

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI CAMPI ELETTRICI PULSATI SULLE
CINETICHE DI SALAGIONE DI BRANZINO FRESCO

Tesi in

69166 - Analisi Fisiche E Reologiche Degli Alimenti

Relatore:

Prof. Pietro Rocculi

Correlatori:

Dott. Juan Manuel Castagnini

Dott. Fabio D'Elia

Dott. Francesco Spataro

Candidato: Elisabetta Stopponi

Matricola N° 940201

Anno Accademico 2020/2021

Sessione unica

Sommario

INTRODUZIONE	1
Capitolo 1: IL BRANZINO	3
1.1 Denominazione e diffusione	3
1.2 Caratteristiche morfologiche, habitat e riproduzione.....	3
1.3 Pesca e acquacoltura	5
1.4 Produzione e consumi	10
Capitolo 2: LA SALAGIONE	13
2.1 Alterazione dei prodotti ittici	13
2.2 La salagione	14
2.3 Prodotti ittici salati	16
2.4 Prodotti ittici marinati	17
2.5 Metodi di salagione	18
2.6 Meccanismi d'azione del cloruro di sodio	21
2.6.1 Effetto antimicrobico	21
2.6.2 Interazione con le proteine muscolari	22
2.6.3 Inibizione dell'attività enzimatica.....	23
2.6.4 Influenza sull'ossidazione lipidica.....	23
Capitolo 3: I CAMPI ELETRICI PULSATI (PEF)	24
3.1 Tecnologie innovative nel settore ittico	24
3.2 I campi elettrici pulsati (PEF)	24
3.3 Componenti dell'impianto	25
3.4 Parametri operativi.....	26
3.5 Fenomeni chimico-fisici	28
3.5.1 Aumento del potenziale transmembrana.....	29
3.5.2 Inizio della formazione di pori.....	29
3.5.3 Evoluzione del numero e della dimensione dei pori	29
3.5.4 Fenomeni conseguenti al trattamento	30
3.6 Applicazioni dei campi elettrici pulsati alle tecnologie alimentari.....	30
3.6.1 Combinazione del PEF a trattamenti convenzionali	31
3.6.2 Inattivazione microbica.....	31
3.7 Il PEF nel settore ittico.....	32
Capitolo 4: MATERIALI E METODI	35
4.1 Materie prime	35

4.2 Preparazione dei campioni	35
4.3 Pretrattamento con PEF	35
4.4 Processo di salamoiaturo	37
4.5 Determinazioni analitiche	37
4.5.1 Peso	37
4.5.2 Sostanza secca.....	38
4.5.3 Attività dell'acqua (a_w)	38
4.5.4 Sale.....	38
4.5.5 Indice di ossidazione lipidica (TBARS)	39
4.5.6 Determinazione colorimetrica.....	40
4.6 Analisi statistiche	41
Capitolo 5: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	42
5.1 Caratterizzazione.....	42
5.2 Pretrattamento con PEF	42
5.3 Processo di salamoiaturo.....	43
5.3.1. Evoluzione del contenuto in acqua, a_w e contenuto in sale.....	43
5.3.2 Evoluzione dell'indice di ossidazione lipidica (TBARS).....	46
5.3.3 Studio della cinetica del trasferimento di massa.....	48
Capitolo 6: CONCLUSIONI.....	51
BIBLIOGRAFIA.....	52

INTRODUZIONE

Recentemente sta crescendo l'interesse del consumatore verso i prodotti ittici, in quanto rappresentano valide fonti di proteine ad alto valore biologico, vitamine, minerali e acidi grassi polinsaturi, soprattutto omega-3.

Dal 1961 al 2017, i consumi mondiali apparenti di pesce sono più che raddoppiati da 9.0 kg a 20.3 kg pro-capite, con un tasso annuale di crescita superiore a quello delle altre proteine animali (carne, uova e latticini). Nel 2017, le proteine di origine ittica rappresentavano il 17% delle proteine animali consumate globalmente, raggiungendo il 50% in alcuni Paesi in via di sviluppo.

D'altra parte, si stima che nel 2018 la produzione ittica mondiale abbia raggiunto i 179 milioni di tonnellate, per un valore dell'export di 164 miliardi di dollari (FAO, 2020).

Tuttavia, il pesce è una matrice alimentare estremamente deperibile, a causa delle sue caratteristiche intrinseche (contenuto in composti azotati non proteici e PUFA, pH post-mortem relativamente elevato, presenza di microrganismi psicotrofi) e di fattori estrinseci legati al livello di contaminazione ambientale, alle condizioni di allevamento, alle modalità di cattura ed abbattimento. Subito dopo l'abbattimento, il pesce va incontro ad una serie di processi degradativi autolitici e di origine microbica che ne influenzano la qualità organolettica, nutrizionale e microbiologica.

Pertanto, è indispensabile adottare adeguate tecniche di manipolazione e conservazione, in grado di prevenire il decadimento qualitativo e prolungare la *shelf-life* del prodotto (Ravishankar, 2016).

La salatura è uno dei metodi più antichi e diffusi per la conservazione del pesce.

Tuttora è disponibile sul mercato una grande varietà di prodotti ittici salati quali sardine, acciughe, aringhe, branzini e merluzzi, prodotti soprattutto dai Paesi scandinavi e mediterranei ed esportati in tutto il mondo, dove sono apprezzati per la qualità sensoriale e i prezzi modesti (Cropotova et al., 2021^a).

L'azione conservante del cloruro di sodio è dovuta alla riduzione dell'attività dell'acqua e alla creazione di una pressione osmotica che ostacola lo sviluppo microbico e l'attività enzimatica, anche a concentrazioni inferiori al 5% (Lupín, Boeri e Moscidar, 1981).

Il sale è in grado di interagire con le proteine muscolari aumentando la *water holding capacity*, quindi può ridurre la perdita di liquido in cottura e migliorare la tenerezza e la succosità del prodotto (Bhat et al., 2019). Infine, il sale è sfruttato come aromatizzante ed esaltatore di sapidità, spesso in combinazione con altri ingredienti quali erbe aromatiche, spezie, zuccheri ed antiossidanti.

Tuttavia, concentrazioni eccessive di sale possono compromettere la qualità del prodotto, in quanto provocano denaturazione delle proteine, *shrinkage* muscolare e disidratazione (Fan et al., 2014).

D'altra parte, il cambiamento degli stili di vita e la crescente preoccupazione per il contenuto di sodio negli alimenti (WHO, 2016) sta orientando il consumatore verso prodotti più semplici da preparare e consumare, validi dal punto di vista nutrizionale e il più possibile simili al prodotto fresco, ma allo stesso tempo gustosi e sicuri (Erkmen & Bozoglu, 2016).

Per questi motivi, i prodotti ittici salati tradizionali stanno cedendo il passo ad alimenti meno processati, ovvero leggermente salati, affumicati, scottati o marinati (Fan et al., 2014).

I principali metodi di salagione sono la salatura a secco e la salamoiatatura, realizzata per immersione o iniezione. La salamoiatatura può essere sfruttata nella preparazione di prodotti ittici leggermente salati, oppure combinata ad altre tecniche come trattamento preliminare ai processi di essiccazione, affumicatura e salatura a secco (Bras & Costa, 2010).

Nell'ottica industriale, l'ottimizzazione del trasferimento di sale dalla salamoia al muscolo è cruciale per ridurre la durata e i costi del processo e allo stesso tempo garantire un prodotto microbiologicamente sicuro.

Tra le diverse tecnologie innovative testate a questo scopo, negli ultimi 50 anni si è diffuso l'impiego dei campi elettrici pulsati (PEF) per il trattamento degli alimenti, grazie alla possibilità di accelerare il trasferimento di massa e favorire l'inattivazione microbica.

Il PEF consiste nell'applicazione di un certo numero di impulsi elettrici ad alta intensità e di breve durata ad un alimento posto tra due elettrodi, in modo da indurre una serie di modificazioni nel tessuto, quali la formazione di pori e l'aumento del potenziale di membrana (Barba et al., 2015).

L'utilizzo del PEF come trattamento preliminare al processo di salamoiatatura potrebbe favorire il trasferimento di massa e garantire una distribuzione più omogenea del sale all'interno del prodotto (Gomez et al., 2019). Tuttavia ad oggi gli studi sulla possibilità di applicazione al settore ittico sono ancora scarsi.

Nonostante il PEF sia considerato una tecnologia non termica, un possibile aumento di temperatura per effetto Joule e l'elettroporazione possono danneggiare i componenti più termolabili della matrice quali acidi grassi polinsaturi, proteine, pigmenti e vitamine (Gomez et al., 2019). Risulta quindi indispensabile valutare il possibile impatto negativo del PEF sulla qualità nutrizionale e sensoriale della matrice trattata.

Premesso questo, lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare gli effetti dei campi elettrici pulsati applicati su campioni di branzino fresco prima dell'immersione in salamoia per verificare la possibilità di accelerare il trasferimento di massa nella matrice, ed in secondo luogo per valutare l'impatto del trattamento sull'ossidazione dei lipidi.

Capitolo 1: IL BRANZINO

1.1 Denominazione e diffusione

Il branzino (*Dicentrarchus labrax*) è una specie ittica demersale appartenente alla famiglia dei *Moronidae* e al genere *Dicentrarchus* (Figura 1.1).

In Italia è noto sia come branzino sia come spigola, in conformità all'Allegato I al DM n° 19105 del 22/09/2017 ("Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale").

È ampiamente diffuso nell'Atlantico orientale, dalla Norvegia al Senegal, incluse le Isole Canarie, ma anche nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero (FishBase, 2013).

Negli ultimi anni sono stati osservati flussi migratori verso nord, probabilmente dovuti all'innalzamento della temperatura dei mari (IFCA, 2017).

Per la sua grande diffusione, è stato recentemente classificato come specie a rischio minimo di estinzione dall'IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Freyhof & Kottelat, 2008).

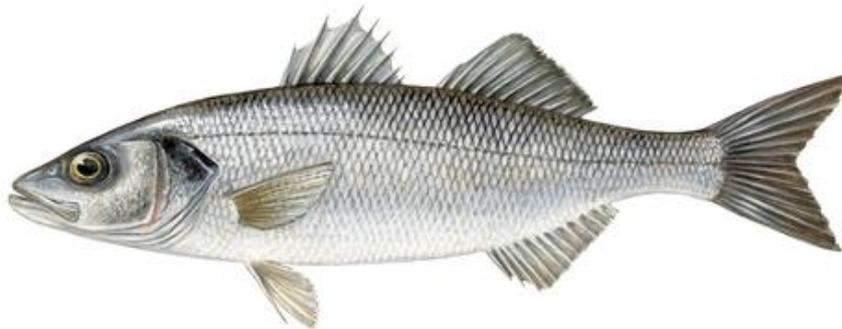


Figura 1.1 - *Dicentrarchus labrax* (*Scandinavian Fishing Year Book*).

1.2 Caratteristiche morfologiche, habitat e riproduzione

Il branzino possiede un corpo robusto e affusolato, caratterizzato da 2 distinte pinne dorsali della medesima lunghezza (la prima dotata di 8-10 raggi spinosi e la seconda di 12-13 raggi molli), una pinna anale (dotata di 3 raggi spinosi e 10-12 raggi molli) e due pinne pettorali di dimensioni inferiori. La pinna caudale è leggermente forcuta e la bocca moderatamente protrattile, munita anteriormente

di denti vomerini appuntiti. L'opercolo è provvisto di due spine robuste e appiattite, rivolte all'indietro, caratteristica distintiva del genere *Dicentrarchus*.

Il dorso presenta una colorazione argentea con sfumature grigio-bluastre, i fianchi sono grigio-argento chiaro mentre il ventre è biancastro, tendente al giallo. Talvolta si nota una zona più scura in corrispondenza dell'opercolo. Gli esemplari più giovani possono mostrare macchie nere sul dorso, che scompaiono una volta raggiunta la lunghezza di 10-15 cm (Bombace & Lucchetti, 2011).

Gli adulti possono raggiungere un peso massimo di 12 kg e una lunghezza massima di 103 cm, anche se in genere le dimensioni variano tra 23 e 46 cm (FishBase, 2013).

Il branzino è una specie eurialina, ovvero capace di adattarsi a un ampio range di salinità: in estate popola le zone lagunari e le foci dei fiumi, mentre in inverno migra in mare aperto. Come altre specie demersali, il suo habitat ideale sono i fondali rocciosi o sabbio-rocciosi; in genere predilige le acque basse costiere, ma può vivere fino a 100 m di profondità (Bombace & Lucchetti, 2011).

La spigola è inoltre euriterma, cioè in grado di sopportare sbalzi termici significativi (5-28°C), anche se il suo range ottimale di temperatura varia tra 8 e 24°C (FishBase, 2013).

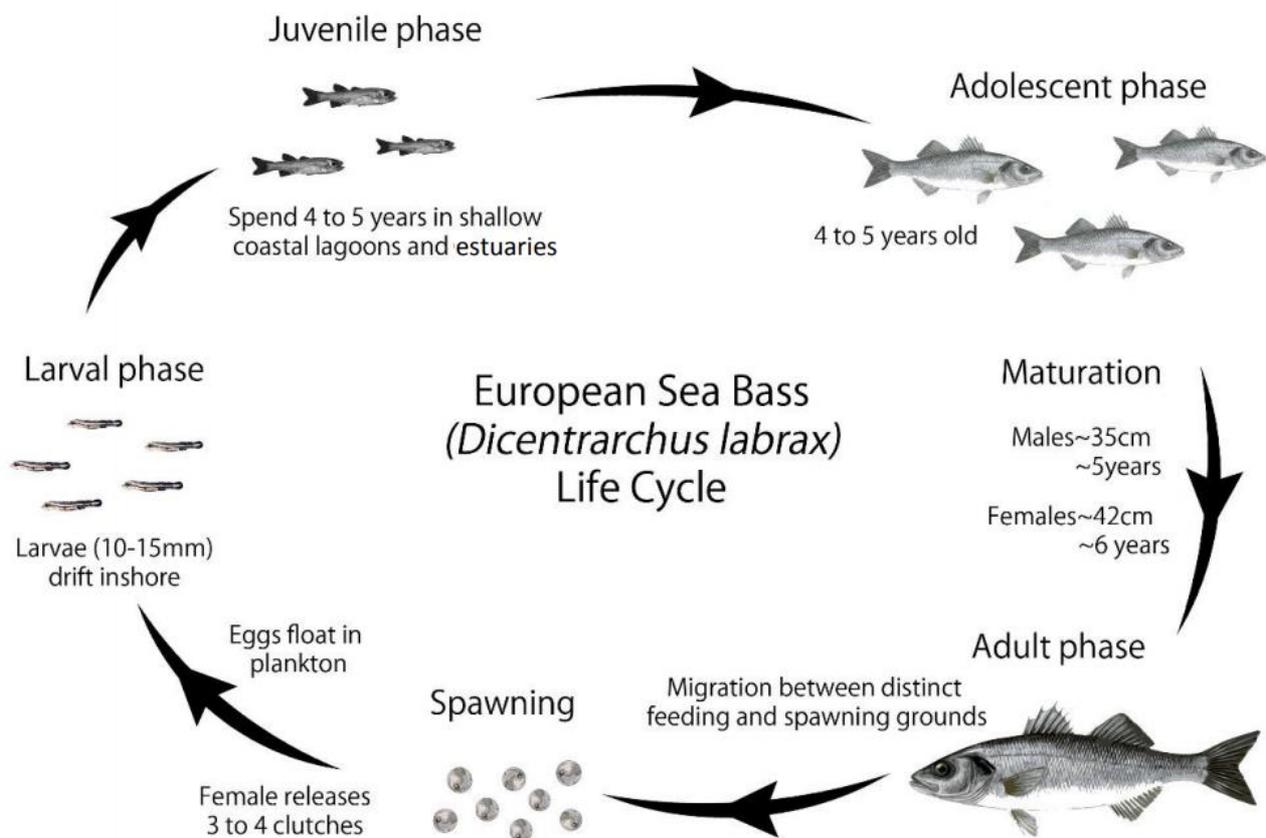


Figura 1.2 - Ciclo vitale del branzino (Carroll, 2014).

Nel Mediterraneo la maturità sessuale viene raggiunta intorno al secondo anno di età nei maschi (alla lunghezza di 23-30 cm) e al terzo nelle femmine (alla lunghezza di 31-40 cm). Nell'Atlantico questo avviene più tardi: tra 4 e 7 anni nei maschi (30-40 cm) e tra 5 e 8 anni nelle femmine (36-46 cm) (Figura 1.2).

La riproduzione avviene una volta l'anno, tra gennaio e marzo nel Mediterraneo e a fine giugno nell'Atlantico. Gli adulti si riuniscono in gruppi e migrano verso le acque costiere più calde, dove depongono piccole uova pelagiche di diametro compreso tra 1.1 e 1.2 mm.

Lo sviluppo dell'embrione ha una durata variabile in base alla temperatura delle acque (circa 3 giorni a 13-14°C). I giovani branzini rimangono nelle acque costiere per i primi 4-5 anni di vita, dove vivono in banchi e si nutrono prevalentemente di invertebrati come gamberi e molluschi; quindi migrano a largo, dove trovano acque più fredde e profondità maggiori. Gli adulti conducono una vita più solitaria e vanno a caccia nelle ore notturne, nutrendosi di invertebrati e di altri pesci (IFCA, 2017; Bombace & Lucchetti, 2011).

1.3 Pesca e acquacoltura

Il branzino è una specie di notevole importanza in Europa sia per la pesca commerciale, sia per la pesca sportiva e l'acquacoltura.

Gli attrezzi impiegati nella pesca commerciale delle spigole selvagge sono in genere reti da imbrocco, ami e palangari; sulle coste della Francia settentrionale è diffuso l'utilizzo di grandi sciabiche (Figure 1.3 e 1.4).

I lavorieri sono strutture fisse in cemento armato a forma di cuneo (Figura 1.5); essendo posizionate nei canali di comunicazione tra la laguna e il mare, permettono di catturare gli esemplari durante la migrazione autunnale (Bombace & Lucchetti, 2011).

Per consentire la sopravvivenza della specie, il Regolamento (CE) n. 1967 del 21 dicembre 2006 relativo alle misure di gestione per lo sfruttamento sostenibile delle risorse della pesca nel mar Mediterraneo ha fissato a 25 cm la taglia minima di cattura e commercializzazione del branzino.

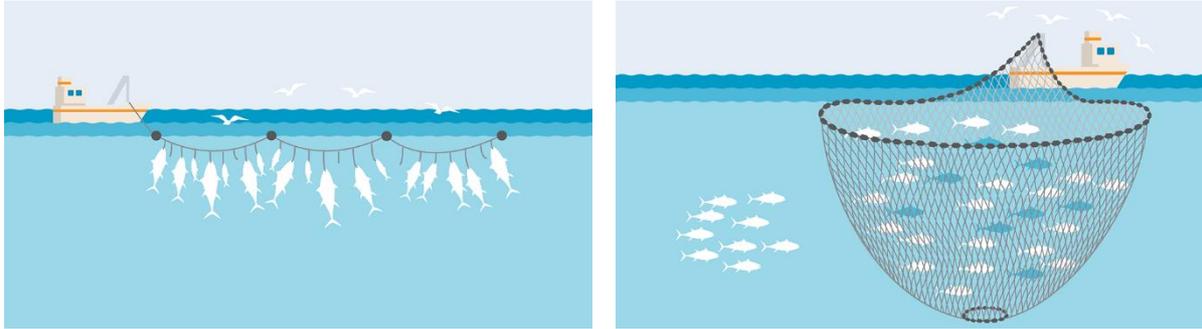


Figura 1.3 e 1.4 - Rappresentazione schematica di un palangaro (a sinistra) e di una sciabica (a destra) (www.msc.org).



Figura 1.5 - Lavoriero (www.ipescatoriorbetello.it).

La maggior parte delle spigole commercializzate in Europa proviene dall’acquacoltura, praticata in maniera sia intensiva (in vasche e gabbie), sia estensiva (in valli e lagune). I principali Paesi produttori nel bacino del Mediterraneo sono Grecia, Turchia, Italia, Spagna, Croazia ed Egitto.

L’allevamento estensivo del branzino viene praticato in vasti ambienti naturali a salinità variabile, situati in prossimità delle coste, come stagni, lagune e foci dei fiumi. A volte i bacini lagunari vengono delimitati da argini artificiali creando le cosiddette “valli di pesca”, da cui deriva il termine “vallicoltura”. Questa pratica sfrutta la migrazione naturale dei pesci eurialini, che in primavera si avvicinano alle coste per la riproduzione. In seguito alla schiusa, le larve entrano nella laguna alla ricerca di cibo e riparo dove vengono intrappolate tramite un sistema di dighe e recinzioni (Bombace & Lucchetti, 2011).

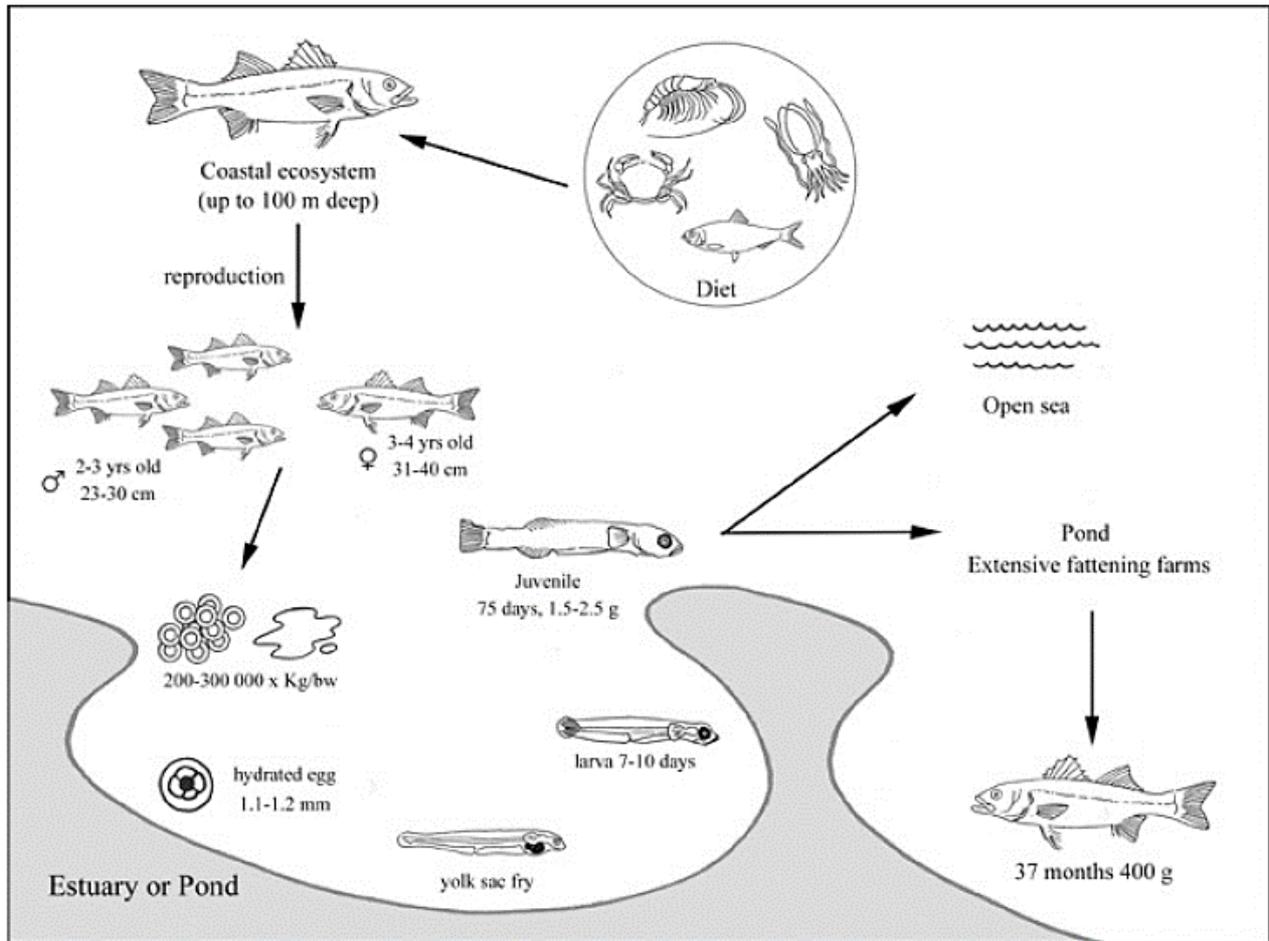


Figura 1.6 - Fasi dell'allevamento estensivo (FAO, 2006).

Nell'allevamento estensivo (Figura 1.6) l'allevatore non fornisce mangime dall'esterno, ma gli esemplari si nutrono della varietà di specie naturalmente presenti nell'ecosistema lagunare. L'intervento dell'uomo si limita alle opere di ripopolamento, gestione degli avannotti, cattura e controllo del regime idraulico. Il vantaggio di questo sistema è la possibilità di allevare contemporaneamente più specie nello stesso ambiente (branzini, orate, cefali, pagelli, anguille...), anche se il raggiungimento delle taglie commerciali richiede un tempo maggiore (400-500g in 37 mesi) (FAO, 2006).

In Italia i maggiori impianti produttivi si trovano in Veneto, Emilia-Romagna e Friuli-Venezia Giulia. In Toscana, Lazio e Sardegna è più comune la "stagnicoltura", che sfrutta gli stagni costieri (Bombace & Lucchetti, 2011).

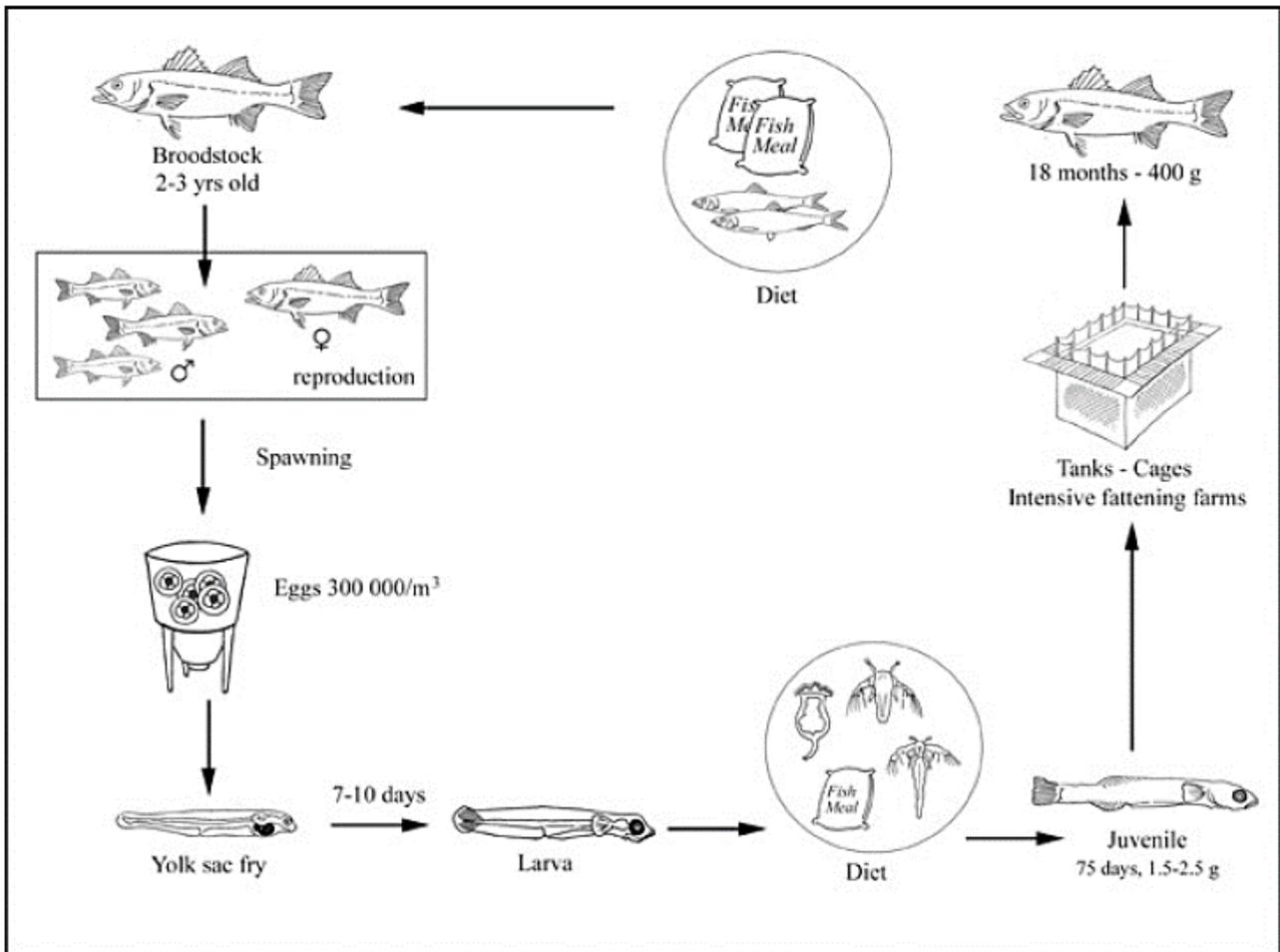


Figura 1.7 - Fasi dell'allevamento intensivo (FAO, 2006).

L'acquacoltura di tipo intensivo (Figura 1.7) viene praticata in gabbie (in mare) o in vasche (a terra). Il ciclo produttivo inizia dai riproduttori, catturati in natura o provenienti da un allevamento, che sono stimolati alla riproduzione attraverso il controllo del fotoperiodo e trattamenti ormonali. Le uova, ricavate tramite spremitura dell'addome delle femmine, sono fecondate con lo sperma maschile e poste negli schiuditori fino alla nascita, che in genere avviene dopo 2-4 giorni dalla deposizione. Le larve sono trasferite in vasche a terra, dove sono alimentate con cibo vivo fino allo svezzamento. I giovani esemplari, chiamati avannotti, vanno incontro a una fase di pre-ingrasso in vasche o in bacini, che dura dai 2 ai 4 mesi. La fase finale di ingrasso viene condotta in vasche artificiali o in gabbie in mare (Figure 1.8 e 1.9) e permette di raggiungere la taglia commerciale di 400 g in 18 mesi.

Le gabbie sono costruite in acciaio, ampie da 4 a 10 m² e profonde fino a 8 m; possono essere ancorate al fondale o galleggianti in mare aperto e sfruttano il naturale ricambio di acqua attraverso la struttura. Le vasche, invece, devono essere continuamente rifornite di acqua marina o salmastra a temperatura controllata (13-18°C). L'elevata densità di allevamento (20-35 kg/m²) tipica di questo sistema

richiede il controllo costante e accurato della qualità delle acque e dello stato di salute dei pesci (FAO, 2006; Bombace & Lucchetti, 2011).



Figura 1.8 e 1.9 - *Gabbie in mare (a sinistra) e vasche a terra (a destra) per l'allevamento del branzino* (www.galaxidimarine.farm; FAO, 2006).

Il fabbisogno alimentare degli avannotti richiede mangimi ad elevato contenuto di proteine (minimo 43%) e lipidi (minimo 12%, ottimale 18-19%), inclusa una quota di acidi grassi polinsaturi n-3 (> 1%). La somministrazione di antiossidanti come vitamina E e selenio è fondamentale per preservare le carni dall'ossidazione (vitamina E \geq 500 mg/kg) (Bombace & Lucchetti, 2011).

1.4 Produzione e consumi

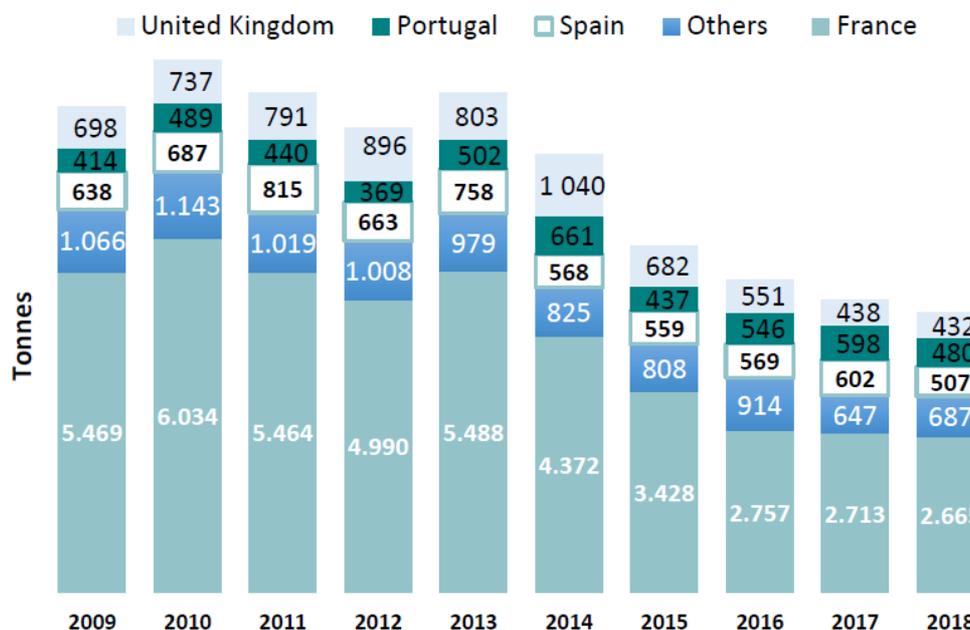


Figura 1.10 - Produzione europea di branzino pescato dal 2009 al 2018 (EUMOFA, 2019 su dati FAO).

L'Unione Europea è il principale produttore di spigola pescata a livello mondiale: si stima che nel 2018 le quantità pescate in Europa abbiano raggiunto le 4700 tonnellate, corrispondenti al 93% del pescato globale di questa specie (Figura 1.10). Tra i Paesi produttori primeggia la Francia, seguita da Spagna, Portogallo, Regno Unito e Grecia (EUMOFA, 2019).

Tuttavia, tra il 2010 e il 2018 la pesca del branzino ha subito un declino significativo (-47%) in seguito alle misure adottate a livello europeo contro il sovra-sfruttamento delle riserve ittiche (EUMOFA, 2019).

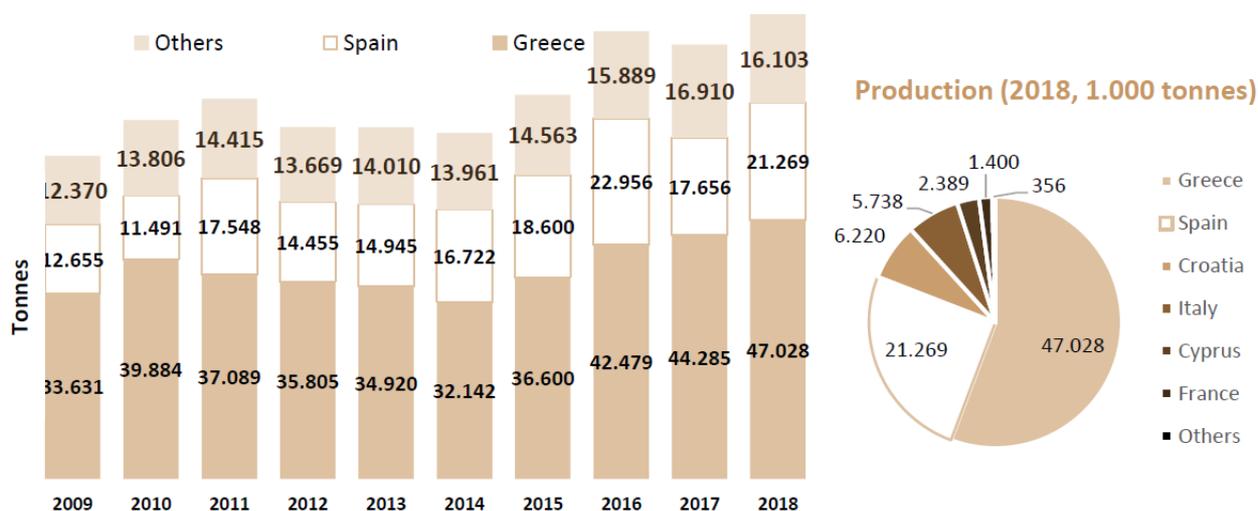


Figura 1.11 - Produzione europea di branzino allevato dal 2009 al 2018 (EUMOFA, 2019 su dati FAO).

Nel 2018, la produzione europea di branzino tramite acquacoltura ha raggiunto un quantitativo record di 84'400 tonnellate, per un valore di mercato di circa 500 milioni di euro (Figura 1.11).

I principali Paesi produttori sono Grecia, Spagna, Croazia e Italia. Tuttavia, la Turchia rimane il principale produttore mondiale di spigola allevata, che viene esportata anche in Europa (EUMOFA, 2019).

In Europa il branzino viene prevalentemente venduto e consumato fresco, solo una piccola parte subisce lavorazioni quali sfilettamento, marinatura, affumicatura e confezionamento.

L'Italia svolge un ruolo fondamentale nel mercato europeo del branzino. Si stima che nel 2018 la produzione complessiva abbia raggiunto quasi 6000 tonnellate, provenienti in gran parte dall'acquacoltura (FAO, 2018). Secondo l'Osservatorio europeo del mercato dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, nel 2017 il branzino era la quinta specie allevata in Italia in termini di volumi (5% della produzione totale da acquacoltura) e la terza per valore commerciale (EUMOFA, 2017) (Figura 1.12).

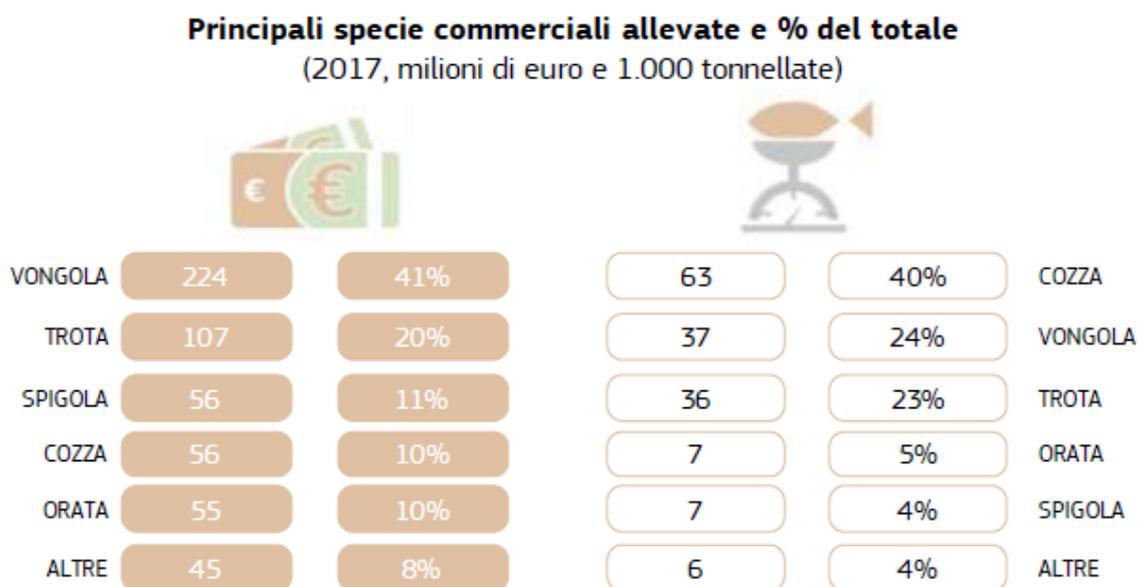


Figura 1.12 - Principali specie commerciali allevate in Italia (EUMOFA, 2017 su dati Eurostat e FAO).

Nonostante sia uno dei maggiori allevatori di branzino in Europa, l'Italia dipende ancora in modo significativo dall'importazione. Nel 2018 sono state importate 30'324 tonnellate di branzino fresco allevato, pari al 500% della produzione nazionale, mentre i volumi esportati sfioravano le 3000 tonnellate (ISMEA, 2020).

L'Italia acquista soprattutto da Grecia, Turchia, Francia, Spagna e Croazia (Kontali Analyse, 2018).

Secondo l'Annuario della BMTI (Borsa Merci Telematica Italiana) relativo all'anno 2019, i consumi totali di pesce in Italia hanno registrato un lieve aumento rispetto al 2018, sia in termini di volumi sia di valore economico (+0.7%) (BMTI, 2019). Nello stesso anno, il branzino era la terza specie consumata dopo l'orata e la cozza, mentre si classificava al quarto posto considerando il corrispondente valore in euro (EUMOFA, 2020) (Figura 1.13).

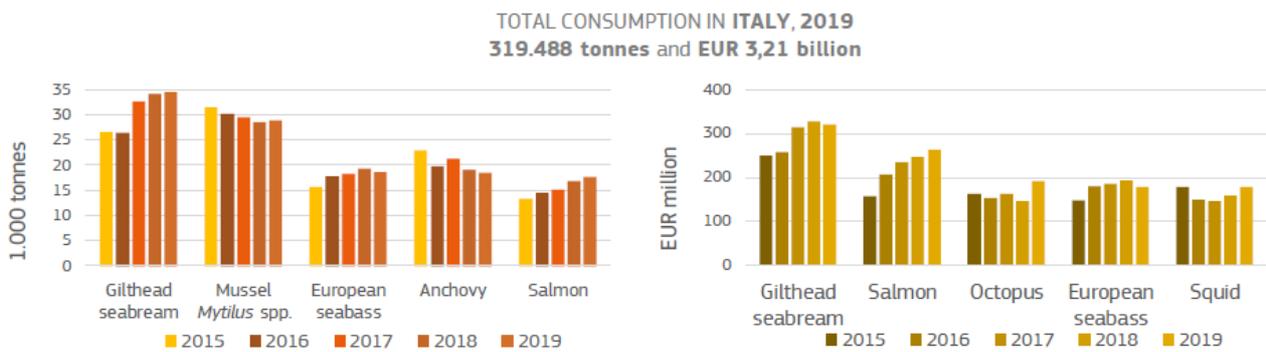


Figura 1.13 - Specie ittiche più consumate in Italia dal 2015 al 2019, in volume e in valore economico (EUMOFA, 2020 su dati Europanel).

Capitolo 2: LA SALAGIONE

2.1 Alterazione dei prodotti ittici

I prodotti ittici freschi sono facilmente soggetti ad alterazioni di tipo microbico, biochimico (ad opera di enzimi endogeni) e chimico (innesco di reazioni di ossidazione e idrolisi).

Questo è dovuto alle caratteristiche peculiari della matrice, quali:

- Elevato contenuto di acqua, che favorisce lo sviluppo microbico e le attività enzimatiche;
- Abbondanza di composti azotati non proteici e amminoacidi liberi, facilmente metabolizzati dai microrganismi;
- Elevato tenore in acidi grassi insaturi, particolarmente suscettibili all'ossidazione;
- Ridotto tenore in glicogeno e valori di pH *post mortem* elevati (> 6.0), insufficienti a ostacolare lo sviluppo microbico.

Altri fattori come stagione di cattura, taglia dell'animale e metodo di pesca possono influenzare la durata della conservazione.

Il deterioramento dei prodotti ittici avviene in due fasi: la prima, caratterizzata da fenomeni autolitici ad opera di enzimi endogeni, predispone la matrice a una seconda fase di sviluppo microbico, associato alla degradazione di composti azotati non proteici (urea, TMAO), amminoacidi liberi e inosina con conseguente sviluppo di off flavours (Arcangeli et al., 2003).

I microrganismi che sviluppano nel pesce fresco possono avere origine endogena (presenti soprattutto nell'apparato digerente) o esogena (derivanti dall'ambiente o da contaminazioni successive alla cattura).

I microrganismi autoctoni dei pesci di acqua salata, originari delle zone temperate, sono generalmente Gram negativi psicrotrofi (in grado di crescere a temperature tra 0 e 25°C): *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio* e *Photobacterium*.

Nelle specie provenienti da acque tropicali prevalgono Gram positivi mesofili, appartenenti ai generi *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*.

Nei pesci di acque dolci riescono a sviluppare anche il genere *Streptococcus* e le *Enterobacteriaceae*. *Pseudomonas spp.* e *Shewanella putrefaciens* sono più frequentemente causa di spoilage nel prodotto fresco, attraverso la degradazione di numerosi metaboliti, in particolare dell'ossido di trimetilammina (TMAO) in trimetilammina (TMA), responsabile dell'odore caratteristico di pesce degradato.

Photobacterium phosphoreum è responsabile del deterioramento nei pesci di acqua salata confezionati sottovuoto o in atmosfera protettiva (Arcangeli et al., 2003).

Fin dall'antichità, l'uomo ha tentato di ostacolare l'inevitabile perdita di freschezza del pesce mettendo a punto una varietà di processi di trasformazione e stabilizzazione, che consentissero di prolungare la conservazione e garantire la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti ittici.

I metodi di stabilizzazione ad oggi più comuni possono essere così riassunti:

- Tecniche basate sul controllo dell' a_w : essiccamento, salagione, affumicamento a caldo;
- Tecniche basate sul controllo chimico: affumicamento, marinatura, fermentazione, aggiunta di conservanti;
- Tecniche basate sul controllo termico: cottura, scottatura, pastorizzazione, sterilizzazione;
- Tecniche basate sulle basse temperature: refrigerazione, congelamento, surgelazione;
- Tecniche basate sulla riduzione del potenziale redox: confezionamento sottovuoto o MAP (De Leonardis, 2008).

2.2 La salagione

La salagione è uno dei metodi più antichi e semplici per preservare grandi quantità di pesce dal deterioramento.

La più remota testimonianza dell'impiego del sale nella conservazione dei cibi risale a circa 10 mila anni fa, come suggeriscono alcuni resti di pesce e cloruro di sodio rinvenuti nel sito di Al Khiday, in Sudan (Maritan et al., 2018).

Per le sue proprietà conservanti, nell'antichità il sale era considerato una merce estremamente preziosa e il controllo delle miniere aveva un'importanza strategica: nell'antica Roma rappresentava il pagamento dei legionari, da cui il termine "salario" (Albarracín et al., 2010).

È noto che i Greci, i Romani, gli Egizi, i Vichinghi e altre popolazioni del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico facessero ampio uso della salagione per preservare i prodotti ittici dal deterioramento (Cropotova et al., 2021^a).

Prima della diffusione delle celle frigorifere sui pescherecci, la salatura permetteva di conservare il pesce a bordo in attesa dello sbarco (De Leonardis, 2008).



Figura 2.1 - Rovine di una fabbrica di garum (antica salsa romana a base di pesce salato e fermentato) a Baelo Claudia, Spagna (foto di Anual, www.commons.wikimedia.org).



Figura 2.2 - Gli antichi Egizi erano soliti seppellire insieme al defunto del cibo conservato con sale e resine, che lo avrebbe sfamato nell'aldilà (foto di Kenneth Garrett, www.nationalgeographic.com).

Attualmente il cloruro di sodio è uno degli additivi più impiegati dall'industria alimentare: in virtù del basso costo e delle molteplici funzioni, è ormai un ingrediente insostituibile nella produzione dei formaggi e dei salumi e nei prodotti trasformati a base di carne e pesce.

In primis, il sale svolge un'azione antimicrobica dovuta alla riduzione dell'attività dell'acqua: essendo un soluto idrofilo, lega le molecole di acqua presenti e le rende indisponibili allo sviluppo microbico. Altrettanto significativa è la capacità di interagire con le proteine miofibrillari, favorendo l'assorbimento di acqua all'interno della struttura proteica. Infine, il sale conferisce sapidità agli alimenti e contribuisce positivamente all'aroma e al gusto (Albarracín et al., 2010).

2.3 Prodotti ittici salati

Una grande varietà di prodotti ittici salati viene attualmente prodotta dai Paesi scandinavi e mediterranei ed esportata in tutta Europa, negli USA e in America Latina, dove sono apprezzati per le tipiche caratteristiche sensoriali e i prezzi moderati (Cropotova et al., 2021^a).

Diverse specie di pesci pelagici si prestano alla salagione: sardine, aringhe, salmone e merluzzo sono le materie prime per la realizzazione di prodotti tipici del nord Europa, fra cui il *klippfisk* norvegese (merluzzo salato ed essiccato) e le *maatjesharing*, aringhe fresche marinate tipiche dei Paesi Bassi (Figure 2.3 e 2.4).

Nei Paesi mediterranei sono impiegati soprattutto merluzzo, tonno, acciughe e sardine; il recente sviluppo dell'acquacoltura ha reso disponibili grandi quantità di branzino, tradizionalmente consumato fresco, che ora si presta anche alla trasformazione industriale (Fuentes, 2007).



Figura 2.3 e 2.4 - A sinistra: stoccaggio del *klippfisk* (www.sjomatnorge.no); a destra: le *maatjesharing* (www.commons.wikimedia.org).

Il cloruro di sodio nei prodotti ittici trasformati è in grado di aumentare la water holding capacity e migliorare la texture in seguito all'interazione con le proteine miofibrillari; tramite la riduzione del cooking loss conferisce maggiore succosità e tenerezza al prodotto cotto (Cropotova et al., 2021^a). Spesso impiegato in combinazione con altre sostanze come spezie, erbe aromatiche, zuccheri e antiossidanti, il NaCl può migliorare l'aspetto sensoriale, anche attraverso l'inattivazione di enzimi proteolitici endogeni. Infine, esercita un parziale effetto antimicrobico dovuto alla riduzione dell' a_w e alla disidratazione osmotica delle cellule batteriche (Albarracín et al., 2010).

Un prodotto ittico salato ha caratteristiche nutrizionali e sensoriali ben diverse dal pesce fresco. Con la diffusione dei prodotti ittici surgelati, i prodotti salati tradizionali hanno perso di interesse sul mercato (De Leonardis, 2008). D'altra parte, la crescente preoccupazione per il contenuto di sodio

negli alimenti trasformati, ai quali si attribuisce circa il 70% del sodio assunto giornalmente (WHO, 2016) ha portato il consumatore a orientarsi verso prodotti leggermente salati o marinati, ottenuti tramite immersione in una soluzione acquosa di cloruro di sodio ed altri ingredienti.

Dal momento che la penetrazione passiva della salamoia nel prodotto è un processo lento, è interesse delle aziende mettere a punto strategie in grado di accelerare la migrazione del NaCl, specie nelle fasi iniziali, quando l'elevata a_w del pesce può favorire lo sviluppo microbico. La riduzione dei tempi di lavorazione avrebbe implicazioni positive non solo sulla sicurezza del prodotto, ma anche sui costi di produzione.

A tale scopo, negli ultimi anni sono state sperimentate diverse tecnologie per accelerare la diffusione del sale nei tessuti, come gli ultrasuoni ad alta intensità (Chemat et al., 2011; Turhan et al., 2013), il sottovuoto pulsato (Andres et al., 2002) e i campi elettrici pulsati (PEF), in combinazione ai processi di salagione e marinatura (Cropotova et al., 2021^a; Cropotova et al., 2021^b).

2.4 Prodotti ittici marinati

Una categoria distinta è rappresentata dai prodotti ittici marinati, ottenuti tramite immersione del pesce in una soluzione acquosa contenente aceto e cloruro di sodio, per un tempo variabile da qualche ora a pochi giorni (Figure 2.5 e 2.6).



Figura 2.5 e 2.6 - Esempi di prodotti ittici marinati (www.san-lorenzo.com; www.3ellefood.it).

L'aceto e il cloruro di sodio agiscono in sinergia esplicando un effetto conservante: l'acido acetico in particolare riduce il pH del mezzo ed esercita un effetto tossico diretto sulle cellule microbiche, mentre il NaCl contribuisce a rassodare e stabilizzare la struttura delle carni.

Il valore finale di pH raggiunto dai prodotti marinati è fondamentale: valori troppo bassi influiscono negativamente sulle caratteristiche organolettiche, mentre valori troppo elevati non garantiscono un'adeguata stabilizzazione nei confronti dello sviluppo microbico e delle reazioni enzimatiche.

Convenzionalmente, si assume come limite massimo il valore di 4.5, al di sotto del quale non avviene la produzione di tossine da parte di *Clostridium botulinum*.

La marinatura può avvenire a freddo oppure a caldo: nel primo caso i prodotti devono essere conservati sotto refrigerazione, invece nel secondo vanno incontro a pastorizzazione e sono stabili anche a temperatura ambiente (De Leonardis, 2008).

Alcune specie di pesce azzurro (acciughe, aringhe e sardine), molluschi e crostacei sono particolarmente adatti alla realizzazione di prodotti marinati crudi; latterini, anguille, trote, sgombri si prestano meglio alla realizzazione di prodotti marinati cotti. Alla soluzione di marinatura possono essere aggiunti vari additivi con azione acidificante, antimicrobica, antiossidante e aromatizzante. I prodotti finiti sono immersi in olio di semi e confezionati in contenitori di metallo, vetro o materiale plastico (Arcangeli et al., 2003).

2.5 Metodi di salagione

La salagione dei prodotti ittici può avvenire con due metodi:

- A secco
- In umido o in salamoia

Nella salagione a secco i pesci vengono disposti in vasche di acciaio inox, leggermente inclinate e munite di canale di scolo per favorire l'eliminazione dell'essudato, e cosparsi uniformemente di sale (Figura 2.7 e 2.8).



Figura 2.7 e 2.8 - Salagione a secco del salmone, a sinistra (www.tekportal.net) e del merluzzo, a destra (www.thefoodellers.com).

Il processo può durare da 15 giorni a 8 settimane: il sale cristallino penetra nel muscolo, facendo fuoriuscire parte dell'acqua di costituzione sotto forma di essudato (exosmosi) e legando quella interna residua, con conseguente abbassamento dell' a_w . Il trasferimento di massa si arresta quando i liquidi tissutali diventano una soluzione salina satura (Arcangeli et al., 2003).

La salagione in umido prevede l'immersione del pesce in soluzioni più o meno concentrate di cloruro di sodio. La durata del trattamento varia in base alla concentrazione salina o forza della salamoia, alle dimensioni dei pesci e alla loro composizione.

Durante il processo, avviene un trasferimento di sale nei tessuti dell'alimento, mentre la salamoia si arricchisce delle sostanze solubili contenute nel muscolo (proteine, carboidrati, minerali e vitamine): il flusso si arresta quando il liquido tissutale e la salamoia raggiungono la medesima concentrazione salina (isotonia).

In alcune industrie viene praticata la salagione ad iniezione di salamoia, allo scopo di favorire una diffusione più rapida ed omogenea del sale nei tessuti ed aumentare le rese del processo (Figura 2.9). Tale metodo prevede l'iniezione della salamoia nel muscolo mediante una serie di aghi dotati di numerosi fori. L'utilizzo di macchinari che operano in continuo con riciclo di salamoia è vantaggioso per i tempi e le rese del processo, tuttavia è maggiore il rischio di una contaminazione microbica "a catena" dei filetti (Arcangeli et al., 2003).



Figura 2.9 - *Macchinario per l'iniezione di salamoia in filetti di pesce (www.equipment7.com).*

L'efficacia di un processo di salamoiatatura dipende da una serie di fattori, tra cui forza, temperatura e omogeneità della salamoia, purezza e granulometria del sale, spessore e composizione del pesce, durata del trattamento, rapporto tra le quantità di pesce e di soluzione.

La forza della salamoia dipende dalla concentrazione salina: in genere si attribuisce un valore di 100° ad una soluzione satura a 16°C, contenente almeno 264 g di NaCl in 1 L di acqua. Affinché il processo sia continuo ed efficace, è necessario rimescolare la soluzione per mantenere la forza della salamoia costante ed omogenea, in quanto tende a indebolirsi in seguito al trasferimento di sale nell'alimento. La concentrazione di NaCl impiegata influenza significativamente le caratteristiche del prodotto finito: in genere non dovrebbe superare il 18-20%, allo scopo di evitare la formazione di cristalli di sale sulla superficie dell'alimento.

La temperatura condiziona la massima quantità di sale in soluzione e quindi la forza della salamoia. È opportuno operare a bassa temperatura ($T < 10^{\circ}\text{C}$) e successivamente conservare i prodotti a 4°C, in modo da prevenire lo sviluppo di microrganismi alofili (De Leonardis, 2008).

La velocità di penetrazione del sale nei tessuti è influenzata dalla sua granulometria e dalla purezza. Il sale fino può essere distribuito in modo più uniforme sulla superficie del pesce, ma tende ad attraversare troppo velocemente gli strati superficiali del muscolo provocando la denaturazione delle proteine e la comparsa delle cosiddette “bruciature da sale”, ostacolando così la successiva penetrazione negli strati più profondi. Quindi in genere si preferisce il sale grosso, con cristalli di dimensioni comprese tra 2 e 4 mm, poiché cristalli di dimensioni eccessive possono causare danni sulla superficie del pesce, specie se la salagione avviene mediante sfregamento.

La purezza di un sale dipende dalla presenza di impurità mescolate al cloruro di sodio, come sali e solfati di calcio e magnesio, che in genere ostacolano il trasferimento nei tessuti. È preferibile utilizzare un sale puro (impurezze $< 1\%$) per ottenere un prodotto più morbido, meno amaro, di colore giallo chiaro, facile da dissalare e più simile al prodotto fresco dopo cottura. L'impiego di sali con un tenore di impurezze più elevato porta all'ottenimento di prodotti più duri e tigliosi, di colore bianco e dal sapore amarognolo (Arcangeli et al., 2003).

Un eccessivo spessore del pesce o la presenza di consistenti depositi di grasso ostacolano la penetrazione del NaCl, consentendo agli enzimi endogeni di innescare i processi autolitici. La frazione lipidica è inoltre suscettibile all'ossidazione e può dar luogo alla comparsa di off flavours. È fondamentale che le fasi di preparazione del pesce (lavaggio, eviscerazione, sfilettamento) siano svolte in condizioni igieniche impeccabili, in modo da preservare la freschezza della materia prima (De Leonardis, 2008).

Infine, è necessario sostituire frequentemente le salamoie, provvedere all'adeguato smaltimento dei reflui e sanificare efficacemente le vasche dopo ogni svuotamento (Arcangeli et al., 2003).

Rispetto alla salagione in umido, nella salagione a secco la penetrazione del sale nei tessuti avviene più lentamente, ma l'umidità e il valore di a_w del prodotto finito sono inferiori, quindi l'effetto antimicrobico è più significativo. Tuttavia, questo metodo può conferire alla superficie dell'alimento un aspetto "oleoso" sgradito, a causa della denaturazione proteica dovuta a una disidratazione troppo rapida, che ostacola la penetrazione del sale in profondità.

Al contrario, i prodotti ottenuti dalla salagione in umido sono caratterizzati da valori di a_w più elevati, quindi sono più suscettibili allo sviluppo microbico e presentano maggior rischio di contaminazioni batteriche derivanti dalla salamoia (Arcangeli et al., 2003).

La salagione, specie se in umido, da sola non è sufficiente a garantire una stabilizzazione efficace e prolungata dell'alimento, pertanto deve essere combinata ad altre tecniche quali affumicatura, disidratazione, cottura, refrigerazione e adeguato confezionamento (De Leonardis, 2008).

2.6 Meccanismi d'azione del cloruro di sodio

2.6.1 Effetto antimicrobico

In generale, l'azione antimicrobica del NaCl è dovuta alla riduzione dell'attività dell'acqua del tessuto in cui diffonde, in seguito al fenomeno della disidratazione osmotica.

L'osmosi è un trasferimento di solvente da una soluzione meno concentrata di soluti a una soluzione più concentrata, che si innesca spontaneamente quando le due zone sono separate da una membrana semipermeabile e termina al raggiungimento dell'isotonia (Campbell et al., 2019).

Questo processo fa sì che durante la salagione del pesce l'acqua intertissutale, poi quella intracellulare fuoriescano dal muscolo, richiamate dall'elevata concentrazione di sale presente sulla superficie esterna o nella salamoia. Questo processo coinvolge anche le cellule microbiche, che iniziano a perdere acqua finché la disidratazione non è tale da provocarne la morte. Allo stesso tempo, il NaCl penetra nei tessuti per diffusione, definita come la tendenza delle molecole di soluto a disporsi uniformemente tra due zone a diversa concentrazione, attraverso un moto spontaneo e casuale (Campbell et al., 2019). Questo fenomeno prevale nella salagione in umido, superando il flusso osmotico in direzione opposta, poiché la salamoia presenta una concentrazione di NaCl significativamente superiore a quella dei liquidi tissutali.

All'interno del muscolo il sale lega l'acqua residua, abbassando ulteriormente l' a_w fino a livelli incompatibili con la crescita della maggior parte dei microrganismi, ma può esercitare anche un effetto tossico diretto su numerosi ceppi batterici.

Possono tuttavia sopravvivere i microrganismi alofili, cioè in grado di crescere a concentrazioni saline elevate e valori di a_w minimi di 0.75, che possono dare luogo a fenomeni putrefattivi nei prodotti ittici

salati. Ad esempio, alcune *Halobacteriaceae* con spiccata attività proteolitica sono responsabili della cosiddetta “alterazione rosa” nel baccalà (merluzzo salato ed essiccato), mentre l’alterazione “grigia” è stata attribuita a muffe come *Sporendonema* e *Oospora*.

Per questo la salagione deve essere necessariamente combinata ad altre tecniche di stabilizzazione (affumicatura, disidratazione, refrigerazione, confezionamento) per garantire ai prodotti ittici una conservazione prolungata (De Leonardis, 2008).

2.6.2 Interazione con le proteine muscolari

Il NaCl penetrato nei tessuti può interagire con le proteine miofibrillari, determinando in alcuni casi un maggiore assorbimento di acqua (*swelling*) e un aumento della *water holding capacity*.

In particolare, gli ioni Cl^- liberati dal sale si associano ai gruppi carichi positivamente delle proteine, frapponendosi nella struttura tridimensionale del muscolo (Figura 2.10).

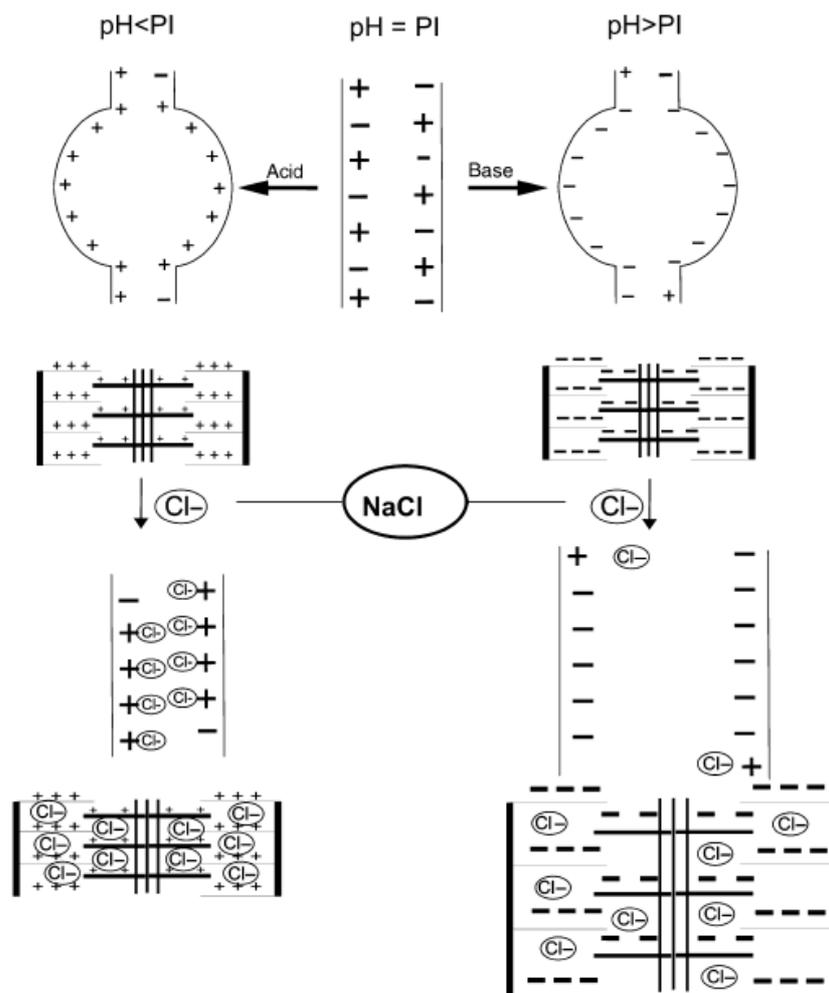


Figura 2.10 - Interazione del NaCl con le proteine miofibrillari (Albarracín et al., 2010).

Quando il pH del pesce è superiore al punto isoelettrico (PI) delle proteine, gli ioni Cl^- neutralizzano le cariche positive residue aumentando la carica netta negativa e quindi le forze repulsive tra miofibrille: l'allontanamento dei miofilamenti favorisce l'assorbimento di acqua all'interno della struttura proteica. Al contrario, quando il pH è inferiore al punto isoelettrico, il legame degli ioni Cl^- alle cariche positive riduce le forze repulsive tra miofibrille e ostacola l'ingresso di ulteriori molecole di acqua. Il pH dei tessuti dei pesci in genere è superiore al PI delle proteine miofibrillari, pertanto l'aggiunta di NaCl esercita un effetto positivo sulla *water holding capacity*.

Concentrazioni eccessive di sale (superiori a 1 M) possono avere un effetto opposto sulla ritenzione idrica, definito *salting out*: gli ioni Cl^- in eccesso competono con le proteine cariche positivamente per legare l'acqua disponibile, provocando la desolvatazione e la precipitazione delle proteine (Albarracín et al., 2010).

2.6.3 Inibizione dell'attività enzimatica

Durante la salagione il muscolo del pesce va incontro a una serie di modificazioni a carico delle proteine miofibrillari e di alcune frazioni di collagene ad opera di enzimi proteolitici endogeni, che conferiscono al prodotto finito il sapore, l'aroma e la consistenza caratteristici. Studi recenti hanno attribuito questo ruolo alle catepsine e alle peptidasi; in particolare, le peptidasi presenti nelle appendici piloriche sarebbero le più attive.

Si pensa che il cloruro di sodio sia in grado di inattivare tali enzimi, soprattutto le catepsine, che avrebbero quindi efficacia solo nelle prime fasi della salagione, quando il sale non è ancora penetrato in profondità (Arcangeli et al., 2003).

2.6.4 Influenza sull'ossidazione lipidica

Alcuni studi hanno attribuito al NaCl un'azione pro-ossidante: infatti sarebbe in grado di aumentare la concentrazione di ioni ferro liberi, che entrando a contatto con la frazione lipidica ne favorirebbero l'ossidazione, con il conseguente sviluppo di *off flavours* e la perdita di valore nutrizionale (Albarracín et al., 2010).

Capitolo 3: I CAMPI ELETRICI PULSATI (PEF)

3.1 Tecnologie innovative nel settore ittico

Recenti indagini sulle scelte d'acquisto dei consumatori hanno evidenziato una preferenza crescente per i *minimally processed foods*: prodotti trasformati di elevata qualità, microbiologicamente sicuri, che abbiano caratteristiche sensoriali desiderabili e un profilo nutrizionale ottimale (Erkmen & Bozoglu, 2016).

Si tratta di una sfida particolarmente difficile per il settore ittico, poiché il pesce è una materia prima estremamente deperibile, soggetta a fenomeni degradativi autolitici e di origine microbica che iniziano subito dopo la cattura (Ravishankar, 2016).

La strategia di conservazione perseguita dalla maggior parte delle aziende, definita *hurdle technology*, è basata sull'applicazione di una serie di fattori (*hurdles*), singolarmente insufficienti a ostacolare lo sviluppo microbico, ma che combinati sono in grado di preservare la qualità ed estendere la *shelf-life* del prodotto. Gli *hurdles* più tradizionali (temperatura, a_w , pH, NaCl, antimicrobici) sono stati recentemente affiancati da tecnologie innovative, note come *mild technologies*, in grado di fornire prodotti di elevata qualità sensoriale e nutrizionale inducendo minime modificazioni nella materia prima, senza l'utilizzo del calore e di conservanti chimici (Tsironi et al., 2020).

Ad oggi, le tecnologie *mild* più diffuse nel settore ittico sono le alte pressioni idrostatiche (HPP), le radiazioni ionizzanti, i campi elettrici pulsati (PEF), le microonde, le onde radio, gli ultrasuoni, la luce pulsata e il plasma freddo (Ravishankar, 2016; Zhao et al., 2019). Queste sono spesso combinate a strategie di packaging innovative, come l'atmosfera modificata (MAP) e il packaging attivo e intelligente, in grado di prolungare la *shelf-life* del prodotto (Ravishankar, 2016).

3.2 I campi elettrici pulsati (PEF)

Tra le tecnologie innovative non termiche per il trattamento degli alimenti, l'impiego dei campi elettrici pulsati è considerata una delle più promettenti.

I consumi energetici ridotti, la possibilità di operare in continuo, la rapidità del processo e l'assenza di prodotti di scarto rendono il PEF una tecnologia innovativa, efficiente e sostenibile, che promette interessanti risultati sia nel trattamento di alimenti e bevande, sia nelle biotecnologie e nell'industria farmaceutica (Gomez et al., 2019).

Il trattamento è basato sull'applicazione di impulsi elettrici ad alta intensità e di breve durata a una matrice animale o vegetale o a una sospensione microbica posta tra due elettrodi.

Questi inducono la formazione di pori nella membrana cellulare, con conseguente aumento della sua permeabilità a ioni e molecole. La vitalità delle cellule trattate dipende dall'intensità del trattamento (voltaggio, durata dell'impulso e del trattamento) e dalle caratteristiche della cellula stessa (dimensioni, forma e orientazione rispetto al campo elettrico): impulsi di intensità compresa tra 0.5 e 1.5 kV/cm inducono modificazioni reversibili, tra 1.0 e 3.0 kV/cm provocano danni irreversibili e tra 15 e 40 kV/cm conducono la cellula alla morte.

In ambito alimentare in genere sono applicati voltaggi tali da garantire l'elettroporazione irreversibile delle membrane, con il duplice scopo di inattivare i microrganismi e aumentare l'efficacia di vari processi (essiccamento, disidratazione osmotica, congelamento e scongelamento, estrazione, ecc.), accelerando la trasmissione del calore e il trasferimento di massa di numerosi composti (Raso et al., 2016).

3.3 Componenti dell'impianto

Un impianto PEF è composto da 4 elementi principali (Figura 3.1) (Gomez et al., 2019):

- generatore di corrente ad alta tensione;
- modulatore di impulsi: consente di applicare una corrente alternata;
- camera di trattamento per il contenimento del prodotto: la tipologia più semplice è di forma rettangolare, di materiale isolante, dotata di due elettrodi alle estremità;
- dispositivo per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

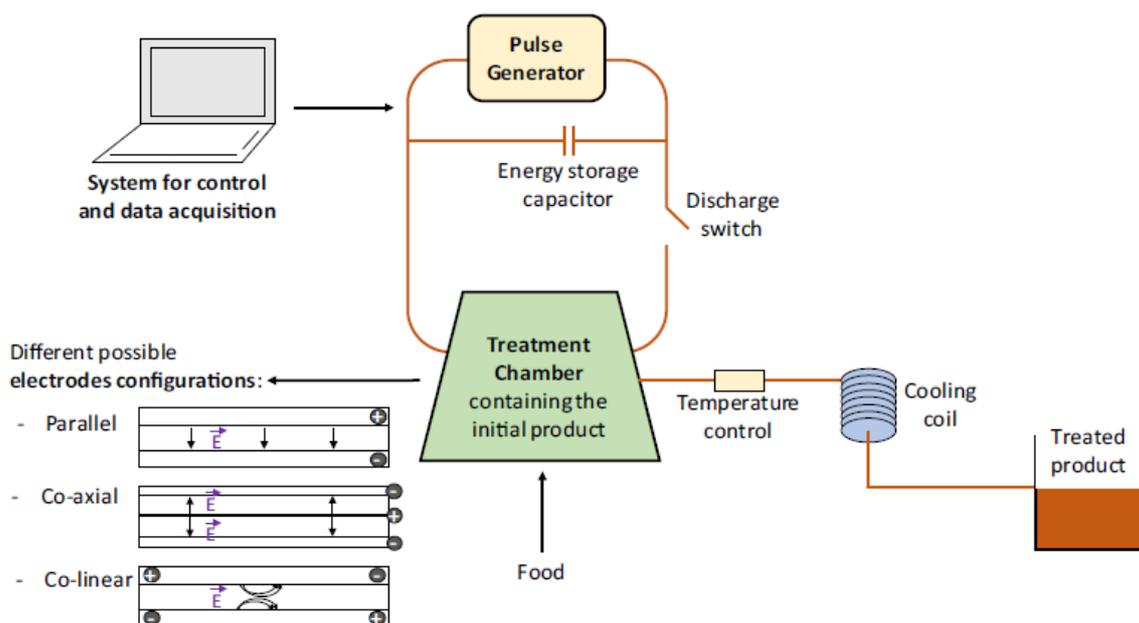


Figura 3.1 - Componenti dell'impianto di trattamento PEF (Gomez et al., 2019).

3.4 Parametri operativi

I parametri fondamentali che caratterizzano un trattamento PEF sono i seguenti (Raso et al., 2016):

- differenza di potenziale elettrico (U_0), [V];
- intensità del campo elettrico (E), [V/cm];
- tempo di trattamento (t), [s];
- forma dell'impulso;
- ampiezza degli impulsi (τ), [μ s o ms];
- numero di impulsi (n);
- energia specifica dell'impulso (W), [kJ/kg];
- frequenza di ripetizione degli impulsi (f), [Hz].

L'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento sono i principali fattori che determinano l'entità del processo.

Nell'Equazione 1, il parametro indicato con E rappresenta la forza del campo elettrico presente nella camera di trattamento e dipende dal voltaggio applicato, dalla geometria della camera e dalla distribuzione spaziale delle proprietà dielettriche del materiale posto tra gli elettrodi (Figura 3.2).

In una camera di trattamento a elettrodi paralleli si crea un campo elettrico omogeneo, perpendicolare alla superficie del prodotto, la cui intensità è ottenuta dividendo il voltaggio, U [kV] per la distanza tra gli elettrodi, L [cm]:

$$E = \frac{U}{L} \quad \text{(Eq. 1)}$$

Il tempo di trattamento (Eq. 2) può essere stimato moltiplicando il numero di impulsi, n per l'ampiezza dell'impulso, τ [μ s o ms], che dipende dalla forma dell'impulso:

$$t = n \cdot \tau \quad \text{(Eq. 2)}$$

In genere, gli impulsi possono essere di forma esponenziale o quadrata, unipolari o bipolari (Figura 3.3).

Il voltaggio e la forma degli impulsi inviati alla camera di trattamento devono essere continuamente monitorati tramite strumenti collocati il più possibile vicino alla camera, per definire con precisione l'entità del trattamento. In genere sono utilizzati degli oscilloscopi collegati alla camera di trattamento e al dispositivo di acquisizione, in grado di delineare con precisione la forma dell'onda.

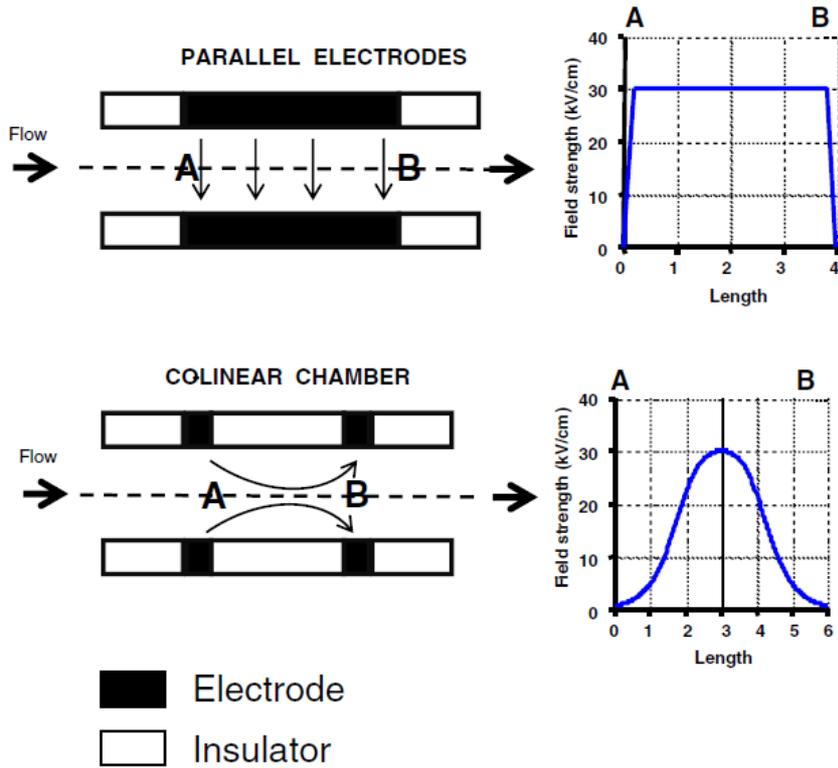


Figura 3.2 - Schema di una camera di trattamento a elettrodi paralleli (in alto) e co-lineare (in basso) e relativa distribuzione dell'intensità di campo elettrico nella zona di trattamento (Raso et al., 2016).

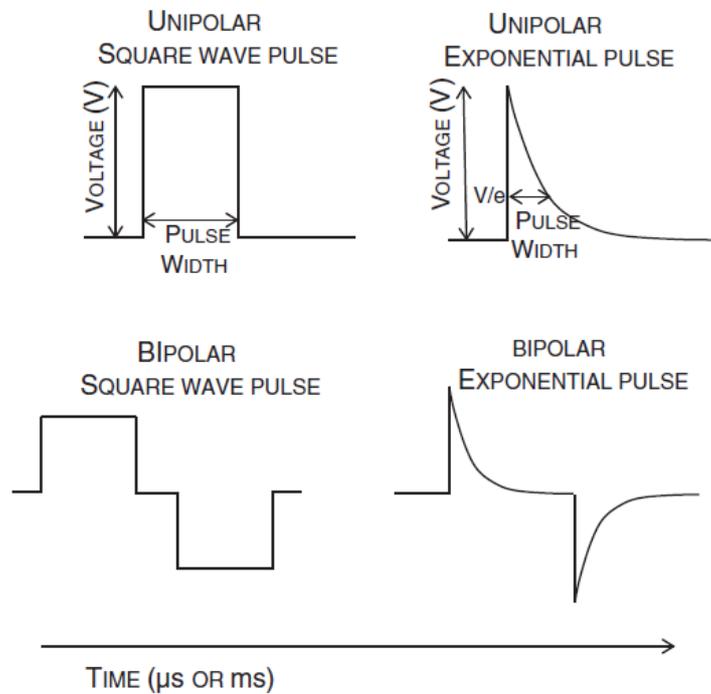


Figura 3.3 - Forma degli impulsi comunemente applicati in un trattamento PEF (Raso et al., 2016).

L'ampiezza o durata di un impulso ad onda quadra è il tempo in cui il voltaggio assume il suo livello massimo. Per gli impulsi di forma esponenziale, rappresenta il tempo necessario a ridurre il voltaggio al 37% del suo valore massimo.

La frequenza (f) indica il numero di impulsi nell'unità di tempo ed è misurata in Hz. È un parametro di fondamentale importanza, in quanto legato all'aumento di temperatura per effetto Joule e all'entità di inevitabili reazioni elettrochimiche all'interfaccia liquido-elettrodi, che possono provocare la migrazione di metalli nella matrice alimentare.

L'energia specifica dell'impulso (W) è la quantità di energia elettrica ricevuta dall'alimento durante il singolo impulso: è legata alle proprietà elettriche del prodotto e alle caratteristiche dell'impulso (forma, voltaggio e ampiezza).

L'energia specifica totale (W_T) si ottiene (Eq. 3) moltiplicando l'energia specifica dell'impulso per il numero di impulsi:

$$W_T = W \cdot n \quad (\text{Eq. 3})$$

Tale parametro è correlato al consumo energetico, perciò può essere sfruttato per stimare i costi operativi e confrontare l'efficienza di diverse condizioni di processo, oppure per valutare l'impatto ambientale del PEF rispetto a quello delle tecnologie tradizionali (Gomez et al., 2019).

Anche la temperatura può influenzare l'efficacia del trattamento. Numerosi studi evidenziano un incremento dell'inattivazione microbica all'aumentare della temperatura di trattamento, dovuto a una maggiore fluidità delle membrane che risultano meno resistenti all'elettroporazione (Barba et al., 2017). Inoltre, la dissipazione di una parte dell'energia elettrica per effetto Joule provoca un aumento inevitabile della temperatura del prodotto, con conseguente riduzione dell'intensità del campo elettrico. Per questo motivo, alcune camere di trattamento sono dotate di sistemi di raffreddamento degli elettrodi (Raso et al., 2016).

3.5 Fenomeni chimico-fisici

L'applicazione dei campi elettrici pulsati su un materiale biologico provoca una serie di modificazioni strutturali nelle membrane cellulari, reversibili o meno, riconducibili al fenomeno dell'elettroporazione. Sono state proposte diverse teorie per spiegare nel dettaglio tale processo, una delle quali ha individuato quattro stadi principali (Saulis, 2010):

1. Aumento del potenziale transmembrana
2. Inizio della formazione di pori
3. Evoluzione del numero e della dimensione dei pori

4. Fenomeni conseguenti al trattamento

3.5.1 Aumento del potenziale transmembrana

L'applicazione di un campo elettrico esterno induce l'accumulo di cariche di segno opposto sui due lati della membrana cellulare, provocando l'aumento del potenziale di membrana (u_m) (Figura 3.4). Il superamento di un valore critico di u_m , variabile in base alla forma e alle dimensioni della cellula, alla struttura del tessuto o alla concentrazione della sospensione cellulare, dà l'avvio alla formazione di pori (Barba et al., 2015; Gomez et al., 2019).

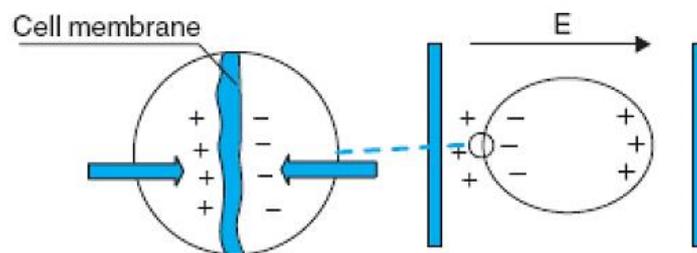


Figura 3.4 - Accumulo di cariche di segno opposto sui due lati della membrana per effetto di un campo elettrico esterno (Klonowski et al., 2006).

3.5.2 Inizio della formazione di pori

La comparsa di piccoli pori idrofilici nella membrana può essere dovuta all'allargamento di pori già esistenti o alla formazione di nuovi canali. Questi possono essere temporanei o irreversibili, in base all'intensità del trattamento applicato, e provocano un incremento della permeabilità della membrana a ioni e molecole (Gomez et al., 2019).

3.5.3 Evoluzione del numero e della dimensione dei pori

Nel corso del trattamento, il numero e la dimensione dei pori cambiano: poiché permettono di stimare l'efficacia di un trattamento, sono stati sviluppati diversi modelli in grado di prevedere l'evoluzione di questi parametri in funzione del tempo (Krassowska & Filev, 2007). Alcuni studi suggeriscono che impulsi di ampiezza maggiore provocano un aumento del numero e delle dimensioni dei pori (Saulis et al., 2007; Gowrishankar et al., 2006).

3.5.4 Fenomeni conseguenti al trattamento

Una cellula trattata può andare incontro a destini diversi, in base all'entità del processo (legata a fattori quali intensità del campo elettrico e tempo di trattamento), alle caratteristiche intrinseche della cellula (stato fisiologico, resistenza intrinseca del ceppo), alla temperatura e alle caratteristiche del mezzo (Figura 3.5) (Gomez et al., 2019).

Trattamenti subletali possono permettere alla cellula di riparare i danni subiti. La chiusura dei pori avviene in due fasi: nella prima fase le dimensioni dei pori diminuiscono rapidamente, mentre nella seconda, più lunga, si richiudono completamente. La temperatura influenza significativamente le capacità di recupero della cellula: un incremento moderato (30-37°C) facilita la chiusura dei pori, mentre basse temperature (4-10°C) stabilizzano i pori e aumentano le probabilità di morte.

Se risulta irreversibile, l'elettroporazione compromette la funzionalità della membrana, provoca la fuoriuscita di materiale cellulare o l'ingresso di molecole estranee e conduce la cellula alla morte (Saulis, 2010).

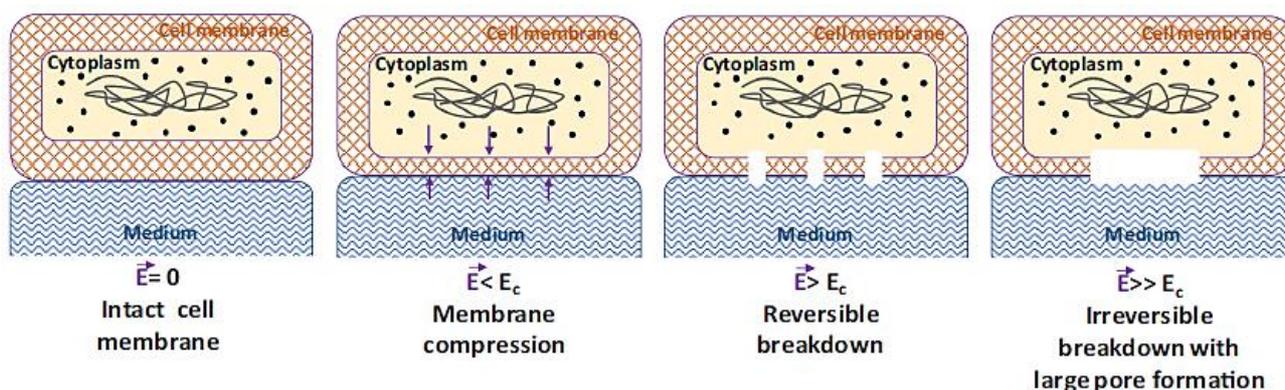


Figura 3.5 - Rappresentazione schematica dell'elettroporazione, reversibile o irreversibile, della membrana di una cellula sottoposta ai campi elettrici pulsati. E_c è il valore critico del campo elettrico (Gomez et al., 2019).

3.6 Applicazioni dei campi elettrici pulsati alle tecnologie alimentari

Il principale effetto dell'applicazione del PEF ai materiali biologici è la distruzione della membrana cellulare, che rappresenta l'interfaccia della cellula con l'ambiente esterno e svolge un ruolo fondamentale in numerose attività metaboliche, come la sintesi di DNA, RNA, proteine ed altri componenti cellulari (Ravishankar, 2016).

In ambito alimentare, sono oggetto di studio due applicazioni principali (Gomez et al., 2019):

a) la disintegrazione di tessuti animali e vegetali e conseguente aumento della permeabilità di membrana;

b) l'inattivazione microbica.

3.6.1 Combinazione del PEF a trattamenti convenzionali

La capacità di disintegrare i tessuti suggerisce l'impiego del PEF come trattamento preliminare a quei processi che richiedono un trasferimento di massa, quali estrazione per pressione o tramite solventi, diffusione, disidratazione e congelamento, allo scopo di aumentare le rese e ridurre i tempi di lavorazione (Raso et al., 2016).

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia dei campi elettrici pulsati nel trattamento di diverse matrici vegetali: ne sono esempi l'estrazione di saccarosio dalla barbabietola (Lopez et al., 2009); l'estrazione di polifenoli dalle foglie di tè (Zderic et al., 2013); l'essiccamento di barbabietole rosse (Shynkaryk et al., 2008); il congelamento di patate, fagioli verdi, spinaci e cipolle (Ben Ammar et al., 2010).

Se applicato a una matrice carnea, il PEF sarebbe in grado di migliorare l'assorbimento di sale, spezie e nitriti durante la stagionatura, riducendo la durata del processo e la quantità di ingredienti utilizzati (McDonnell et al., 2014). Altrettanto positivo risulta l'impatto sulla texture, parametro di fondamentale importanza per la qualità sensoriale e l'accettabilità dei prodotti carnei. Infatti, l'applicazione dei campi elettrici pulsati prima della stagionatura può favorire l'intenerimento della struttura muscolare e accelerare la proteolisi delle proteine miofibrillari (Gomez et al., 2019).

3.6.2 Inattivazione microbica

L'effetto letale del PEF sulle cellule microbiche è dovuto all'azione sinergica degli impulsi, che disintegrano fisicamente la membrana, con il calore sviluppato per effetto Joule, che aumenta la fluidità della membrana e la rende più sensibile al trattamento (Barba et al., 2017).

L'efficacia battericida dipende dalle condizioni di processo (intensità del campo elettrico e tempo di trattamento), dalle caratteristiche della cellula (stato fisiologico, resistenza intrinseca del ceppo, condizioni colturali precedenti), dalla temperatura e dalle caratteristiche del mezzo (Barba et al., 2015). Alcuni studi mostrano che i microrganismi in fase di crescita esponenziale sono più sensibili degli stessi durante la fase stazionaria, probabilmente a causa delle maggiori dimensioni delle cellule in fase log o all'espressione di geni di risposta allo stress nella fase successiva (Saldaña et al., 2009). La possibilità di disattivare cellule microbiche è stata sfruttata nella "pastorizzazione a freddo" di numerosi alimenti liquidi o semisolidi, come succhi di frutta (Timmermans et al., 2019), latte e prodotti lattiero caseari (Buckow et al., 2014), uova (Yogesh et al., 2016) e bevande alcoliche (Yang et al., 2016). In particolare, i risultati sperimentali confermano il PEF come valida alternativa alla

tradizionale pastorizzazione termica di succhi vegetali, dove minimizza i cambiamenti fisico-chimici della materia prima e preserva la biodisponibilità dei composti bioattivi, garantendo allo stesso tempo una decontaminazione efficace (Gabric et al., 2018).

3.7 Il PEF nel settore ittico

Nonostante la crescente diffusione del PEF nel trattamento degli alimenti, sono ancora scarsi gli studi sulle possibilità di applicazione al settore ittico.

Alcune pubblicazioni hanno mostrato come l'applicazione dei campi elettrici pulsati sul tessuto di un pesce induca una serie di cambiamenti fisico-chimici, microstrutturali e sensoriali che hanno interessanti implicazioni per l'attitudine tecnologica ai processi di cottura, conservazione, stagionatura ed estrazione.

Diverse specie di pesci demersali del genere *Gadus* sono state trattate con campi elettrici pulsati di intensità pari a 2 kV/cm: l'analisi microscopica ha rivelato che i campioni trattati presentavano una struttura più porosa rispetto al campione di controllo (Figure 3.6 e 3.7); sottoposti a cottura, gli stessi hanno rilasciato una minore quantità d'acqua. Questo mette in luce la capacità del PEF di aumentare la water holding capacity, in quanto una struttura più porosa permette di trattenere una maggiore quantità d'acqua per capillarità e di ridurre le perdite in cottura, con impatto positivo sulla texture del prodotto (Klonowski et al., 2006).

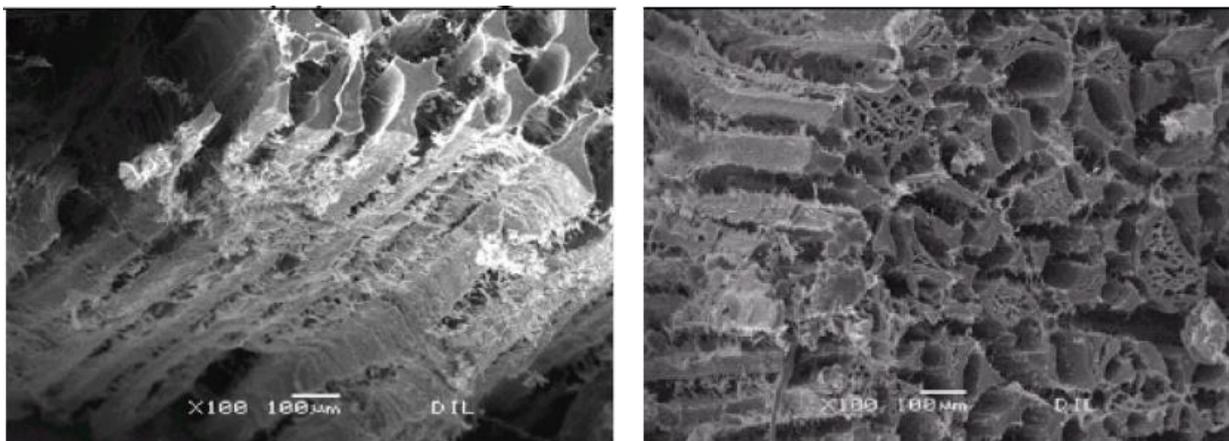


Figura 3.6 e 3.7 - Sezione longitudinale di campioni di merluzzo iniettati con salamoia prima (a sinistra) e dopo (a destra) il trattamento con PEF (Klonowski et al., 2006).

Altri studi più recenti hanno evidenziato un effetto significativo del PEF sul trasferimento di massa nei processi di diffusione.

Ad esempio, Semenoglou et al. (2020) hanno indagato l'effetto combinato della disidratazione osmotica (in soluzioni di NaCl al 5% e glicerolo a diverse concentrazioni) e del pre-trattamento con PEF (1.6 kV/cm) su filetti di branzino. I risultati hanno mostrato un aumento significativo dei coefficienti di diffusione relativi alla perdita d'acqua e all'ingresso di solidi nei campioni pre-trattati. Un ulteriore studio su filetti di branzino, sottoposti a pre-trattamento con PEF a diverse intensità (0.3 e 0.6 kV/cm) e successivamente immersi in salamoia per 8 giorni, ha riscontrato la riduzione del tempo necessario alla penetrazione del sale e un aumento della percentuale di NaCl assorbito, rispetto ai campioni di controllo. Questi risultati suggeriscono l'impiego del PEF come trattamento preliminare alla salagione, per la sua capacità di accelerare la diffusione del sale e favorirne la distribuzione omogenea nel muscolo (Cropotova et al., 2021^a).

È stato inoltre valutato l'impatto del PEF sull'ossidazione di lipidi e proteine, fenomeno che può ridurre l'elevato valore nutrizionale di un prodotto ittico. Alcuni campioni di branzino trattati alle intensità di 0.3 e 0.6 kV/cm hanno mostrato un aumento significativo dei prodotti primari (perossidi) e secondari (TBARS) dell'ossidazione lipidica rispetto al controllo, poiché il danneggiamento della membrana espone maggiormente i fosfolipidi agli agenti pro-ossidanti (enzimi, ferro libero, emoproteine). Per lo stesso fenomeno, è stata riscontrata una maggiore concentrazione delle basi di Schiff e dei composti carbonilici generati dall'ossidazione delle proteine (Cropotova et al., 2021^b).

Pertanto, nel definire le condizioni operative è indispensabile trovare un compromesso tra i vantaggi tecnologici perseguibili e il possibile impatto negativo sul profilo nutrizionale dell'alimento.

Al momento, i campi elettrici pulsati non sono applicati alla decontaminazione microbica dei prodotti ittici. Poiché il muscolo del pesce presenta una struttura più delicata rispetto ad altre matrici animali e vegetali, deve necessariamente essere trattato ad intensità di campo inferiori a 10 kV/cm, alle quali l'azione battericida non è efficace (Guerrero-Beltran & Welti-Chanes, 2016).

È possibile impiegare trattamenti di maggiore intensità (intorno a 20 kV/cm) per l'estrazione di composti di interesse e la valorizzazione di sottoprodotti dell'industria.

Ad esempio, il PEF è stato applicato all'estrazione di proteine dai mitili (Zhou et al., 2017); all'estrazione di calcio, collagene e solfato di condroitina (un integratore alimentare efficace contro l'osteoartite) dalle lische di pesce (He et al., 2017) e all'estrazione di proteine con proprietà emulsionanti da viscere di abalone (Li et al., 2016). In ciascun caso, il pre-trattamento con PEF ha permesso di aumentare le rese e ridurre i tempi e i costi operativi, rispetto ai metodi estrattivi tradizionali.

In conclusione, i vantaggi del PEF rispetto ai trattamenti convenzionali possono essere così riassunti:

- aumento del trasferimento di massa
- miglioramento delle rese di estrazione
- riduzione dei tempi di lavorazione
- riduzione dell'entità dei parametri di estrazione convenzionali (es. tempo e temperatura, concentrazione di solventi)
- ridotta degradazione dei composti termolabili (es. vitamine, aromi, pigmenti, proteine...)
- costi energetici ridotti e minore impatto ambientale
- possibilità di combinazione con altri trattamenti (Barba et al., 2015).

A fronte di questi vantaggi, alcune criticità limitano tuttora la diffusione dei campi elettrici pulsati nell'industria alimentare, prima fra tutte la necessità di elevati investimenti per l'acquisto degli impianti (Gomez et al., 2019).

Nonostante il PEF sia ritenuto una tecnologia non termica, va comunque valutato il modesto ma inevitabile incremento di temperatura per effetto Joule, che potrebbe avere impatto sulla composizione, l'aspetto e il profilo nutrizionale dell'alimento (Barba et al., 2015).

Inoltre, l'utilizzo del PEF dovrebbe essere ristretto ad alimenti caratterizzati da una bassa conducibilità, per evitare un eccessivo aumento di temperatura dovuto al riscaldamento ohmico, ed omogenei, per prevenire discontinuità nel trattamento (Chauhan & Unni, 2015).

Infine, nonostante la capacità di disattivare le forme vegetative di molti microrganismi, non è stata dimostrata l'efficacia del PEF sulla disattivazione di spore, che rappresentano un problema in molti alimenti trattati termicamente e confezionati in assenza di ossigeno.

Alla luce degli esempi forniti, i campi elettrici pulsati possiedono enormi potenzialità applicative nel settore alimentare; indubbiamente sono necessari ulteriori studi per l'ottimizzazione delle condizioni di processo, in funzione delle caratteristiche della matrice da trattare e dell'obiettivo tecnologico perseguito (Gomez et al., 2019).

Capitolo 4: MATERIALI E METODI

4.1 Materie prime

La sperimentazione è stata condotta su esemplari di branzino (*Dicentrarchus labrax*) allevati dall'azienda Galaxidi Marine Farm S.A. (Galaxidi, Grecia), sfilettati e spellati presso l'azienda Economia del Mare (Cesenatico, Italia). I filetti sono stati disposti in contenitori di polistirene, ricoperti di ghiaccio frantumato dopo posizionamento di un film plastico, e trasferiti presso il CIRI Agroalimentare di Cesena, dove sono stati stoccati a $3 \pm 1^\circ\text{C}$ fino alla preparazione dei campioni.

4.2 Preparazione dei campioni

Da ciascun filetto sono stati ricavati manualmente campioni di forma quadrangolare, di dimensioni 2×2 cm e peso 5 ± 1 g. In totale sono stati ottenuti 85 campioni (Figura 4.1).

Tutte le analisi sono state realizzate in cinque repliche.



Figura 4.1 – Preparazione dei campioni.

4.3 Pretrattamento con PEF

Il pretrattamento è stato eseguito in un impianto PEF su scala pilota (Mod. S-P7500, Alintel, Italia) (Figura 4.2). Il generatore utilizzato è in grado di fornire impulsi monopolari di forma rettangolare,

modulabili in termini di ampiezza (5 – 20 μ s), frequenza (20 – 500 Hz) e durata del trattamento (1 – 600 s).

La camera di trattamento (50 x 50 x 50 mm) è costituita da elettrodi paralleli di acciaio inossidabile, spessi 3 mm e distanti tra loro 50 mm (Figura 4.3).

I valori di output di voltaggio (V) e amperaggio (A) sono stati monitorati mediante un oscilloscopio (Picoscope 2204a, Pico Technology, UK) collegato al generatore e al PC. I dati sono stati acquisiti ed elaborati attraverso il software Picoscope v.6.

La camera è stata riempita con acqua di rubinetto a 20°C avente conduttività di 471 μ S/cm.

I trattamenti sono stati condotti a temperatura ambiente, a tre diverse intensità di campo: 0.3 kV/cm, 0.9 kV/cm e 1.5 kV/cm, ottenute impostando dei valori di amperaggio rispettivamente di 7, 12 e 20 A. In ogni prova sono stati mantenuti costanti la frequenza (100 Hz), l'ampiezza dell'impulso (10 μ s) ed il tempo di trattamento (10 s). Sono state effettuate 20 repliche per ogni intensità di trattamento. 20 campioni, denominati “controllo”, non hanno subito alcun trattamento.

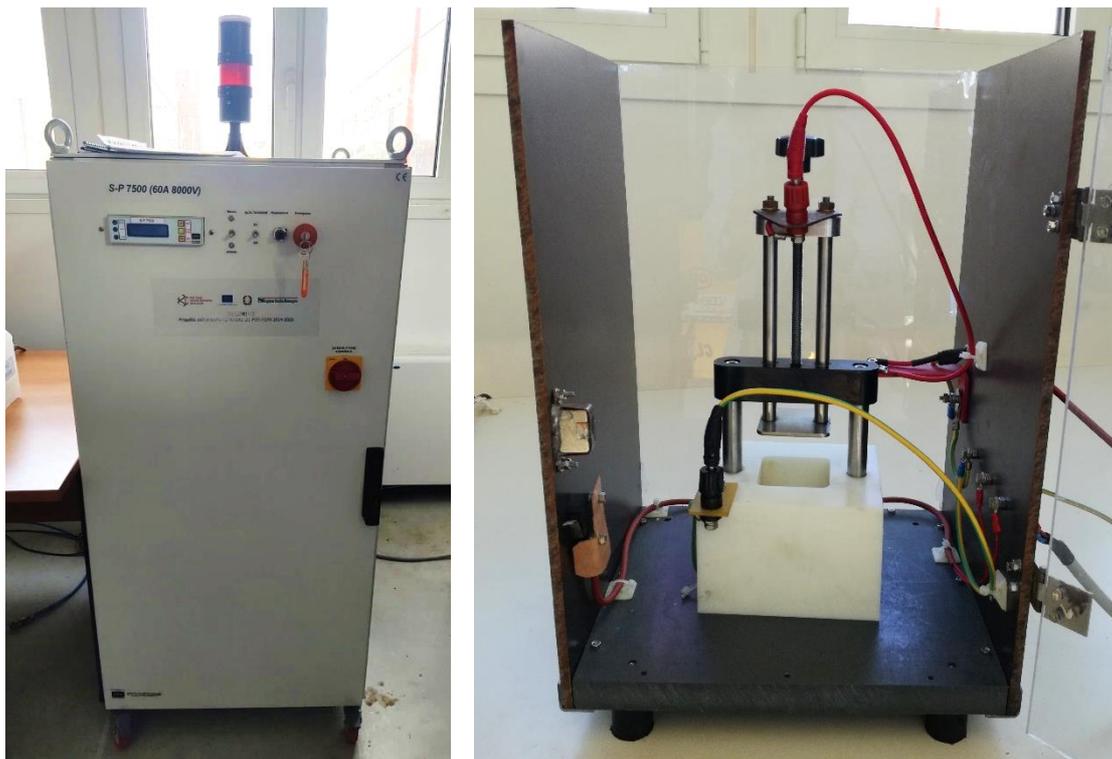


Figura 4.2 e 4.3 – Impianto pilota per il trattamento con PEF: generatore di impulsi (a sinistra) e camera di trattamento (a destra).

4.4 Processo di salamoiatatura

Ciascun campione è stato pesato con una bilancia analitica e posto singolarmente in una ciotolina di alluminio contenente la soluzione di NaCl al 10% p/v, in quantità tale da mantenere un rapporto campione:salamoia di 1:10.

Ciascuna ciotolina è stata sigillata con un foglio di alluminio e siglata con un numero da 1 a 20, seguito dall'intensità del trattamento subito: controllo, 0.3, 0.9 e 1.5 kV.

I campioni sono stati conservati in cella a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ e sottoposti a diverse determinazioni analitiche a distanza di 24, 96, 144 e 192 ore dall'immersione in salamoia.

Il piano sperimentale è illustrato in Figura 4.4.

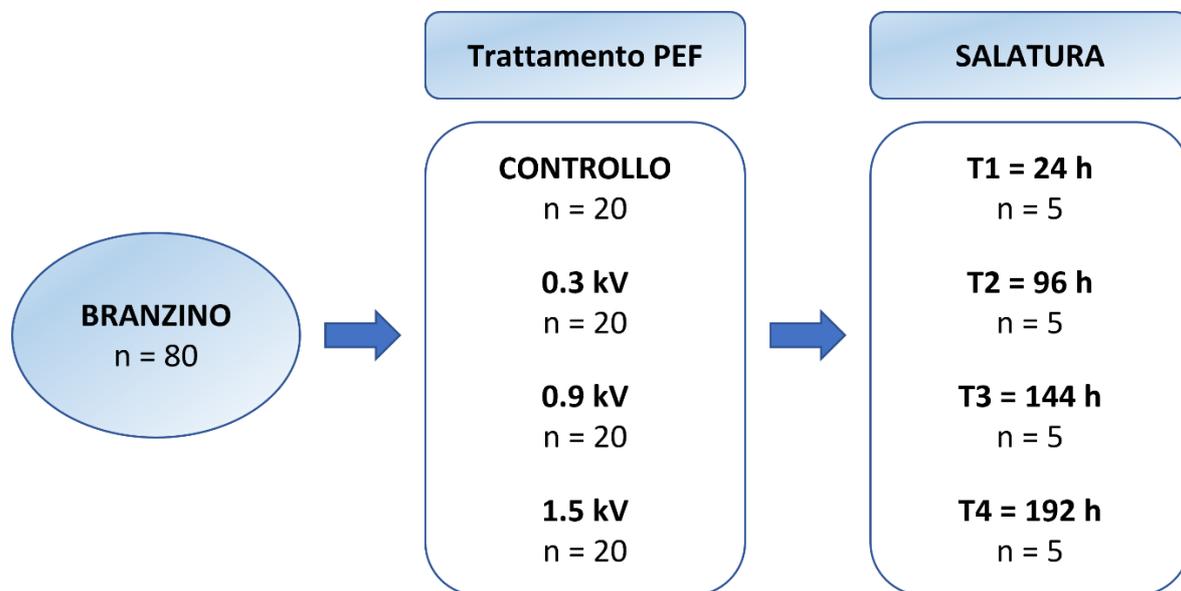


Figura 4.4 – Piano sperimentale.

4.5 Determinazioni analitiche

4.5.1 Peso

Dopo averlo asciugato superficialmente con della carta assorbente, ciascun campione è stato pesato tramite bilancia analitica prima dell'immersione in salamoia; successivamente la misurazione è stata ripetuta a distanza di 24, 96, 144 e 192 ore dalla prima pesata.

4.5.2 Sostanza secca

La sostanza secca è stata determinata con metodo gravimetrico. Dopo aver assorbito l'umidità superficiale con della carta, sono stati pesati circa 2 g di ciascun campione in ciotoline di alluminio mediante una bilancia analitica.

I campioni di branzino sono stati trasferiti in stufa a 70°C per almeno 48h, fino al raggiungimento di peso costante. Il contenuto in sostanza secca è stato espresso in g campione secco/g campione fresco (Eq. 4).

$$\text{Sostanza secca} = \frac{\text{Peso campione secco}}{\text{Peso campione fresco}} \quad (\text{Eq. 4})$$

4.5.3 Attività dell'acqua (a_w)

L'attività dell'acqua è stata valutata tramite un analizzatore a punto di rugiada mod. AquaLab (Decagon Devices, USA) (Figura 4.5). Il campione è stato tagliato in pezzi sottili (1-2 mm) e disposto nelle capsule in modo da formare un unico strato sul fondo. Le capsule sono state richiuse per isolare il campione dall'ambiente fino al momento delle analisi, condotte termostatando il campione a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 4.4 - Analizzatore AquaLab a punto di rugiada (Decagon Devices, USA).

4.5.4 Sale

Il contenuto di sale è stato determinato mediante titolazione con AgNO_3 0.1 M e HNO_3 1 M, seguendo il metodo di Mohr (AOAC, 1990). Il pesce è stato tritato manualmente in piccoli pezzi e sono stati pesati 1 ± 0.05 g di ciascun campione in un contenitore di plastica, aggiungendo acqua distillata fino

al volume di 50 mL. Il bicchiere è stato posizionato in un titolatore potenziometrico TitraLab mod. AT1000 (Hach, Colorado, USA) (Figura 4.6).

Il titolatore aggiunge automaticamente 4 mL di HNO_3 1 M (reagente) all'inizio dell'analisi e aliquote di AgNO_3 0.1 M (titolante) durante la titolazione. Al termine dell'analisi è stato inserito il peso reale del campione per ottenere il contenuto in percentuale di NaCl.



Figura 4.6 – *Apparato sperimentale per la determinazione del contenuto di sale.*

4.5.5 Indice di ossidazione lipidica (TBARS)

Il grado di ossidazione lipidica del campione è stato stimato in base alla misura delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS), condotta attraverso il metodo descritto da Bao e Ertbjerg (2015).

In breve, 2.5 g di campione (tritato finemente) sono stati addizionati di 7.5 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 5% p/v e 0.25 mL di soluzione antiossidante di butil-idrossitoluene (BHT) in etanolo al 4.2% p/v. La miscela è stata omogeneizzata in ghiaccio con ultraturrax IKA T25 (IKA Works, Staufen, Germany) per 30 s a 13000 r.p.m., quindi filtrata con carta filtro (Filter-Lab 1300/80) (Figura 4.7). Sono stati prelevati 3 mL di estratto filtrato e posti in una provetta conica insieme a 3 mL di acido tiobarbiturico 0.02 M. I campioni sono stati posti in un bagno d'acqua a 100°C per 40 minuti, raffreddati in ghiaccio e sottoposti a lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 532 nm (Figure 4.8 e 4.9). Per ogni replica la lettura è stata ripetuta tre volte.

È stata costruita una curva di calibrazione utilizzando 8 soluzioni a concentrazione nota di tetrametossipropano (TMP). Dalla relazione tra concentrazione di TMP (mg/mL) e assorbanza della soluzione è stato stimato il contenuto in TBARS dei campioni, espresso in mg TMP/kg campione.

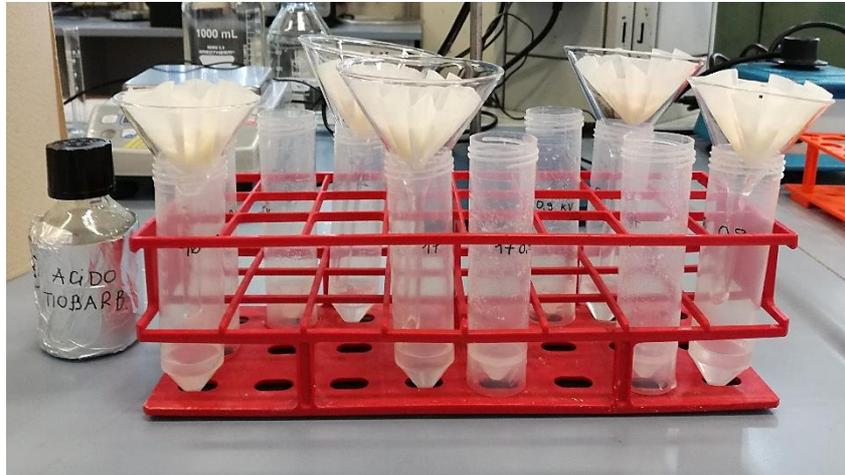


Figura 4.7 – *Filtrazione dei campioni.*

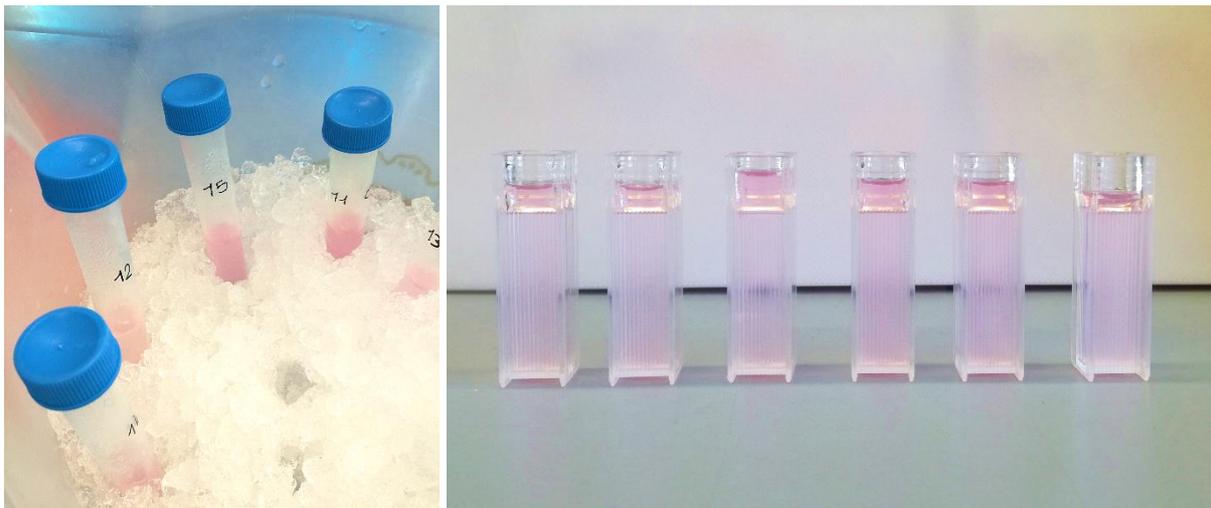


Figura 4.8 – *Raffreddamento in ghiaccio dei campioni.*

Figura 4.9 – *Campioni pronti per la lettura spettrofotometrica.*

4.5.6 Determinazione colorimetrica

Il colore del campione non trattato al tempo zero è stato valutato tramite colorimetro tristimolo (Colorflex EZ, Hunterlab, USA) (Figura 4.10). Sono stati impostati i seguenti parametri di acquisizione: illuminante D65, angolo di osservazione 10°, testa di misura di 19.1 mm di diametro. I dati di colore sono stati espressi nella scala CIE L*,a*,b*. Prima delle analisi, la taratura dello strumento è stata eseguita su due mattonelle standard bianca e nera, fornite dal produttore.



Figura 4.10 - Colorimetro tristimolo (*Colorflex EZ, Hunterlab, USA*).

4.6 Analisi statistiche

Tutti i risultati sono stati espressi come $\text{media} \pm \text{SD}$. La significatività delle differenze tra i dati è stata verificata tramite l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il test di Tukey HSD ($p < 0.05$).

I dati relativi alla cinetica del processo di salamoia sono stati modellati tramite il modello esponenziale di Newton:

$$MR = \frac{m_t - m_\infty}{m_0 - m_\infty} = e^{-kt} \quad \text{(Eq. 5)}$$

Dove MR (mass ratio) è il rapporto di massa, m è il peso del campione e i pedici 0 , t e ∞ rappresentano, rispettivamente, il valore iniziale, il valore al tempo t e all'equilibrio. La costante cinetica del modello di Newton è rappresentata da k , mentre t indica il tempo. Per valutare la bontà del modello ('*goodness of fit*') sono stati calcolati: il coefficiente di determinazione (R^2), la somma degli errori al quadrato (SSE) e la radice dell'errore quadratico medio (RMSE). Valori di R^2 più alti (vicini a 1) e valori di SSE e RMSE più bassi (vicini a 0) indicano che il modello si adatta meglio ai dati sperimentali. L'analisi di regressione è stata eseguita utilizzando Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

Capitolo 5: RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Caratterizzazione

In tabella 5.1 sono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione dei campioni di branzino fresco, prima del trattamento con PEF.

Tabella 5.1 – Caratterizzazione del campione fresco.

a_w	Sostanza secca (g ss/ g f)	Colore		
		L^*	a^*	b^*
0.992 ± 0.001	0.27 ± 0.02	43.2 ± 0.8	-3.5 ± 0.1	1.0 ± 0.8

5.2 Pretrattamento con PEF

Durante il trattamento PEF, l'intensità di corrente e il voltaggio applicato sono stati monitorati in maniera continua tramite un oscilloscopio. La forma dell'impulso così delineata, per ciascuna intensità di trattamento, è riportata nella Figura 5.1.

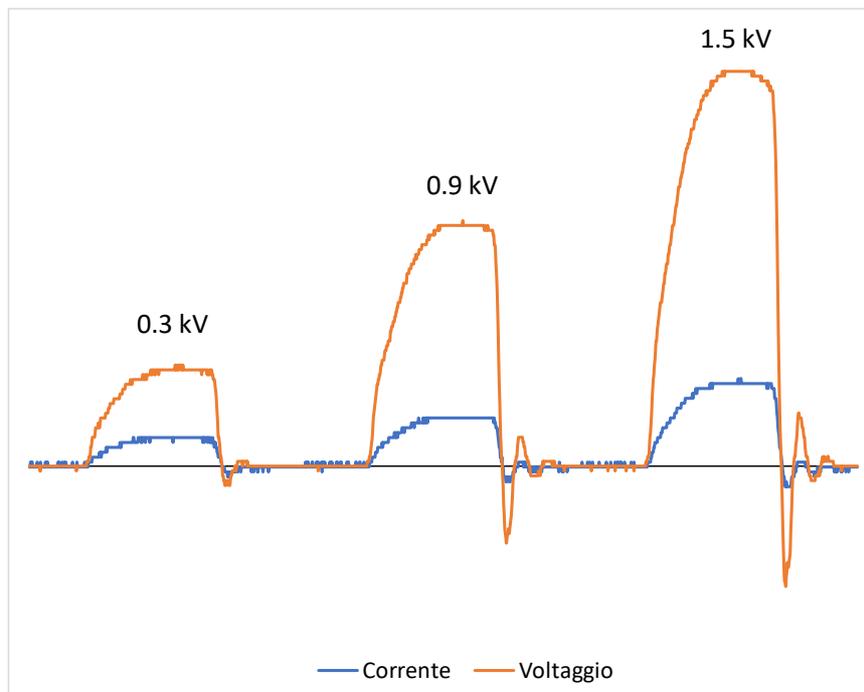


Figura 5.1 – Forma d'onda della corrente e tensione durante il trattamento PEF, come registrato dall'oscilloscopio.

5.3 Processo di salamoiatatura

5.3.1. Evoluzione del contenuto in acqua, a_w e contenuto in sale

Durante un processo di salagione, i principali componenti scambiati tra l'alimento e l'ambiente circostante sono l'acqua e il sale. Nella salagione in salamoia, l'ingresso di NaCl nel tessuto è guidato dal gradiente di concentrazione tra la soluzione ed i liquidi tissutali (Nguyen et al., 2010), ed è accompagnato dall'assorbimento di acqua, con conseguente aumento di peso. L'aumento di peso durante la produzione degli alimenti ittici salati dipende anche dalla capacità delle proteine miofibrillari di trattenere l'acqua all'interno del muscolo (Thorarinsdottir et al., 2011).

La presenza di NaCl nel periodo *post-mortem* può favorire l'assorbimento di acqua nel tessuto: infatti, il sale sembra stimolare l'attività di alcuni enzimi proteolitici endogeni e favorire la degradazione delle proteine strutturali del sarcomero, che in genere si oppongono allo *swelling* delle fibre muscolari. Ulteriori cambiamenti conformazionali indotti dal sale sulla miosina e su alcune frazioni di collagene possono influenzare la solubilità e l'aggregazione di tali proteine, con effetti sulla capacità di legare acqua (Thorarinsdottir et al., 2011).

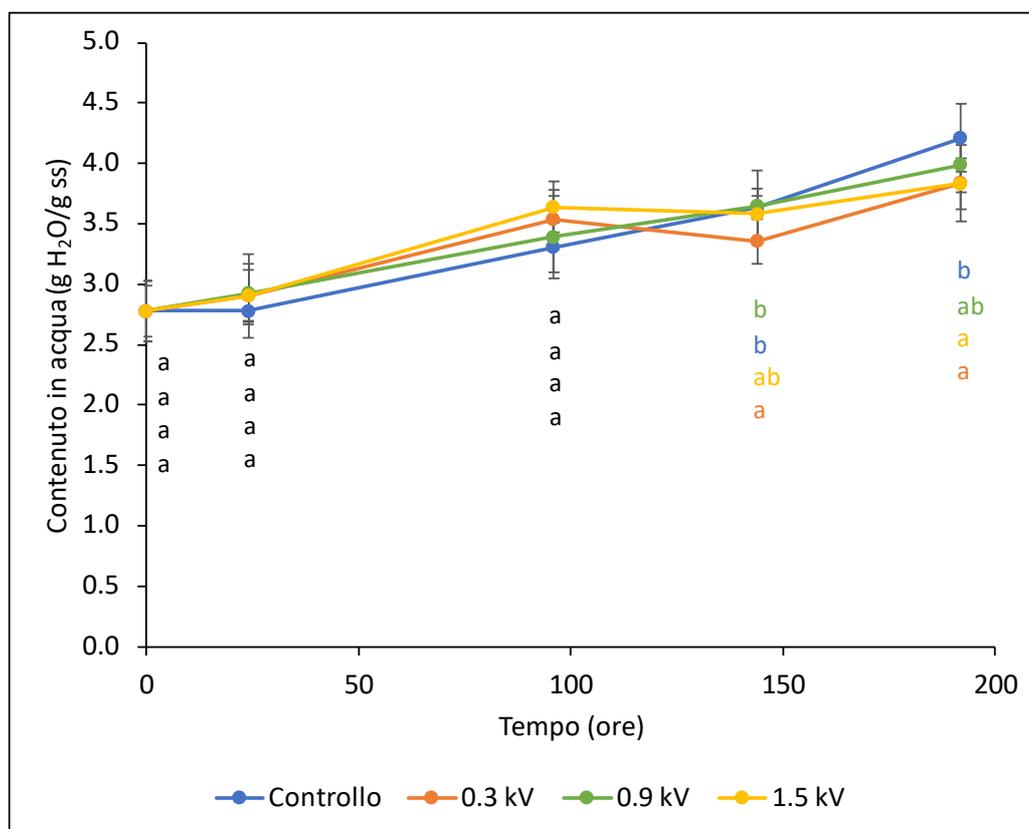


Figura 5.2 - Evoluzione del contenuto di acqua nei campioni durante il processo di salamoiatatura. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) tra i tempi di trattamento.

In Figura 5.2 si può osservare un aumento del contenuto di acqua nei campioni al trascorrere del tempo di salatura. Questo è il risultato del processo diffusivo della salamoia all'interno delle cellule muscolari e della capacità delle proteine miofibrillari di assorbire acqua.

Confrontando i risultati tra i campioni ad ogni tempo di analisi, sono state osservate differenze statisticamente significative tra i campioni dopo 144 e 192 ore di salatura.

D'altra parte, riguardo alla durata del processo di salatura, sono state rilevate differenze significative nel contenuto di acqua tra 0-24, 96-144 e 192 ore.

Questa tendenza conferma quanto osservato da Cropotova et al. (2021^a), che hanno analizzato gli effetti dei campi elettrici pulsati applicati a diverse intensità su campioni di branzino prima dell'immersione in salamoia. Analogamente, è stato osservato un aumento costante del contenuto di umidità dei campioni fino al giorno 5, senza riscontrare differenze significative tra i campioni trattati con PEF e il controllo. Tuttavia, tale studio riporta un crollo netto del contenuto di acqua nei campioni non trattati dopo 192 ore, fenomeno che non è stato osservato nella presente sperimentazione.

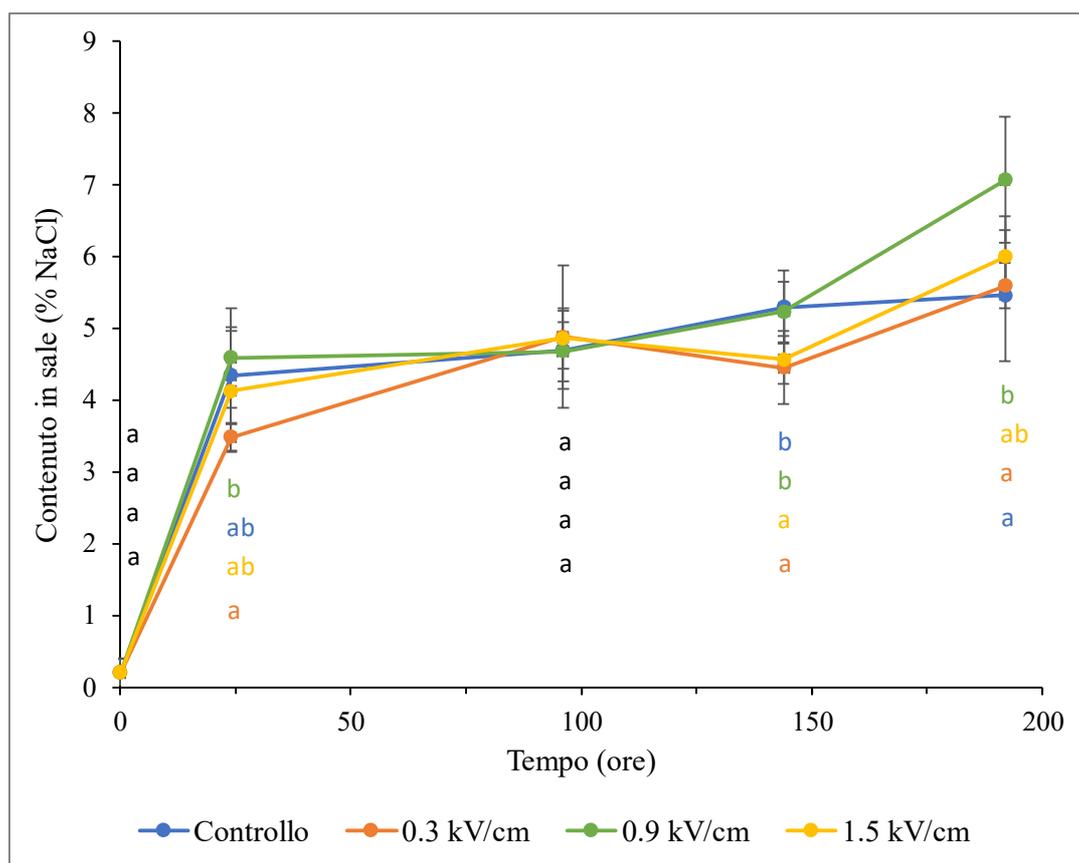


Figura 5.3 – Variazione del contenuto di NaCl nei campioni durante il processo di salamoiatura. Lettere minuscole diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) tra i tempi di trattamento.

Per quanto riguarda il contenuto di sale nei campioni, la Figura 5.3 mostra un aumento della concentrazione di NaCl durante il processo di salatura. Nuovamente, si è rivelato significativo l'effetto del tempo di immersione in salamoia. Inoltre, sono state riscontrate differenze significative tra i campioni trattati e il controllo dopo 144 e 192 ore; è da sottolineare un aumento rilevante della concentrazione di sale nei campioni trattati con PEF a 0.9 kV/cm e immersi in salamoia per 192 ore. Un simile andamento crescente è riportato dalla pubblicazione appena citata (Cropotova et al., 2021^a), che ha tuttavia evidenziato un significativo incremento della concentrazione di sale nei campioni trattati rispetto a quelli non trattati già dopo 2 giorni, suggerendo la possibilità di ridurre la durata del processo di salatura grazie al pretrattamento con PEF.

Infine, in Tabella 5.2 si riporta l'attività dell'acqua dei campioni durante il processo di salamoiatatura.

Tabella 5.2 - a_w dei campioni durante il processo di salamoiatatura.

Tempo (ore)	Controllo	0.3 kV/cm	0.9 kV/cm	1.5 kV/cm
0	0.992 ± 0.001 ^{a,A}	0.992 ± 0.001 ^{a,A}	0.992 ± 0.001 ^{a,A}	0.992 ± 0.001 ^{a,A}
24	0.947 ± 0.001 ^{b,B}	0.945 ± 0.003 ^{b,B}	0.947 ± 0.003 ^{b,B}	0.945 ± 0.003 ^{b,B}
96	0.939 ± 0.001 ^{d,C}	0.939 ± 0.001 ^{d,C}	0.939 ± 0.001 ^{c,C}	0.938 ± 0.001 ^{c,C}
144	0.942 ± 0.001 ^{cd,D}	0.943 ± 0.002 ^{c,D}	0.941 ± 0.002 ^{c,D}	0.939 ± 0.003 ^{c,D}
192	0.942 ± 0.004 ^{c,B}	0.945 ± 0.002 ^{bc,B}	0.945 ± 0.001 ^{b,B}	0.947 ± 0.002 ^{b,B}

Lettere minuscole diverse indicano differenze significative dovute al tempo di salamoia per ogni intensità di trattamento (per colonna). Lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra i gruppi dovute al tempo di salamoia (per riga).

Dal momento che il valore di a_w del pesce refrigerato è strettamente correlato allo sviluppo dei microrganismi degradativi, l'evoluzione di questo parametro è la causa principale della perdita di qualità e della fine della *shelf-life* del prodotto durante la conservazione refrigerata (Sofra et al., 2018).

Dal punto di vista microbiologico, la riduzione dell'attività dell'acqua al di sotto di 0.95 ha un effetto significativo sul tasso di crescita di *Pseudomonas* spp. (Neumeyer et al., 1997), che è il principale microrganismo degradativo del pesce fresco e refrigerato del Mediterraneo (Giuffrida et al., 2013; Tsironi et al., 2009; Tsironi & Taoukis, 2014).

In tutti i campioni, è stato possibile ridurre l'attività dell'acqua al di sotto di 0.95 dopo 24 ore dall'immersione in salamoia.

Analizzando i risultati in funzione del trattamento con PEF e del tempo di salamoia (confronto tra gruppi), non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i campioni di controllo e quelli trattati con PEF né allo stesso tempo di salatura, né tra i campioni dopo 24 e 192 ore.

Un risultato analogo è stato raggiunto da Crobotova et al. (2021^a), che hanno registrato valori di a_w inferiori a 0.95 in tutti i campioni di branzino immersi nella salamoia al 10% di NaCl dopo due giorni di trattamento, senza osservare differenze significative tra i campioni pretrattati con PEF alle diverse intensità e il controllo. Al contrario, la salamoia al 5% di NaCl si è rivelata insufficiente a ridurre l' a_w al di sotto di 0.97 in tutti i campioni.

Questo conferma l'effetto determinante della concentrazione di sale sul parametro a_w , in quanto il cloruro di sodio è in grado di stabilire interazioni ioniche con i fluidi presenti nel muscolo, mentre il trattamento con PEF o la durata del processo di salamoia hanno scarsa influenza sull'attività dell'acqua.

5.3.2 Evoluzione dell'indice di ossidazione lipidica (TBARS)

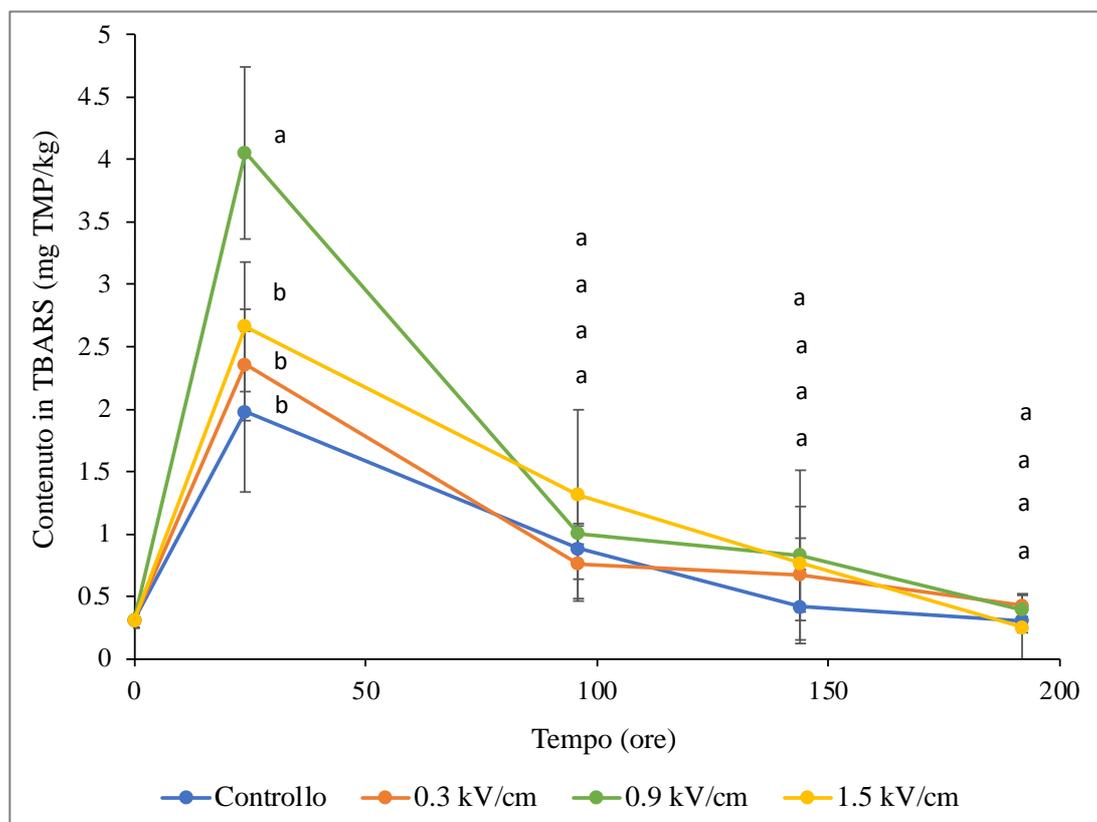


Figura 5.4 – Variazione del contenuto in TBARS nei campioni durante il processo di salamoiatra.

La Figura 5.4 mostra i risultati relativi alla determinazione dei TBARS.

I lipidi altamente insaturi del pesce sono facilmente suscettibili all'ossidazione, che induce alterazioni nella struttura, nel colore e nel valore nutrizionale dell'alimento, a cui conferisce odore e sapore di rancido (Olafsdottir et al., 1997). La quantificazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) rappresenta un valido indicatore della qualità di un prodotto ittico ed è ampiamente effettuata per determinare i prodotti di ossidazione secondari e stimare il grado di ossidazione dei lipidi (Özogul et al., 2011).

Dopo 24 ore dall'immersione in salamoia, è stato osservato un aumento della concentrazione dei TBARS sia nei campioni trattati con PEF sia nel controllo, riportando differenze statisticamente significative solo nel caso del trattamento con PEF a 0.9 kV/cm.

Il trattamento con PEF precedente alla salamoia potrebbe aver compromesso l'integrità della membrana cellulare del muscolo, a causa di danni meccanici indotti dall'elettroporazione sulla struttura del tessuto del pesce, favorendo così l'esposizione a diversi pro-ossidanti (enzimi, ferro, emoproteine, ecc.) e accelerando l'ossidazione dei lipidi. Questa teoria è supportata dallo studio di Kantono et al. (2019), che hanno precedentemente analizzato gli effetti del trattamento con PEF sull'ossidazione dei lipidi nel muscolo di manzo. Questi studiosi hanno ipotizzato che l'ossidazione lipidica nei campioni trattati con PEF fosse associata alla perdita di integrità della membrana cellulare che avrebbe causato la liberazione di pro-ossidanti, con effetti simili al congelamento.

D'altra parte, alcuni studi hanno attribuito ai campi elettrici pulsati un possibile effetto anti-ossidante dovuto all'inattivazione di alcuni enzimi endogeni pro-ossidanti quali lipossigenasi e perossidasi in latte e matrici vegetali (Zhao et al., 2012) e nella soia (Li et al., 2008; Liu et al., 2014).

A sostegno di ciò, Cropotova et al. (2021^b) hanno osservato che un aumento dell'intensità del campo elettrico da 0.3 a 0.6 kV/cm ha provocato la riduzione di diversi indici di ossidazione lipidica (numero di perossidi e indice TBARS) su campioni di branzino trattati con PEF e sottoposti a salamoiatura. Dal confronto con i risultati ottenuti nel presente studio, alcune differenze nella struttura del tessuto potrebbero aver causato le discrepanze osservate.

Anche il processo di salagione può aver influito sull'ossidazione lipidica. Vidal et al. (2015) hanno osservato una riduzione della stabilità ossidativa dei lipidi in filetti di branzino sottoposti a salatura e successivamente a prove di termo-ossidazione accelerata. Il processo di ossidazione è iniziato prima nei campioni salati rispetto ai non salati, inoltre nei primi è stata riscontrata una maggiore concentrazione di composti di ossidazione secondari (aldeidi).

Pertanto, si può ipotizzare un effetto combinato del PEF e del processo di salatura sulla qualità ossidativa dei lipidi presenti nel campione. Senza dubbio, l'equilibrio tra azione pro-ossidante e anti-

ossidante esercitate da tali trattamenti dipende dalla struttura della matrice, dal grado di insaturazione dei lipidi e dalle condizioni di processo applicate.

Nel presente studio, il significativo incremento della concentrazione di TBARS nei campioni trattati a 0.9 kV dopo 24 h, rispetto a quelli sottoposti alle altre intensità di campo elettrico e al controllo nei diversi tempi di prelievo, potrebbe attribuire un ruolo determinante all'intensità di campo applicata, rispetto al tempo di immersione in salamoia.

Ad ogni modo, vale la pena sottolineare che, nonostante il significativo aumento rispetto al campione di controllo, i livelli di TBARS si sono mantenuti sufficientemente bassi, considerando che la qualità di un prodotto ittico può considerarsi accettabile finché il valore di TBARS rimane al di sotto di 8 mg di malonildialdeide / kg (Özogul et al., 2011).

5.3.3 Studio della cinetica del trasferimento di massa

La figura 5.5 mostra la variazione del peso dei campioni durante il processo di salamoia. Come già illustrato nella sezione 5.3.1, questa evoluzione è dovuta alla diffusione di acqua e NaCl dalla soluzione all'interno del muscolo del pesce. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra il campione di controllo e quelli trattati con PEF.

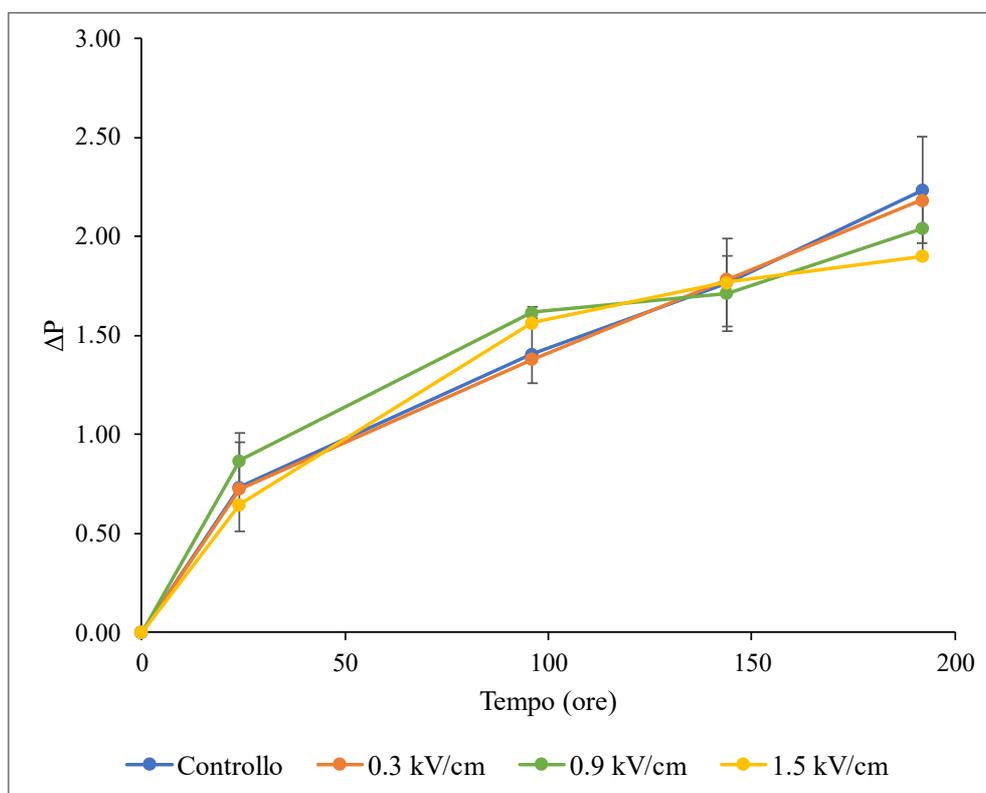


Figura 5.5 – *Variazione del peso dei campioni durante il processo di salamoiatura.*

Allo scopo di studiare e modellare la cinetica del processo di salatura, è stato calcolato il rapporto di massa (MR) di ciascun campione (Figura 5.6).

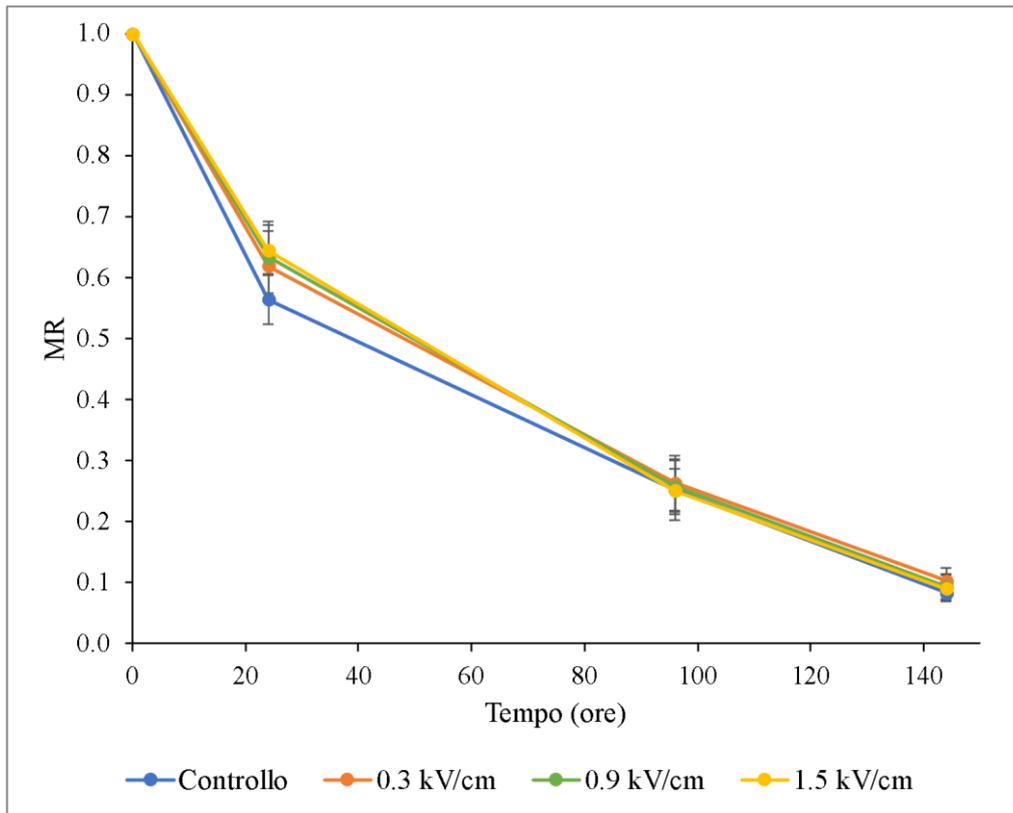


Figura 5.6 – MR dei campioni durante il processo di salamoiatura.

Applicando la regressione non lineare è stato possibile calcolare il valore della costante cinetica (k) del modello di Newton. I risultati ottenuti per ciascun gruppo di campioni e la bontà dell'approssimazione sono illustrati nella Tabella 5.3. In ciascun caso, il modello di Newton consente una stima eccellente dei dati sperimentali. In generale il valore di R è risultato maggiore di 0.96, SSE minore di 0.08 e RMSE minore di 0.07 nei diversi gruppi di campioni.

Riguardo al parametro cinetico, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra il controllo e i campioni trattati con PEF alle diverse intensità. Questo sembra indicare che il pretrattamento con PEF non abbia avuto un effetto rilevante sulla velocità del trasferimento di massa durante l'immersione in salamoia.

Tabella 5.3 – Parametri del modello di Newton.

Campione	k	R²	SSE	RMSE
Controllo	0.018 ± 0.003 ^a	0.969	0.076	0.063
0.3 kV/cm	0.016 ± 0.002 ^a	0.977	0.054	0.053
0.9 kV/cm	0.016 ± 0.002 ^a	0.990	0.024	0.036
1.5 kV/cm	0.016 ± 0.002 ^a	0.987	0.032	0.041

Capitolo 6: CONCLUSIONI

I campioni di branzino sono stati studiati con l'obiettivo di valutare l'effetto di tecnologie innovative sul processo di salatura.

In base ai risultati ottenuti, si può affermare che le differenze riscontrate tra i campioni trattati con PEF e il campione di controllo (senza trattamento) sono state molto ridotte.

A differenza di quanto emerso da studi precedenti, realizzati con il medesimo trattamento PEF e sulla stessa matrice (filetti di branzino), il pretrattamento con PEF non ha migliorato il rendimento in peso e acqua dei prodotti, né accelerato in modo significativo l'assorbimento di NaCl durante il processo di salamoitura. Solo nei campioni trattati all'intensità di 0.9 kV/cm è stato osservato un aumento significativo del contenuto di sale rispetto al controllo, trascorse 192 ore dall'immersione in salamoia. Senza dubbio, queste discrepanze sono dovute alla variabilità della materia prima.

Inoltre, si può ipotizzare che lo stato di *rigor mortis*, quindi il tempo trascorso tra la morte e la successiva manipolazione, possa essere un fattore determinante delle differenze con le sperimentazioni precedenti. Tale parametro può sicuramente avere un effetto significativo sullo stato delle proteine e sulla loro reattività all'applicazione di un campo elettrico.

Pertanto, questo aspetto richiede ulteriori studi, poiché potrebbe chiarire molte delle discrepanze riportate nella letteratura relativa all'applicazione dei PEF sui tessuti animali.

Infine, si può ipotizzare un effetto combinato del pretrattamento con PEF e del processo di salatura sull'ossidazione dei lipidi presenti nel campione, anche se non è stata compromessa la qualità finale del prodotto nelle condizioni di processo applicate nel presente studio.

Questo aspetto merita di essere ulteriormente approfondito, allo scopo di minimizzare l'ossidazione lipidica durante la salagione del branzino e preservare più a lungo la qualità nutrizionale e organolettica del prodotto.

BIBLIOGRAFIA

AOAC (1990). Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Arcangeli, G., Baldrati, G., & Pirazzoli, P. (2003). La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione. SSICA Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari. Litografica Faenza Srl, 68-74, 127-129, 136-139 e 164.

Barba, F. J., Koubaa, M., do Prado-Silva, L., Orlien, V., & Sant'Ana, A. D. S. (2017). Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 20–35.

Ben Ammar, J., Lanoisellé, J. L., Lebovka, N. I., Van Hecke, E., & Vorobiev, E. (2010). Effect of a pulsed electric field and osmotic treatment on freezing of potato tissue. *Food Biophysics*, 5(3), 247–254.

BMTI (2019). Annuario sul mercato ittico.

Bombace, G. & Lucchetti, A. (2011). Elementi di biologia della pesca (1st ed.). Edagricole, Milano, 303-305.

Buckow, R., Chandry, P. S., Ng, S. Y., McAuley, C. M., & Swanson, B. G. (2014). Opportunities and challenges in pulsed electric field processing of dairy products, *International Dairy Journal*, 34(2), 199–212.

Campbell, M. K., Farrell, S. O. & McDougal, O. M. (2019). Biochimica (9th ed.). EdiSES, Napoli.

Carroll, A. (2004). Population Dynamics of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in Welsh Waters, MSc Marine Environmental Protection Thesis, Bangor University.

Chauhan, O. P., & Unni, L. E. (2015). Pulsed electric field (PEF) processing of foods and its combination with electron beam processing. In S. D. Pillai, & S. Shayanfar (Eds.). *Electron beam pasteurization and complementary food processing technologies* (1st ed.). Woodhead Publishing, 157–184.

Cropotova, J., Tappi, S., Genovese, J., Rocculi, P., Laghi, L., Dalla Rosa, M., Rustad, T. (2021^a). Study of the influence of pulsed electric field pre-treatment on quality parameters of sea bass during brine salting. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 70.

Cropotova, J., Tappi, S., Genovese, J., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., Rustad, T. (2021^b). The combined effect of pulsed electric field treatment and brine salting on changes in the oxidative stability of lipids and proteins and color characteristics of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Heliyon*, 7(1).

De Leonardis, A. (2008). Qualità e processi di trasformazione dei prodotti ittici (1st ed.). ARACNE editrice Srl, Roma, 99-118, 124-129 e 147-149.

Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016). Food microbiology: Principles into practice. Chapter 9: Food preservation by combination of techniques (hurdle technology) (1st ed.). John Wiley & Sons, Ltd, 166-180.

EUMOFA (2017). Profilo Paese: Italia.

EUMOFA (2019). Species profile: European seabass.

EUMOFA (2020). The EU fish market – 2020 Edition.

FAO (2006). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*.

FAO Fisheries & Aquaculture – Statistics (ultimo accesso: 18/10/2021).

Faridnia, F., Ma, Q. L., Bremer, P. J., Burritt, D. J., Hamid, N., & Oey, I. (2015). Effect of freezing as pre-treatment prior to pulsed electric field processing on quality traits of beef muscles. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 31–40.

FishBase (2013). *Dicentrarchus labrax*.

Freyhof, J. & Kottelat, M. (2008). *Dicentrarchus labrax*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008.

Gabric, D., Barba, F., Roohinejad, S., Gharibzahedi, S. M. T., Radojcin, M., Putnik, P., & Bursac Kovačević, D. (2018). Pulsed electric fields as an alternative to thermal processing for preservation of nutritive and physicochemical properties of beverages: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 41(1).

Giuffrida, A., Valenti, D., Giarratana, F., Ziino, G., & Panebianco, A. (2013). A new approach to modelling the shelf life of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *International Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 1235–1242.

Gowrishankar, T. R., Esser, A. T., Vasilkoski, Z., Smith, K. C., & Weaver, J. C. (2006). Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1266–1276.

Guerrero-Beltran, J. A., & Welti-Chanes, J. (2016). Pulsed Electric Fields. *Encyclopedia of Food and Health*, 561-565.

He, G., Yin, Y., Yan, X., & Wang, Y. (2017). Semi-bionic extraction of effective ingredient from fishbone by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2).

IFCA (2017). Managing sustainable fisheries, European seabass.

ISMEA mercati - Banca dati commercio estero agroalimentare nazionale (2020). (ultimo accesso: 18/10/21).

Kantono, K., Hamid, N., Oey, I., Wang, S., Xu, Y., Ma, Q., Faridnia, F., & Farouk, M. (2019). Physicochemical and sensory properties of beef muscles after Pulsed Electric Field processing. *Food Research International*, 121, 1-11.

Kontali Analyse (2018). Monthly seabass and seabream report.

Krassowska, W., & Filev, P. D. (2007). Modelling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, 92(2), 404–417.

Li, Y.Q., Chen, Q., Liu, X.H., & Chen, Z.X. (2008). Inactivation of soybean lipoxygenase in soymilk by pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 109, 408–414.

Li, M., Lin, J., Chen, J., & Fang, T. (2016). Pulsed electric field-assisted enzymatic extraction of protein from abalone (*Haliotis Discus Hannai Ino*) viscera. *Journal of Food Process Engineering*, 39(6), 702–710.

Liu, Z. W., Zeng, X. A., Sun, D. W., & Han, Z. (2014). Effects of pulsed electric fields on the permeabilization of calcein-filled soybean lecithin vesicles. *Journal of Food Engineering*. 131, 26–32.

Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2009). Enhancement of the solid–liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *Food Science and Technology*, 42(10), 1674–1680.

McDonnell, C. K., Allen, P., Chardonnerau, F. S., Arimi, J. M., & Lyng, J. G. (2014). The use of pulsed electric fields for accelerating the salting of pork. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1054–1060.

Neumeyer, K., Ross, T., & McMeekin, T.A. (1997). Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. *International journal of food microbiology*. 38, 45–54.

Nguyen, M.V., Thorarinsdottir, K.A., Gudmundsdottir, A., Thorkelsson, G. & Arason, S. (2010). The effects of salt concentration on conformational changes in cod (*Gadus morhua*) proteins during brine salting. *Food Chemistry*, 125, 1013-1019.

Olafsdottir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., ... & Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8(8), 258-265.

Özogul, Y., Durmuş, M., Balıkcı, E., Özogul, F., Ayas, D., & Yazgan, H. (2011). The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (*Sardinella aurita*). *International journal of food science & technology*, 46(2), 236-242.

Ravishankar, C. N. (2016). Recent Advances in Processing and Packaging of Fishery Products: A Review, *Aquatic Procedia* (7), 201-213.

Regolamento (CE) n. 1967 del 21 dicembre 2006 relativo alle misure di gestione per lo sfruttamento sostenibile delle risorse della pesca nel mar Mediterraneo.

Saldaña, G., Puértolas, E., López, N., García, D., Álvarez, I., & Raso, J. (2009). Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 160–165.

Saldana, G., Puertolas, E., Monfort, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2011). Defining treatment conditions for pulsed electric field pasteurization of apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 29–35.

Saulis, G., Satkauskas, S., & Praneviciute, R. (2007). Determination of cell electroporation from the release of intracellular potassium ions. *Analytical Biochemistry*, 360(2), 273–281.

Semenoglou, I., Dimopoulos, G., Tsironi, T., & Taoukis, P. (2020). Mathematical modelling of the effect of solution concentration and the combined application of pulsed electric fields on mass transfer during osmotic dehydration of sea bass fillets. *Food and Bioproducts Processing*, 121, 186-192.

Shynkaryk, M., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2008). Pulsed electric fields and temperature effects on drying and rehydration of red beetroots. *Drying Technology*, 26(6), 695–704.

Sofra, C., Tsironi, T., Taoukis, P.S., 2018. Modeling the effect of pre-treatment with nisin enriched osmotic solution on the shelf life of chilled vacuum packed tuna. *Journal of Food Engineering*, 216, 125–131.

Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Sigurgisladottir, S., Valsdottir, T., & Tornberg, E. (2011). Effects of different pre-salting methods on protein aggregation during heavy salting of cod fillets. *Food Chemistry*, 124(1), 7-14.

Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Berendsen, L. B. J. M., Nederhoff, A. L., Matser, A. M., Van Boekel, M. A. J. S., Nierop Groot, M. N. (2019). Moderate intensity Pulsed Electric Fields (PEF) as alternative mild preservation technology for fruit juice, *International Journal of Food Microbiology*, 298(2), 63-73.

Tsironi, T., Salapa, I., & Taoukis, P. (2009). Shelf life modeling of osmotically treated chilled gilthead seabream fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 23–31.

Tsironi, T., Taoukis, P. S., (2014). Effect of processing parameters on water activity and shelf life of osmotically dehydrated fish filets. *Journal of Food Engineering*, 123, 188–192.

Vidal, N. P., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2015). ¹H NMR study of the changes in brine- and dry-salted sea bass lipids under thermo-oxidative conditions: Both salting methods reduce oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 440-449.

WHO (2016). SHAKE. The Salt Habit, the SHAKE Technical Package for Salt Reduction.

Yang, N., Huang, K., Lyu, C., & Wang, J. (2016). Pulsed electric field technology in the manufacturing processes of wine, beer, and rice wine: A review. *Food Control*, 61, 28–38.

Yogesh, K. (2016). Pulsed electric field processing of egg products: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 934–945.

Zderic, A., Zondervan, E., & Meuldijk, J. (2013). Breakage of cellular tissue by pulsed electric field: Extraction of polyphenols from fresh tea leaves. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 1795–1800.

Zhao, W., Yang, R., & Zhang, H. Q. (2012). Recent advances in the action of pulsed electric fields on enzymes and food component proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 27, 83–96.

Zhou, Y., He, Q., & Zhou, D. (2017). Optimization extraction of protein from mussel by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3).