e immerso nel film. Anche l'analisi sull'attività di enzimi lisosomali non ha evidenziato un differente comportamento tra i differenti campioni (Fig. 2).

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

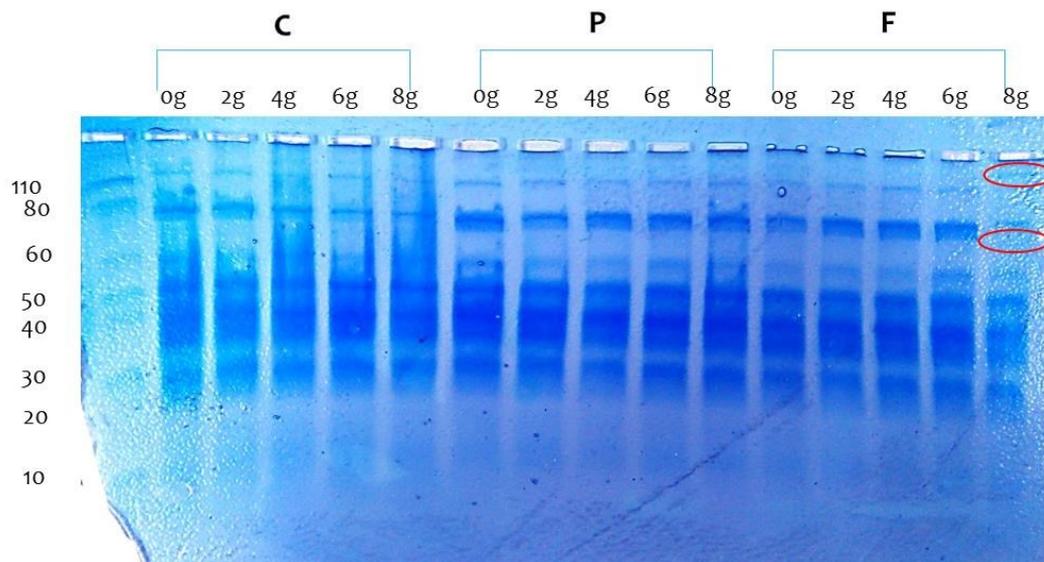


Figura 2. SDS-PAGE campioni di pesce spada (condizioni sperimentali: 4 °C, 0/2/4/6/8 giorni). Line 1 - markers molecolare; Line 2-6: spada controllo; line 7 - 11: spada pre-trattato; line 12 - 16: spada immerso nel film edibile.

Dal punto microbiologico si è valutato l'effetto del pretrattamento e del film edibile sulla componente microbica, al fine di verificare se quest'ultimo potesse rallentare la crescita di microrganismi potenzialmente tossici. I saggi condotti hanno evidenziato come per tutte e tre le tipologie di campione di pesce spada non emergano differenze a carico dell'aumento della carica microbica totale in termini di ufc/g nell'arco temporale analizzato.

L'analisi e la valutazione del contenuto in acidi grassi saturi ed insaturi non hanno evidenziato sostanziali differenze relativamente al trend MUFA/SFA e a quello PUFA/SFA.

Relativamente all'analisi della trimetilammina sui campioni di pesce spada confrontando i valori di TMA ottenuti nelle differenti tre condizioni rispetto al valore limite di 20mg/100g di campione, si notava che i campioni non trattati superavano questo valore già dopo due giorni, mentre i campioni pretrattati o trattati con il film edibile superavano tale valore dopo i sei giorni. Si osservava anche che i campioni di tonno pretrattati e trattati con film edibile raggiungevano valori di TMA superiori rispetto a quelli del pesce spada, fatto probabilmente dovuto alla maggiore componente grassa presente nella carne della prima tipologia di pesce, che porta quindi ad una maggiore degradazione del prodotto.

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

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

Bibliografia

- Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. 1975 - Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res.* **31**(6):347-364.
- 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.
- 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.
- D'Agostino F., Masullo T., Bennici C., Salamone M., Tagliavia M., Nicosia A., Carimi F., Abbate L., Motisi A., La Bella F., Fontana E., Carra A., Mercati F., Mazzola S., Cuttitta A. 2015 - Protocolli di produzione di miscele di pectine. Technical Report, CNRSOLAR code: 6527TR2015 DOI:10.13140/RG.2.1.2804.1769
- Eskes C, Hoffmann S, Facchini D, Ulmer R, Wang A, Flego M, Vassallo M, Bufo M, van Vliet E, d'Abrosca F, Wilt N. 2014 - Validation study on the Ocular Irritation assay for the eye irritation testing. *Toxicology in vitro*, **28**(5):1046-65. doi: 10.1016/j.tiv.2014.02.009.
- 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.
- Natsch A. 2010 - The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers Functional relevance and hypothesis on innate reactions to skin sensitizers; *Toxicol Sci*; **113**(2): 284-292
- Masullo Tiziana, Bennici Carmelo, Salamone Monica, Tagliavia Marcello, Nicosia Aldo, Mazzola Salvatore, Cuttitta Angela - 2015a - Analisi dei profili nutrizionali e valutazione degli indicatori di performance inerenti la shelf life di prodotti ittici. Technical Report, CNRSOLAR code 6617TR2015 DOI:10.13140/RG.2.1.1594.3843
- Masullo, T., Bennici, C., Salamone, M., Tagliavia, M., D'Agostino, F., Nicosia, A., Cuttitta, A., Monastero, C., Di Natale, M., Ranalli, M., Mirabello, D., Stincone, P., Abbate, L., Motisi, A., La Bella, F., Fontana, E., Carra, A., Mercati, F., Stampone, G., Di Pierro, M., Ciancimino, C., Di Noto, A.M., Oliveri, G., Alio, V., Carimi, F., Mazzola, S. - 2015b - Protocolli di pretrattamento sul prodotto agroalimentare fresco o minimamente processato e individuazione del processo ottimale. Technical Report, CNRSOLAR

Sperimentazione e validazione di nuove tecnologie per il miglioramento della shelflife dei prodotti ittici attraverso l'uso di un film edibile a base pectinica.

code 6533TR2015