

METODICHE ESERCITAZIONI CHIMICA DEGLI ALIMENTI

Determinazione delle proteine.

Per la determinazione delle proteine si utilizza il metodo Kjeldhal, un metodo che valuta tutto l'azoto proteico e non proteico presente all'interno degli alimenti.

La metodica prevede 3 fasi: una fase di digestione, una di distillazione ed una di titolazione. Si pesano circa 2 g. del campione ricordandosi di appuntare il peso, si pongono in un provettone Kjeldhal e si aggiungono 20 ml di acido solforico 96% e dei catalizzatori che accelerano la reazione: 0,8 g. di solfato di rame e 5,6 g. di solfato di potassio. Il provettone 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 distillatore Kjeldhal dove viene distillato per 3 minuti 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 era stata aggiunta una quantità nota di acido solforico 0,1 N e 100µl di indicatore colorimetrico così costituito: 0,1g di blu di metilene e 0,2g di rosso metile sciolti in 100 ml di alcool etilico. L'indicatore in ambiente acido ha colore viola, in ambiente basico è verde, mentre al punto di equilibrio della reazione vira fino al grigio.

La titolazione è quindi effettuata con NaOH 0,1 N fino al viraggio del distillato.

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 0,1 N posti nella beuta
- ml NaOH = ml NaOH 0,1 N utilizzati per titolare il campione
- K = 0.873 (valida per i prodotti lattiero caseari, diversa per altre matrici)
- m = peso del campione.

Determinazione del grasso

Per la determinazione del grasso possiamo utilizzare diverse metodiche in rapporto alla matrice alimentare da analizzare e dalla purezza del grasso che dobbiamo ottenere. L'estrazione del grasso dal latte è effettuata utilizzando il butirrometro di Gerber. All'interno del butirrometro sono inseriti 11ml di latte, 10ml di acido solforico 96%, 1ml di alcool isoamilico. Si chiude il butirrometro e si agita fino a completa dissoluzione del latte utilizzando delle precauzioni poiché essendo una reazione esotermica si sviluppa calore rendendo bollente il butirrometro. Si pone in una centrifuga riscaldata a 65°C per butirrometri per 10 minuti. Si legge sulla scala graduata aiutandosi con lo spingi tappo la quantità di grasso presente nel campione. A Per quanto riguarda le matrici alimentari solide possiamo utilizzare l'estrazione con il Soxhlet se dobbiamo effettuare solo un'analisi quantitativa, o la metodica di Folc modificata se dobbiamo ottenere un grasso puro su cui poi effettuare altri tipi di analisi per es. la determinazione degli acidi grassi. Per effettuare l'estrazione con il Soxhlet si pesano 10g di campione e si pongono in una capsula di porcellana aggiungendo sabbia di mare o sodio solfato anidro fino ad ottenere un impasto omogeneo. La capsula è posta in stufa a 100°C per una notte. Si pone in stufa a 100°C il bicchiere di estrazione vuoto per circa 1h, si fa raffreddare in un essiccatore e si pesa. Il campione leggermente polverizzato è posto in un ditale di cellulosa che è inserito nell'apparecchio di estrazione. La miscela di estrazione è costituita da etere etilico ed etere di petrolio in parti uguali. L'apparecchio è dotato di una piastra riscaldante che surriscalda la miscela evaporandola e creando un continuo ricircolo della stessa all'interno del campione. Dopo circa 2h il bicchiere è posto nuovamente in stufa fino alla completa evaporazione del solvente e ripesato. 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.

La metodica di Folc originaria utilizzava come solventi di estrazione il cloroformio e metanolo. In seguito essa è stata modificata utilizzando reagenti meno tossici rispetto a quelli precedentemente usati. Infatti il cloroformio e metanolo sono stati sostituiti dall'esano e dall'isopropanolo. A 15g di campione omogeneizzato sono aggiunti 100ml di una soluzione di esano:isopropanolo (3:2) (HIP). Il tutto è omogeneizzato con un mixer 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 12 ml 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 utilizzando una temperatura di 55°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.

CONSERVABILITÀ DEI PRODOTTI ITTICI

I prodotti della pesca rivestono un'enorme importanza nell'alimentazione umana sia in termini qualitativi, viste le loro elevatissime proprietà nutrizionali, sia quantitativi, considerato che i consumi tendono progressivamente all'incremento, specie in Italia dove, in base ai dati ISMEA (Istituto di servizi per il Mercato Agricolo Alimentare), il numero di famiglie che consuma prodotti della pesca almeno una volta la settimana è salito, in questi ultimi tre anni, dal 45% al 51%. Tale aumento, peraltro, è in parte ascrivibile alle diverse emergenze sanitarie che hanno investito, in quest'ultimo decennio, il settore delle carni, come pure al notevole incremento quali-quantitativo delle fonti di approvvigionamento extra-comunitario e della rete distributiva. Quest'ultimo aspetto, d'altronde, oltre a garantire una più capillare distribuzione del pescato refrigerato anche in regioni lontane dalle principali fonti di approvvigionamento, ha consentito nel contempo di migliorare la qualità dei prodotti alla vendita, specie in termini di stato di conservazione. I prodotti della pesca, infatti, sono caratterizzati, come ben noto, da un'estrema deperibilità tanto da renderne, spesso, complessa la commercializzazione su larga scala.

La “**conservabilità**” dei prodotti della pesca dipende da numerosi fattori suddivisibili in *endogeni ed esogeni*.

Relativamente ai “**Fattori Endogeni**”, vanno annoverati:

- la composizione chimica della muscolatura,
- la conformazione e la struttura dei tessuti,
- il corredo enzimatico muscolare e intestinale,
- lo stato sanitario.

In particolare, è noto come i pesci, rispetto a numerosi altri animali terrestri, posseggano ridotte quantità di glicogeno muscolare da cui dipende, oltre che una rapida risoluzione del *rigor mortis*, anche una scarsa acidificazione muscolare post-mortale. Ciò, ovviamente, comporta una minore inibizione dei batteri alteranti che precocemente possono raggiungere, anche a livello muscolare, elevate concentrazioni

.

In generale, l'acidificazione muscolare dei pesci può essere suddivisa in tre categorie:

- **acidificazione intensa** con pH finale tra 5,4 e 6, tipica dei pesci “a carni rosse”;
- **acidificazione media** con un pH finale tra 6 e 6,2, tipica dei pesci a “carni bianche”;
- **acidificazione scarsa** con un pH finale tra 6,2 e 6,4, tipica dei pesci dulciacquicoli.

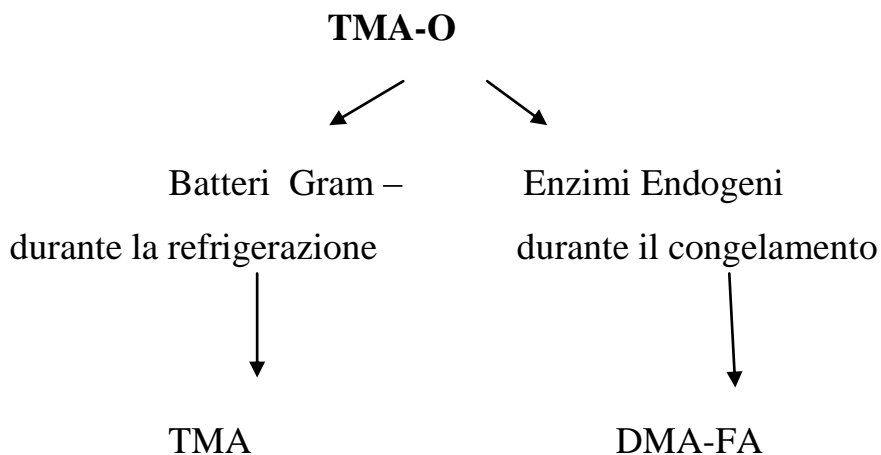
Le attività microbiche ed enzimatiche post-mortali a carico della muscolatura sarebbero inoltre, particolarmente favorite dall'elevato contenuto in acqua e dalla ridotta quantità di tessuto connettivo. Il connettivo può condizionare il comportamento microbico, specie in termini di “ostacolo” alla loro progressione muscolare.

Nel contesto della composizione chimica della muscolatura, non va dimenticata l'elevata concentrazione in polipeptidi e amminoacidi liberi che forniscono importanti nutrienti per la moltiplicazione batterica. Peraltro, il loro utilizzo da parte dei batteri determina, molto spesso, la comparsa di odori sgradevoli e/o di sostanze tossiche per l'uomo (ammine biogene). Considerazioni simili valgono anche per l'ossido di trimetilammina (TMA-O).

Nei muscoli e negli organi degli Osteoitti, si trova in abbondante quantità il **TMA-O** (OSSIDO DI TRIMETILAMMINA) che è il principale costituente della frazione azotata non proteica. Il TMA-O viene sintetizzato nei pesci principalmente per via enzimatica, anche se può essere assorbito come tale attraverso la catena alimentare a partire da alcune alghe particolarmente ricche di TMA-O.

La scissione post-mortem del TMA-O si attua mediante due vie principali:

- la prima, a causa di **BATTERI GRAM-** (*Pseudomonas*, *Alteromonas*) dà origine a **TRIMETILAMMINA**;
- la seconda, a causa di un **ENZIMA ENDOGENO** (una **DEMETILASI**) scinde il TMA-O in **DIMETILAMMINA (DMA)** e **FORMALDEIDE (FA)**.



Livelli particolarmente elevati TMA-O sono presenti nei Gadidi.

Dalla degradazione batterica del TMA-O, che porta alla formazione di TMA, si sviluppa il “caratteristico odore di pesce”. Pertanto la graduale riduzione della concentrazione di TMA-O e l’incremento di TMA vengono utilizzati come parametri chimici per misurare l’alterazione nel PESCE REFRIGERATO; mentre la DMA viene considerata un indice di deterioramento per il PESCE CONGELATO.

Si ritiene che:

- valori di TMA < 1mg/100g attestino “pesce freschissimo”
- valori di TMA < 5mg/100g attestino “buono stato di conservazione”
- valori $5 < \text{TMA} < 20\text{mg}/100\text{g}$ attestino “incipiente stato di alterazione”
- valori di TMA > 20mg/100g attestino “prodotto alterato”

Sempre nel contesto dei fattori endogeni, anche la conformazione del pesce e la strutturazione dei tessuti possono condizionarne fortemente la conservabilità. Al riguardo, infatti, considerato che le principali fonti di contaminazione muscolare sono la cute, l’intestino e le branchie, si ritiene genericamente che nei “pesci piatti” nei quali il rapporto tra superficie cutanea e massa muscolare è piuttosto elevato, sia particolarmente rilevante l’origine cutanea, mentre in quelli a sezione trasversale approssimativamente circolare, sia più importante la fonte intestinale. È pur vero, tuttavia, che la velocità di raggiungimento della muscolatura da parte dei batteri è strettamente relazionata anche alla struttura della cute e delle sierose, dal momento

che pesci dotati di cute spessa e di abbondante quantità di muco cutaneo (a sua volta contenente sostanze antibatteriche specifiche) possono offrire un'elevata resistenza alla migrazione batterica transcutanea, come pure pesci di notevoli dimensioni con sierose piuttosto spesse possono, di solito, risultare parecchio conservabili. A conferma di ciò, è noto come pesci appartenenti alla stessa specie e pescati nelle medesime condizioni, ma di dimensioni differenti possano avere una conservabilità grossomodo direttamente proporzionale alla loro dimensione.

Oltre a quanto sinteticamente riportato, la conformazione e la strutturazione tessutale possono avere influenza sulla conservabilità in relazione alla posizione topografica e alla dimensione di alcuni apparati e organi quali l'intestino, lo stomaco e i ciechi pilorici, il fegato (contenente in molte specie il tessuto pancreatico). Ciò in quanto tali sedi, in funzione della specie e del tipo di alimentazione, contengono un'enorme quantità di enzimi proteolitici e lipolitici che in corso di conservazione, possono colliquare gradualmente i tessuti vicini, progredendo dunque, verso la muscolatura, così contribuendo al suo deterioramento. È ovvio che tale fenomeno si somma all'azione delle proteasi muscolari la cui attività è strettamente correlata a fattori endogeni (specie, sesso, periodo riproduttivo, biochimismo post-mortale, ecc...) ed esogeni (temperatura esterna, stress indotto dalla cattura, traumatismi, ecc...).

La degradazione delle proteine derivante da tali fenomeni, unitamente a quella determinata dai batteri alteranti, provoca un progressivo aumento dell'**AZOTO BASICO VOLATILE TOTALE** che, proprio per questo è considerato uno dei più affidabili indicatori di alterazione del pescato.

L'**ABVT** (**AZOTO BASICO VOLATILE TOTALE**) è un indice generico; fornisce indicazioni di massima che risentono però della specie, degli eventuali stress durante la pesca, del tipo di muscolatura, dell'uso di ghiaccio. Ha un contenuto iniziale che oscilla intorno a 12-16mg/100g di carne e si innalza solo al termine della sua vita commerciale. Il Reg. CE 2074/05 fissa i limiti di ABVT solo per alcune categorie di prodotti della pesca:

- 25 mg/100g di carne per i prodotti della pesca appartenenti alla famiglia *Sebastes spp.*, *Helicolenus dactylopterus*, *Sebastichthys capensis*.
- 30 mg/100g di carne per i prodotti della pesca appartenenti alla famiglia dei *Pleuronettidi* (escluso l'halibut: *Hippoglossus spp.*).
- 35 mg/100g di carne per i prodotti della pesca appartenenti alla famiglia dei *Merlucidi*, specie appartenenti alla famiglia dei *Madidi* e *Salmo salar*.
- 60 mg di azoto/100 g dei prodotti della pesca interi utilizzati direttamente per la preparazione di olio di pesce destinato al consumo umano.

Al di là dei suddetti fattori endogeni, la conservabilità dei prodotti della pesca è, ovviamente, condizionata anche da numerosi ‘**Fattori Esogeni**’. A tal proposito va innanzitutto ricordato che la flora batterica dei pesci è strettamente relazionata alle caratteristiche dell’ambiente acqueo di provenienza. Proprio per tale motivo, il distretto geografico, la stagione, la temperatura, i livelli di contaminazione antropica e le relative modificazioni fisico-chimiche che da ciò ne derivano possono condizionare quali- quantitativamente la microbiologia delle acque e conseguentemente, dei pesci che le popolano.

Relativamente al distretto geografico in generale, è possibile affermare che, nei pesci catturati in acque temperate, la flora microbica risulta costituita da germi mesofili Gram-negativi, aerobi o anaerobi facoltativi quali *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* e Gram-positivi quali *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Lattobacillaceae*, ecc... Nei pesci tropicali prevarrebbero, invece, i germi Gram-positivi e quelli appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, mentre in quelli provenienti da acque fredde, specie sulle superfici (cute e branchie), i Gram-negativi psicrotrofi (*Pseudomonas*, *Alteromonas* e *Shewanella*) e i Gram-positivi quali quelli del genere *Clostridium* nell’intestino.

Per quanto concerne la stagione, è noto che nei periodi caldi le correnti ascensionali determinano un certo sommovimento dei fondali con relativo passaggio in sospensione di batteri prevalentemente sedimentari tra cui quelli del genere *Vibrio* e *Clostridium*.

I fattori esogeni genericamente riportati agiscono, dunque, nella maggior parte dei casi, indirettamente sulle caratteristiche igienico-sanitarie dei pesci, condizionandone quali-quantitativamente la flora microbica. Questa, dopo la pesca, si moltiplica, in corso di stoccaggio a refrigerazione, con velocità proporzionali al grado di psicrotrofia, modificando chimicamente e strutturalmente le superfici che la albergano. A partire da tali sedi (cute, branchie e intestino), come detto in precedenza, i batteri possono raggiungere la muscolatura con ovvie conseguenze igienico-sanitarie. Tale progressione, tuttavia, è fortemente condizionata anche da altri fattori esogeni, tra cui appare di primaria importanza il sistema di cattura.

Nessun sistema di cattura può essere considerato influente sulle caratteristiche igienico-sanitarie e qualitative del pescato, dal momento che, anche con i sistemi meno traumatizzanti, si determina comunque un forte stress e un'agonia più o meno prolungata. Alla luce di quanto appena detto, le conseguenze specifiche possono, dunque, riguardare la velocità di insorgenza e risoluzione del rigor mortis, l'acidificazione post-mortale, l'insorgenza precoce di odori sgradevoli, le modificazioni della pigmentazione cutanea a seguito di una tumultuosa risposta adrenergica e noradrenergica (con conseguente riduzione dell'ATP), le modificazioni di consistenza e di colore della muscolatura, per effetto dell'accumulo di lattati (solo in alcune specie a carni rosse quali quelle appartenenti alla famiglia degli Scombridae), la riduzione delle difese antibatteriche specifiche a livello di cute, branchie ed intestino.

Tali generiche conseguenze possono essere, peraltro, aggravate da fattori traumatizzanti legati allo specifico sistema di pesca, come pure, nel caso di determinati distretti in cui le attività di cattura sono molto intense, dallo spessore aggiuntivo rappresentato dalla c.d. "pressione piscatoria".

Volendo entrare maggiormente nel merito, è noto come tutti i SISTEMI DI PESCA CON RETE determinino delle lesioni di continuo sulla cute, o comunque, un allontanamento delle squame, in conseguenza dei movimenti che i pesci effettuano nel tentativo di liberarsi. Tali lesioni che, ovviamente, possono facilitare la

progressione dei batteri verso la muscolatura durante lo stoccaggio, risultano più gravi ed evidenti allorquando si impieghino “sistemi di reti in movimento”, come nei sistemi di pesca a strascico. In quest’ultimo caso, l’azione traumatizzante deriva anche e soprattutto dallo sfregamento dei pesci con il fondo marino, dallo sfregamento tra i pesci stessi all’interno del c.d. “sacco”, e dai traumatismi determinati dalla contemporanea presenza di corpi estranei (pietre, grossi detriti, ecc.). Le sollecitazioni meccaniche che derivano dalla pesca a strascico possono compromettere, chiaramente, oltre che la cute, anche l’apparato mio-scheletrico, portando alla comparsa di fratture e/o emorragie. Oltre a ciò, le stesse compressioni e gli sfregamenti, possono determinare la fuoriuscita di materiale fecale. Tra i “sistemi a rete fissa”, invece, meritano un piccolo cenno quelli a circuizione, ampiamente impiegati per la pesca del pesce azzurro o per la cattura industriale dei tonni. Specie per questi ultimi, tale tecnica di pesca può risultare particolarmente idonea laddove, dopo la cattura, le reti vengono rapidamente issate a bordo; viceversa il prolungato mantenimento in acqua dei pesci, all’interno della rete, è causa di una serie di dismetabolismi (specie dell’omeostasi acido-base) oltre che di vere e proprie lesioni traumatiche (emorragie muscolari) . Ciò in quanto i tonni necessitano, per la loro corretta respirazione di mantenere elevato il flusso d’acqua all’interno delle camere branchiali cosa che consente, allo stesso tempo, di eliminare i lattati muscolari in maniera efficiente (come ricordiamo, essi contribuiscono alle modificazioni di consistenza e di colore della muscolatura). La costrizione determinata invece dal loro mantenimento in vita all’interno di una rete a circuizione, provoca il blocco di tali meccanismi di escrezione con notevoli ripercussioni organolettiche e igieniche sul prodotto finito. Poco o per nulla traumatizzanti risultano, invece, i SISTEMI DI PESCA AD AMI : tra questi ricordiamo, quantomeno, il “palangaro”, sistema multi-ami impiegato sia a fondo che in superficie per diverse specie ittiche demersali e pelagiche. Tale tecnica comunque, pur non determinando danni meccanici, causa una prolungata sofferenza dei pesci catturati e, talvolta, la morte in acqua degli stessi che permanendo a lungo a temperature, specie in estate, piuttosto elevate, possono andare

incontro a precoci modificazioni organolettiche in virtù della moltiplicazione batterica, soprattutto a carico dell'intestino. Un cenno a parte meritano, infine, sempre nel contesto delle influenze del metodo di cattura, le tecniche impiegate in ACQUACOLTURA. Va precisato che trattasi di pesci potenzialmente già sottoposti a numerosi stressori "cronici" derivanti dalle tecniche di allevamento intensivo e per i quali, dunque, vanno poste particolari attenzioni nel contesto della raccolta. È possibile operare in maniera più controllata associando fasi di parziale o totale stordimento dei pesci a fasi di vera e propria scarificazione. In acquacoltura dulciacquicola, ad esempio, specie per i grossi Salmonidi, si opera una preliminare sedazione mediante acqua e ghiaccio; dopo di ciò i pesci vengono portati a morte o mediante "annocatura" (trauma sulla regione del cranio) manuale o meccanizzata, o impiegando la corrente elettrica (elettrocuzione), o, ancora insufflando nell'acqua anidride carbonica. Con tali tecniche si riduce di molto il tempo di scarificazione e dunque lo stress, garantendo nel contempo, una precoce refrigerazione dei prodotti. Di contro, relativamente all'elettrocuzione, sono state segnalate lesioni emorragiche e, talvolta, fratture della colonna vertebrale, dovute alle violente contrazioni che in entrambi i casi i pesci possono manifestare prima della morte. Simili considerazioni valgono anche per i pesci d'acquacoltura marina, laddove tali tecniche sono state impiegate, per lo più, solo sperimentalmente. Il metodo di riferimento, infatti, per tale comparto è il c.d. *crioshock* che consiste nell'immissione dei pesci, previamente catturati con reti a circuizione, in miscele (1:1) di acqua e ghiaccio. Tale tecnica, pur garantendo un'immediata refrigerazione del prodotto con i vantaggi igienici che ne derivano, produce una lunga agonia, dal momento che le specie marine principalmente allevate (spigole e orate) non reagiscono alle basse temperature nella stessa maniera dei salmonidi, ma piuttosto vanno incontro a morte per shock termico. Per le spigole, inoltre, vengono spesso segnalate, specie laddove si utilizzino maggiori percentuali di ghiaccio, lesioni emorragiche nel ventre e negli occhi o, laddove il carico di pesci nelle vasche è eccessivo, lesioni traumatiche cutanee causate dagli sfregamenti tra i soggetti.

Determinazione dell'ABVT e del TMA

La carne di pesce per la sua peculiare composizione è soggetta, durante la conservazione, soprattutto se effettuata in maniera inadeguata o se protratta per lungo tempo, a delle trasformazioni che portano alla comparsa di diverse molecole chimiche che permettono di apprezzarne la freschezza e l'idoneità al consumo. Le caratteristiche organolettiche, sapore e soprattutto odore, rappresentano, in primo luogo, uno strumento di primaria importanza per valutare lo stato di freschezza del pesce. Essi dipendono da un considerevole numero di fattori. Il pesce mostra, rispetto alla carne degli animali terrestri, delle caratteristiche che ne portano ad una facile alterazione. Esso presenta, innanzitutto, concentrazioni relativamente basse di glicogeno muscolare e, di conseguenza, valori di pH post-mortem elevati. Ciò porta alla comparsa di processi di alterazione precoci e prevalentemente di origine batterica; nella carne degli animali terrestri, invece, la degradazione è opera di enzimi endogeni, mentre l'attività batterica si instaura solo in un secondo tempo con la demolizione degli amminoacidi.

In un primo momento, l'attività batterica porta ad una decomposizione che conferisce al pesce odori gradevoli, detti di "frutta"; in seguito, con la degradazione degli estrattivi azotati, degli amminoacidi, dei grassi e degli zuccheri, si sviluppano odori sgradevoli per la presenza di nuove molecole chimiche, quali la trimetilammina (TMA), l'ammoniaca e l'idrogeno solforato responsabili di odori repellenti, "fecaloide-ammoniacale".

Le sostanze azotate proteiche vengono, quindi, attaccate, in percentuali simili tra loro, dai batteri proteolitici fino alla liberazione di amminoacidi. Nel pescato conservato a basse temperature, i microrganismi psicrofili sono localizzati nel muco che riveste la cute, sulle mucose e nell'apparato digerente. I fenomeni autolitici che avvengono a carico degli enzimi (catepsine, per la maggior parte di localizzazione lisosomiale) sono limitati a quelle preparazioni a base di pesce (prodotti marinati) che presentano valori di pH bassi (intorno a 4) e ridotti contenuti di sale (concentrazioni di cloruro di sodio inferiori al 5%). Nei prodotti ittici non eviscerati, anche gli enzimi del tratto

digerente (endopeptidasi tripsino-simili presenti nei ciechi pilorici ed altri enzimi pepsino-simili di provenienza gastrica) possono giocare un ruolo di una certa importanza nei processi di degradazione proteica. L'attività di questi ultimi enzimi è comunque notevolmente influenzata dalla stagione di cattura, in quanto si rende maggiore nel periodo di massima alimentazione. La successiva demolizione del substrato aminoacidico porta alla comparsa di composti volatili dall'odore, tra cui amine, ammoniaca, acidi grassi a corta catena, mercaptani ed idrogeno solforato (questi ultimi due alterano molto gravemente, a concentrazioni di pochi ppb, le caratteristiche organolettiche del pesce). L'ammoniaca, che rappresenta la quasi totalità dell'ABVT, origina dal catabolismo aminoacidico che si instaura durante i fenomeni di deterioramento. Durante le prime fasi della conservazione dei prodotti ittici, ridotte quantità si possono formare anche come conseguenza dei fenomeni autolitici. La quantità di ABVT è stata correlata con le caratteristiche organolettiche. I processi alterativi si manifestano più rapidamente nei pesci marini rispetto a quelli d'acqua dolce per la presenza, in quantità comprese tra l'1% e il 7% del peso secco del tessuto muscolare dei primi, di ossido di trimetilamina (TMAO) che risulta virtualmente assente nei secondi. La TMAO è un'alchilamina quaternaria neutra che, nel tempo, può essere ridotta a trimetilamina (TMA), responsabile in quanto volatile del tipico "odore di pesce". La TMA è una delle basi azotate volatili che si formano durante i processi alterativi delle parti proteiche dei pesci di mare, dopo la loro morte. Praticamente assente nel muscolo dei pesci appena catturati, essa viene per la maggior parte prodotta, per riduzione del TMAO ed attraverso una serie di reazioni biochimiche molto complesse, ad opera di alcuni batteri o per azione di determinati gruppi enzimatici.

Il metodo di riferimento è la metodica di microdiffusione in cella di Conway.

100g di muscolo di pesce è omogeneizzato con 50ml di soluzione al 20% di acido tricloroacetico (TCA 20%). 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 metilene a 0.066% (16.5mg di verde di bromocresolo e 33mg di rosso di metilene 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 0.01N, 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 dell'FFA

Il test FFA (Free Fatty Acid – acidi grassi liberi dovuti alla scissione-idrolisi del trigliceride nei suoi composti bruti) mira alla valutazione del grado di inacidimento del campione da analizzare e si esprime in % di acido oleico presente all'interno del campione. 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, reagente utilizzato per la ulteriore purificazione del campione perché elimina l'umidità residua del campione.

A 25ml del filtrato sono aggiunti 25ml di alcol etilico al 95% e 5 gocce di fenolftaleina, indicatore colorimetrico che vira in rapporto al pH del mezzo.

Si titola con idrossido di sodio 0.1N fino ad ottenere un colore rosa violaceo persistente una volta raggiunto l'equilibrio.

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 del numero di acido tiobarbiturico (TBA) Pearson

La malondialdeide (MDA) è uno dei maggiori prodotti della degradazione degli idroperossidi lipidici, per cui è utilizzata come marker del grado di perossidazione.

Il metodo più comune per la misura della MDA negli alimenti e nei campioni biologici è il test dell'acido tiobarbiturico (TBA). Esso si basa su una quantificazione spettrofotometrica dei composti rosa che si formano a pH basso ad alte temperature per reazione di 1 molecola di MDA con 2 molecole di TBA. Tali composti hanno un massimo assorbimento a 532-535 nm e vengono usualmente indicati con la sigla TBARS. Il valore dei T-BARS è espresso in equivalenti di malondialdeide, standard usato per la costruzione della retta di taratura in quanto uno dei principali marker dei processi di ossidazione lipidica.

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. Il campione omogeneizzato è posto in un protettone. Si lava il bicchiere del mixer con 47.5 ml di acqua e si aggiunge al protettone 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. 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.

$$\text{Numero di TBA} = 7.8 \times \text{densità ottica (mg aldeide malonica/kg)}.$$