

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari

*Dottorato di Ricerca in
“Scienze e Tecnologie Alimentari”
XXV Ciclo*

Dr. DANILO SCALONE

***Studio e Caratterizzazione di alcuni prodotti tipici Mediterranei in
termini di Qualità e funzioni Salutistiche***

Dissertazione Finale

***Coordinatore:
Prof. Giovanni Spagna***

***Tutor
Prof. Giuseppe
Muratore***

Indice

<i>Premessa</i>	3
<i>CAPITOLO 1</i>	
<i>Alimenti Funzionali</i>	5
<i>CAPITOLO 2</i>	
<i>I prodotti Alimentari : modelli, indici di qualità e tendenze</i>	10
<i>CAPITOLO 3</i>	
<i>Il Fico d'india: proprietà salutistiche e caratteristiche tecnologiche</i>	21
<i>CAPITOLO 4</i>	
<i>La Mandorla: proprietà salutistiche e confronto tra le cultivar siciliane con quelle di provenienza estera</i>	34
<i>CAPITOLO 5</i>	
<i>Articolazione della Ricerca</i>	54
<i>CAPITOLO 6</i>	
<i>Risultati e Conclusioni</i>	57
<i>CAPITOLO 7</i>	
<i>Allegati</i>	79
<i>CAPITOLO 8</i>	
<i>Bibliografia</i>	127

Premessa

L'importanza e lo stretto legame del binomio "alimentazione e buona salute" è sottolineata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che considera nutrizione adeguata e salute diritti umani fondamentali. L'alimentazione è uno dei fattori che maggiormente incidono sullo sviluppo, sul rendimento e sulla produttività delle persone, sulla qualità della vita e sulle condizioni psico-fisiche con cui si affronta l'invecchiamento. Inoltre una dieta corretta è un validissimo strumento di prevenzione per molte malattie e di trattamento per molte altre.

Le abitudini alimentari caratteristiche dell'area del mediterraneo sono state costantemente associate a una bassa incidenza di malattie cardiovascolari e tumorali (Willet et al.1995; Trichopoulou et al., 2004).

Le proprietà salutari dei prodotti mediterranei hanno raggiunto oggi un alto livello di riconoscimento, la ricerca al giorno d'oggi è rivolta verso diversi alimenti singoli: cereali, frutta, vegetali, olive e dei loro principali componenti tipo fibre, vitamine e polifenoli (Visioli et al., 2002).

Il contributo apportato dai singoli micronutrienti sulle attività protettive, permette di mettere a fuoco delle linee guida alimentari di certi alimenti e la possibilità di formulare alimenti funzionali e nutraceutici.

In letteratura esistono molti studi sugli effetti benefici dei polifenoli presenti nell'olio di oliva (Visioli, 2002, P.Andrewes, 2003) la cui vasta gamma di attività farmacologiche potrebbe fornire una spiegazione parziale sull'alta longevità e la bassa incidenza di malattie degenerative osservate nell'area mediterranea.

Mentre ricerche sul pomodoro si sono dedicate agli effetti benefici sulla salute di alcuni componenti come i carotenoidi e il licopene (Visioli et al., 2003; Riso et al., 2004; Muratore et al., 2005; Licciardello et al., 2009).

Altri studi sono stati effettuati sulle proprietà salutari di estratti da piante e ortaggi e dei loro composti isolati. Molti lavori riportano gli studi sugli antiossidanti e sulle

attività modulate da enzimi endogeni in vegetali (Kris-Etherton et al., 2002).

In un sistema agroalimentare caratterizzato da piccole e medie imprese, come in Sicilia, è essenziale la presenza di strumenti idonei alla comunicazione e allo sviluppo della qualità dei prodotti per aggiungere valore al prodotto e quindi per essere competitive sul mercato (Visioli et al., 2004).

1. Alimenti Funzionali

“Che il nutrimento sia la tua medicina e la medicina il tuo nutrimento” recitava Ippocrate più di 2400 anni fa. Che la salute cominci nel piatto, dunque, non è certo un’idea nuova, ma le nostre abitudini alimentari e i prodotti che consumiamo non sono mai cambiati così rapidamente come negli ultimi anni, tanto che il confine tra

alimenti e farmaci diventa sempre più evanescente. I grandi produttori del settore alimentare e farmaceutico sembrano soddisfatti di questo ritorno di entusiasmo per quell'alimentazione salutistica tanto popolare agli inizi del secolo scorso. Il nuovo millennio esige però un pizzico di tecnologia in più e oggi si parla di alimenti funzionali, o di rivoluzione nutraceutica. La nuova frontiera per nutrizionisti, alimentaristi, industriali e politici. E' infatti l'idea che un'alimentazione adeguata possa stimolare le difese immunitarie dell'organismo e conseguentemente esercitare una azione di contrasto nei confronti di determinate patologie, promuovere la salute e ridurre, per quanto possibile, le cure sanitarie.

Le definizioni scientifiche degli alimenti funzionali sono tanto diverse quanto sfuggenti. La più lineare rimane quella dell'International Life Science Institute (ILSI), che riconosce come funzionale "qualsiasi alimento o ingrediente di cui sia stata sufficientemente dimostrata la capacità di apportare beneficio a una o più funzioni dell'organismo, oltre agli adeguati effetti nutrizionali, in modo rilevante o per il miglioramento dello stato di salute e di benessere o per una riduzione del rischio di malattia.

I "functional food" come vengono chiamati negli Stati Uniti, vanno oltre i bisogni di base poichè dovrebbero essere un genere alimentare e non un derivato in polvere o capsule, in modo da essere integrati in una dieta convenzionale, intervenendo specificatamente nel metabolismo per regolare processi di difesa biologica, prevenire malattie, aiutare nel controllo delle condizioni psicofisiche e contrastare i processi di invecchiamento cellulare.

Per molti secoli, c'è stata una radicata credenza che alcuni alimenti ed erbe avessero proprietà curative ed effetti benefici sulla salute. Nel ventesimo secolo è prevalso nel mondo occidentale un crescente uso ed abuso di farmaci, per alleviare o prevenire malattie. Attualmente è in atto un sensibile cambio di tendenza: la conoscenza e scoperta di sostanze nutrienti e componenti privi di interesse

nutrizionale, ma con riconosciute proprietà salutiste, ha indotto numerosi studiosi ad approfondire le conoscenze in merito alle relazioni struttura-funzioni biochimiche di innumerevoli sostanze che si trovano naturalmente in alimenti ed i possibili effetti sul corpo umano. Questo ha portato in un primo momento a un aumento della popolarità degli alimenti salutarie e della medicina olistica (metodo di cura del corpo e della mente) che ha avuto inizio negli anni '70 e sembra trovare nel nuovo millennio maggiore interesse grazie ad una evidenza scientifica emergente. Uno dei risvolti di questo movimento è stato il cambiamento enfatico dall'aspetto negativo degli alimenti con elevati contenuti in grassi, sale, colesterolo od additivi artificiali, verso il concetto che certi alimenti o loro ingredienti possano avere un impatto molto positivo sulla salute umana e, più in generale, sullo stato di benessere. La consapevolezza nell'opinione corrente e quindi da parte dei consumatori, che uno stile di vita sano può aiutare a ridurre il rischio di malattie e promuovere la salute, ha creato un mercato lucroso per una grande fetta di nuovi prodotti genericamente denominati "alimenti funzionali". Le attuali vendite di questo genere di prodotti ha comportato lautissimi guadagni (nell'ordine di miliardi di dollari), in Giappone, negli Stati Uniti e in Europa. Questa crescente apertura dei consumatori a comprare prodotti "salutarie" ha indotto molte industrie alimentari del mondo occidentale a un crescente interesse, studio e sviluppo di nuovi alimenti dietetici come prebiotici, probiotici, alimenti a basso contenuto di colesterolo o arricchiti con vitamine, e allo stesso tempo formulati in modo da contenere un basso tenore di grassi, di sale od elevato tenore in fibre.

Il concetto di alimento funzionale è stato favorito da un gran numero di fattori: l'incremento delle aspettative di vita dei consumatori nei paesi sviluppati, aumenti dei costi sanitari a causa di una maggiore insorgenza di patologie correlabili ad errate abitudini alimentari, progresso nella tecnologia degli alimenti e degli ingredienti, necessità di investimenti pubblici agli istituti di ricerca per divulgare le proprie scoperte nonché la grande rubrica di notizie data da queste scoperte e dalle

pubblicazioni salutiste in generale.

Molti consumatori sono incapaci o riluttanti a cambiare le loro abitudini dietetiche nella direzione delle linee guida previste e si rivolgono agli alimenti di origine industriale per la versione salutare del loro prodotto favorito.

La dieta mediterranea è caratterizzata dall'abbondanza di alimenti vegetali, molti di questi con effetti positivi sul benessere umano.

Alcuni esempi di questi alimenti caratteristici dell'area mediterranea :

- Mandorle e nocciole: ricchi in fenoli, flavonoidi, isoflavonoidi, fitosteroli e sono collegati alla riduzione dei lipidi nel sangue e alla riduzione della malattie cardiovascolari (11).
- Frutti e Vegetali: sono gli alimenti più significativi nella dieta mediterranea , ricchi in flavonoidi e in molecole bioattive, i quali portano benefici alla salute (Ninfali et al.,2005; Panico et al.,2005). Sono una fonte di fibre, vitamine, minerali, flavonoidi e terpeni, i quali provvedono alla protezione dei processi ossidativi.
- Nel pesce la presenza acidi grassi polinsaturi presenti permettono di regolare fattori emostatici e permettono di prevenire aritmie cardiache, tumori e ipertensione. Questi inoltre rivestono un ruolo fondamentale per la funzionalità neuronale e la prevenzione di certe malattie psichiatriche (Serra et al., 2004; Psaltopoulou et al., 2004).

Alcuni studi sulla popolazione mediterranea e asiatica, in cui la dieta tradizionale è ricca di prodotti di origine vegetale, mostrano una bassa incidenza di malattie cardiovascolari e una lunga aspettativa di vita (Kushi et al., 1995).

Sebbene alcune interazioni tra questi composti non sono ancora del tutto conosciuti, carotenoidi, acido folico e fibre sembrano rivestire un ruolo importante per la prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Alcuni degli effetti benefici sulla salute umana sono stati attribuiti ai polifenoli

presenti in varie matrici vegetali e in taluni prodotti alimentari. L'attività antiossidante di questi composti sono responsabili dell'azione citoprotettiva. Studi sul vino rosso ad esempio hanno mostrato gli effetti protettivi inducendo dei cambiamenti sul profilo lipoproteico, tramite i propri meccanismi ossidativi e le funzioni endoteliali. L'endotelio regola il tono vascolare bilanciando delicatamente due fattori differenti in risposta a stimoli differenti: vaso-dilatatorio (ossido nitrico, NO) e vaso-costrittorio (endoteline) prodotti dall'endotelio stesso. I polifenoli presenti nel vino hanno un effetto vaso-dilatatorio dovuto all'attività stimolante dell'NO. In condizioni sperimentali si è dimostrato che il resveretrolo (polifenolo stilbene) ha un effetto protettivo per il cuore e i reni grazie alla sua attività antiossidante e di sovra-regolazione della produzione di NO.

Pitsavos et al. (2005), hanno studiato gli effetti della dieta mediterranea sulla capacità antiossidante (TAC) in 3042 soggetti i quali non avevano malattie cardiovascolari accertate. L'associazione tra dieta mediterranea è stata correlata positivamente con la TAC. Studi ulteriori hanno mostrato la correlazione positiva con il consumo di frutta, vegetali e olio di oliva e invece una correlazione inversa con il consumo di carne rossa (Pitsavos et al., 2005).

In altri studi, sono state sottoposte un gruppo di donne a regime alimentare secondo i principi della dieta mediterranea, dopo 6 settimane i risultati hanno mostrato piccoli ma importanti benefici in riferimento a certi rischi cardiovascolari come ad esempio: basso livello di colesterolo totale e basso indice di massa corporea.

In pazienti ricoverati per problemi cardiaci, l'incidenza di morte si è ridotta significativamente in quei pazienti che hanno seguito regimi alimentari tipici della dieta mediterranea.

E' stato dimostrato che il consumo di frutta e legumi (alimenti che rivestono un ruolo fondamentale nella dieta mediterranea) riduce la concentrazione di cisteina nel siero nell'uomo (Samman et al., 2003) e conseguentemente il rischio di malattie cardiache

specialmente per la categoria di persone a rischio.

Gli alimenti vegetali contengono un alto contenuto di potassio, magnesio e calcio i quali intervengono nella riduzione della pressione sanguigna.

Un fattore da non trascurare nell'utilizzo di questi alimenti è la loro interazione durante la loro manipolazione e cottura. Ad esempio, l'utilizzo di olio d'oliva durante la cottura del pomodoro incrementa l'assorbimento del licopene (un carotenoide con funzioni di ridurre il rischio tumorale e di patologie cardiache) (Fielding et al., 2005 Muratore et al., 2008.).

Ninfali et al.(2005) hanno dimostrato che aggiungendo delle erbe aromatiche nelle preparazioni vegetali come delle insalate la capacità antiossidante aumentava dal 150 % al 200 %.

2. I prodotti Alimentari : modelli, indici di qualità e tendenze

Aspetto, flavour, consistenza e valore nutritivo, sono i quattro attributi principali considerati dal consumatore nella scelta di un alimento (Perez-Tello, 2001).

Il consumo di alimenti e succhi è strettamente legato alla stimolazione dei sensi: odore e tatto. La percezione dell'odore dipende da una complessa miscela di molecole idrofobiche a basso peso molecolare in genere strutturalmente molto diverse tra loro.

Trattamenti termici, eccessivi processi industriali, cattiva conservazione, portano i vari alimenti a perdere quel profilo aromatico che li caratterizzava, assumendo di contro sapori e odori poco apprezzati dai consumatori.

Oggi il supermercato è il luogo in cui il consumatore ha a disposizione una grande scelta di prodotti, freschi, minimamente trattati, secchi, inscatolati, sotto-aceto e congelati, il cui produttore si sforza di distinguersi sulla base di indicatori di qualità (Barret et al., 1995).

Questi indicatori sono molto difficili da misurare quantitativamente e accuratamente, in quanto dipendono da una serie di variabili individuali come ad esempio articolo/componente (Civille et al., 2003). Generalmente questi componenti sono calcolati usando dei valori arbitrari la cui somma permette di sviluppare un punteggio totale che descriva meglio la condizione e gli effetti sulla salute umana. Inoltre questi indici sono sviluppati per cercare di risolvere alcuni problemi che si possono presentare durante l'analisi dei dati altamente correlati.

Un fatto noto è che questi componenti possono interagire tra di loro con un meccanismo sinergico o in contrapposizione (Hu et al., 2002).

Nel settore della nutrizione, l'approccio è stato quello di studiare la correlazione tra il singolo nutriente o alimento e il rischio di malattie croniche, ma questo approccio ha mostrato problemi dovuti alla complessità dei regimi alimentari dell'individuo, dalle possibili correlazioni con i nutrienti ingeriti e dalle possibili interazioni degli effetti alimento/nutriente (Kant et al., 1996) in quanto questi possono interagire tra di loro influenzando la loro biodisponibilità e il loro assorbimento. Diversi studiosi hanno cercato di creare un modello matematico per sviluppare e valutare queste correlazioni (modello alimentare); tali modelli sono stati costruiti in funzione alle linee guida o raccomandazioni, come ad esempio il Diet Quality Index (DQI) (Kris-Etherton et al., 2002), il Healthy Eating Index (HEI) (Visioli et al., 2004) , il Dietary Guidelines Index (DGI)(Ninfali et al., 2005) o in funzione al modello alimentare

Mediterraneo.

Il DQI, proposto da Patterson et al. è basato sulle raccomandazioni per l'alimentazione e la salute americane. Questo modello consiste in otto componenti principali : grassi totali, grassi saturi e colesterolo, frutta, vegetali, cereali, legumi, proteine, sodio e calcio. Sono stati assegnati ad ogni alimento valori da 0 a 2, il valore 0 è assegnato a quegli individui che assumono quegli alimenti mentre 2 a quegli individui che non assumono gli alimenti consigliati. La somma dei valori darà risultati da 0 a 16 in cui il primo sarà indice di regime alimentare eccellente e il secondo regime alimentare povero.

Il modello HEI è stato sviluppato dal Dipartimento dell'Agricoltura Americano e si basa sulle linee guida alimentari per gli americani (1995). Questo modello si basa su 10 componenti principali : cereali , ortaggi, frutta, latte e carne, grassi totali e grassi saturi , colesterolo e sodio . i punteggi assegnati ad ogni componente va da 0 a 10 e in funzione della somma ottenuta si che valori prossimi allo 0 indica un regime alimentare non in accordo a quanto definito dalle linee guida viceversa valori prossimi a 100 indicano che il regime alimentare dell'individuo va in accordo a quanto definito dalle linee guida.

Il modello alimentare mediterraneo ha ricevuto un aumento dell'attenzione e d'interesse, perché molti studi hanno riportato significative correlazioni tra il regime alimentare e la riduzione di malattie cardiovascolari e alcune forme di tumori. (Kant et al., 1996; Trichopoulou et al., 2003, 2005).

Il modello mediterraneo è sviluppato su 8 componenti principali : cereali, vegetali, frutta e nocciole, latte e derivati, carne e derivati, pesce, legumi, rapporto grassi monoinsaturi e saturi. I punteggi associati ai singoli componenti vanno da 0 a 1, il valore ottenuto dalla somma ci indica e il regime alimentare si avvicina al modello (somma=8) oppure se è lontano dal modello (somma =0).

Parallelamente agli studi di modellizzazione matematica degli indicatori nell'industria

agro-alimentare la qualità dei prodotti finiti, delle materie prime e dei semilavorati, è valutata di routine mediante analisi strumentali (chimiche, fisiche e microbiologiche), che consentono di stabilirne la salubrità e/o il valore nutrizionale, oppure mediante il giudizio di esperti.

Se però s'intende come qualità: la combinazione di attributi o caratteristiche di un prodotto che hanno significato nel determinare l'accettabilità del consumatore (Gould,1977), o nel soddisfare le esigenze (bisogni ed aspettative) del consumatore (ISO 9000, 2005), le analisi sopra citate non sono più sufficienti a definire la qualità ma occorre approfondire il concetto di accettabilità o qualità sensoriale.

Qualità sensoriale è l'accettazione delle caratteristiche percepibili di un prodotto, da parte di un consumatore che sia il regolare fruitore di una categoria di prodotti, o comunque compreso nel target di mercato (Galvez et al., 1992).

La differenza che intercorre fra la definizione di qualità e la definizione di qualità sensoriale sta nel termine caratteristiche percepibili. In campo alimentare questo termine deve essere interpretato in modo da includere tutte le percezioni delle caratteristiche di un alimento (sicurezza, convenienza, valore) e non solamente quelle percepibili attraverso i sensi (Civille, 1991).

La definizione di qualità precedentemente fornita incorpora tre differenti aspetti (Cardello, 1995):

1. l'uso del consumatore come referente;
2. l'utilizzo dell'accettabilità come misura della qualità;
3. la relatività del giudizio riflessa nei concetti di categoria di prodotti e target di mercato.

Purtroppo nessun modo analitico strumentale consente di valutare il livello di gradimento che il consumatore riserverà a un dato prodotto alimentare; per tale motivo oggi si assiste ad un crescente interesse per l'utilizzo del giudizio del consumatore e dell'analisi sensoriale come strumento decisionale per il marketing

(Garber et al., 2003).

Il rinnovato interesse per il fenomeno consumo risiede nella consapevolezza della crescente importanza che rivestono le dinamiche dei consumi nell'influenzare (oltre che nell'essere influenzate da) il comportamento degli operatori del sistema economico.

Numerosi studi (Blandford, 1984, Malassis et al., 1986, Wheelock et al., 1989, Connor 1994) hanno evidenziato, oltre alla saturazione dei fabbisogni pro-capite energetici e di sostanze nutritive, una progressiva riduzione degli spostamenti tra le grandi categorie di alimenti, la quale prefigura una tendenza della struttura dei consumi alla omogeneizzazione e livello territoriale e sociale.

Tuttavia la staticità e l'omologazione dei consumi sono soprattutto fenomeni di superficie, come testimoniano da un lato l'aumentata dinamicità delle variazioni all'interno delle grandi categorie di alimenti, e dall'altro la crescente varietà delle modalità con cui i prodotti alimentari vengono consumati.

In relazione all'interpretazione di questi fenomeni, in situazione di saturazione quantitativa e di regime alimentare stabilizzato come quelle che caratterizzano i paesi avanzati, viene diminuendo la rilevanza diretta dei fattori esplicativi tradizionali, costituiti dai livelli di reddito e dalla struttura dei prezzi relativi dei beni, soprattutto quanto più si voglia considerare l'andamento dei consumi a maggiori livelli di dettaglio, e dunque secondo una prospettiva più confacente a quella del sistema delle imprese (Begalli et al., 1993). In questa situazione, infatti il generico prodotto alimentare assume la natura di convenience good, ovvero a basso valore unitario e ad acquisto ripetuto, il che determina nel consumatore una diminuzione della sensibilità al prezzo di mercato, a vantaggio delle altre componenti che costituiscono il prezzo d'uso (Becker 1965, Schary 1971, Berry 1979), inteso come l'insieme delle risorse impiegate in maniera esplicita e implicita nel processo di acquisizione-elaborazione-ingestione dei beni alimentari.

Il reddito mantiene una notevole importanza, ma soprattutto di tipo indiretto, in quanto ad esso sono correlati numerosi fattori che determinano la struttura delle preferenze dei consumatori (ad esempio disponibilità di attrezzature funzionali alla conservazione e preparazione dei cibi, o livello di informazione), fattori che a loro volta hanno una elevata incidenza sulla formazione delle percezioni del prezzo e del rapporto prezzo-qualità (Tokoyama et al., 1994).

L'acquisto e il consumo del cibo vengono dunque sempre più a dipendere da un insieme di situazioni soggettive (ad esempio disponibilità di tempo per la preparazione dei cibi, dimensione della famiglia, valore attribuito al tempo libero) che la teoria tradizionale relegava nella scatola nera dei gusti del consumatore quali variabili non osservabili, e che invece è opportuno ricondurre a variabili osservabili nella misura in cui dipendono dall'azione di un insieme di fattori socialmente determinati di natura demografica, economica, culturale visti in precedenza parlando di indicatori della qualità.

Le nuove tendenze dei consumi, intese come manifestazioni dei principali criteri che sembrano orientare i comportamenti dei consumatori, sono state schematicamente ricondotte a due grandi categorie in base al gruppo di variabili che maggiormente sembrano determinarle: la prima è stata più direttamente riferita al modificarsi dell'organizzazione sociale del lavoro e ai cambiamenti demografici (variabili socio-economiche), e ricomprende la ricerca di elevato contenuto di servizio *time saving* e la tendenza alla destrutturazione dei pasti; la seconda imputabile in misura maggiore all'operare delle variabili socio-culturali, è stata invece articolata in due dimensioni fondamentali, a seconda che la tendenza sia incentrata sull'attenzione al contesto esterno alla persona del consumatore o sulla ricerca del benessere a livello soggettivo.

A cavallo delle due categorie è collocabile la tendenza ad una rinnovata attenzione al prezzo.

La ricerca di elevato contenuto di servizio è rivolta a far fronte all'aumento del costo opportunità del lavoro familiare imputabile anche all'estendersi delle aspirazioni d'impiego del tempo extra-lavorativo, e si manifesta su vari aspetti del processo di consumo.

Innanzitutto il consumatore tende a richiedere una tipologia di servizio commerciale sempre più qualificata e varia: le scelte su dove effettuare l'acquisto e con quale frequenza farlo diventano interdipendenti (Pellegrini,1987), e anzi tendono addirittura a precedere la decisione rispetto allo specifico bene da acquistare; vengono richiesti assortimenti commerciali molto ampi e molto profondi; aumentano le esigenze di servizi time saving (ad esempio lettura ottica dei prezzi, piste veloci di pagamento, servizio baby sitting) e/o che incidano sulla percezione della penosità del tempo investito (miglioramento delle condizioni ambientali del punto vendita) (Berry 1979; Schary 1971, Pellegrini 1994).

Tendono poi a mutare le modalità di reperimento delle informazioni pre-acquisto: l'accentuazione del carattere di convenienza good conduce alla formulazione di scelte di tipo ripetitivo, il che porta da una parte ad una importanza crescente dell'informazione pubblicitaria e della marca, e dall'altra a formulare le scelte stesse non tanto in base a ciascun prodotto bensì all'assortimento nel suo complesso valutato però con procedure di semplificazione (Gamba et al., 1984, Pellegrini 1994), il che favorisce lo sviluppo della grande distribuzione.

L'aspetto forse più evidente è costituito dall'orientamento verso i prodotti che consentono una semplificazione delle attività di preparazione: da una parte uno spostamento verso cibi più semplici, che per loro stessa natura richiedono un minore tempo di elaborazione culinaria; dall'altra parte una sostituzione, ferma restando la complessità dei cibi consumati, dalla preparazione domestica con i servizi di trasformazione e adattamento svolti nell'ambito delle fasi della trasformazione industriale e-o commerciale, per cui si acquistano non ingredienti ma segmenti di

pasto già pronti in tutto o in parte (Senauer, 1990), esternalizzando una serie di attività che possono andare dalla pulitura fino alla pre-cottura o alla cottura vera e propria.

La ricerca di un maggior grado di elaborazione non comporta necessariamente, da parte dell'industria, un intervento sul prodotto in quanto tale, ma spesso implica solamente una differenziazione basata sul tipo di confezionamento e/o porzionatura: assume cioè grande rilievo la presentazione di prodotto nelle forme, dimensioni e formulazioni più adatte alle specifiche occasioni di acquisto-preparazione-consumo, ma secondo modalità che consentono una mediazione tra le esigenze legate alla praticità e il bisogno di mantenere un certo legame con la tradizione e/o rispondere ad altre tendenze che originano più direttamente dalle variabili socio-culturali.

A questa tendenza di contenuto di servizio si affianca la nuova organizzazione del sistema dei pasti, che diventa sempre meno strutturata, e condiziona fortemente le tipologie di alimenti cui il consumatore rivolge la propria attenzione (Marshall, 1993; Censis 1988).

La destrutturazione dei pasti si manifesta in primo luogo nella ricerca di occasioni di fruizione meno formali: i pasti infatti tendono a essere semplificati e vengono affiancati da un complesso di altre micro-occasioni di fruizione "snacking" (Senauer, 1990). Tali fenomeni determinano una situazione di difficoltà per i prodotti che costituiscono un accompagnamento (ad esempio confetture, formaggi da condimento, pesce e carne tal quale, frutta e ortaggi tal quali), mentre risultano avvantaggiati prodotti che dispongono di un buon contenuto di servizio e sono adatti ad una pluralità di occasioni di consumo (quali i latticini caseari più innovativi – formaggi fresche molli, yogurt, frutta e ortaggi minimamente lavorati), spesso appositamente elaborati dall'industria di trasformazione talvolta mediante un semplice intervento sulla modalità di confezionamento o di presentazione (confezioni monodose, succhi di frutta in piccolo formato, frutta e vegetali di IV gamma).

In secondo luogo si deve rilevare la diffusione dei pasti fuori casa, che rispondono comunque ad esigenze e motivazioni differenziate ma riconducibili a due mercati abbastanza distinti, quello della ristorazione collettiva (aziende, scuole, sanità ed altre convivenze) e quello della ristorazione privata-commerciale. In generale la traslazione della spesa da domestica a extradomestica fa sì che le imprese si trovino di fronte una domanda di natura molto più professionale rispetto a quella delle famiglie, meno istintiva e meno attenta ai fattori immateriali di differenziazione e più sensibile invece ai contenuti intrinseci di elaborazione e di servizio aggiunto, oltre che al fattore prezzo.

Una ulteriore tendenza si riferisce alla crescente attenzione per i problemi legati agli aspetti materiali e immateriali della propria soggettività.

Per quanto riguarda la dimensione materiale, all'origine di questo orientamento vi è da un lato la constatazione che il modello di consumo occidentale ha dato origine a gravi problemi di malnutrizione, e dall'altro la maggior diffusione dei risultati dei progressi realizzati in campo medico, a cui si accompagna il rinnovato interesse per la forma fisica e per la cura del corpo (Brunori, Di Iacovo et al., 1988; Mackenzie 1990).

Le conseguenze di questo atteggiamento si manifestano: in una richiesta di prodotti light, ovvero di alimenti con minor contenuto calorico, privo o con basso apporto di grassi e zuccheri, e/o di prodotti arricchiti di vitamine, sali minerali, fibre e così via; in una richiesta di prodotti che non presentano tracce e residui di sostanze ritenute dannose per la salute (conservanti, coloranti, pesticidi) e quindi anche di prodotti realizzati con sistemi di produzione biologica o lotta integrata (Brunori, Di Iacovo et al., 1988; Mackenzie 1990); e in una crescente diffusione dei prodotti freschi e dei prodotti trasformati ma ottenuti con procedimenti in grado di mantenere il più possibile inalterate caratteristiche e proprietà iniziali delle materie prime.

Nell'ambito della dimensione immateriale della soggettività invece il consumatore

mira anche alla realizzazione della propria personalità e desiderio di distinzione, sia sotto il profilo sensoriale-gustativo, in cui prevale l'esaltazione del gusto e dell'aspetto estetico del prodotto (edonismo), che sotto il profilo di ciò che il consumatore desidera essere, e dunque del bisogno d'identificazione con sistemi di valori e comportamenti (consumo come aspirazione-identificazione); ne costituiscono esempi il ritorno-riavvicinamento ai valori del mondo rurale (prodotti tipici, ma anche determinate modalità, canali e luoghi di acquisto – vendita diretta in azienda, agriturismo), la diffusione delle catene di fast food ispirate al modello americano, i già ricordati prodotti etnici e le relative modalità di fruizione. Nella tendenza edonistica si assiste ad un ritorno di attenzione al gusto in quanto tale, cui possono essere associati molti prodotti, da quelli tradizionali a quelli invece maggiormente innovativi, dai cibi semplici a quelli più elaborati, fino alla già ricordata richiesta di freschezza. In questo caso prevale la dimensione del prodotto in senso fisico, connessa agli ingredienti utilizzati, ai metodi di produzione e di preparazione, alla confezione e modalità di presentazione.

Nell'ambito della dimensione materiale l'attenzione delle imprese si concentra, oltre che su una maggiore diversificazione dei prodotti e servizi offerti, sull'alimento nella sua essenza, sia sotto l'aspetto nutrizionale e calorico, che sotto l'aspetto igienico sanitario.

Nel secondo caso, che riguarda sia la corrente edonistica che del consumo-aspirazione, occorre invece curare soprattutto i fattori di immagine (con particolare riferimento alla fase di fruizione), anche se secondo accezioni diverse: mentre infatti nell'edonismo l'aspetto di immagine è legato all'estetica del prodotto/servizio da consumare, nel consumo – aspirazione l'immagine riguarda piuttosto l'aspetto evocativo.

In generale, le tendenze che hanno origine più direttamente dalla sfera socio-culturale sono accomunate dal ruolo decisivo che la comunicazione e l'informazione

rivestono nel rapporto impresa – consumatore , ruolo rafforzato dal progressivo allontanamento di quest'ultimo dalla sfera della produzione e dalla sua parallela crescita di sensibilità e organizzazione, che si traduce anche in una maggior capacità di orientare e addirittura determinare le azioni delle imprese.

Per il consumatore diventa, infatti importante non solo il modo in cui l'impresa realizza il prodotto e la natura delle materie prime utilizzate, ma addirittura il fatto che la filosofia dell'impresa rispetti particolari principi morali (consumatore etico: Mackenzie, 1990): tutto questo induce le imprese ad una maggiore cura per le informazioni riportate sulla confezione del prodotto e al messaggio pubblicitario ad esso associato, nonché ad un crescente interesse per la certificazione, in grado di assicurare la corrispondenza del prodotto e o processo a particolari requisiti.

Le tendenze appena esaminate non esauriscono la complessità del consumo alimentare: infatti il consumatore esprime un'esigenza di consumo sempre più differenziata (varietà) e mutevole nel tempo (variabilità), e inoltre le proprie scelte in base a più criteri di consumo, talvolta contrastanti.

La varietà è imputabile al moltiplicarsi delle occasioni di consumo e di fruizione, ma è anche il riflesso di un atteggiamento di costante ricerca del nuovo, che non si manifesta soltanto con il passaggio da ampie quote di pochi prodotti a piccole quote di molti prodotti, ma anche attraverso la moltiplicazione dei luoghi d'acquisto frequentati, dalle fonti di informazione utilizzate, dei tempi dedicati alle diverse fasi dell'attività di consumo (Censis 1988). La variabilità dei criteri di consumo impiegati, ovvero la maggior disponibilità del consumatore a revocare le scelte fatte, deriva soprattutto dalla crescente ricerca di individualità e dal ritorno alla medietà nel consumo: tutto ciò , unitamente alla maggior informazione e al livello culturale del consumatore medio, determina una velocizzazione dei cambiamenti e un allentamento della fedeltà alla marca, al prodotto, al servizio, al canale di acquisto, fenomeni di fronte ai quali diventano fattori strategici per il sistema delle imprese sia

la flessibilità nella reazione dei cambiamenti, tanto a livello di impresa che di sistema di relazioni tra imprese (Bowlby et al., 1992) che la capacità di anticipare e indurre il mutamento stesso.

Le tendenze dei consumi, e le modalità con cui le stesse si manifestano nel singolo consumatore, fanno sì che le imprese si trovino di fronte una situazione di crescente complessità: non solo non esiste più un consumatore-tipo verso cui tendono ad uniformarsi i comportamenti di consumo, ma la stessa segmentazione diventa una strada sempre più difficile da percorrere in quanto la varietà, la variabilità e la coesistenza di più criteri di consumo oggi delineano un ideal-tipo di consumatore a geometria variabile (Censis 1994), non solo rispetto agli oggetti dell'acquisto ma anche a tutte le fasi del processo di consumo.

Sulla base di questi dati, le imprese hanno sempre più necessità di interfacciarsi con il mondo della ricerca in tutti i settori al fine di poter offrire al consumatore il prodotto idoneo alle sue esigenze.

Sulla base di quanto analizzato precedentemente il lavoro del dottorato di ricerca si è basato sulla selezione di due prodotti tipici dell'area del mediterraneo il fico d'india e le mandorle.

3. Il Fico d'india: proprietà salutistiche e caratteristiche tecnologiche

Il Fico d'india è una pianta della famiglia delle Cactacee (*Opuntia Ficus Indica*) diffusa in tutti i paesi tropicali e sub-tropicali. Originaria dell'altopiano Messicano venne introdotta in Europa dagli spagnoli verso la metà del 1500. In Italia la coltura ha sempre avuto nel passato carattere spontaneo con interesse prevalentemente locale.

Le piante appartenenti al genere *Opuntia* sono delle xerofite comprendenti 200 - 300 specie circa che crescono nelle zone aride e semiaride. Grazie alla loro ampia variabilità genetica, le piante appartenenti all'*Opuntia* mostrano un'elevata adattabilità ambientale, e possono, tuttavia, essere adattabili alle diverse condizioni climatiche (Markus et al., 2006).

I frutti e i cladodi possono essere facilmente prodotti in presenza di alte temperature e scarsa quantità di acqua, condizioni sfavorevoli per la maggior parte delle altre colture. In molti continenti il fico d'india è considerata come importante coltura di rivegetazione per il controllo del vento e dell'erosione idrogeologica nelle aree più colpite (Guevara et al., 2005).

Il fico d'india può essere utilizzato in molteplici campi: alimentare, biomedicale ed erboristico. Mentre molti di questi usi vengono sfruttati limitatamente in alcuni paesi, nel resto del mondo l'utilizzo principale è alimentare (Flores, 1995) Nei paesi mediterranei, i cladodi del fico d'India non sono utilizzati come alimento, mentre sono largamente utilizzati i frutti, che si consumano allo stato fresco e dai dietologi sono considerati ottimi integratori nella "dieta mediterranea" (Butera et al., 2002; Lee et al., 2002). Recentemente, molti paesi hanno aumentato la produzione di fichi d'India, la Sicilia è seconda fra tutti i paesi al mondo per la produzione e l'esportazione. Le cultivar siciliane di fico d'India producono frutti gialli, rossi e bianchi per effetto della

combinazione di due pigmenti betalainici, la rossoviola betanina e la giallo-arancio indicaxantina.

I frutti di *Opuntia ficus indica* (L. Miller) hanno ottenuto gradualmente una importanza economica nell'agricoltura siciliana (Galati et al., 2002).

I cladodi (detti comunemente pale o impropriamente foglie) costituiscono il fusto e si raggruppano formando ramificazioni. Sono ricoperti da una pellicola cerosa che protegge la pianta dall'eccessivo calore, impedendo la traspirazione e proteggendola da un possibile attacchi. Dopo quattro anni di sviluppo, i cladodi subiscono una lignificazione, costituendo un vero tronco, sono costituiti da acqua (92%), da carboidrati e fibre (4-6%) e in minor quantità da proteine (1-2%). Questi contengono anche minerali, principalmente calcio (1%), e un contenuto moderato di vitamina A e C. In diverse zone dell'America Meridionale e soprattutto in Messico i cladodi sono utilizzati tal quale o in fette, dopo la rimozione delle spine. Sono utilizzati in campo alimentare principalmente come additivi e farine, ad esempio in prodotti da forno permettono di ottenere prodotti ad alto contenuto di fibre, o come succhi, previa bollitura, (Guevara et al., 2005). Inoltre, essi possono essere utilizzati nelle composizioni farmaceutiche ed erboristiche a (Saenz-Hernandez, 1995).

Un altro componente importante presente nei cladodi sono gli idrocollidi (Trachtenburg et al., 1982) utilizzata in diversi campi, come additivo alimentare e come materiale water-proof per le pitture, grazie al contenuto di residui di arabinosio, galattosio, ramnosio e xilosio (Anderson et al., 1925; Sands et al., 1929; Amina et al., 1970).

Alcuni studi sono stati condotti per la determinazione della composizione chimica dei frutti di fichi d'india, appartenenti a diverse cultivar, soprattutto messicani e cileni (Sawaya et al., 1983; Saenz, 1990, 1995, 2008; Ewaidah et al., 1992; Rodriguez et al., 1996; Parish et al., 1997; Livrea et al., 2006).

Il frutto fresco mostra avere una composizione simile degli altri frutti e vegetali, ma

la determinazione della sua composizione è alla base per gli eventuali trattamenti tecnologici del frutto stesso, in **Tabella 1** sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche di maggior rilievo per i frutti appartenenti alle *Opuntia* spp.

Nella composizione chimica e nel contenuto di minerali riportati dai differenti autori presenta un contenuto in solidi solubili del 16% (circa), confrontabile a quello di altri frutti come prugne, albicocche e pesche (Pimienta, 1990; Schmidt-Hebel et al., 1990).

In riferimento al contenuto in zuccheri la polpa è costituita da glucosio e fruttosio per il 53% e 47% rispettivamente (Sawaya et al., 1983; Russel et al., 1987), presenti come zuccheri liberi e quindi direttamente utilizzabile dall'organismo (Cheftel et al., 1983).

L'apporto calorico del frutto è di circa 50 Kcal/100 g (Sawaya et al., 1983; Schmindt-Hebel et al., 1990) al pari di pere, albicocche e arance.

Inoltre, sono presenti proteine (0.21-1.6%), grassi (0.09-0.7%), fibre (0.02-3.15%) e ceneri (0.4-1%), tutti confrontabili agli altri frutti (Paredes et al., 1973; Askar et al., 1981). Il contenuto totale di amminoacidi è 257.24 mg/100g, valore simile a quello degli agrumi e dell'uva, e superiore rispetto ad altri frutti. Altri componenti, il cui contenuto è superiore rispetto ai comuni frutti sono: serina, acido amino butirrico, glutammina, prolina, arginina e istidina (Askar et al., 1981). Il fico d'india mostra inoltre un alto contenuto di acido ascorbico (40 mg/100 g) (Pimienta, 1990) e la concentrazione di vitamina C è agli stessi livelli di mele, pere, uva e banane (Cheftel et al., 1983, Saenz, 1985). Il contenuto in potassio (217 mg/100g) e un basso contenuto di sodio (0.6 - 1.19 mg/100g) permette di ridurre il rischio di problemi ai reni e di pressione arteriosa (Sepulveda et al., 1990; Rodriguez et al., 1996). Per quanto riguarda il contenuto in Calcio e Fosforo, i frutti di fico d'india, presentano un contenuto elevato circa di 15.4 - 32.8 mg/100 g e 12.8 - 27.6 mg/100 g rispettivamente (Sawaya et al., 1983, Sepulveda et al., 1990).

Il contenuto in acidi organici presente nel succo dei frutti di fico d'india delle tre varietà italiane gialla, rossa e bianca (Barbagallo et al., 1998) è di circa 17 mg/100 g per l'acido citrico, che è quello maggiormente presente, seguito dal malico e dal succinico.

La colorazione dei frutti dipende dal contenuto dei pigmenti, clorofilla e betalaine, rappresenta oltre che un'importante fonte di polifenoli, un indice di qualità per il consumatore finale.

La presenza di questi differenti pigmenti ha effetti sulla stabilità dei prodotti ottenuti, le betalaine per esempio sono più stabili delle clorofille in condizioni di trattamento termico e variazione di pH. Quindi da ciò si potrebbe dedurre che i frutti a colorazione viola potrebbero essere più stabili rispetto a quelli verdi.

Le betaleine sono dei cromo-alcaloidi azotati e la loro presenza esclude le antocianine, sono stabili a pH compreso tra 4 e 7, e sono particolarmente indicati come coloranti per gli alimenti a bassa acidità. Le betalaine riscontrate nei frutti di fico d'india sono betacianine (responsabili del colore rosso-viola) e le betaxantine (responsabili del colore giallo), in quantità superiori (100 mg/100 g) a quelle contenute nella barbabietola rossa (50 mg/100 g).

Castellar et al., (2003) riportano un contenuto di betacianina di 80 mg/100 g in *O. stricta*, riuscendo ad affermare che il frutto di fico d'india potrebbe essere una fonte migliore da cui estrarre le betaleine rispetto alla barbabietola rossa, che presenta invece problemi tecnologici e sensoriali dovuti all'alto contenuto di geosmina. La presenza contemporanea di betacianine e betaxantine nei frutti di fico d'india comporta un range cromatico più ampio, legata anche all'assenza completa di geosmina che conferisce alla betaleina estratta dalla barbabietola rossa il tipico flavor, alti livelli di nitrati ed un elevato contenuto in carica microbica.

È noto che i frutti sono molto sensibili ai "danni da freddo" se esposti a temperature inferiori a 10 °C. in assenza di refrigerazione, la senescenza aumenta rapidamente e

i frutti diventano suscettibili alle infezioni da parte di microrganismi, in particolare *Penicillium* spp. ed *Alternaria* spp. e marciumi causati da alcuni ceppi di lieviti e batteri. I danni da freddo non interessano solo l'esterno dei frutti, ma essi diventano incommerciabili. I sintomi si evidenziano con delle macchie brune superficiali e sono spesso accompagnate dallo sviluppo di off-flavors (Schirra et al., 1997), intaccando la costituzione e il contenuto nutrizionale dei frutti stessi. Diversi autori hanno ipotizzato che gli enzimi svolgono un ruolo attivo nella qualità di frutti e vegetali (Barret et al., 1995) tra cui lipossigenasi e pectinestasi (**Tabella 2**), De Gregorio et al., 2010 hanno dimostrato inoltre che esiste una correlazione tra l'attività lipossigenasica e le proprietà organolettiche dei frutti di fichi d'india, in particolare hanno osservato che le diverse condizioni di coltivazione dei frutti per incrementarne la qualità influenzano l'attività specifica della lipossigenasi.

I componenti aromatici del fico d'India sono stati ricercati per primi da Flath et al., (1978) che trovarono gli alcoli come classe maggiormente rappresentata nell'estratto volatile di una varietà messicana, seguiti da diversi altri studi condotti da Di Cesare et al., (1992) e Carrandi (1995). Secondo questi autori componente aromatica, è costituita principalmente da etanolo (76.33%), seguita 2,1-esenolo, 1-esanolo; 2,6 nonanale e 2-nonenale e 2-esenale.

Lo studio dei composti volatili, risulta importante per la messa a punto dei processi tecnologici in quanto sono causa delle scarse qualità edonistiche dei prodotti a base di fichi d'india.

Diversi studi sono stati condotti sui trattamenti dei frutti Paredes et al. (1973) utilizzarono trattamenti con acido citrico per ridurre il pH a 4.3, sodio benzoato (500 ppm) ed effettuato un trattamento termico di 90 °C per 5 min, i risultati hanno mostrato che il prodotto confezionato sottovuoto in latta avevano un odore e un gusto gradevole senza problemi microbiologici. Recentemente uno studio condotto sui frutti di fichi d'india minimamente trattati e confezionati in atmosfera modificata

riporta che l'effetto positivo sull'inibizione dello sviluppo della carica microbica, patogena e non, si osserva solo su frutti confezionati in atmosfera modificata e conservati a temperature minori di 4 °C (Corbo et al., 2008).

Del Nobile (2009), ha effettuato uno studio per prolungare la shelf-life in fichi d'india minimamente trattati. I risultati ottenuti hanno mostrato che l'utilizzo di un coating con alginato permette di prolungare la shelf-life dei frutti in 13 giorni. Inoltre altri risultati hanno mostrato che i film barriera testati nel lavoro, non hanno avuto effetti positivi per l'incremento di shelf-life, probabilmente dovuto alla presenza del bio-film presente sulla superficie del frutto.

Questi studi non fanno riferimento come ad altri studi più recenti alla presenza degli enzimi endogeni presenti nei frutti e che sono causa di sviluppo di off-flavours e degradazioni varie come il rammollimento enzimatico.

Sulla base di quanto riportato sopra, diversi studi sono stati condotti dal nostro gruppo di ricerca mirati alla determinazione di enzimi endogeni nel fico d'india quali la Lipossigenasi (EC 1.3.11.12) e la Pectinesterasi (EC 3.1.1.11), responsabili rispettivamente, della produzione di off-flavours e il rammollimento strutturale. Inoltre sono stati eseguiti degli studi sugli effetti di differenti packaging in aggiunta a dei trattamenti tecnologici, affiancando il tutto alle analisi sensoriali.

Lipossigenasi (LOX) è un enzima che si trova in molte piante e animali, che catalizza la ossigenazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA) per formare idroperossidi di acidi grassi. Essi sono presenti in una vasta gamma di organi e tessuti biologici, ma sono particolarmente abbondanti nei semi di legumi da granella (fagioli e piselli), e tuberi di patate. Lipossigenasi da fonti diverse, catalizza ossigenazione in diversi punti lungo la catena di carbonio, denominata "posizionale" o "regio" specificità, tale specificità ha implicazioni significative per il metabolismo dei idroperossidi risultanti in un certo numero di importanti metaboliti secondari Acido linoleico e linolenico sono i principali acidi grassi polinsaturi in tessuti vegetali, nella reazione catalizzata dalla

LOX l'inserimento di ossigeno avviene a sia la posizione 9 o 12 per generare il corrispondente 9 - o 13-idroperossidi. Mentre la maggior parte LOXs finora caratterizzati sono localizzati in diversi organelli della cellula citosol, cloroplasti, mitocondri, vacuoli. In soia, lipossigenasi sono stati identificati con il coinvolgimento di azoto e assimilare partizionamento e sembrano essere regolata in risposta a pianta azoto stato in entrambi i modelli di tessuto-specifici e in maniera controllata. Un ruolo chiave per alcune isoforme di LOX è la generazione di idroperossidi di acidi grassi destinati acido jasmonico (JA), che innesca l'attivazione del gene durante la risposta ferita nelle piante. (*Baysal et. al., 2006*)

Diversi autori hanno studiato/riportano la correlazione tra l'attività lipossigenasica e la qualità dei vegetali, Barrett et al., in particolare, ipotizzano che la lipossigenasi potrebbe essere rappresentare un indicatore enzimatico della qualità di frutti e vegetali sottoposti a "blanching" (**Tabella 3**).

Molti dei cambiamenti qualitativi di cui i vegetali surgelati e non sono catalizzati da enzimi, quindi è logico scegliere un enzima come indicatore dell'adeguatezza di un processo di scottatura. Dal 1949 al 1975, la catalasi è stata utilizzata come un indicatore enzimatico per i piselli verdi e diversi altri vegetali. Nel 1975 il Dipartimento dell'agricoltura americano raccomandava che l'inattivazione della perossidasi era necessaria per minimizzare il deterioramento qualitativo durante la conservazione a basse temperature la determinazione della catalasi non era uno strumento valido. Inattivando perossidasi, però, si può supporre che tutti gli altri enzimi coinvolti nella qualità dei prodotti sono stati inattivati, tuttavia, l'uso di perossidasi può anche causare la perdita non necessaria di colore, sapore, texture, e la qualità dei nutrienti, oltre ad un uso eccessivo di energia e di acqua, economicamente svantaggioso. Come illustrato in **Tabella 2** non c'è un singolo enzima chiave che è responsabile per tutti i cambiamenti qualitativi dei vegetali possibili durante la conservazione a freddo (Barrett et al., 1995). In molti vegetali la

limitazione di qualità dovuta al congelamento è lo sviluppo di off-flavor, che è molto spesso catalizzata dalla lipossigenasi. Piuttosto che designare un processo per inattivare tutti gli enzimi o i più resistenti, i ricercatori hanno recentemente concluso che l'enzima selezionato come indicatore dovrebbe essere uno dei più direttamente coinvolti con i maggiori cambiamenti durante il congelamento. Williams et al., (1986) valutarono l'aspetto sensoriale di puree scottate a cui è stato aggiunto e verificato che la LOX era l'enzima più attivo nel deterioramento/perdita di aroma nel fagiolino verde Inglese e fagioli verdi. La lipossigenasi è ampiamente distribuita nei vegetali ed è stata provata la sua partecipazione nella formazione e lo sviluppo di off-flavor e la perdita di colore (**Tabella 2**). Gli off-flavor sono prodotti come il risultato dell'ossidazione catalizzata dalla LOX di acidi grassi contenenti unità cis, penta 1,4 dieni (-CH-CH-CH₂-CH-CH-). Il più grande ostacolo all'utilizzo della LOX come indicatore è che fino ad oggi non è disponibile un test rapido da utilizzare nelle industrie di surgelati. L'analisi della LOX può essere condotta in laboratorio attraverso un metodo spettrofotometrico o polarigrafico, entrambi possono porre difficoltà e non sarebbero di possibile realizzazione in impianti continui. Il metodo spettrofotometrico non può essere utilizzato se la soluzione di reazione è torbida, il metodo polarigrafico può poco sensibile poichè misura l'attività lipossigenasica in aggiunta a qualsiasi altra reazione che utilizza O₂. Dalla **Tabella 3** risulta che i principali svantaggi presentati per l'adozione della LOX come indicatore della qualità dei vegetali durante la conservazione è dovuta alle limitazioni dei saggi enzimatici e non, messi a punto e noti fino ad oggi (Williams *et al.*, 1986). Mentre i vantaggi del suo impiego sono correlati alla sua ampia diffusione nel regno vegetale e al suo comprovato coinvolgimento e ruolo nello sviluppo di off-flavor e perdita di colore, oltre al fatto che può essere termicamente inattivata. Mentre la perossidasi potenzialmente utilizzabile come indicatore enzimatico, è facilmente determinabile grazie a test rapidi, ma non è chiara la sua correlazione con la qualità dei vegetali,

non è inattivata con il blanching e è possibile che si riattivi dopo il trattamento.

La molteplicità di utilizzo del fico d'india in tutte le sue parti, giustifica l'importanza che ha assunto in questi anni sia dal punto di vista economico che nutrizionale.

La collaborazione tra i produttori e la ricerca: da un lato l'ottenimento di colture a più alta resa, un minore contenuto in semi e lo sviluppo di coltivazioni intensive e dall'altro il miglioramento delle tecnologie post-raccolta e l'ottimizzazione dei processi industriali permetterebbe di sviluppare ulteriormente il settore del fico d'india e quindi utilizzare questa coltura come fonte di componenti benefiche per l'alimentazione umana e per scopi non alimentari utilizzando sottoprodotti di matrici naturali.

Scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto un saggio enzimatico ad elevata sensibilità ed investigare l'attività lipossigenasica nei frutti di fico d'india appartenenti alle diverse varietà (bianca, gialla e rossa) al fine di poter comprovare una correlazione tra la componente aromatica degli stessi in post raccolta e il suo ruolo nello sviluppo di off-flavor in prodotti di IV gamma.

Tabella 1 – Caratteristiche chimico fisiche di maggior rilievo per i frutti di fichi d'india (*Opuntia* spp.)

Parametro	
Peso (g)	67-126
Semi	3-7% del peso fresco
— Numero di semi/frutto	150-300
— Idrocolloidi	arabinani, ramnogalatturani
— Lipidi totali (mg/kg)	98.8 (sul peso secco)
— Lipidi principali	acidi linolenico, oleico, palmitico
— Steroli	β -sitosterolo, campesterolo
Buccia	36-48 % del frutto fresco
— Colore	verde, arancione, rosso, porpora
— Idrocolloidi	pectine
— Lipidi totali (mg/kg)	36.8 (su peso secco)
— Lipidi principali	acidi linolenico, oleico, palmitico, γ -linoleico, α -linoleico
— Steroli	β -sitosterolo, campesterolo
— Vitamine (liposolubili)	vitamina E
Polpa	39-64 % del frutto fresco
— Colore	bianco, giallo-arancio, rosso, porpora
— Pigmenti	indicaxantina (prolina-betaxantina), acido γ -aminobutirrico – betaxantina, muscariuna VII (istidina-betaxantina), vulgaxantina I (glutammina-betaxantina), betanina, isobetanina
— Contenuto pigmenti (mg/kg)	66-1140 5.6-6.5
— pH	acido citrico
— Acido principale	0.5-1.1
— Acidi totali tiolabili (g/L)	12-17
— Solidi solubili totali (%)	glucosio, fruttosio
— Zuccheri	100-130
— Zuccheri totali (g/L)	90:1 – 450:1
— Ratio Zuccheri:Acidità	prolina, taurina, glutammina, serina
— Amminoacidi	calcio, magnesio
— Minerali	vitamina C
— Vitamine	quercetina, campferolo, isoramnetina
— Fenoli	miscela di ramnogalatturani e fino al 50% di sostanze non-pectiche
— Idrocolloidi	acidi linolenico, oleico, palmitico, γ -linoleico, α -linoleico
— Lipidi	β -sitosterolo, campesterolo
— Steroli	8.7
— Lipidi totali (mg/kg)	2-(E/Z) – 2.6- nonadiene-1-ol, acido metil estere 2-metilbutanoico
— Composti aromatici	

Tabella 2 – enzimi responsabili del deterioramento nei vegetali non trattati.

Quality defect	Enzima responsabile
Sviluppo di off-flavor	Lipossigenasi Lipasi Proteasi
Textural changes	Enzimi pectici Cellulasi
Color changes	Polifenolossidasi Clorofilliasi Perossidasi Lipossigenasi^a
Nutritional changes	Ascorbic ossidasi Tiaminasi

^aGli idroperossidi e i radicali formati dall'ossidazione lipidica possono distruggere clorofilla e carotenoidi (Williams et al., 1986)

Tabella 3 – *Pro e contro* dell'utilizzo della Perossidasi e della Lipossigenasi come indicatori.

Enzyme indicator	Pro	Contro
Perossidasi	<p>— Ampia distribuzione nei tessuti vegetali</p> <p>— Resistenza all'inattivazione termica</p> <p>— Determinazione quantitativa semplice e rapida</p>	<p>— Correlazione alla qualità non chiara</p> <p>— Per l'inattivazione può essere richiesto un trattamento termico spinto</p> <p>— Rigenerazione dopo il trattamento</p> <p>— Diversi vegetali contengono diversi isoenzimi termicamente stabili</p> <p>— L'1-10% dell'attività residua è stabile in molti vegetali</p>
Lipossigenasi	<p>— Ampia distribuzione nelle piante (in particolare legumi e semi)</p> <p>— Evidente coinvolgimento nello sviluppo di off-flavor e cambiamento del colore</p> <p>— Termicamente inattivabile</p>	<p>— Un saggio rapido non è disponibile o non è utilizzato</p> <p>— Interferenze nel saggio spettrofotometrico</p> <p>— Il metodo polarografico può non essere sensibile</p> <p>— Un'ossidazione lipidica non-enzimatica può verificarsi</p>

4. La Mandorla: proprietà salutistiche e confronto tra le cultivar siciliane con quelle di provenienza estera

Le mandorle sono un tipico frutto mediterraneo, dal punto di vista nutrizionale contiene importanti costituenti: grassi (mono e polinsaturi), carboidrati, proteine, fibre, zuccheri insieme a tannini, ceneri e fitati.

Le migliori condizioni pedoclimatiche per la coltivazione del mandorlo sono le aree temperate, dove sono meno frequenti le brinate tardive (<http://www.agraria.org/coltivazioniarboree/mandorlo.htm>).

La coltivazione del mandorlo in Sicilia ricopre quasi il 60% della superficie mandorlicola italiana, concentrandosi in due specifiche aree: la Sicilia sudorientale e centromeridionale, risultando prevalentemente localizzata nelle provincie di Agrigento, di Enna; di Siracusa e di Caltanissetta. La nostra isola è la prima regione d'Italia sia in termini di copertura di superficie che in termini di produzione; ciò grazie alle condizioni pedoclimatiche che fanno della Sicilia una terra vocata alla produzione del mandorlo (Di Pino, 2010).

La commercializzazione del prodotto siciliano, destinato quasi esclusivamente al mercato interno, è attualmente contrastata dalle produzioni provenienti dagli USA e dalla Spagna. Infatti, le attività agroindustriali nazionali che effettuano la lavorazione e la trasformazione delle mandorle per uso dolciario tendono sempre più ad utilizzare materia prima californiana e/o spagnola, in quanto risultano essere più competitive in termini economici, considerando anche che l'offerta regionale non risulta sempre in grado di soddisfare le esigenze merceologiche (Di Pino, 2010).

Pur essendo molto diffuso nel bacino del Mediterraneo, il mandorlo ha avuto in questo ambiente periodi di stasi, se non di regressione, a causa dell'inadeguatezza degli impianti, spesso obsoleti e con tecniche di coltivazione tradizionali. Viceversa negli USA si è verificato un deciso sviluppo grazie alle nuove piantagioni specializzate eseguite con portainnesti capaci di adattarsi alle condizioni pedoclimatiche e con buona affinità d'innesto e all'introduzione di moderni sistemi di raccolta meccanizzata.

Il Mandorlo (*Amygdalus communis* L. = *Prunus amygdalus* Batsch; *Prunus dulcis* Miller) è una pianta originaria dell'Asia centro occidentale e, marginalmente, della Cina.

Appartiene alla Famiglia delle Rosaceae, sottofamiglia Prunoideae. Alla specie

Amygdalus communis appartengono tre sottospecie di interesse frutticolo:

- *A. communis* spp sativa (con seme dolce ed endocarpo duro; comprende la maggior parte delle specie coltivate).
- *A. communis* spp amara (ha seme amaro per la presenza di amigdalina).
- *A. communis* spp fragilis (con seme dolce ed endocarpo fragile).

Alla specie *Amygdalus communis* appartengono tre tipi di [mandorla](#):

1. sativa, con seme dolce e guscio duro che comprende la maggior parte delle specie coltivate, con endocarpo legnoso e duro, dal sapore dolce; i semi sono utilizzati nell'alimentazione, nell'industria dolciaria e per l'estrazione dell'olio di mandorla officinale nel campo della cosmetica, (Falsa Barese, Fascionello, Filippo Ceo, Genko, Tuono, Pizzuta D'Avola);

2. fragilis, con seme dolce e guscio fragile a differenza delle altre citate (Santoro, Fragile di Terlizzi);

3. amara, con seme amaro per la presenza di prunasina e amigdalina, entrambi glucosidi cianogenici; i [glicosidi](#) sono costituiti da una parte zuccherina e da una non zuccherina detta aglicone. Durante la maturazione, la prunasina, presente nelle radici, frutti e semi, è convertita in amigdalina, D(-)-mandelonitrile-beta-D-gentiobioside, altrimenti nota come vitamina B17, ad opera di enzimi appartenenti alla famiglia delle ossidoriduttasi. Successivamente, l'amigdalina è degradata per azione delle beta-glucosidasi, questa fase porta alla formazione di prunasina; successivamente la prunasina è idrolizzata da un altro beta-glucosidasi, cioè l'idrolasi-prunasina, la cui azione porta alla formazione di mandelonitrile; quest'ultimo composto viene scisso in benzaldeide e acido cianidrico dall'enzima mandelonitrilelasi. L'acido cianidrico è un inibitore della respirazione cellulare; I sintomi da intossicazione da cianuro consistono in mal di testa, vertigini, vomito immediato e dolore in sede addominale alta, seguiti da respiro affannoso, non associato a colorito cianotico, che successivamente diventa più rallentato con sincope, letargia, convulsioni e coma. Anche due o tre semi, che non sono in grado di causare l'intossicazione negli adulti possono essere molto pericolosi per un bambino. Tuttavia questo composto può essere

detossificato dall'azione dell'enzima beta-ciano-ala sintetasi.

Il frutto è una drupa che presenta esocarpo carnoso, di colore verde, a volte con sfumature rossastre, più spesso peloso ma anche glabro, ed endocarpo legnoso contenente il seme o mandorla; questo è ricoperto da un tegumento (episperma) liscio o rugoso, di colore variabile dal marrone all'ocra.

La parte edibile della mandorla è costituita da tre parti: il kernel o **nocciolo**, lo skin o **tegumento** e il **guscio**.

Il **nocciolo** della mandorla presenta una forma ovoidale con gli estremi ben marcati, è di colore biancastro e risulta liscio al tatto.

I noccioli sono largamente diffusi e stimati in tutto il mondo per le loro caratteristiche sensoriali, nutrizionali e per i loro effetti sulla salute (Venkatachalam et al., 2006). Il mandorlo è diffuso principalmente nelle regioni Mediterranee da cui si ottiene circa il 28% della produzione mondiale.

Le mandorle contengono un'ampia varietà di composti fenolici e flavonoidi (Milbury, et al., 2006) e, il loro consumo, è associato ad una riduzione del rischio di malattie croniche a livello ematico (Pellegrini et al., 2006). Il genere Prunus è caratterizzato da interessanti proprietà biologiche come attività sedative, anti-infiammatorie, anti-tumorali, anti-lipidemiche e antiossidanti. Sebbene sia stato già dimostrato che i componenti delle mandorle abbiano un potenziale antiossidante, informazioni scientifiche sulle proprietà antiossidanti di tutta la mandorla sono ancora piuttosto scarse; quindi, la valutazione di tale proprietà rimane un lavoro interessante e prezioso, in particolare per la ricerca di nuove fonti di antiossidanti naturali, alimenti funzionali e nutraceutici. Barreira et al. (2008), hanno studiato le proprietà antiossidanti di diverse cultivar di mandorle (Casanova, Duro Italiano, Molar, Orelha de Mula and Pagarinhos cv.), attraverso una serie di analisi chimiche e biochimiche utilizzando DPPH, l'inibizione dell'emolisi ossidativa negli eritrociti, l'uso del TBARS, etc.; alla fine di tale studio la Duro Italiano ha rivelato migliori proprietà antiossidanti, presentando in tutte le prove analitiche i più bassi valori di EC50 e il più alto contenuto di antiossidanti. Inoltre utilizzando il metodo HPLC sono stati determinati, nell'estratto di semi di mandorla, composti fenolici tra cui i più dominanti sono le procianidine B2 e B3.

Il seme della mandorla è racchiuso in un rivestimento esterno, chiamato **tegumento**, che protegge la mandorla dall'ossidazione e dalla contaminazione microbica. Molte trasformazioni della mandorla nel settore alimentare, come la

produzione di articoli da pasticceria e panetteria o la formulazione di snack e cereali, prevede l'utilizzo delle mandorle prive del loro tegumento esterno il quale viene allontanato mediante il processo di sbiancamento che prevede l'uso di acqua calda. Le bucce delle mandorle sono sotto prodotti dell'agricoltura; dopo macinazione, possono essere destinate all'alimentazione animale sotto forma di mangimi o bruciate come combustibile in impianti di trasformazione.

Il tegumento costituisce circa il 4% del frutto della mandorla ed è definito come una sorgente di composti fenolici; infatti, studi recenti sui fitofarmaci presenti nelle bucce delle mandorle hanno dimostrato la presenza di composti potenzialmente benefici per la salute umana, aprendo, quindi, nuove possibilità di attribuire alla mandorla maggiore valore nutrizionale (Chen et al. 2005). Ricerche risalenti agli ultimi anni hanno evidenziato il potere anti-infiammatorio, anti-cancerogeno e anti-HIV di tre determinati triterpenoidi, cioè acido betulinico, acido oleanico e acido ursolico, Frison-Norrie e Sporns, nel 2002, Wijeratne e al., nel 2006, hanno segnalato la presenza di quattro differenti flavonoidi glicosilati, cioè isorhamnetina rutinoside, isorhamnetina glucoside, kaempferolo rutinoside e kaempferolo glucoside. Altri ricercatori hanno indagato sulla composizione del tegumento della mandorla arrivando alla conclusione che il contenuto di composti fenolici antiossidanti rappresenta circa il 38-57% della percentuale totale della mandorla intera.

Il **guscio** della mandorla, che costituisce il mesocarpo, diventa secco, coriaceo e astringente al gusto, conseguenza dell'alta concentrazione di flavonoidi a differenza di altri frutti appartenenti alla stessa specie botanica; questi flavonoidi, considerato il lungo periodo di maturazione, giocano un ruolo importante nella protezione del frutto dal calore intenso, dalla radiazione ultravioletta e dall'infestazione di parassiti. Dopo la raccolta, la composizione del mesocarpo in zuccheri, flavonoidi e antiossidanti in generale rimane stabile per anni, finché il mesocarpo, denominato guscio, mantiene la sua umidità di circa l'8-20%. Inoltre, questa parte fondamentale della mandorla, contiene fibre insolubili costituite da cellulosa, emicellulosa, pectine, tannini e cere. Quindi, il guscio secco della mandorla rappresenta una possibile fonte per la produzione di alimenti funzionali, integratori di fibre, additivi alimentari e fitofarmaci, al di là dell'utilizzo di più basso valore come foraggio e lettiera per gatti (Rabinowitz, 1991, 2002, 2004).

Takeoka et al.(2003), hanno analizzato l'estratto di guscio di mandorla, senza

attenzione alla varietà e ottenuto mediante l'utilizzo di metanolo; l'analisi è stata effettuata usando il meccanismo a fasi invertite di HPLC; con tale studio si è potuto ricavare la composizione precisa dell'estratto e sono stati evidenziati principalmente: acido clorogenico, acido criptoclorogenico e acido neoclorogenico, nelle rispettive concentrazioni di 42.52 ± 4.50 , 7.90 e 3.04 mg/100 g del peso fresco. Inoltre, l'estratto è stato testato per la capacità di inibire l'ossidazione di metile a linolato, a 40 °C, approvando un maggiore potere antiossidante dell'alfa-tocoferolo, a concentrazione equivalente (10 µ/1 g di metile-linolato); successivamente a più alte concentrazioni (10 µ/1 g di metillinolato), l'estratto del guscio di mandorla ha mostrato un potere antiossidante ancora maggiore e simile a quello dell'acido clorogenico. Questi dati affermano l'alto valore nutrizionale attribuito al guscio della mandorla.

La mandorla, soprattutto se consumata come frutta secca, ha un valore preponderante nell'alimentazione umana. È infatti, grazie all'elevata qualità dei suoi componenti che si consiglia il consumo quotidiano di frutta secca, purché sia fatto con moderazione. La mandorla secca appartiene alla vasta famiglia della frutta oleosa, di cui fanno parte anche altri tipi di frutta con il guscio come noci, pinoli, arachidi e pistacchi; se tutti questi prodotti sono accomunati dallo scarso contenuto in acqua che li caratterizza e quindi dall'elevato apporto calorico, la composizione chimica e quindi l'apporto nutrizionale sono diversificati. Volendo focalizzare l'attenzione sulle mandorle, diversi studi sperimentali, hanno riscontrato una presenza ben rappresentativa di fibra alimentare; inoltre l'elevato contenuto in grassi trova una valida giustificazione del termine "oleosa" che accompagna questi prodotti; tale caratteristica non deve essere vista con sguardo negativo perché presenta riflessi nutrizionali positivi in quanto la composizione di questo tipo di grassi è ricca in acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi di cui ben si conosce l'azione benefica nel contrastare le cosiddette malattie del benessere, contribuendo ad abbassare i livelli di colesterolo nel sangue e riducendo il rischio di alterosclerosi e di cardiopatie. È da sottolineare l'elevato contenuto in un acido grasso monoinsaturo, l'acido oleico (di cui è ricco l'olio di oliva), questo acido è in grado di ridurre il colesterolo incidendo solo sul contenuto della frazione lipoproteica Ldl (colesterolo cattivo), mantenendo costante invece la frazione lipoproteica Hdl (colesterolo buono) alla quale si lega il colesterolo che viene portato via dai depositi delle arterie (spazzino del sangue), conferendo a tale prodotto e a tutti

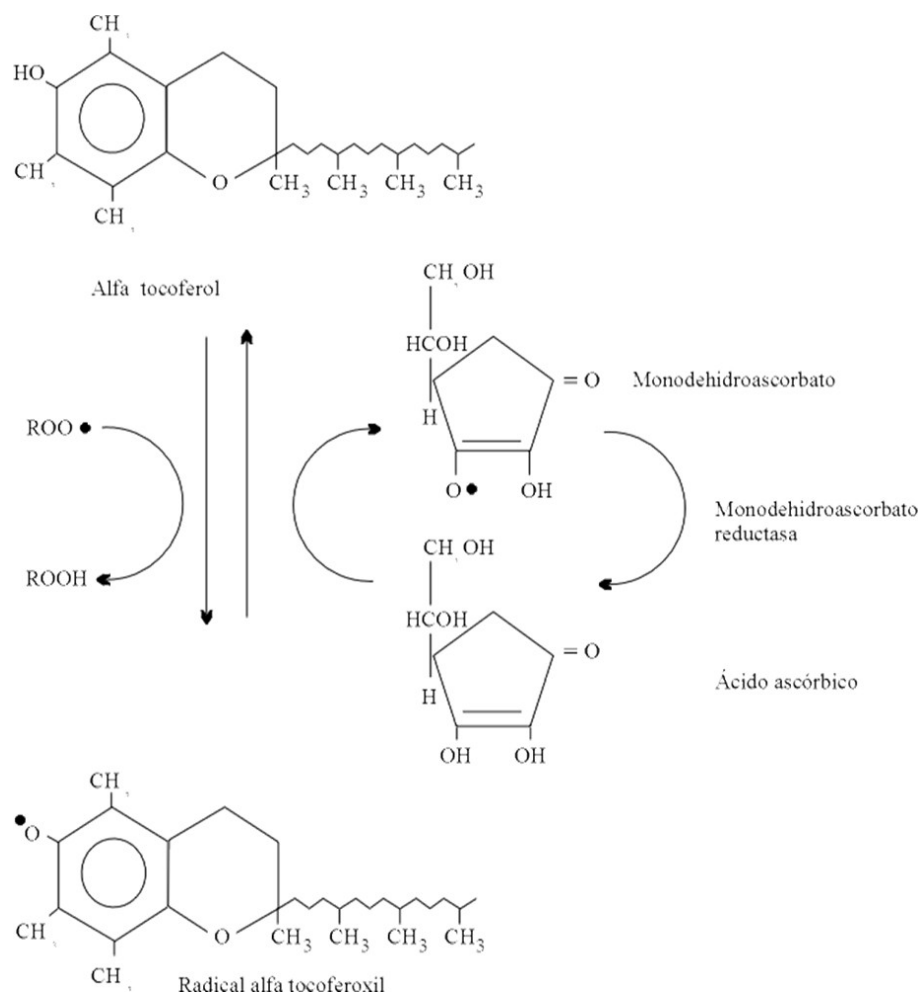
quelli che contengono acido oleico , un'azione protettiva nei riguardi del cuore. Anche gli elementi minerali sono presenti in quantità rilevante, tra questi, in ordine d'importanza quantitativa, il potassio (K), il fosforo (P), il magnesio (Mg), il calcio (Ca) e, a seguire in minore quantità, ferro (Fe), selenio (Se), sodio (Na), zinco (Zg). Nelle mandorle sono presenti anche componenti vitaminici come la vitamina B1 (tiamina); questa si compone di un [anello tiazolico](#) e di uno [pirimidinico](#) uniti tra loro da un [gruppo metilenico](#). È una vitamina idrosolubile che in [acqua](#) forma [soluzioni](#) debolmente acide ([N](#) dell'anello tiazolico è assai elettronegativo per cui forma un legame molto polare che spinge [CH](#) a comportarsi da [acido](#) rilasciando un [protone](#)) e che, in tali condizioni, ha una buona stabilità al [calore](#) ed all'[ossidazione](#), ma si inattiva in tempi rapidi se il [pH](#) è alcalino. In ambiente basico, inoltre, l'aggiunta di ferrocianuro ne determina l'ossidazione a tiocromo, composto fluorescente utile per determinarne la quantità nei campioni. La tiamina, una volta assunta con gli alimenti, si presenta nell'intestino in forma libera o come fosfoestere, nel qual caso viene poi sottoposta a [idrolisi](#) dalle [fosfatasi](#). La forma libera della vitamina viene assorbita da due diversi meccanismi: uno di trasporto attivo saturabile (operante a concentrazioni di tiamina fisiologiche di circa 2 μM) ed uno di trasporto passivo non saturabile (operante a concentrazioni più elevate). I processi di assorbimento avvengono per lo più a livello del [duodeno](#) e diminuiscono lungo l'[intestino tenue](#). Una volta entrata negli [enterociti](#), la tiamina viene liberata nel [plasma](#) o in forma libera o coniugata con un gruppo fosfato (tiamina monofosfato). Una volta arrivata nei tessuti essa viene fosforilata a tiamina difosfato (o pirofosfato), la forma attiva, dalla [tiamina-pirofosfatosintetasi](#). La [tiamina pirofosfato](#) (TPP) è il [coenzima](#) delle [decarbossilasi](#) dei chetoacidi e delle [transchetolasi](#). Essa, infatti, ha un ruolo importante nella decarbossilazione ossidativa del [piruvato](#) e dell' [\$\alpha\$ -chetoglutarato](#) nel [ciclo di Krebs](#) (importante per la formazione di energia metabolica) e nella reazione transchetolasica nel [ciclo dei pentosi fosfato](#) (importante per la produzione di [NADPH](#) e di [ribosio 5-fosfato](#)). Il meccanismo chimico delle reazioni in cui interviene la tiamina prevede la formazione di un [legame covalente](#) tra C:2 dell'anello tiazolico ed il carbonio carbonilico della molecola da trasformare. Successivamente si sviluppa una reazione di decarbossilazione (perdita di [CO₂](#)). La transchetolasi, invece, catalizza il trasferimento di un gruppo aldeidico da un donatore ad un accettore.

Altro nutriente vitaminico di maggior rilievo nella mandorla secca è la vitamina E (detto anche tocoferolo); i tocoferoli presentano tre [centri stereogenici](#) (su C:2, C:4 e C:8); sono composti oleosi, insolubili in [acqua](#) e solubili nei [solventi](#) apolari; sono facilmente degradati dall'[ossigeno](#) e dai [raggi UV](#) e sono abbastanza resistenti al [calore](#).

Essi vengono assorbiti a livello dell'[intestino](#) tenue previa precedente [idrolisi](#), qualora presenti sotto forma di [esteri](#). La buona funzionalità delle vie di [idrolisi](#) ed assorbimento dei [lipidi](#) sono essenziali anche per i tocoferoli in quanto essi vengono inclusi in [micelle](#) formate dagli [acidi biliari](#) e dai prodotti dell'idrolisi lipidica avvenuta per azione del [succo pancreatico](#). Generalmente l'assorbimento dei tocoferoli varia tra il 20 ed il 40% di quello assunto con i cibi. I **tocoferoli** vengono assorbiti dagli [enterociti](#) e vengono poi rilasciati, inglobati nei [chilomicroni](#), nella [circolazione linfatica](#) e da lì rilasciati in quella sistemica. Nel [flusso ematico](#), essi vengono trasportati inclusi nelle [lipoproteine](#). Nel [fegato](#) viene attuata una selezione preferenziale del RRR-tocoferolo che viene incorporato nelle lipoproteine epatiche, mentre gli altri composti con azione vitaminica simile non vengono accettati. Questo processo avviene grazie ad una specifica proteina legante l' α -tocoferolo (α -tocopherolbinding protein: TBP) che lo lega, lo trasporta agli scompartimenti cellulari e ne permette l'inclusione nelle lipoproteine.

Le azioni ed i meccanismi con cui la vitamina E agisce nell'organismo erano quasi del tutto oscuri fino ad un decennio fa.

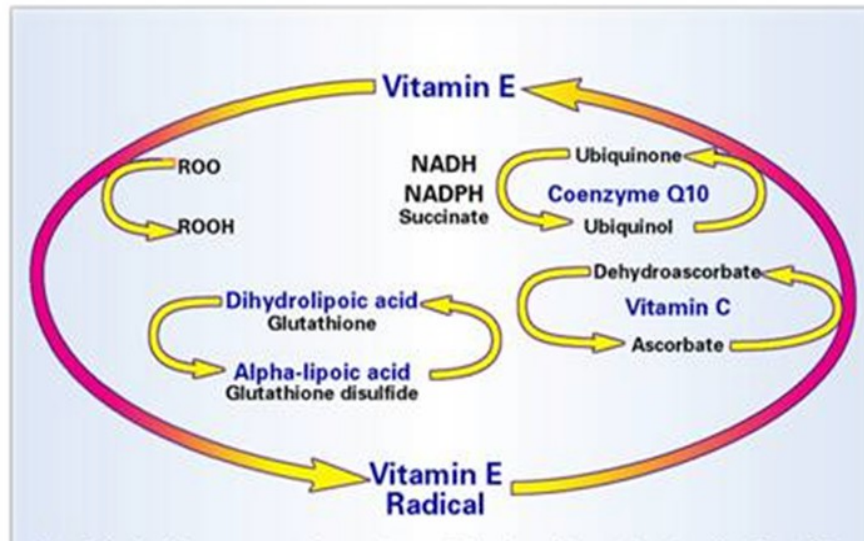
La **vitamina** ha un ruolo importante, in quanto fattore [antiossidante](#), nella prevenzione dell'ossidazione degli [acidi grassi](#) polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di [perossidazione lipidica](#). Tale evento, scatenato dall'azione di [radicali liberi](#), si sviluppa attraverso delle reazioni a catena che continuano il processo. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un [elettrone](#) ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la perossidazione lipidica.



Tale reazione redox trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la [vitamina C](#) o con il [glutazione](#) o con il [coenzima Q10](#) per riformare l' α -tocoferolo. Le azioni ed i meccanismi con cui la vitamina E agisce nell'organismo erano quasi del tutto oscuri fino ad un decennio fa.

La vitamina ha un ruolo importante, quale fattore [antiossidante](#), nella prevenzione dell'ossidazione degli [acidi grassi](#) polinsaturi, evento chiave nello sviluppo del processo di [perossidazione lipidica](#). Tale evento, scatenato dall'azione di [radicali liberi](#), si sviluppa attraverso delle reazioni a catena che continuano il processo. La vitamina E è in grado di bloccare questo fenomeno donando un [elettrone](#) ai radicali perossilipidici, rendendoli in tal modo meno reattivi e bloccando di fatto la perossidazione lipidica. Tale reazione redox (Fig. 26) trasforma la vitamina E in un radicale α -tocoferossilico che è piuttosto stabile, grazie allo sviluppo di fenomeni di risonanza, e che può reagire con la

[vitamina C](#) o con il [glutathione](#) o con il [coenzima Q10](#) per riformare l'α-tocoferolo.



Questo elevato potere antiossidante consente di proteggere dagli effetti negativi conseguenti alla formazione di radicali liberi, quali l'invecchiamento cellulare, varie forme di tumore e le malattie cardiovascolari. A tal riguardo è di rilievo la presenza del betasitosterolo, un fitosterolo che compete con l'assorbimento del colesterolo della dieta.

Diversi medici e analisti, facendo una panoramica dei valori nutrizionali della mandorla, sono in grado di elencare precisamente i quantitativi di ogni costituente ed in particolare, in 100 g di mandorle secche, troviamo:

Contenuto dei principali costituenti:

Calorie (575 kcal), Grassi (49.42 g), Carboidrati (21.67 g), Proteine: (21.22 g), Fibre (12.2 g), Zuccheri (3.89 g), Acqua (4.7 g), Amido (0.74 g), Ceneri (2.99 g).

Contenuto in Minerali:

Calcio (264 mg), Sodio (1 mg), Fosforo (484 mg), Potassio (705 mg), Ferro (3.72 mg), Magnesio (268 mg), Zinco (3.08 mg), Rame (0.996 mg), Manganese (2.285 mg), Selenio (2.5 mcg).

Contenuto in Vitamine:

Retinolo (0 mcg), Betaina (0.5 mg), Vitamina A, IU (1 IU), Vitamina A, RAE (0 mcg), Tiamina (0.211 mg), Riboflavina (1.014 mg), Niacina (3.385 mg), Acido Pantotenico (0.469 mg), Piridossina (0.143 mg), Acido folico (0 mcg), Folato alimentare (50 mcg), Folato DFE (50 mcg), Folati, totali (50 mcg), Cobalamina (0 mcg), Vitamina B-12 (0 mcg), Acido ascorbico (0 mg), Alpha-tocoferolo (26.22 mg), Vitamina E, aggiunta(0 mg), Fillochinone (0 mcg), Colina totale (52.1 mg), Carotene-beta (1 mcg), Luteina + zeaxantina (1 mcg), Tocoferolo beta (0.29 mg) Tocoferolo gamma (0.65 mg), Tocoferolo delta (0.05 mg).

Contenuto in grassi:

Acidi grassi monoinsaturi: (30.889 g), Acidi grassi polinsaturi (12.07 g), Acidi grassi saturi (3.731 g), Acidi grassi trans (0.017 g), Acidi grassi trans-monoenoici (0.012 g), Acidi grassi trans-polienoico (0.005 g), Beta-sistosterolo (132 mg), Campesterolo (5 mg), Colesterolo (0 mg), Stigmasterolo (4 mg).

Contenuto in amminoacidi:

Acido aspartico (2.911 g), Acido glutammico (6.81 g), Alanina (1.027 g), Arginina (2.446 g), Cisteina (0.189 g), Fenilalanina (1.12 g), Glicina (1.469 g), Isoleucina (0.702 g), Istidina (0.557 g), Leucina (1.488 g), Lisina (0.58 g), Metionina (0.151 g), Prolina (1.032 g), Serina (0.948 g), Tirosina (0.452 g), Treonina (0.598 g), Triptofano (0.214 g), Valina (0.817 g).

Contenuto in zuccheri:

Destrosio (0.12 g), Fruttosio (0.09 g), Galattosio (0.05 g), Lattosio (0 g), Maltosio (0.04 g), Saccarosio (3.6 g).

Contenuto di grassi monoinsaturi:

14:1 (0 g), 15:1 (0 g), 16:1 c (0.231 g), 16:1 indifferenziato (0.243 g), 16:1 t (0.012 g), 17:1 (0.025 g), 18:1 c (30.611 g), 18:1 indifferenziato (30.611 g), 18:1 t (0 g), 20:1 (0.01 g), 22:1 indifferenziato (0 g), 24:1 c (0 g).

Contenuto di grassi saturi:

4:0 (0 g), 6:0 (0 g), 8:0 (0 g), 10:0 (0 g), 12:0 (0 g), 13:0 (0 g), 14:0 (0.006 g), 15:0 (0 g), 16:0 (3.044 g), 17:0 (0.007 g), 18:0 (0.658 g), 20:0 (0.013 g), 22:0 (0.002 g), 24:0 (0 g).

Contenuto di grassi polinsaturi:

18:2 CLA (0.001 g), 18:2 indifferenziato (12.061 g), 18:2 n-6 c,c (12.055 g), 18:2 indifferenziato (0.005 g), 18:3 indifferenziato (0.006 g), 18:3 n-3 c,c,c (0.006 g), 18:3 n-6 c,c,c (0 g), 18:4 (0 g), 20:2 n-6 c,c (0.004 g), 20:3 indifferenziato (0 g), 20:4 indifferenziato (0 g), 20:5 n-3 (0 g), 22:5 n-3 (0 g), 22:6 n-3 (0 g).

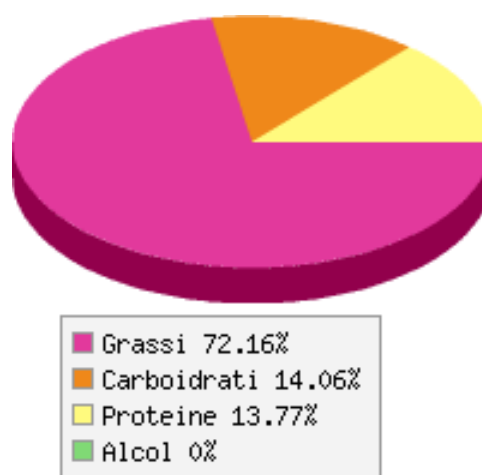


Figura 3 Composizione chimica delle Mandorle

Gli esperti di dietetica, dopo diversi studi, hanno dimostrato che per assumere le sostanze nutritive e le calorie necessarie, consigliano di mangiare ogni giorno una varietà degli alimenti inclusi nella guida piramidale U.S. Food Guide Pyramid. La frutta secca, tra cui le mandorle, appartengono al gruppo delle carni, pollame, pesce, legumi. Il numero di porzioni consigliate per gli alimenti di questo gruppo è 2-3 al giorno. Inoltre, i risultati di numerose ricerche e studi epidemiologici hanno spinto nel 2004 la US Food and Drug Administration per la prima volta nel settore dei cibi a stabilire che le mandorle possono fregiarsi di questo claim nutrizionale "Ricerche approfondite ma non conclusive, dimostrano che mangiare mandorle in un consumo razionale, come parte di una dieta con pochi grassi saturi e colesterolo, nell'abito una dieta che non preveda l'aumento globale delle calorie, può ridurre il rischio di malattie coronariche e il

miglioramento dell'attività antiossidante dell'organismo".

Tra tutti gli alimenti, le mandorle, insieme ad altre specie di frutti oleosi, sono state tradizionalmente associate alla dieta mediterranea. Nell'organismo umano, l'autossidazione degli acidi grassi polinsaturi è un meccanismo associato a diversi effetti negativi quali i danni cellulari, l'invecchiamento cellulare, lo sviluppo di malattie cardiache e tumori, sminuendo quindi anche il valore commerciale dell'alimento. È per tale motivo che gli antiossidanti hanno già da tempo giocato un ruolo di preminente importanza nella commercializzazione di prodotti alimentari sia per aumentare la shelf-life sia per ridurre gli sprechi e le perdite nutrizionali inibendo e ritardando l'ossidazione (Baino et al., 2005); in particolare gli antiossidanti naturali stanno via via sostituendo l'uso di antiossidanti sintetici come butilidrossianisolo, additivo naturale noto anche con le sigle BHA o E320, ed il butilidrossitoluene, fenolo alchilato noto anche con la sigla BHT, di cui si pensa abbiano un potere cancerogeno. I composti fenolici degli organismi vegetali, possono agire come agenti riducenti (terminatori di radicali liberi), da chelanti di metalli e inibitori dell'azione dell'ossigeno singoletto.

In particolare, la composizione chimica della mandorla, che caratterizza i fattori nutrizionali e gli eventuali fattori anti nutrizionali, è stata ed è oggetto di numerosi studi (Begona et al.,2010;Gary et al., 2000; Ali et al., 2010; Joao et al. 2008; Mandalari et al., 2010).

Gli studi di caratterizzazione della componente chimica e antiossidante sono state svolte principalmente su cultivars starniere, come le californiane, le spagnole e le siriane, pochissimi lavori sono stati eseguiti su quelle siciliane.

Nel 2010, Mandalari et al., affermano che un regolare consumo di mandorle intere, in dosi moderate, riduce il livello di glicemia postprandiale, di insulinemia e il danno ossidativo delle proteine nei soggetti sani. Tali effetti salutari sono stati attribuiti, oltre che al profilo lipidico e di altre componenti caratteristiche di questi prodotti, alla presenza di composti fenolici antiossidanti. Soprattutto, nella buccia delle mandorle sono stati trovati determinati polifenoli i quali agiscono, sinergicamente con le vitamine C ed E, per proteggere il colesterolo LDL dall'ossidazione e per aumentare la difesa antiossidante, generando di conseguenza una riduzione del rischio di cancro e di malattie cardiovascolari. I composti fenolici presenti nella buccia delle mandorle comprendono sia polimeri a basso peso molecolare che ad alto peso molecolare; le differenti strutture

identificate corrispondono ad acidi e aldeidi idrobenzoici, acidi idrossicinnamminici, flavan-3-oli, glicosidi e agliconi flavonoidi e ai conidi idro-flavonoidi; inoltre, riguardo composti fenolici ad alto peso molecolare, sono stati rilevati i tipi A e B di procianidine e propelargonidine. Ancora, un altro studio scientifico, promosso da Sang e dai suoi collaboratori, nel 2010, ha permesso di identificare i costituenti fenolici nelle mandorle e di valutarne il potenziale di attività ossidante; riuscendo a dimostrare la presenza di acido 3-prenyl-4-O- β -glucopyranosyloxy-4-hydroxybenzoic, di catechine e di acido protocatecuico.

In una recensione del 2007 nel giornale di Biochimica Nutrizionale, Chung-Yen et al., spiegano le fasi di un'analisi effettuata da loro stessi sugli effetti dei polifenoli presenti in un estratto di mandorla nell'organismo umano; essi affermano che i polifenoli insieme alla vitamina C o E, consentono di limitare lo sviluppo di malattie cardiache nell'uomo in quanto riducono l'ossidazione di [lipoproteine a bassa densità](#) nel sangue, ossidando loro stessi i radicali liberi capaci di generare questo danno; ciò porta alla conclusione che le persone che conducono una dieta ricca di composti antiossidanti naturali vanno incontro ad una limitazione dello stress ossidativo cellulare, evitando quindi l'eventuale rischio, non ancora del tutto accertato, di antiossidanti sintetici.

Data la necessità di utilizzare moderne tecnologie di trasformazione e nuovi trattamenti di lavorazione dei prodotti alimentari mirati ad una maggiore sicurezza igienico-sanitaria oltre che a bisogni commerciali, quali anche la soddisfazione del consumatore, risulta necessario esaminare l'effetto di determinate operazioni unitarie, che nel caso delle mandorle riguardano principalmente basate un aumento della temperatura, su questi benefici costituenti. Bradley et al., (2010), mostrano l'influenza della torrefazione e della pastorizzazione sui composti fenolici delle mandorle; sperimentalmente è, infatti, provato che i trattamenti termici a caldo alterano il contenuto di polifenoli e antiossidanti della buccia della mandorla: in particolare, dopo torrefazione, i fenoli totali e il potere dell'attività antiossidante totale si riduce di circa il 30% mentre la quantità degli acidi flavonoidi e degli acidi fenolici rimane costante; dopo pastorizzazione, invece, questi tre valori non variano significativamente. Al contrario, durante lo stoccaggio per un periodo di 15 mesi, a temperature comprese tra 4° e 23°C e in assenza di luce, si osserva quasi un raddoppio della quantità di fenoli totali, di acidi flavonoidi e fenolici e del potere antiossidante totale. Tuttavia ulteriori studi sono necessari per comprendere

meglio i meccanismi fisici e/o biochimici di queste modifiche.

Negli ultimi anni l'interesse di molti ricercatori per i polifenoli si è rivolto, oltre che sull'analisi dell'aspetto quantitativo e della loro azione benefica, anche sull'identificazione qualitativa di tali componenti.

Mandalari et al., (2010), sulla base di tutti gli effetti benefici per la salute umana associati al consumo delle mandorle, pubblicano un loro studio per l'analisi delle principali componenti sulla comparazione tra la polvere di buccia di mandorle fresche, prima congelata e successivamente scongelata per l'uso, e polvere di buccia di mandorle scottate.

Dalle analisi eseguite si è potuto constatare che non ci sono differenze nella distribuzione dei composti fenolici della parete cellulare dei due campioni. In effetti, una volta illuminati il campione di polvere di buccia di mandorle scongelate e quello di buccia di mandorle sbollentate con luce UV, veniva emessa una luce fluorescente dai fenoli all'interno della parete delle cellule dello sclerenchima, all'interno delle cellule dello xilema, e dalla cuticola sovrastante le cellule dei granuli di aleurone. Riguardo, invece, la biodisponibilità dei flavonoidi e di altri composti antiossidanti, è certo che il processo di scottatura rimuove molti dei composti antiossidanti; infatti, il contenuto dei fenoli totali, espresso in milligrammi di acido gallico equivalente (GAE), per 100g di bucce di mandorle fresche è 3474.1 ± 239.8 e per 100g di bucce di mandorle scottate è 278.9 ± 12.0 ; questi dati dimostrano la sostanziale perdita dei composti fenolici nelle mandorle sbucciate dopo scottamento. Dei due campioni sono stati successivamente identificati 21 flavonoidi e cioè: acido protocatecuico, acido p-idrossibenzoico, catechine, acido clorogenico, acido vanillico, epicatechine, acido trans-p-cumarico, eriodictiolo-7-O-glucoside, quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside, naringenin-7-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, eriodictiolo, quercetina, naringenina, kaempferolo, isoramnetina.

Il presente studio ha dimostrato ancora una volta che le bucce di mandorle contengono quantità significative di composti fenolici e flavonoidi potenzialmente biodisponibili per l'assorbimento nel tratto gastro-intestinale. Alla luce di tutti questi studi, diversi studiosi si sono interessati all'approfondimento delle conoscenze sulla mandorla con lo scopo di generare non solo mangimi animali ma anche potenziali fonti di antiossidanti per le

applicazioni farmaceutiche e per la realizzazione di cibi funzionali.

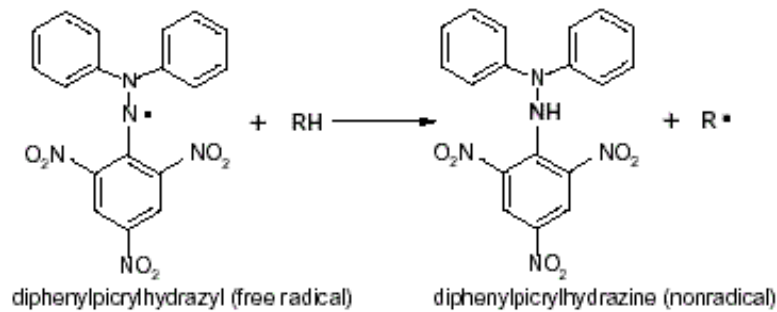
Considerata la discreta adattabilità di questa pianta alle diverse condizioni di crescita e, considerate le caratteristiche chimico-fisiche del frutto del mandorlo, che consentono svariati usi nel settore alimentare oltre ad un vantaggioso e salutare consumo per l'organismo umano, la mandorla rappresenta sicuramente uno dei punti forza dell'economia dei diversi paesi produttori i quali investono sempre più in questo settore.

In Sicilia, per esempio, i dati ISTAT (The National Institute for Statistics) evidenziano che il mandorlo occupa 47.350 ettari di terreno, rappresentando il 60% della superficie mandorlicola italiana. La produzione siciliana ammonta a circa 762.115 ql. in guscio con una plv di circa 115 milioni di euro. Solo la provincia di Agrigento ha una superficie di 14.500 ettari; segue la provincia di Enna con 12.000 ettari, la provincia di Siracusa con 5.400 ettari ed infine le province di Catania – Palermo – Ragusa che complessivamente ammontano a quasi 2.500 ettari. Questa realtà, però, si trova a fare i conti con aspetti tecnici agronomici; il mercato italiano infatti è attualmente scavalcato da altri paesi, come la California e il Portogallo dove sono state introdotte nuove tecnologie nel sistema produttivo, non altrettanto compatibili con la situazione strutturale ed infrastrutturale delle aziende mandorlicole siciliane, creando così una vera e propria presa di posizione a livello mondiale.

Tuttavia, se da un lato il commercio mondiale impone l'attuazione di tecniche moderne che si adattano perfettamente alle esigenze di mercato attuale, dall'altro gli studi scientifici tengono conto di tutte le cultivar, esaltandone le caratteristiche tipiche di ognuna, strettamente legate all'ambiente di crescita.

In un articolo de il Food and Chemical Toxicology, pubblicato il 27 February 2008, João C.M. Barreiraa et al., scrivono riguardo uno studio realizzato in Portogallo e incentrato sulle possibili variazioni della proprietà antiossidante di ben 8 cultivar (Casanova, Duro Italiano, Molar, Orelha de Mula e Pegarinhos), supponendo che queste siano correlate alle differenti zone di produzione. Le analisi sono state svolte secondo alcuni metodi chimici e biochimici; tra questi una tecnica molto diffusa per la determinazione della capacità antiossidante, prevede di generare un catione radicale cromoforo stabile, come il DPPH (difenilpicrilidrazile), e di valutare poi la capacità dell'antiossidante in base alla diminuzione di assorbanza che si osserva in seguito alla cattura del radicale; la reazione che avviene è la donazione di un idrogeno dall'antiossidante (RH) al

DPPH:



Il radicale R che viene generato subisce poi altre reazioni, che determinano il numero di molecole di DPPH ridotte da ogni molecola di antiossidante.

Altre tecniche utilizzate per questo studio sono: la quantificazione di TBARS-tiobarbiturico sostanze reattive acido - sono formati come sottoprodotto di [perossidazione lipidica](#) (cioè come prodotti di degradazione di grassi), attraverso l'uso di [acido tiobarbiturico](#) come reagente; l'utilizzo di AAPH, composto idrosolubile capace di generare radicali liberi, infatti, la scomposizione di AAPH produce azoto molecolare e due radicali di carbonio, questi ultimi possono combinarsi per produrre composti stabili o reagire con l'ossigeno molecolare per dare radicali perossidi.

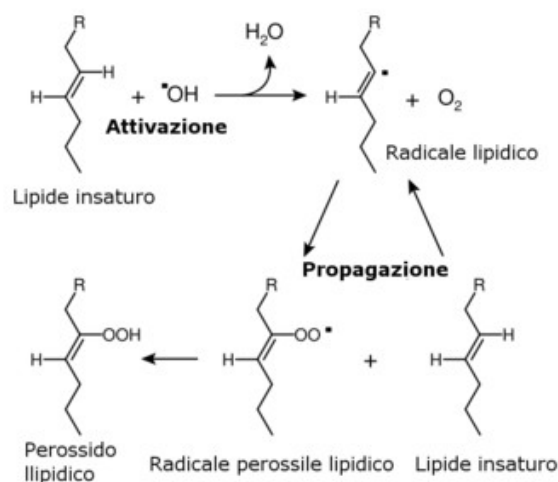
Dai risultati ottenuti si nota come le differenze tra le diverse cultivar siano state complessivamente ridotte, variando infatti da 7.53 ± 0.66 a 13.59 ± 0.98 ; questi risultati possono essere considerati buoni dato che si parla di prodotti ad alta percentuale lipidica e pertanto non solubili in solventi polari.

Tuttavia è possibile osservare qualche differenza, guardando la riproducibilità dei risultati stessi (ad esempio CV = 5.53% in Molar cultivar; CV = 24.17% per Pegarinhos). Nonostante i bassi valori ottenuti per le rese di estrazione, è stato trovato un buon contenuto in antiossidanti, dimostrando quindi l'efficienza dell'estrazione, soprattutto per Duro Italiano, Ferraduel e Ferrastar cvs (>10%). Da una panoramica dei valori ottenuti, si è constatato che la Duro Italiano cv. presenta la più alta concentrazione di fenoli (163.71 ± 3.04 mg/g). contro la più bassa della Pegarinhos (twin seeds) cv. (9.22 ± 1.04 mg/g); Pegarinhos cv. ha mostrato la più alta concentrazione di flavonoidi mentre Ferraduel cv. la più bassa (6.24 ± 1.36 mg/g).

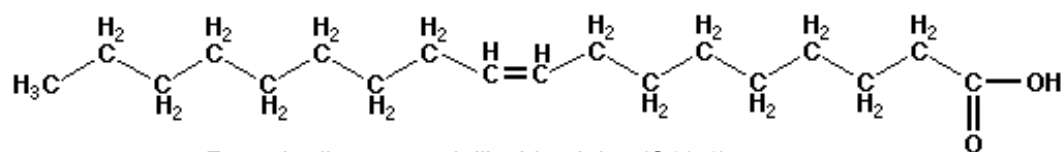
Se da un lato questi tipi di studi analitici consentono di approfondire le

conoscenze delle diverse cultivar, dall'altro mirano a rilanciare sul piano della qualità quelle cultivar ancora legate ai tradizionali schemi produttivi e commerciali, come le pregiate cultivar siciliane che attualmente risentono molto della concorrenza californiana e spagnola. In funzione a queste considerazioni, parte della ricerca durante il lavoro di Dottorato è stata orientata alla caratterizzazione chimica e nutrizionale della mandorle siciliane a confronto con quelle californiane e spagnole.

La tipicità della frutta secca nazionale è stata valorizzata con il conseguimento di marchi riconosciuti a livello europeo come la Denominazione di Origine Protetta (DOP) ed Indicazione Geografica Protetta (IGP), tra cui la Mandorla di Agrigento che insieme alla Mandorla di Avola sono nella fase di istruttoria per la certificazione DOP. Requisito fondamentale che consente di garantire le caratteristiche organolettiche del prodotto è sicuramente la freschezza. Infatti, i **grassi polinsaturi** presenti nella frutta secca oleosa vanno facilmente incontro a processi ossidativi di irrancidimento provocando un decadimento del sapore; le modificazioni chimiche degli acidi grassi avvengono tramite [meccanismo radicalico](#) che implica l'azione prolungata dell'[ossigeno](#). L'idrolisi scinde le catene di acidi grassi dallo scheletro di [glicerolo](#); questi acidi grassi liberi possono andare incontro ad una ulteriore auto-ossidazione, attraverso un processo mediato da [radicali liberi](#). Questo processo può dare luogo a molecole molto reattive chimicamente (radicali liberi a loro volta) che possono generare quegli odori e sapori alterati e fastidiosi comunemente associati ai cibi ed agli [oli](#) definiti irranciditi. Il deterioramento qualitativo del cibo viene provocato dalla produzione di acidi grassi a catena più corta, quali l'[acido propionico](#) e l'[acido butirrico](#), che conferiscono odore e gusto molto sgradevoli. Questi processi chimici possono anche distruggere i [nutrienti](#) contenuti negli alimenti. Sotto determinate condizioni, l'irrancidimento e la distruzione di [vitamine](#), ad esempio, può avvenire molto rapidamente.



La frazione lipidica rappresenta la componente principale delle mandorle, ed è, pertanto la frazione più significativa da un punto di vista nutrizionale e calorico. Essa



Formula di struttura dell'acido oleico (C18:1)

//

è costituita principalmente da acidi grassi essenziali, come l'acido linoleico e da acidi grassi monoinsaturi, come l'acido oleico, il cui ruolo cruciale nella dieta umana è ben noto e studiato da tempo. La somma delle quantità di acido linoleico e di acido oleico raggiunge una percentuale pari al 90% del contenuto totale in lipidi. La frazione rimanente è costituita da acido stearico, palmitico e palmitoleico. Un carattere estremamente favorevole da un punto di vista nutrizionale, consiste nell'elevato grado di insaturazione (rapporto acidi grassi insaturi - acidi grassi saturi) i cui valori sono generalmente superiori a dieci. Questo parametro colloca le mandorle tra gli alimenti la cui composizione in acidi grassi meglio si adatta alle funzioni strutturali che da tali molecole devono essere assolte nell'organismo umano. L'elevato contenuto in acido oleico (71% della frazione lipidica totale), consente di accostare le mandorle all'olio di oliva (che ne contiene in genere il 75% del totale), le cui caratteristiche salutistiche sono note da anni.

Purtroppo questo contenuto in acidi grassi oltre ad essere associato a

un'azione benefica è associato anche a dei problemi di conservazione delle mandorle e della frutta secca in generale.

Le mandorle, ed il kernel principalmente, sono costituite da trigliceridi e acidi grassi polinsaturi, per questo vanno incontro a fenomeni di irrancidimento ossidativo e idrolitico (Watkins, 2005). In un lavoro di Buranasompob, et al., (2007) si è ipotizzato che un breve trattamento termico potesse inattivare la lipossigenasi (LOX) o gli ezimi lipatici così da estendere la shelf-life delle mandorle.

La LOX, come visto precedentemente, è un enzima endogeno presente in tante varietà di vegetali particolarmente in legumi, fagioli, piselli, nocciole (Whitaker, 1991). LOX (EC1.13.11.12 linoleato: ossigeno ossidoriduttasi) che catalizza l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi contenente unità cis,cis 1-4 pentadiene (Robinson, 1995).

Il meccanismo di azione della LOX è stato studiato da diversi autori in diverse matrici vegetali e anche nel lavoro del dottorato nella parte riguardante i fichi d'india.

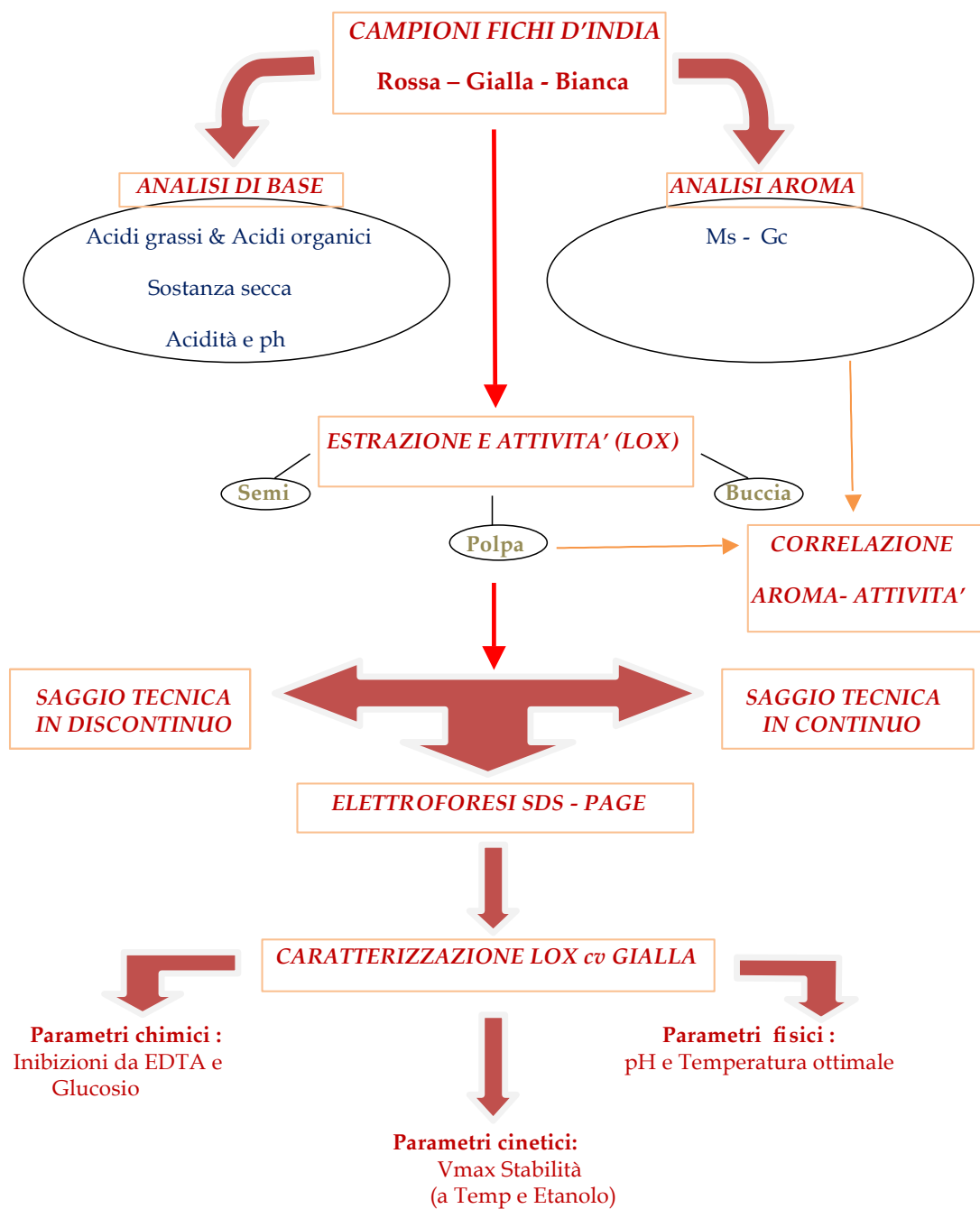
Zacheo et al., (2000) ha riportato che l'attività della LOX nell'estratto di mandorla diminuisce dopo 10 minuti a 80°C.

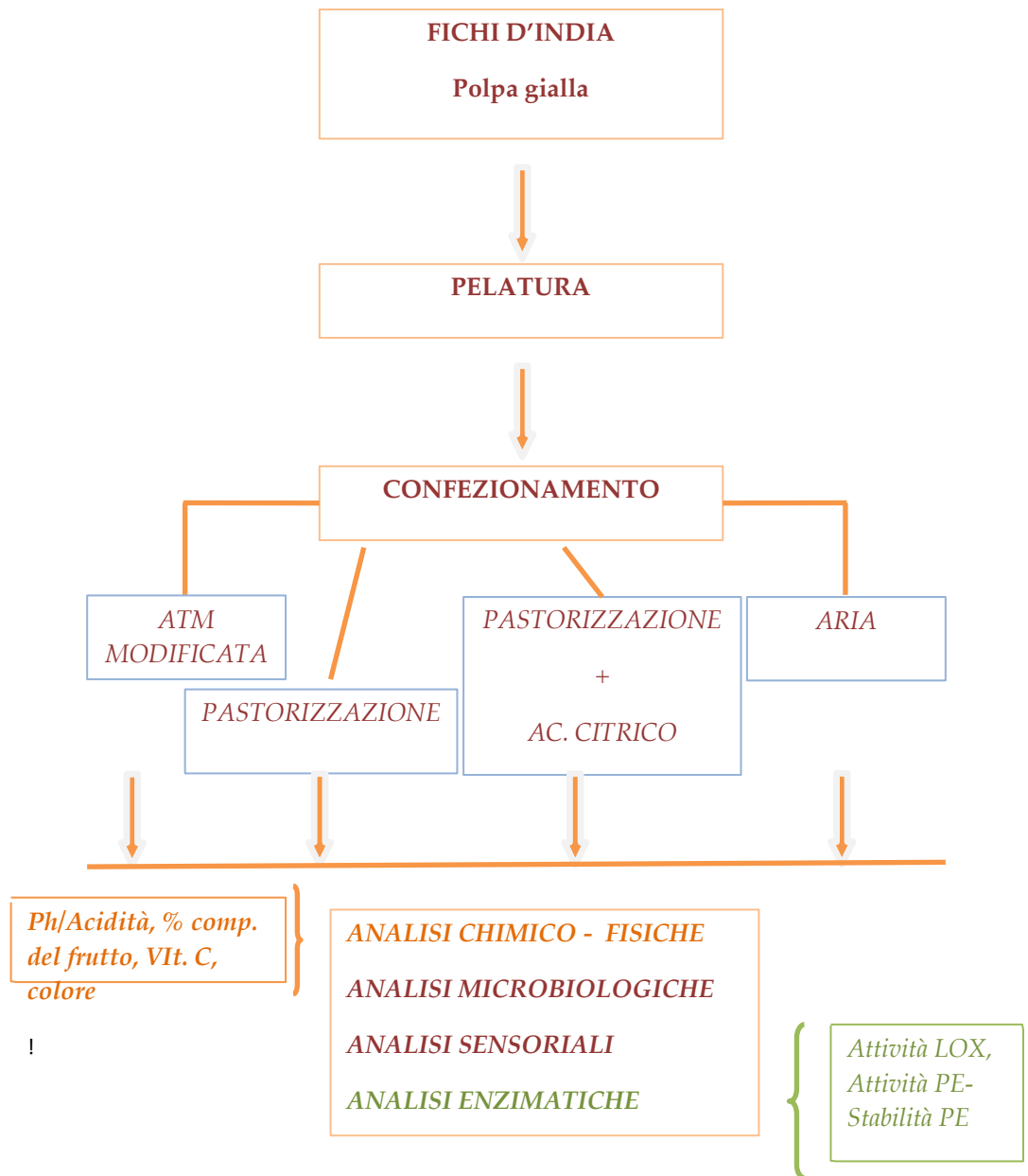
Nel lavoro di Buranasompob et al., (2007) è stata valutata l'attività della LOX nella mandorle a temperature e tempi diversi.

Un breve trattamento termico (55 °C per 2 minuti) permette di inattivare l'enzima nelle mandorle e quindi ritardare l'irrancidimento ossidativo durante lo stoccaggio e la distribuzione, ottenendo una maggiore shelf-life del prodotto.

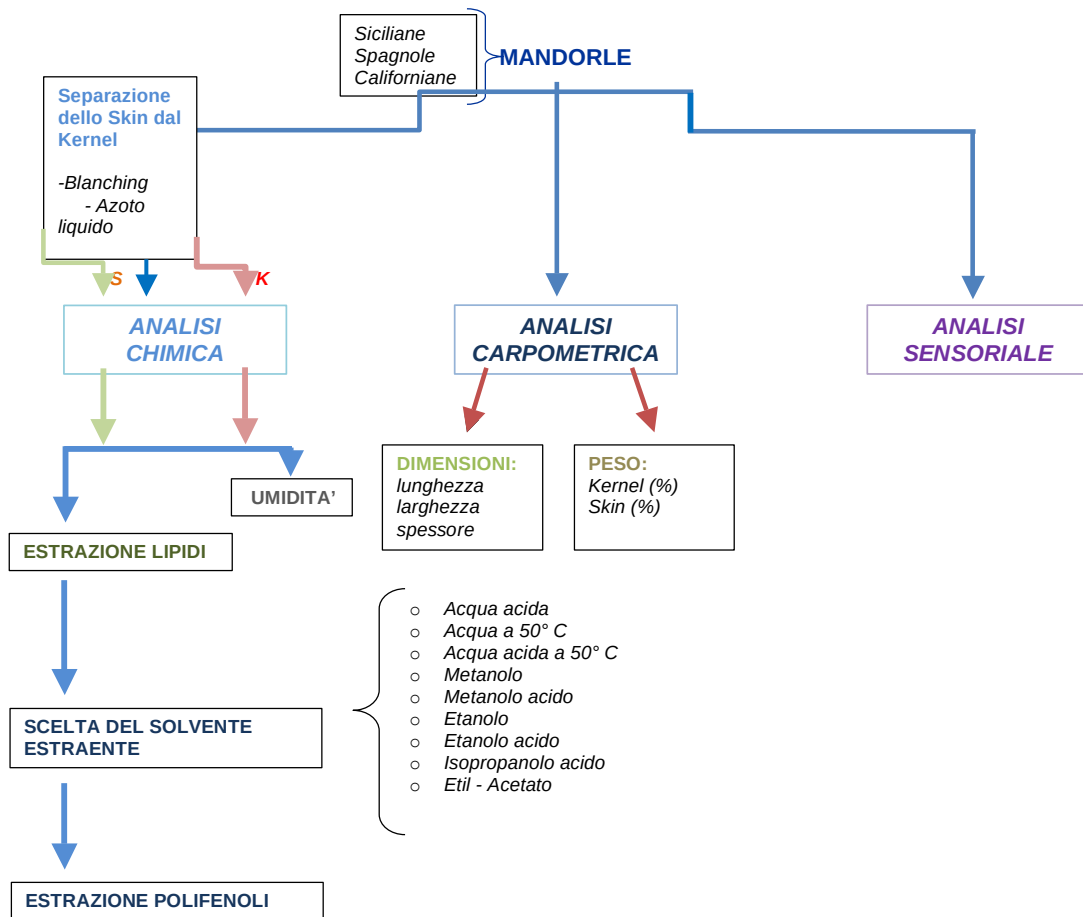
Inoltre riportando i risultati ottenuti dal lavoro del fico d'india e da altri lavori, l'inattivazione della LOX permetterebbe di interrompere la formazione di off-flavours.

5. Articolazione della Ricerca
Fico d'india





Mandorle



6. Risultati e Conclusioni

Tutti i risultati sono stati riportati nei lavori in allegato al presente elaborato finale di tesi, alcuni risultati sulle mandorle sono riportate di seguito in quanto facenti parte integrante di un progetto Regionale ancora in corso di svolgimento.

Analisi carpometrica

Dall'analisi Biometrica delle cultivar di mandorle analizzate è stato possibile evidenziare come le cultivar siciliane sono quelle che presentano le maggiori dimensioni del seme rispetto alle cultivar californiane e spagnole, ma una forma, rispetto ad esse, meno regolare.

Nelle tabelle che seguono è possibile consultare i valori e le misure che hanno caratterizzato ogni singola cultivar analizzata, focalizzando l'attenzione sulla lunghezza, sulla larghezza, sullo spessore e sul peso del seme, e poi da quest'ultimo è stata determinata la percentuale di skin e di kernel.

ROMANA									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	25	15	10	1,33	1,24	0,09	92,94	7,60	
2	24	15	10	1,18	1,10	0,08	93,07	7,45	
3	22	16	11	1,25	1,16	0,08	92,96	7,58	
4	28	16	10	1,66	1,53	0,13	91,88	8,84	
5	25	17	10	1,51	1,38	0,12	91,91	8,81	
6	24	14	9	1,04	0,95	0,8	91,55	9,24	
7	25	16	9	1,23	1,12	0,10	91,35	9,47	
8	24	15	9	1,09	1,01	0,7	93,06	7,46	
9	26	15	10	1,36	1,25	0,10	92,14	8,53	
10	27	16	11	1,41	1,29	0,11	91,50	9,29	
11	22	14	10	1	0,92	0,07	92,33	8,31	
12	25	16	10	1,56	1,46	0,09	93,63	6,81	
13	20	14	12	1,12	1,04	0,07	93,06	7,45	
14	24	16	9	1,18	1,08	0,09	91,80	8,94	
15	21	14	9	0,97	0,91	0,06	93,37	7,10	
16	25	16	10	1,26	1,12	0,14	88,91	12,47	
17*	25	12	11	1,33	1,20	0,12	90,45	10,56	
18*	26	13	14	1,82	1,66	0,16	91,08	9,79	
19*	24	11	12	1,38	1,25	0,13	90,56	10,43	
20*	28	13	14	2,28	2,09	0,18	91,91	8,80	
21*	22	15	14	1,64	1,51	0,12	92,48	8,13	
22*	29	14	14	2,25	2,06	0,19	91,41	9,39	
23*	26	14	13	1,78	1,62	0,16	90,69	10,26	
24*	27	12	13	2,08	1,91	0,17	91,65	9,11	
25*	23	12	13	1,69	1,53	0,16	90,47	10,53	

* semi gemellari

Tabella 4. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Romana

FASCIONELLO									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	27	15	11	1,05	0,97	0,08	92,47	7,53	

2	28	16	10	1,01	0,92	0,09	91,42	8,58
3	30	17	10	1,38	1,29	0,09	93,37	6,63
4	32	19	11	1,75	1,61	0,14	91,99	8,01
5	31	17	9	1,49	1,37	0,12	91,98	8,02
6	27	16	12	1,34	1,22	0,11	91,37	8,63
7	26	15	10	1,26	1,26	0,09	92,43	7,57
8	27	16	10	1,39	1,27	0,11	91,74	8,26
9	25	16	9	1,17	1,07	0,09	91,65	8,35
10	26	14	9	1,23	1,12	0,11	91,62	8,38
11	30	14	11	1,52	1,39	0,13	91,49	8,51
12	27	13	10	1,29	1,19	0,10	92,25	7,75
13	30	14	9	1,44	1,31	0,12	91,39	8,61
14	25	14	10	0,97	0,89	0,07	92,26	7,84
15	32	15	9	1,60	1,46	0,14	91,44	8,56
16	29	15	11	1,40	1,27	0,12	91,17	8,83
17	27	13	10	1,17	1,07	0,09	91,54	8,46
18	25	13	10	1,08	1,00	0,08	92,75	7,25
19	24	13	9	0,93	0,86	0,07	92,21	7,79
20	28	15	9	1,12	1,02	0,10	91,06	8,95
21	26	13	11	1,06	0,98	0,08	91,80	8,20
22	25	13	12	1,17	1,07	0,09	91,77	8,23
23	23	12	10	0,82	0,76	0,06	92,92	7,08
24	25	13	9	0,92	0,85	0,07	92,34	7,66
25	26	14	10	1,20	1,11	0,08	92,94	7,06

Tabella 5. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Fascionello

PIZZUTA								
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)
1	28	17	6	1,43	1,31	0,12	91,74	8,26

2	29	16	6	1,29	1,19	0,10	91,93	8,07
3	29	15	7	1,40	1,29	0,12	91,56	8,44
4	29	15	6	1,40	1,29	0,11	92,00	8,00
5	30	15	6	1,39	1,28	0,11	92,16	7,84
6	28	14	5	1,11	1,01	0,10	91,16	8,84
7	25	12	5	0,8	0,72	0,07	91,09	8,91
8	28	14	6	1,22	1,12	0,09	92,39	7,61
9	28	15	6	1,29	1,17	0,11	91,36	8,64
10	26	14	5	1,04	0,95	0,09	91,03	8,97
11	26	14	6	1,12	1,02	0,09	91,53	8,47
12	27	16	6	1,32	1,20	0,12	90,90	9,10
13	26	13	6	0,93	0,86	0,07	92,71	7,29
14	27	16	6	1,23	1,13	0,10	92,08	7,92
15	31	16	6	1,52	1,40	0,12	91,96	8,04
16	29	16	6	1,42	1,29	0,13	91,00	9,02
17	29	17	6	1,51	1,39	0,12	92,02	7,88
18	30	16	6	1,49	1,38	0,11	92,35	7,62
19	27	14	6	1,16	1,07	0,09	91,50	8,20
20	31	17	6	1,52	1,39	0,13	91,25	8,72
21	29	15	6	1,34	1,22	0,11	91,29	8,71
22	27	15	6	1,11	1,01	0,10	91,10	8,9
23*	26	11	9	1,38	1,22	0,16	88,25	11,75
24*	29	16	8	1,55	1,38	0,17	88,63	11,37
25*	23	14	8	1,12	1,00	0,12	89,28	10,72

* semi gemellari

Tabella 6. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Pizzuta.

FERRAGNES									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	29	17	10	1,91	1,77	0,13	92,90	7,10	
2	29	17	10	1,93	1,78	0,15	92,13	7,87	
3	28	16	8	1,56	1,44	0,11	92,64	7,36	
4	29	16	8	1,72	1,57	0,15	91,34	8,66	
5	29	17	8	1,74	1,59	0,15	91,04	8,96	
6	27	16	7	1,60	1,47	0,13	91,97	8,03	
7	27	16	7	1,53	1,40	0,13	91,41	8,59	
8	29	18	8	1,82	1,68	0,13	92,35	7,65	

9	30	16	8	1,89	1,75	0,15	92,20	7,80
10	27	16	8	1,66	1,54	0,12	92,72	7,28
11	28	15	7	1,59	1,47	0,12	92,37	7,63
12	28	15	7	1,40	1,29	0,11	92,20	7,80
13	31	16	8	1,85	1,70	0,15	91,74	8,26
14	25	15	5	0,79	0,73	0,06	92,21	7,79
15	26	15	8	1,56	1,44	0,12	92,27	7,73
16	24	15	7	1,14	1,03	0,11	90,44	9,56
17	30	16	8	1,87	1,73	0,14	92,41	7,59
18	28	16	6	1,36	1,26	0,10	92,69	7,31
19	28	16	8	1,71	1,58	0,13	92,21	7,79
20	26	15	8	1,55	1,44	0,11	92,55	7,45
21	23	15	7	1,07	0,98	0,09	91,06	8,94
22	25	17	9	1,56	1,44	0,11	92,52	7,48
23	26	15	8	1,49	1,35	0,13	90,67	9,33
24	29	18	9	2,08	1,88	0,19	90,68	9,32
25	26	18	9	2,01	1,83	0,17	91,13	8,87

Tabella 7. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Ferragnes.

TUONO								
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)
1	24	17	8	1,60	1,47	0,13	91,59	8,41
2	25	14	7	1,01	0,92	0,09	91,22	8,78
3	24	15	9	1,40	1,29	0,11	92,45	7,55
4	24	15	9	1,36	1,24	0,11	91,70	8,30
5	25	15	7	1,24	1,13	0,10	91,78	8,22
6	25	14	7	1,35	1,24	0,11	91,93	8,07
7	24	14	8	1,28	1,19	0,09	92,71	7,29
8	23	15	8	1,42	1,31	0,11	92,31	7,69
9	23	14	8	1,16	1,07	0,09	92,36	7,64
10	24	14	8	1,27	1,15	0,12	90,64	9,36
11*	25	14	11	0,94	0,83	0,11	88,66	11,34

12	26	16	10	1,49	1,37	0,12	91,82	8,18
13	23	13	7	1,06	0,98	0,09	91,73	8,27
14	25	16	10	1,53	1,42	0,11	93,02	6,98
15	24	16	9	1,45	1,34	0,11	92,43	7,57
16	24	15	8	1,23	1,13	0,09	92,28	7,72
17	25	15	9	1,36	1,25	0,10	92,30	7,70
18	25	16	8	1,47	1,33	0,13	90,94	9,06
19	24	15	7	1,12	1,01	0,11	90,37	9,63
20	25	14	8	1,39	1,29	0,10	92,65	7,35
21*	24	13	11	1,61	1,43	0,18	88,53	11,47
22*	27	16	13	2,36	2,13	0,23	90,44	9,56
23*	25	18	10	1,80	1,61	0,19	89,40	10,60
24*	23	15	12	1,81	1,61	0,20	88,93	11,07
25*	26	15	12	1,89	1,71	0,18	90,53	9,47

* semi gemellari

Tabella 8. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Tuono.

GENCO									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	23	14	8	1,11	0,99	0,12	89,02	10,98	
2	23	14	8	1,03	0,92	0,11	89,41	10,59	
3	20	13	8	0,92	0,82	0,10	89,49	10,51	
4	19	11	8	0,78	0,70	0,08	90,21	9,79	
5	20	13	7	0,89	0,80	0,10	89,29	10,71	
6	21	13	9	1,04	0,94	0,10	90,07	9,93	
7	21	14	8	0,81	0,72	0,09	89,48	10,52	
8	21	13	9	0,99	0,89	0,10	89,69	10,31	
9	21	13	7	0,83	0,76	0,07	91,97	8,03	
10	23	13	8	1,11	1,00	0,10	90,55	9,45	
11	20	12	7	0,79	0,71	0,08	89,88	10,12	
12	21	13	8	1,00	0,90	0,09	90,66	9,34	
13	19	11,5	7	0,68	0,62	0,06	91,36	8,64	
14	21	13,5	6	0,88	0,80	0,08	90,42	9,58	
15	21	14	8	0,94	0,85	0,09	90,10	9,90	

16	19	11,5	7	0,77	0,70	0,07	90,58	9,42
17	21	12	8	0,97	0,88	0,09	90,90	9,10
18	21	13	8,5	0,99	0,91	0,09	91,27	8,73
19	23	14	7	1,02	0,93	0,09	90,83	9,17
20	19	12	8	0,81	0,74	0,08	90,48	9,52
21	21	13	7,5	0,91	0,83	0,09	90,63	9,37
22	20	14	8	0,88	0,79	0,09	89,57	10,43
23*	21,5	13	10	1,21	1,05	0,16	87,18	12,82
24*	23	15	9	1,20	1,05	0,15	87,72	12,28
25*	21,5	13	11,5	1,35	1,18	0,16	87,94	12,06

* semi gemellari

Tabella 9. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Genco.

VALENCIA									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	23	13	6	0,97	0,91	0,06	94,01	5,99	
2	24	12	7	1,01	0,95	0,06	93,64	6,36	
3	23	13	6,5	1,03	0,96	0,07	92,81	7,19	
4	20	13	6	0,86	0,80	0,07	92,29	7,71	
5	23	11,5	6,5	0,93	0,87	0,06	93,29	6,71	
6	26	12	7,5	1,38	1,30	0,08	94,04	5,96	
7	29	13,5	6	1,54	1,43	0,11	93,01	6,99	
8	23	13	6,5	1,05	0,98	0,07	92,98	7,02	
9	25	16	6	1,08	1,00	0,08	93,01	6,99	
10	25	12	6,5	1,07	1,00	0,07	93,18	6,82	
11	23	12	6	1,02	0,95	0,07	93,08	6,92	
12	26,5	11	6	1,01	0,93	0,07	92,82	7,18	
13	22	12	6,5	0,96	0,90	0,06	93,78	6,22	
14	25	12,5	6	1,04	0,95	0,09	91,55	8,45	
15	24	12,5	5,5	1,12	1,02	0,10	91,48	8,52	
16	25	13,5	7	1,38	1,27	0,11	91,71	8,29	
17	26	14	7	1,37	1,24	0,13	90,51	9,49	
18	20	13	7	0,95	0,88	0,06	93,34	6,66	
19	24	12	6,5	1,03	0,96	0,07	93,67	6,33	

20	25	12	7	1,23	1,16	0,07	94,51	5,49
21	24,5	10	7	0,87	0,81	0,06	93,63	6,37
22	21,5	13,5	6,5	1,00	0,92	0,08	91,54	8,46
23	23	12	7	1,13	1,05	0,08	92,70	7,30
24	21	12	5	0,69	0,63	0,06	91,44	8,56
25	23	12	5,5	0,98	0,91	0,07	92,44	7,56

Tabella 10. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Valencia.

LARGUETA									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	24	13	7	1,09	1,03	0,06	94,43	5,57	
2	24	12	6	1,07	0,99	0,08	92,51	7,49	
3	25	11	6,5	1,06	1,00	0,06	94,14	5,86	
4	26,5	12	7	1,28	1,20	0,08	94,04	5,96	
5	25	13	7	1,27	1,17	0,10	92,25	7,75	
6	27	12	7,5	1,36	1,27	0,09	93,68	6,32	
7	24	11	6,5	0,99	0,92	0,08	92,30	7,70	
8	24	12	6	1,01	0,96	0,06	94,54	5,46	
9	25	12	7,5	1,24	1,17	0,08	93,91	6,09	
10	28,5	12,5	7	1,39	1,30	0,09	93,29	6,71	
11	27	12	7	1,29	1,21	0,07	94,27	5,73	
12	24	12	6	0,90	0,84	0,06	93,35	6,65	
13	24	12	6,5	0,96	0,90	0,06	93,87	6,13	
14	24	12	7	1,02	0,96	0,07	93,65	6,35	
15	25	12,5	7	1,20	1,12	0,08	93,28	6,72	
16	28	12	7	1,18	1,10	0,08	93,17	6,83	
17	26,5	12	6	1,15	1,06	0,09	92,00	8,00	
18	26,5	13	8	1,40	1,32	0,07	94,73	5,27	
19	25	12	6,5	1,13	1,06	0,07	94,05	5,95	
20	24	12	6,5	1,10	1,03	0,07	94,09	5,91	
21	25	12,5	7	1,34	1,27	0,07	95,04	4,96	
22	24	12	6,5	1,11	1,04	0,06	94,28	5,72	

23	23	12,5	7	1,08	1,00	0,08	92,94	7,06
24	24	12	7	1,11	1,04	0,07	93,82	6,18
25	25	12	8	1,37	1,30	0,07	94,77	5,23

Tabella 11. *Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Largueta.*

SONORA									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	27	13	9	1,65	1,56	0,09	94,47	5,53	
2	27	13	8	1,48	1,39	0,09	94,16	5,84	
3	28	12	9	1,56	1,47	0,09	94,26	5,74	
4	28	12	8	1,59	1,49	0,09	94,25	5,75	
5	26	12	6,5	1,31	1,23	0,08	93,97	6,03	
6	27	12,5	8,5	1,75	1,66	0,09	94,91	5,09	
7	28	12	8	1,45	1,36	0,09	93,87	6,13	
8	27	13	8	1,71	1,62	0,09	95,00	5,00	
9	26	12	7,5	1,40	1,33	0,08	94,54	5,46	
10	24	12	6,5	1,20	1,13	0,07	94,15	5,85	
11	27	12,5	7,5	1,50	1,42	0,08	94,67	5,33	
12	27	12	8	1,63	1,54	0,08	94,86	5,14	
13	26,5	12	7	1,39	1,30	0,09	93,47	6,53	
14	27	12,5	7	1,43	1,35	0,08	94,21	5,79	
15	22	11	7	1,06	0,99	0,07	93,68	6,32	
16	28	12	8	1,50	1,41	0,09	94,09	5,91	
17	30	12	9	1,71	1,62	0,09	94,78	5,22	
18	23,5	12	8	1,35	1,27	0,08	94,05	5,95	
19	30	12	7,5	1,73	1,62	0,11	93,70	6,30	
20	26	12	8	1,40	1,32	0,08	94,43	5,57	
21	30	12	8	1,66	1,57	0,09	94,62	5,38	
22	25	12	7	1,38	1,31	0,08	94,57	5,43	
23	26	12	8	1,37	1,30	0,07	94,79	5,21	
24	23	12	6	1,02	0,96	0,06	94,00	6,00	
25	28	13	7	1,50	1,41	0,09	94,05	5,95	

Tabella 12. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Sonora.

CARMEL									
Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Peso kernel (g)	Peso Skin (g)	Kernel (%)	Skin(%)	
1	22,5	10	7	0,86	0,81	0,05	94,16	5,84	
2	22	12	10	1,13	1,05	0,08	92,63	7,37	
3	19	10	9	0,90	0,85	0,05	94,43	5,57	
4	24	11	8,5	1,10	1,04	0,06	94,83	5,17	
5	25	10,5	8	1,05	0,99	0,06	94,65	5,35	
6	19	11	8	0,81	0,77	0,05	94,24	5,76	
7	20	11	8	0,94	0,89	0,05	94,43	5,57	
8	26	11,5	7	1,17	1,08	0,09	92,43	7,57	
9	23	10	6,5	0,97	0,92	0,05	94,40	5,60	
10	23	10	7	0,87	0,81	0,05	94,12	5,88	
11	22	10	7,5	0,89	0,84	0,05	94,33	5,67	
12	22	10	7	0,84	0,79	0,05	94,12	5,88	
13	25	10	7,5	1,01	0,95	0,06	94,42	5,58	
14	22,5	11	7,5	0,89	0,84	0,05	94,14	5,86	
15	25	11	9	1,25	1,15	0,10	92,16	7,84	
16	24	11	7	0,95	0,88	0,07	93,14	6,86	
17	26	11	7	1,06	1,00	0,06	94,48	5,52	
18	23	11	6,5	0,94	0,89	0,05	94,44	5,56	
19	23	11	8	0,99	0,94	0,06	94,38	5,62	
20	26	10	6,5	0,88	0,84	0,04	95,44	4,56	
21	25	11	7,5	1,08	1,00	0,08	92,43	7,57	
22	24	11	8	1,11	0,97	0,14	87,48	12,52	
23	23	11,5	8,5	1,15	1,07	0,08	92,84	7,16	
24	25	11	8	1,15	1,06	0,09	92,25	7,75	
25	24	11	7	0,92	0,85	0,07	92,62	7,38	

Tabella 13. Analisi Carpometrica della cultivar siciliana Carmel.

Campione	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Spessore (mm)	Peso seme (g)	Kernel (%)	Skin(%)
Fascionello	27,7	14,6	10,4	1,23	91,9	8,1
Romana	24,6	14,4	11	1,45	91,8	8,2
Pizzuta	27,8	14,9	6,2	1,2	91,3	8,7
Ferragnes	27,5	16	7,8	1,62	91,9	8,1
Tuono	27,5	14,9	8,9	1,42	91,3	8,7
Genco	24,4	13	8	0,95	89,9	10,1
Carmel	20,9	10,7	7,6	0,99	93,5	6,5
Sonora	23,3	12,1	7,6	1,46	94,3	5,7
Largueta	26,6	12,1	6,8	1,16	93,7	6,3
Valencia	25,1	12,5	6,4	1,06	92,8	7,2
Siciliane	25,4	14,6	8,7	1,3	91,4	8,7
Californiane	24,9	11,4	7,6	1,2	93,9	6,1
Spagnole	24,4	12,3	6,6	1,1	93,3	6,7

Tabella 14. Valori medi dell'analisi Carpometrica per ogni cultivar.

Tra le cultivar siciliane la Genco è quella che possiede mandorle **piccole**, di forma sferoide-amigdaloidale, con sutura ventrale aperta e sutura dorsale rilevata, mentre la Ferragnes è quella che presenta le dimensioni maggiori del seme con un peso medio di 1,62g, contro i 0,95g della cultivar Genco.

La cultivar Sonora è quella che si distingue, per le maggiori dimensioni tra le cultivar californiane, mentre per le cultivar spagnole la Langueta è quella più voluminosa.



Figura 4. Mandorle siciliane a confronto

Di rilevante importanza è sottolineare come le percentuali di Kernel e di Skin dei semi, siano differenti tra le cultivar siciliane e straniere, registrando una maggiore percentuale di Skin tra le cultivar Siciliane, che come sappiamo è la fonte principale dei composti antiossidanti chiamati polifenoli, accostandosi su valori medi di 8,7% per le cultivar siciliane e di 6,1% per quelle californiane.

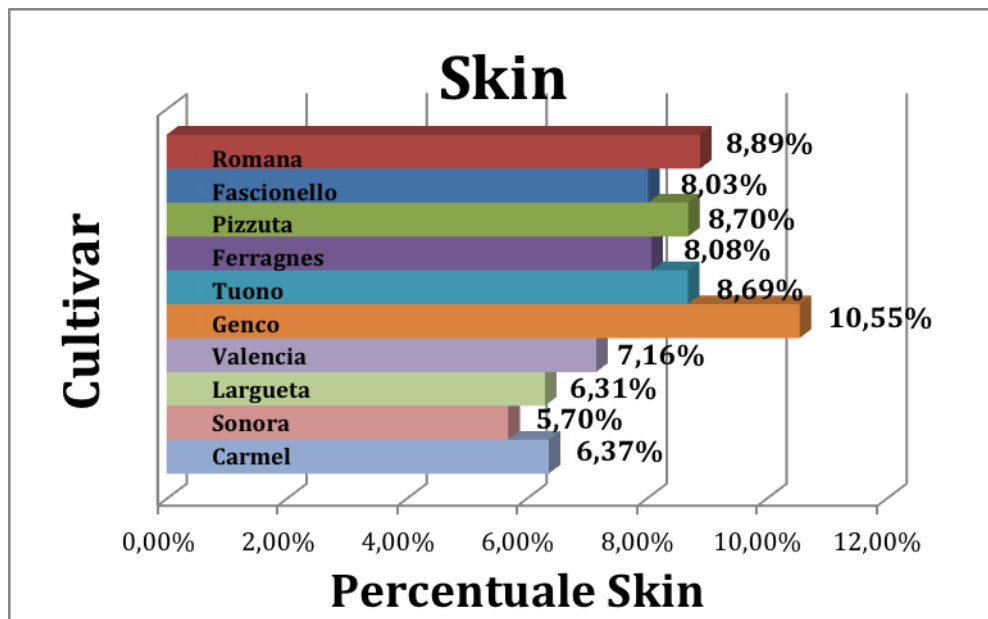


Figura 5. Percentuale di Skin presente nelle diverse cultivar

In alcune cultivar è stato possibile riscontrare con una discreta frequenza la presenza, all'interno dell'endocarpo, di due semi (fenomeno dannoso ai fini commerciali), la cultivar Romana è stata quella che ha presentato il 36% di semi gemellari, a seguire la Tuono con il 24%, la Pizzuta e la Genco con il 12%. Invece le cultivar Fascionello e Ferragnes hanno mostrato l'assenza di semi doppi insieme alle cultivar californiane e spagnole che però ci sono pervenute già in confezioni commercializzate di 500g, quindi è possibile che siano già state private dei semi gemellari.

Contenuto in Lipidi

Il contenuto totale di grassi rilevato in tutte le cultivar di mandorle studiate si aggira intorno al 40% e il 59% (riferito ai campioni tal quale), il che significa che il grasso, è la frazione principale del seme di mandorla.

Le mandorle Valencia di origine spagnola, sono quelle che hanno registrato il più basso contenuto in grasso (40%), seguite dalla cultivar Largueta, che è anch'essa una mandorla spagnola, e dalla cultivar californiana Carmel.

Le mandorle più grasse invece, sono risultate quelle siciliane appartenenti alle cultivar Genco e Tuono, il cui contenuto in grasso ha raggiunto rispettivamente il 59% e il 57%.

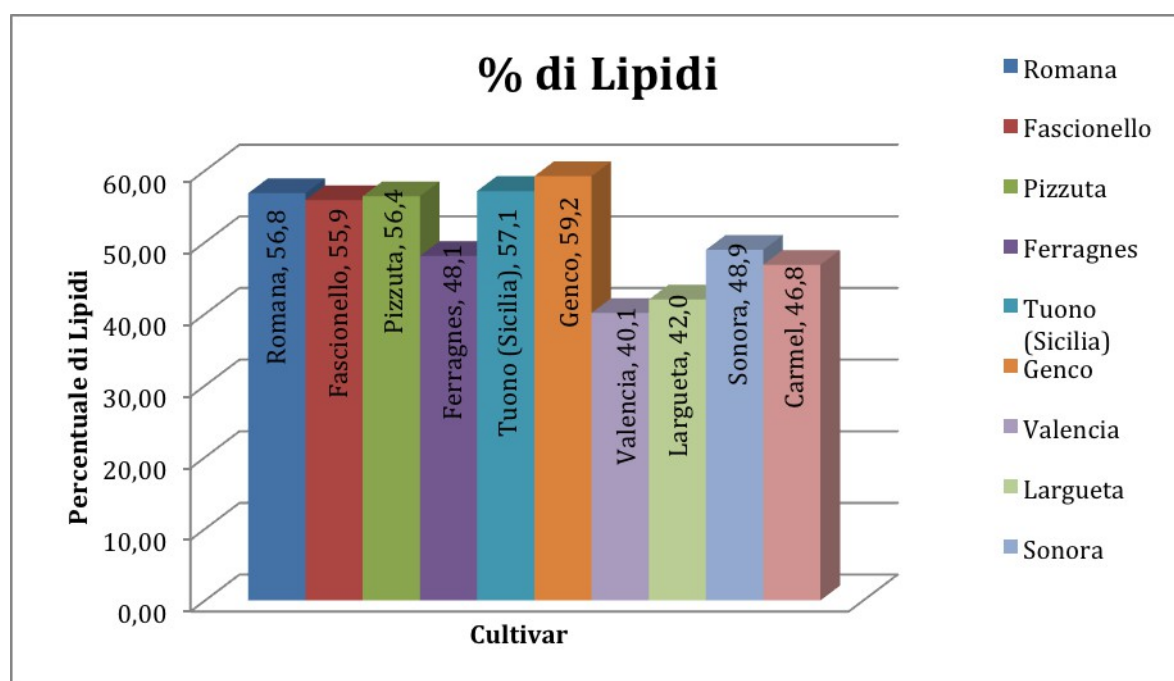


Figura 6. Percentuale di Lipidi nelle diverse cultivar

Le analisi effettuate separatamente tra lo skin e il kernel della mandorla, hanno permesso di evidenziare come la maggior parte del contenuto in lipidi derivi principalmente dal kernel.

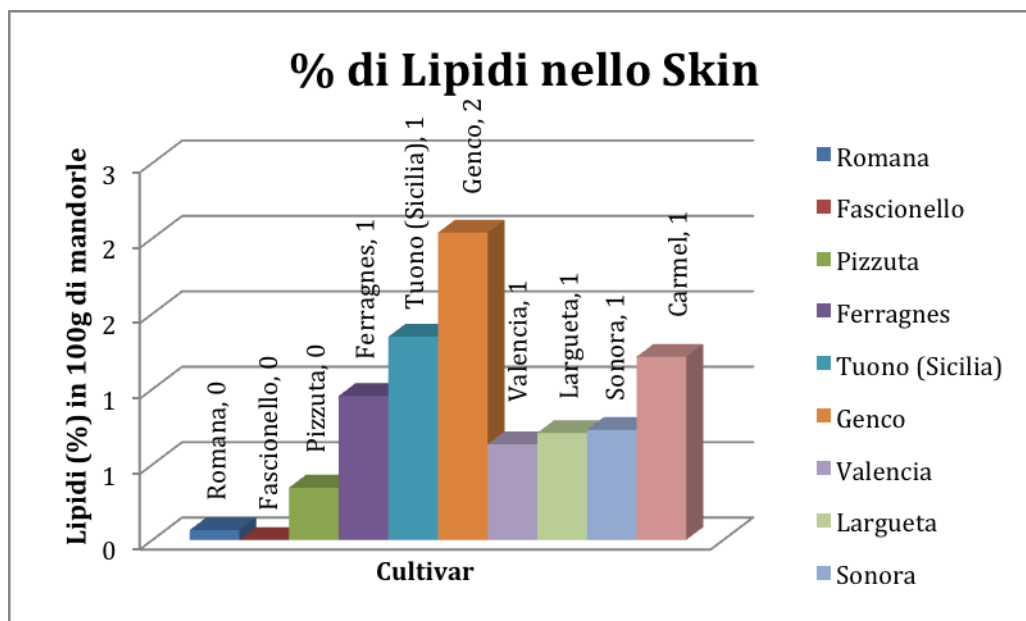


Figura 7. Percentuale di Lipidi nello skin delle diverse cultivar

Nella tabella di seguito illustrata è possibile consultare le quantità di campioni utilizzati e i risultati ottenuti dall'analisi quantitativa della sostanza grassa.

CULTIVAR		PESO CAMPIONE (g)	CAMPIONE SGRASSATO (g)	% GRASSO	% GrassoTotale
Romana	S	0,9999	0,9925	0,74%	56,83%
	K	5,328	2,035	61,81%	
Fascionello	S	1,0053	0,9872	1,80%	55,88%
	K	5,0382	1,9771	60,76%	
Pizzuta	S	1,042	1,0083	3,23%	56,40%
	K	5,0363	1,874	62,79%	
Ferragnes	S	1,417	1,2496	11,81%	48,06%
	K	5,0152	2,4449	51,25%	
Tuono (Sicilia)	S	2,0082	1,6968	15,51%	57,14%
	K	5,1131	1,9891	61,10%	
Genco	S	2,0016	1,6151	19,31%	59,21%
	K	5,012	1,8086	63,91%	
Valencia	S	1,5045	1,3713	8,85%	40,12%
	K	5,0031	2,8754	42,53%	
Largueta	S	1,5028	1,3337	11,25%	41,98%
	K	5,0095	2,8029	44,05%	
Sonora	S	1,4923	1,3091	12,28%	48,93%
	K	5,004	2,4396	51,25%	
Carmel	S	0,5167	0,4182	19,06%	46,85%
	K	5,0022	2,5642	48,74%	

Contenuto in lipidi delle diverse cultivar (S=Skin, K=Kernel).

Contenuto in Polifenoli

La quantità di polifenoli estratti dalle cultivar di mandorle studiate va da un minimo di 1254,9 mg/100g di sostanza secca (SS) fino ad un massimo di 2168,7 mg/100g di sostanza secca.

La tabella di seguito mostra il contenuto totale di polifenoli contenuti nelle diverse cultivar espressi come mg/100g di sostanza secca:

<i>CULTIVAR</i>	<i>Contenuto polifenolicoSkin mg/100 g (S.S.)</i>	<i>Contenuto polifenolicoKernel mg/100 g (S.S.)</i>	<i>Contenuto polifenolico Totale mg/100 g (S.S.)</i>
<i>Romana</i>	1543,84	5,39	1549,24
<i>Fascionello</i>	2136,21	8,75	2144,96
<i>Pizzuta</i>	2161,57	7,13	2168,70
<i>Ferragnes</i>	1672,35	6,30	1678,66
<i>Tuono</i>	2013,00	5,43	2018,43
<i>Genco</i>	1312,84	4,94	1317,79
<i>Valencia</i>	2012,80	9,10	2021,91
<i>Largueta</i>	1247,21	7,69	1254,91
<i>Sonora</i>	1267,27	5,33	1272,60
<i>Carmel</i>	1566,96	6,85	1573,81

Contenuto Polifenolico espresso in mg/100g di Sostanza Secca (SS).

Le mandorle che mostrano un maggior contenuto in polifenoli sono risultate le cultivar siciliane Pizzuta e Fascionello con rispettivamente 2168,7 mg/100g di sostanza secca e 2144,96 mg/100g di sostanza secca e a seguire la cultivar spagnola Valencia con 2021,9 mg/100g di sostanza secca e Tuono, di origine siciliana, con 2018,4 mg/100g di sostanza secca (**Figura 8**).

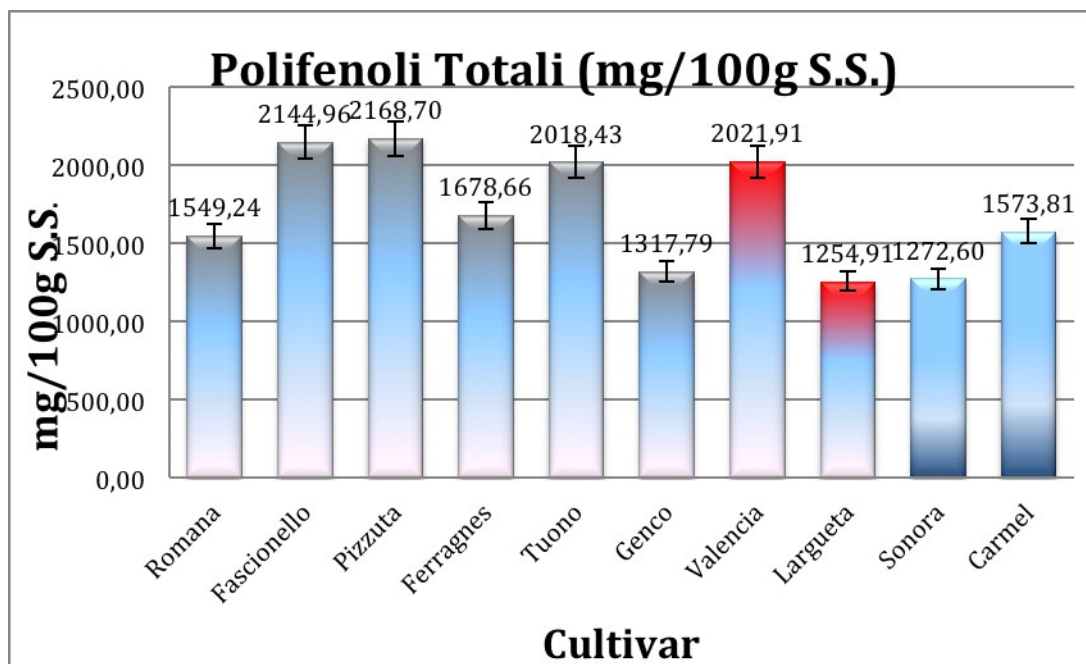


Figura 8. Contenuto totale di polifenoli espresso in mg/100 di S.S.

I risultati sono stati anche espressi riferendo la quantità di polifenoli estratti al campione tal quale, considerando in questo modo anche la quantità di grassi che era stata estratta ai fini delle analisi.

CULTIVAR	Polifenoli (mg/100g) Skin TQ	Polifenoli (mg/100g) Kernel TQ	Polifenoli totali (mg/100g Seme TQ)
Romana	1749,79	5,63	159,61
Fascionello	2448,66	9,19	205,07
Pizzuta	2468,96	7,48	221,53
Ferragnes	1874,63	6,62	157,64
Tuono	2289,84	5,65	204,16
Genco	1452,10	5,13	157,84
Valencia	2280,79	9,65	172,32
Largueta	1445,20	8,17	98,82
Sonora	1380,32	5,67	84,00
Carmel	1790,40	7,18	120,82

Contenuto Polifenolico espresso in mg/100g di Tal Quale (TQ)

In questo caso la quantità di polifenoli estratti risulta sempre maggiormente contenuta nelle cultivar siciliane Pizzuta, Fascionello e Tuono, mentre la quantità più bassa viene registrata per le cultivar straniere Carmel, Largueta e Sonora con un minimo di 84 mg/100g di tal quale per quest'ultima cultivar.

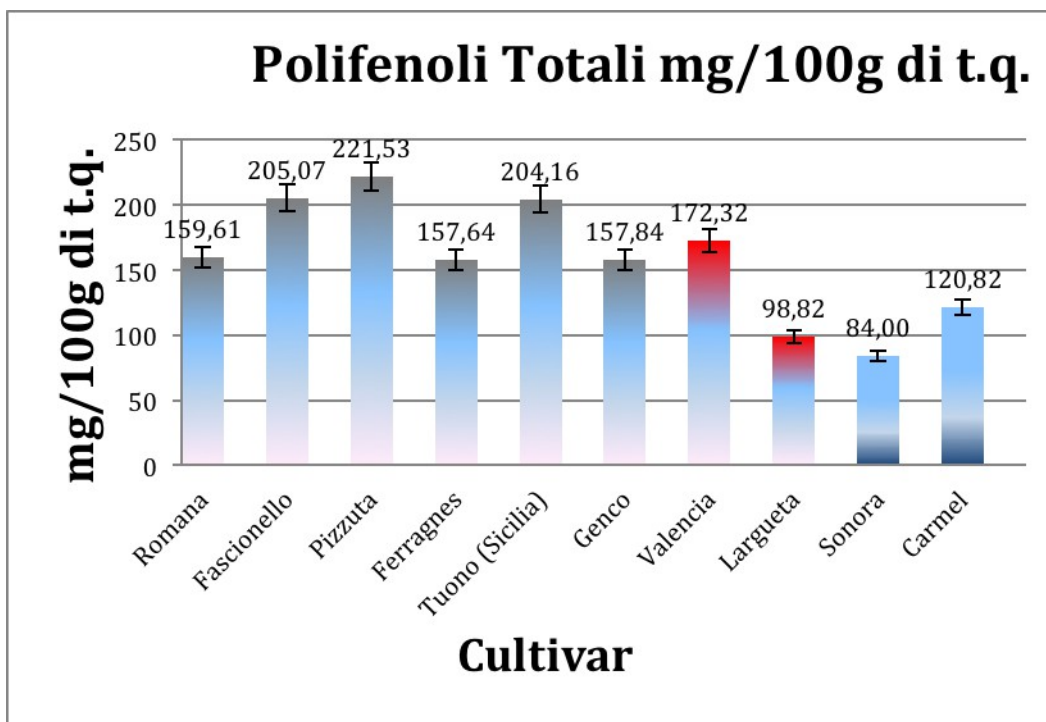


Figura 9. Contenuto totale di polifenoli espresso in mg/100 di t.q.

Anche in questo caso, l'analisi separata dello Skin dal Kernel ci ha permesso di individuare la localizzazione esatta nel seme di questi importanti composti antiossidanti. Lo Skin è risultato la parte di seme che contiene la quasi totalità dei polifenoli estratti.

Solvente di estrazione

Dalla **figura 9** è possibile evincere come l'Etanolo acido sia stato il solvente che più di tutti abbia permesso di estrarre la maggior quantità di polifenoli dalle mandorle.

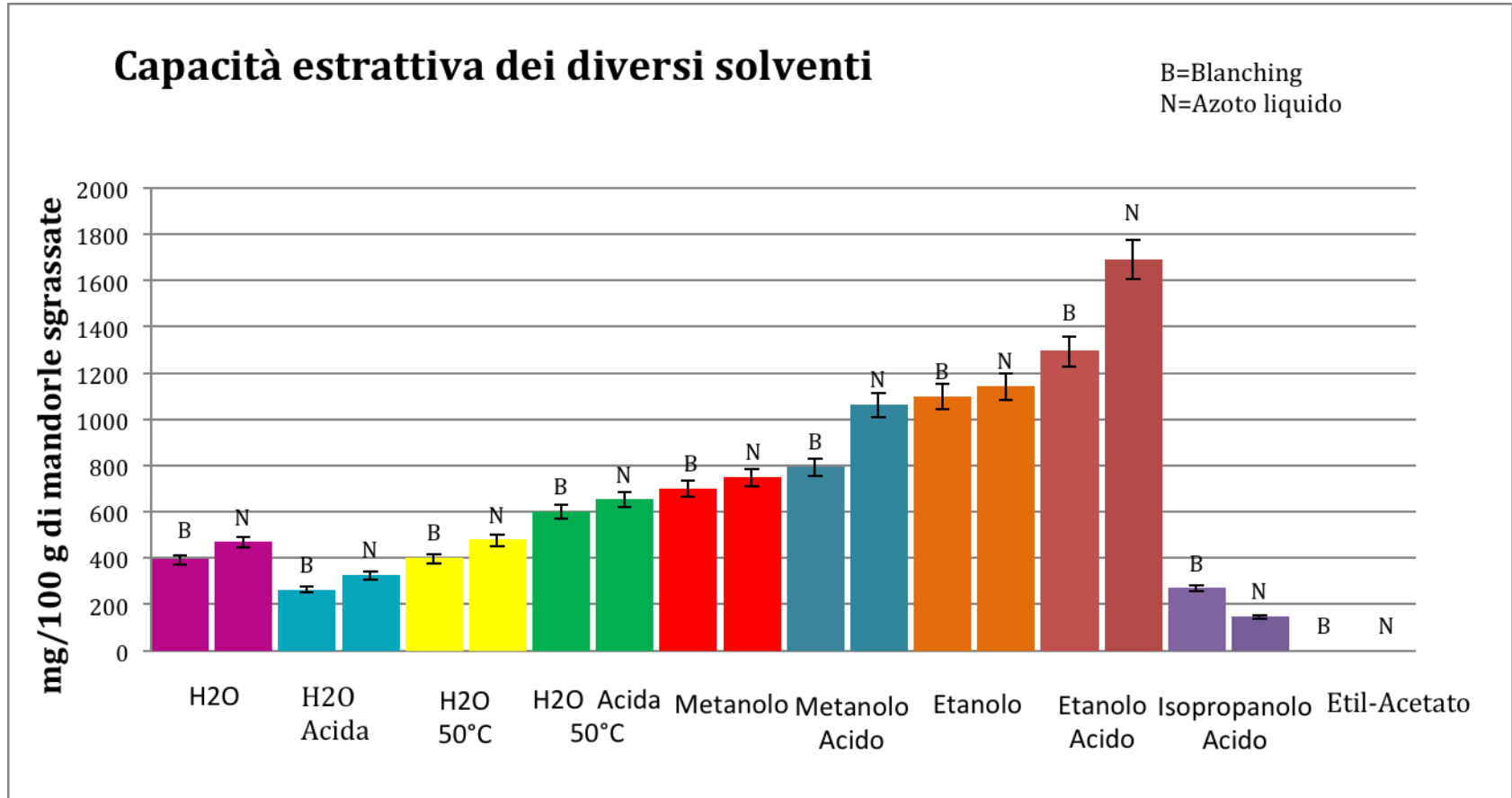


Figura 9. Capacità estrattiva dei diversi solventi

Nelle figure di seguito illustrate invece vengono riportate le capacità estrattive dei diversi solventi distinguendo, ancora una volta, lo Skin dal Kernel e il trattamento con Azoto liquido da quello con il Blanching.

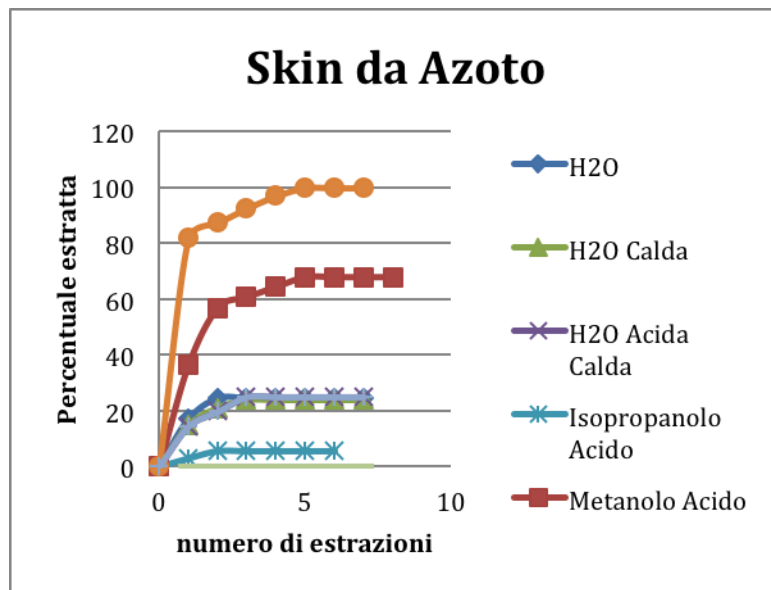


Figura 10. Percentuale estratta dallo Skin da Azoto con i diversi solventi

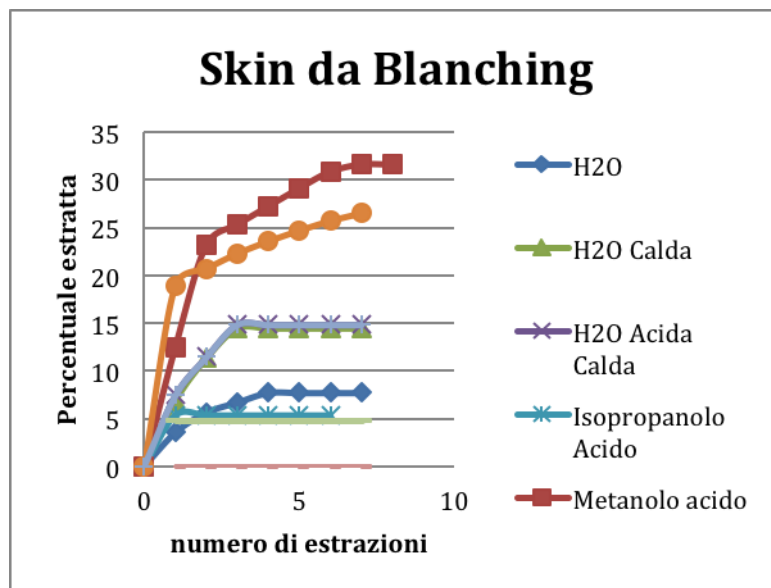


Figura 11. Percentuale estratta dallo Skin da Blanching con i diversi solventi

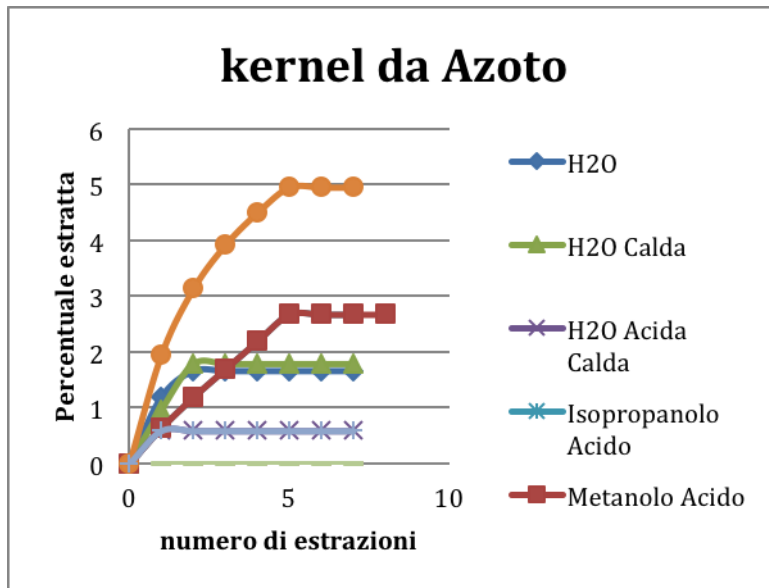


Figura 12. Percentuale estratta dal Kernel da Azoto con i diversi solventi

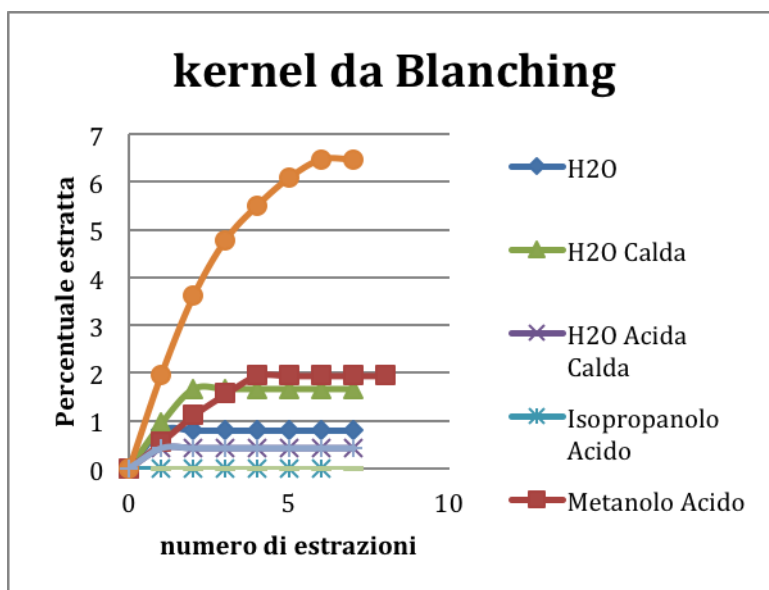


Figura 13. Percentuale estratta dal Kernel da Blanching con i diversi solventi

I risultati sono stati espressi in **mg/100g di skin o kernel sgrassaticosi** come è possibile leggere dalla tabella sottostante:

		<i>Skin</i>	<i>Kernel</i>	<i>H₂O di cottura</i>
<i>H₂O</i>	Blanchin	1035,25	107,62	211,82
	g			
	Azoto	3300,88	222,38	/
<i>H₂O Acida</i>	Blanchin	648,13	0	211,82
	g			
	Azoto	0	0	/
<i>H₂O a 50 °C</i>	Blanchin	1940,88	224,20	211,82
	g			
	Azoto	3205,14	240,31	/
<i>H₂O Acida a 50 °C</i>	Blanchin	1576,30	535,68	211,82
	g			
	Azoto	2658,88	477,52	/
<i>Metanolo Acido</i>	Blanchin	4243,62	262,71	211,82
	g			
	Azoto	9112,33	360,38	/
<i>Etanolo</i>	Blanchin	1995,05	56,91	211,82
	g			
	Azoto	3375,33	79,62	/
<i>Etanolo Acido</i>	Blanchin	3558,42	868,9	211,82
	g			
	Azoto	13432,6	667,44	/
		9		
<i>IsopropanoloAcido</i>	Blanchin	718,43	0	211,82
	g			
	Azoto	752,81	96,58	/
<i>Etil-Acetano</i>	Blanchin	0	0	0
	g			
	Azoto	0	0	/

Contenuto Polifenolico espresso in mg/100g di skin/kernel sgrassato estratto con i diversi solventi

La tabella mostra chiaramente come le estrazioni in Etanolo acido siano state quelle più efficienti, dal momento in cui la quantità di polifenoli estratti risulta di 13432,69 mg/100g di skin sgrassato per i campioni trattati in azoto.

La tabella soprariportata mostra anche come il Metanolo acido sia il più efficiente nelle estrazioni dello skin trattato con blanching, ma considerando la quantità totale che ne viene estratta, questa risulta sempre minore a quella estratta con Etanolo acido in seguito al trattamento con azoto liquido.

L'acqua acida, l'isopropanolo e l'etil-acetato sono stati invece i solventi meno efficienti; questi risultati quindi potrebbero essere spiegati basandoci sulla scala della polarità dei diversi solventi, considerando che ogni solvente acidificato aumenta la propria polarità.

Sulla base dei dati riportati nella tabella sottostante, possiamo dire che la polarità dei nostri polifenoli si avvicina di più a quella degli alcoli, visto che risultano più solubili in etanolo acido, e a conferma di ciò possiamo vedere come le estrazioni in acqua ed in etil-acetato, che si trovano agli estremi di questa scala di polarità, non hanno dato risultati soddisfacenti.

POLARITA' DECRESCENTE	SOLVENTI
H ₂ O	Acqua
RCOOH	Acidi organici (acido acetico)
RCONH ₂	Ammidi (N,N-dimetilformamide)
ROH	Alcoli (metanolo, etanolo)
RNH ₂	Ammine(trietilammina, piridina)
RCOR	Aldeidi, chetoni (acetone)
RCOOR	Esteri (acetato d'etile)
RX	Alogenuri(CH ₂ Cl ₂ >CHCl ₃ >CCl ₄)
ROR	Eteri (dietiletere)
ArH	Aromatici (benzene, toluene)
RH	Alcani (esano, etere di petrolio)

Polarità decrescente dei Solventi

Umidità e Sostanza Secca

Dalle analisi sulla sostanza secca, invece, è emerso che la cultivar siciliana Romana, insieme alla Genco, Ferragnes, e Tuono, anch'esse di origine siciliane, sono quelle che possiedono la quantità maggiore di sostanza secca, appostandosi su valori che vanno da 95,5% a 95,8%.

Le cultivar spagnole, Largueta e Valencia, insieme a quella californiana Sonora, al contrario, sono state quelle che hanno registrato i valori più bassi passando dal 93,7% al 93,8%.

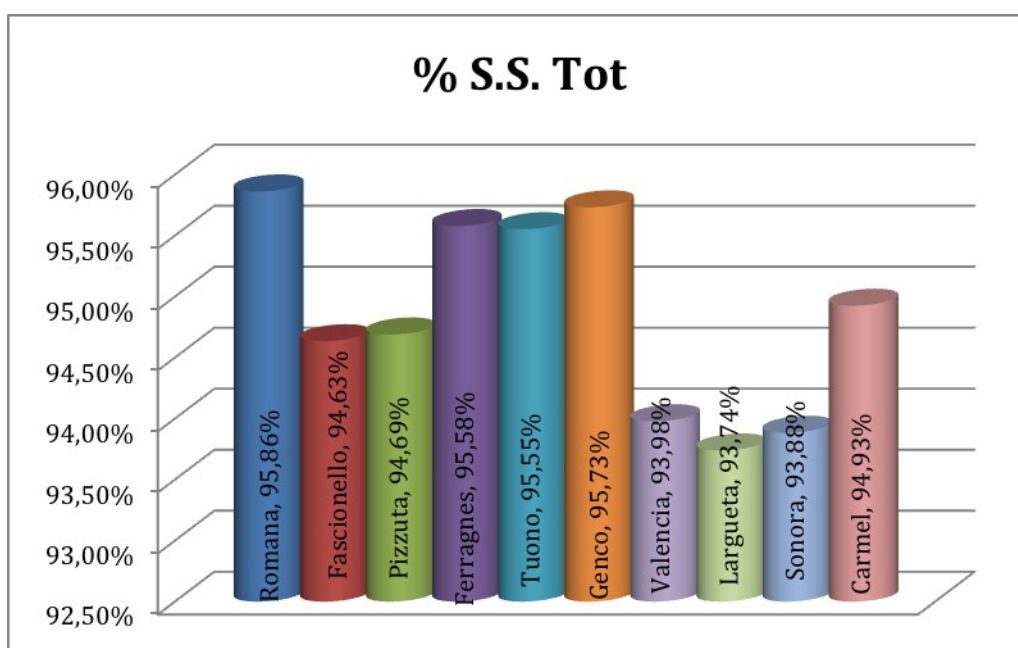


Figura 14. Percentuale di Sostanza Secca nelle diverse cultivar

Confrontando ancora una volta lo Skin con il Kernel possiamo dire come lo Skin sia la parte che contiene la percentuale di Umidità maggiore, così come è possibile leggere dai grafici che seguono:

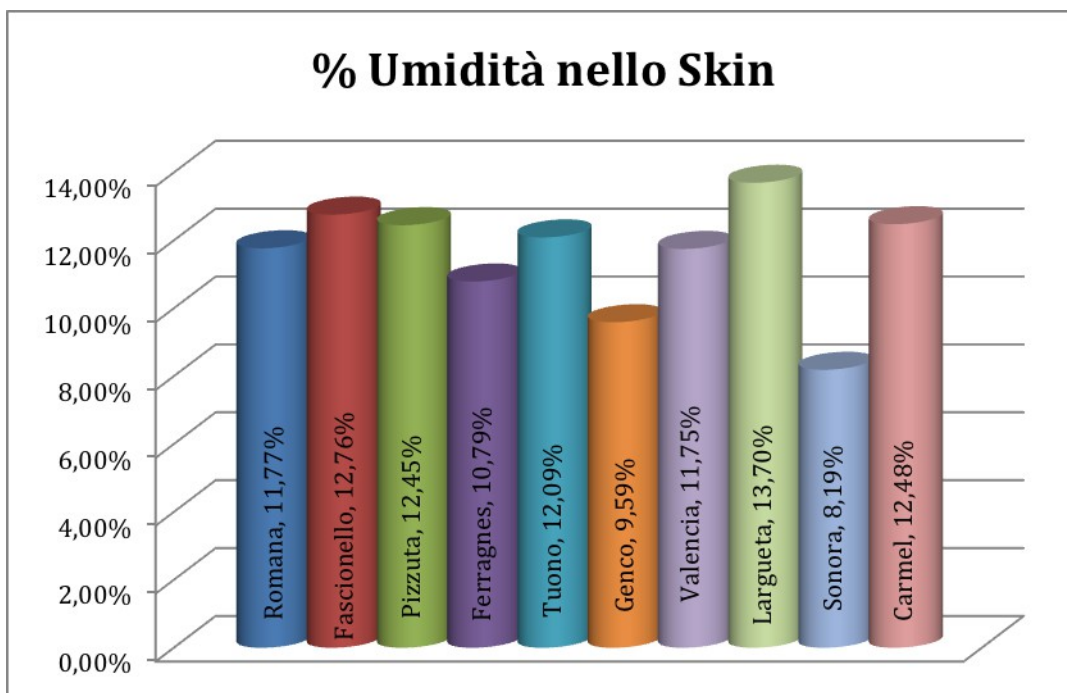


Figura 15. Percentuale di Umidità nello skin

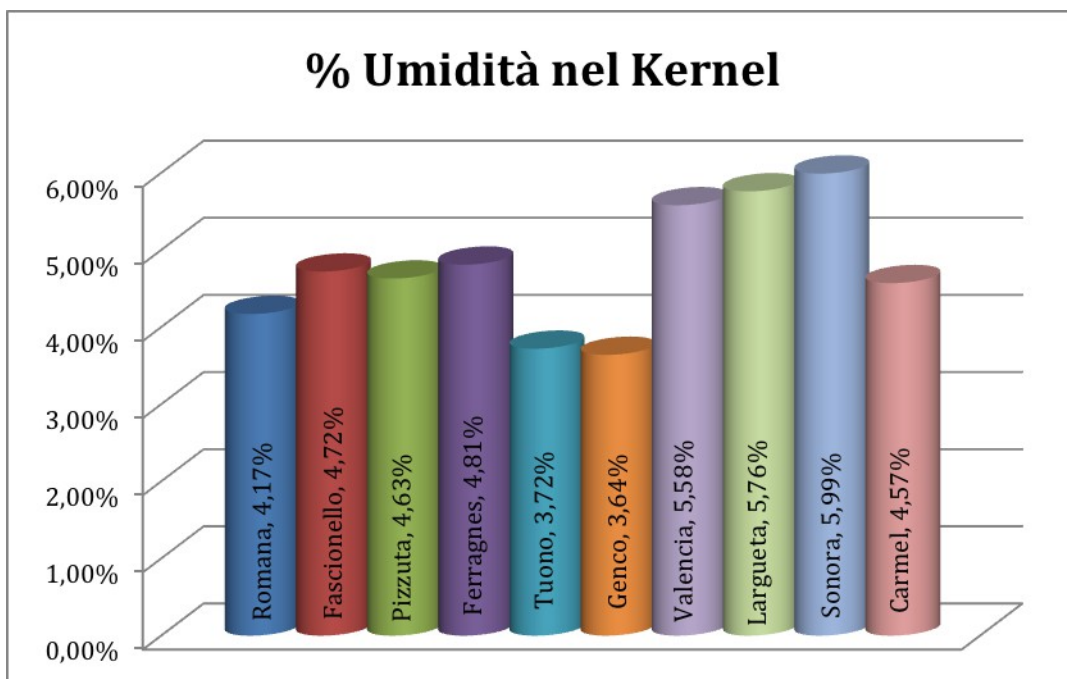


Figura 16. Percentuale di Umidità nel Kernel

Contenuto in Sali Minerali

La composizione in Sali minerali delle cultivar siciliane e straniere analizzate è risultata principalmente composta in K, Mg e Ca, mentre Cu, Fe, Zn e Se sono risultati presenti in quantità molto più basse rispetto ai primi (**Figure 17-26**).

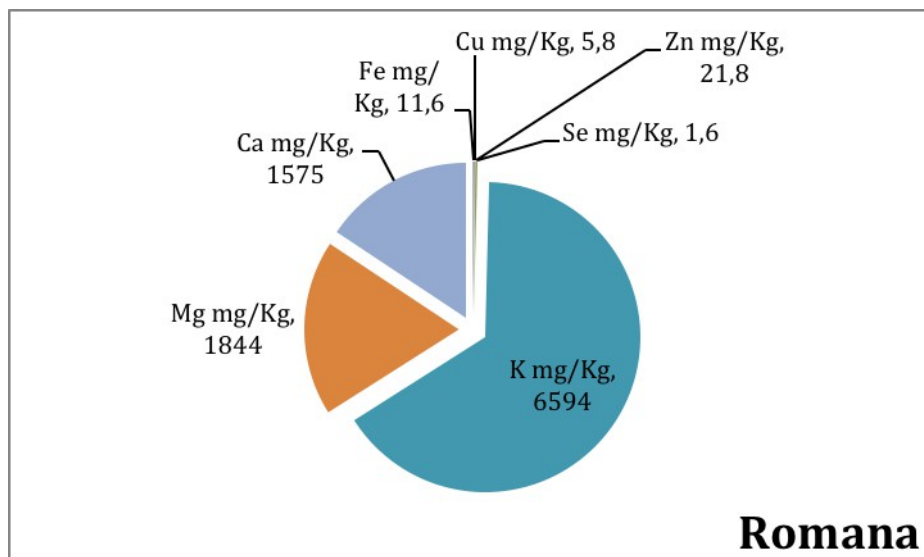


Figura 17. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Romana

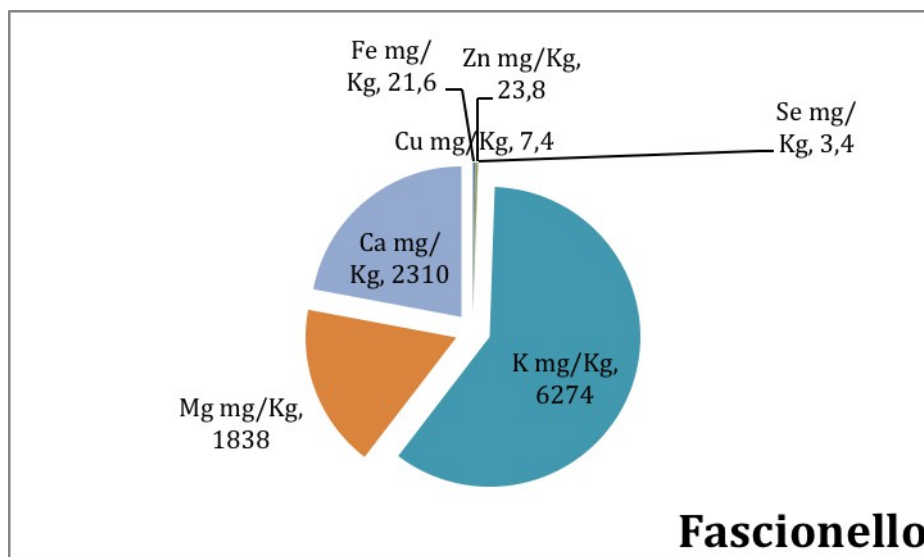


Figura 18. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Fascionello

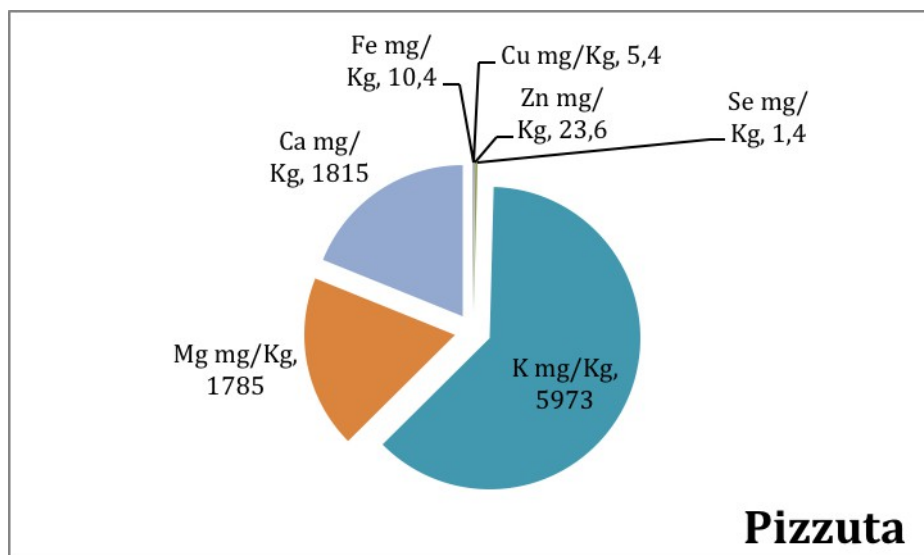


Figura 19. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Pizzuta

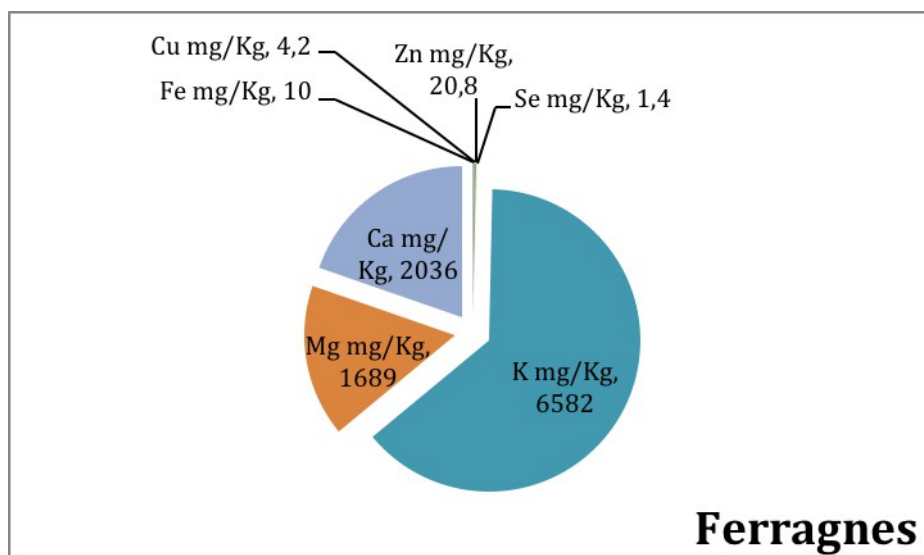


Figura 20. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Ferragnes

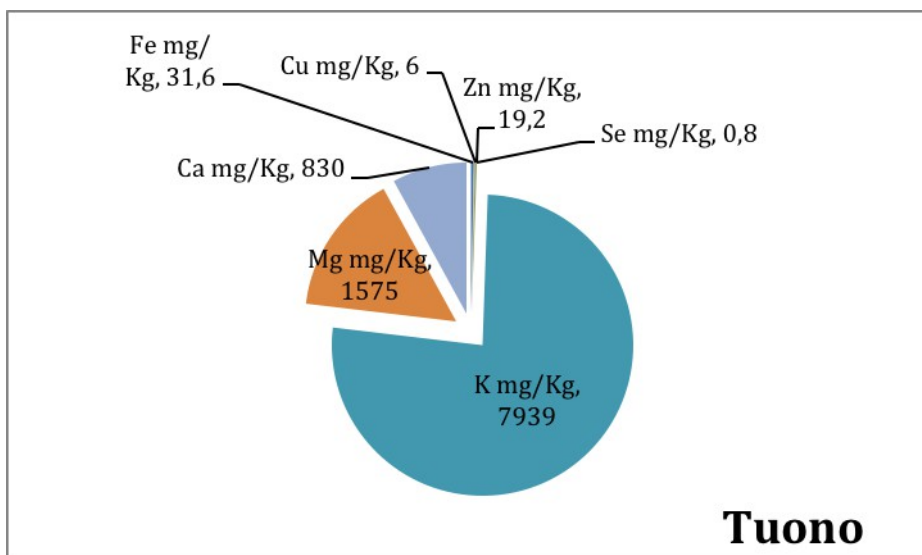


Figura 21. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Tuono

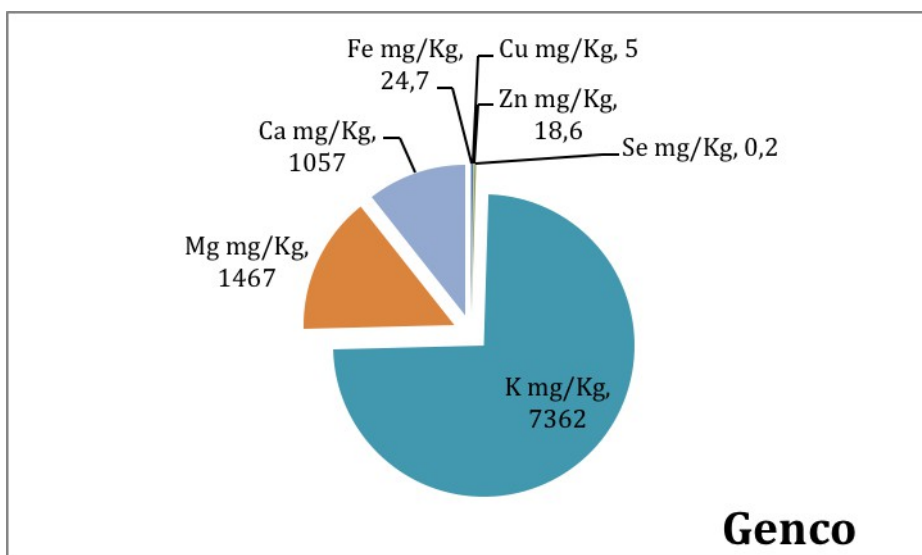


Figura 22. Composizione in sali minerali della cultivar siciliana Genco

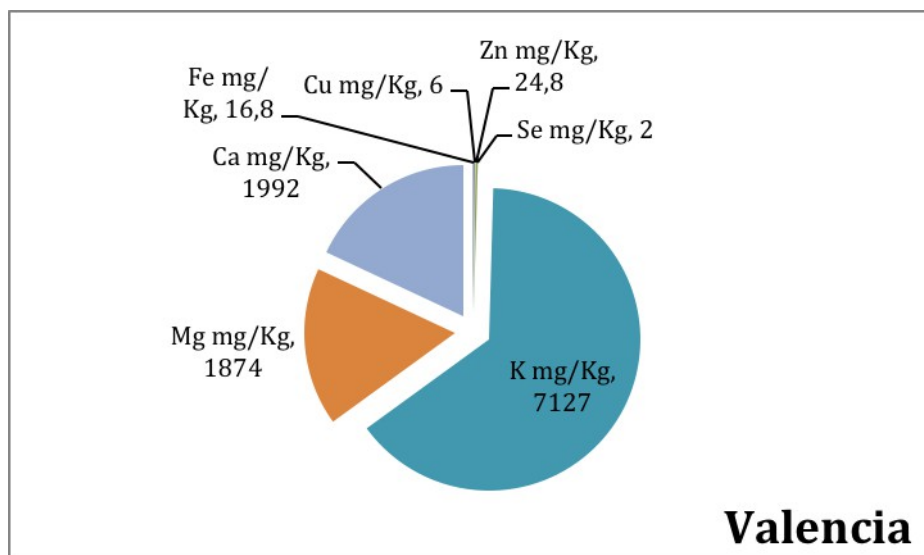


Figura 23. Composizione in sali minerali della cultivar spagnola Valencia

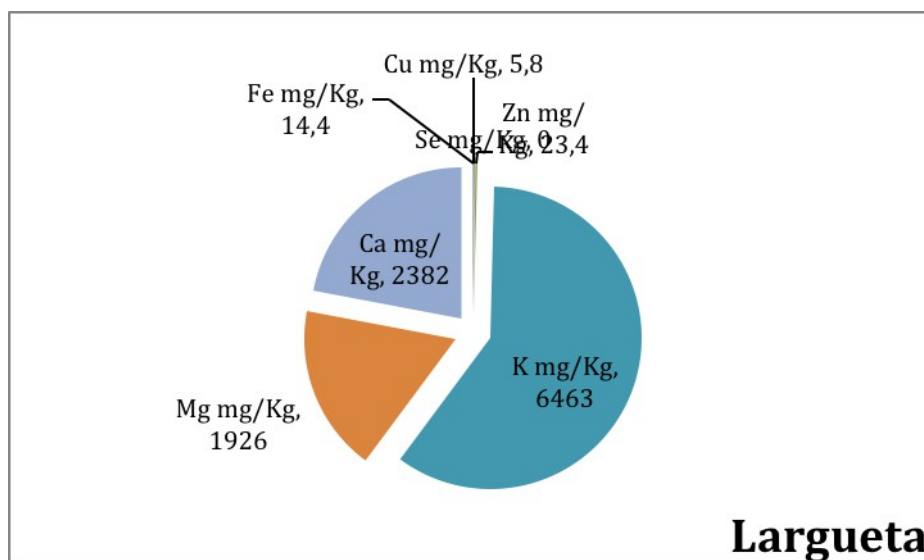


Figura 24. Composizione in sali minerali della cultivar spagnola Largueta

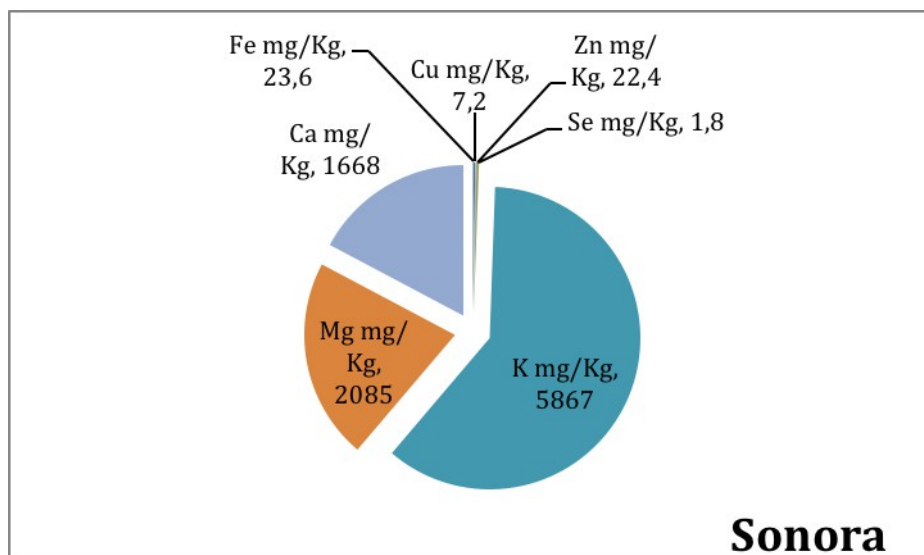


Figura 25. Composizione in sali minerali della cultivar californiana Sonora

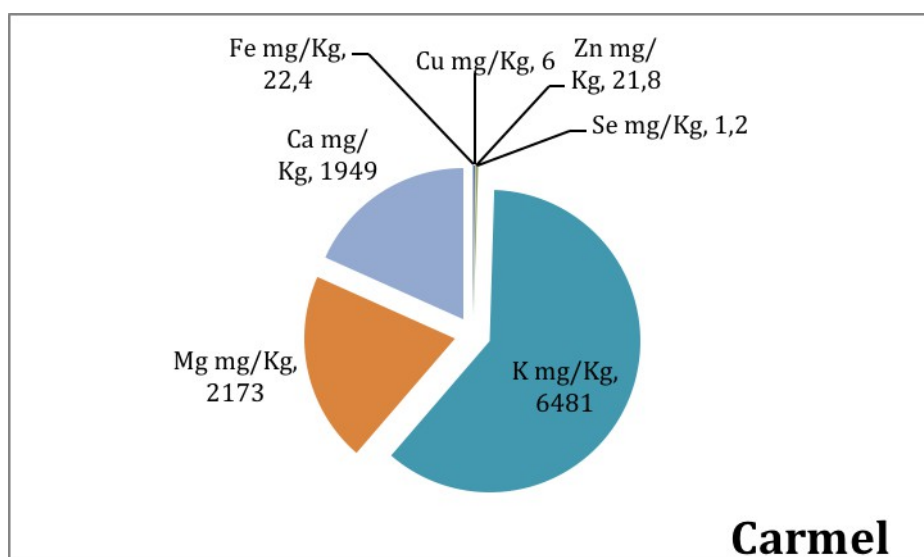


Figura 26. Composizione in sali minerali della cultivar californiana Carmel

Il K è risultato maggiormente presente nelle cultivar siciliane Tuono e Genco (**Figura 27**) con una quantità rispettivamente pari a 7939 mg/kg di tal quale e 7362 mg/kg di tal quale, nelle altre cultivar i valori di K sono pressoché risultati presenti nella stessa quantità, ad esclusione della cultivar siciliana Pizzuta con 5973 mg/kg di tal quale e della cultivar californiana Sonora con 5867 mg/kg di tal quale.

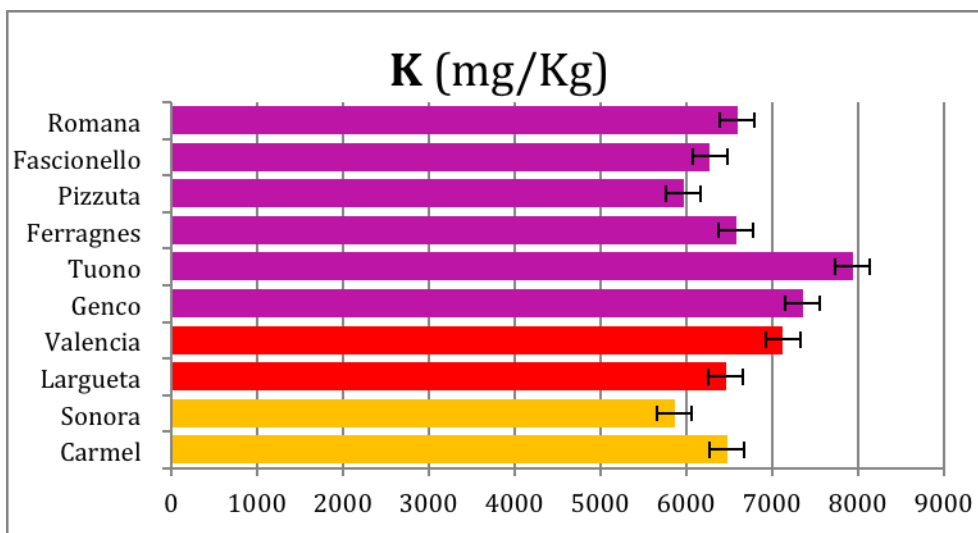


Figura 27. Quantità di K nelle diverse cultivar

Il Mg invece è risultato maggiormente presente nelle cultivar californiane e spagnole, per poi arrivare a valori poco più bassi nelle cultivar siciliane (**Figura 28**) che hanno registrato 1844 mg/kg di tal quale per la cultivar Romana e 1467 mg/kg di tal quale nella cultivar Genco.

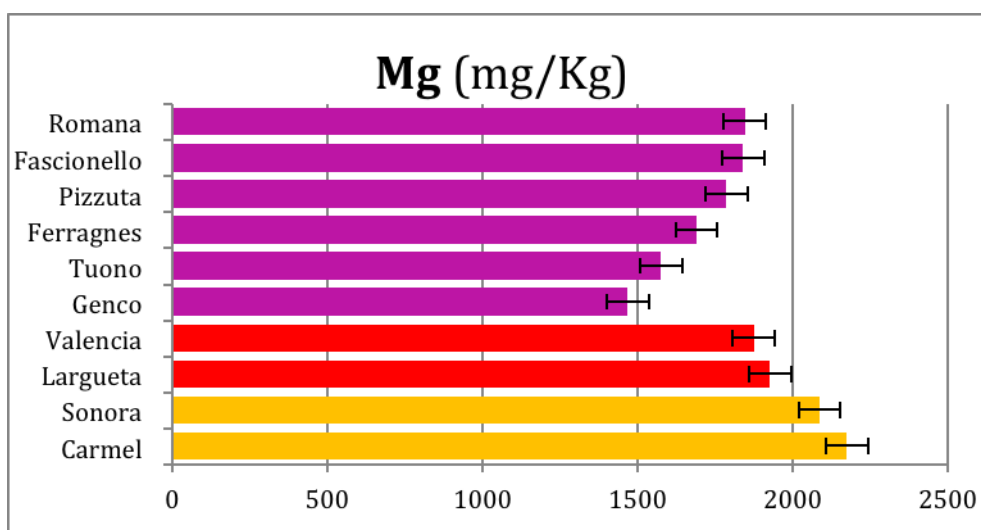


Figura 28. Quantità di Mg nelle diverse cultivar

Il Ca è risultato principalmente contenuto nella cultivar spagnola Largueta e siciliana Fascionello. Mentre i valori più bassi sono stati registrati per le cultivar siciliane Genco e Tuono con rispettivamente 1057 mg/kg di tal quale e 830 mg/kg di tal quale.

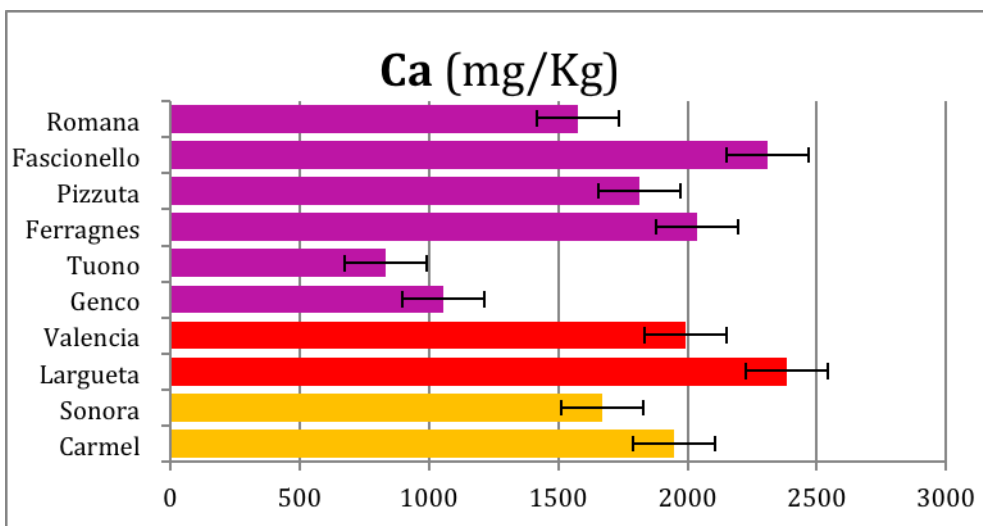


Figura 29. Quantità di Ca nelle diverse cultivar

Interessanti invece i valori del contenuto in altri minerali, il Se ad esempio ha registrato valori di gran lunga più bassi rispetto a tutti gli altri, con un picco di 3,4 mg/kg di tal quale per la cultivar fascio nello, fino a registrare un valore $< 0,2$ mg/kg di tal quale per la cultivar spagnola Largueta (Figura 30).

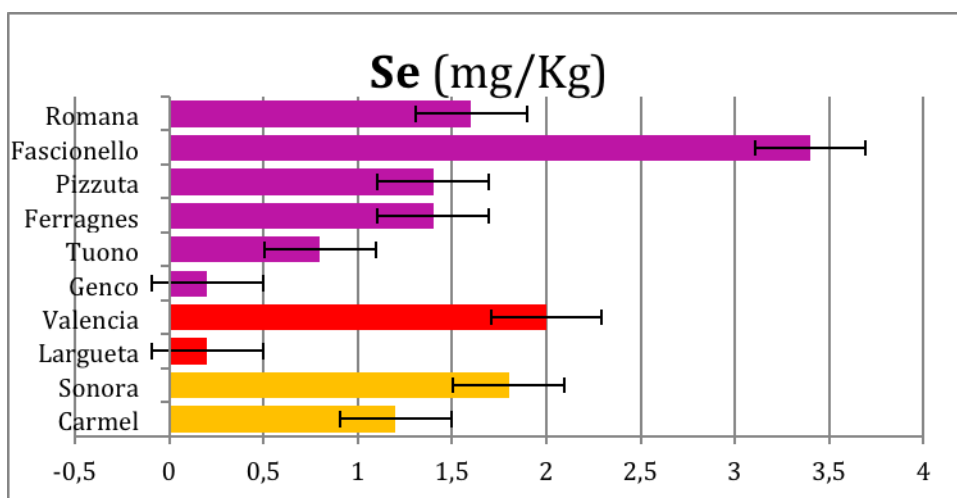


Figura 30. Quantità di Se nelle diverse cultivar

Lo Zn è risultato invece contenuto all'incirca nella stessa quantità in tutte le cultivar, ad eccezione per la Genco, Tuono e Ferragnes che hanno mostrato i valori più bassi (Figura 31).

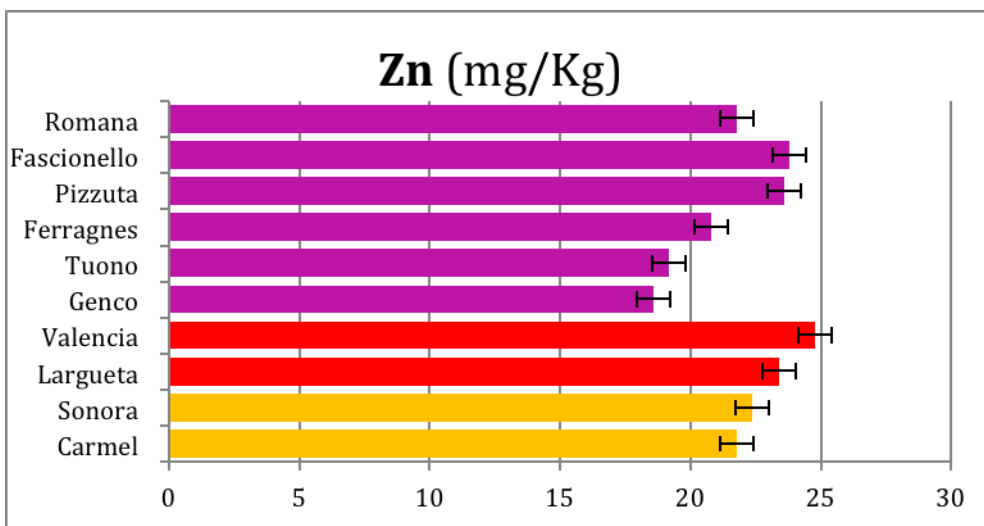


Figura 31. Quantità di Zn nelle diverse cultivar

Anche il Cu ha mostrato circa lo stesso contenuto in tutte le cultivar, mostrando un maggior contenuto nella cultivar siciliana Fascionello e californiana Sonora (Figura 32).

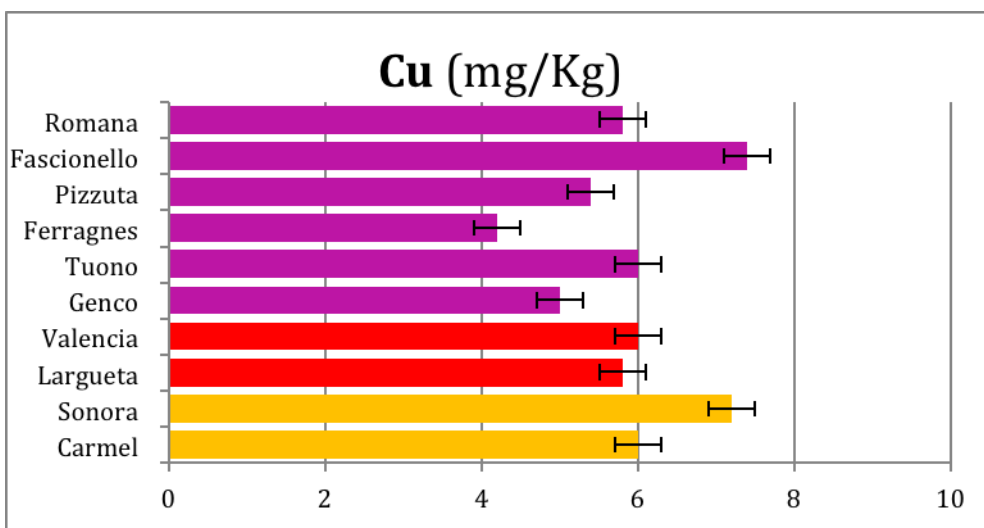


Figura 32. Quantità di Cu nelle diverse cultivar

Il Fe è risultato maggiormente contenuto nella cultivar siciliana Tuono e Genco che ha mostrato lo stesso contenuto nelle cultivar californiane e siciliana Fascionello, tutte le altre cultivar hanno mostrato valori nettamente più bassi (Figura 33).

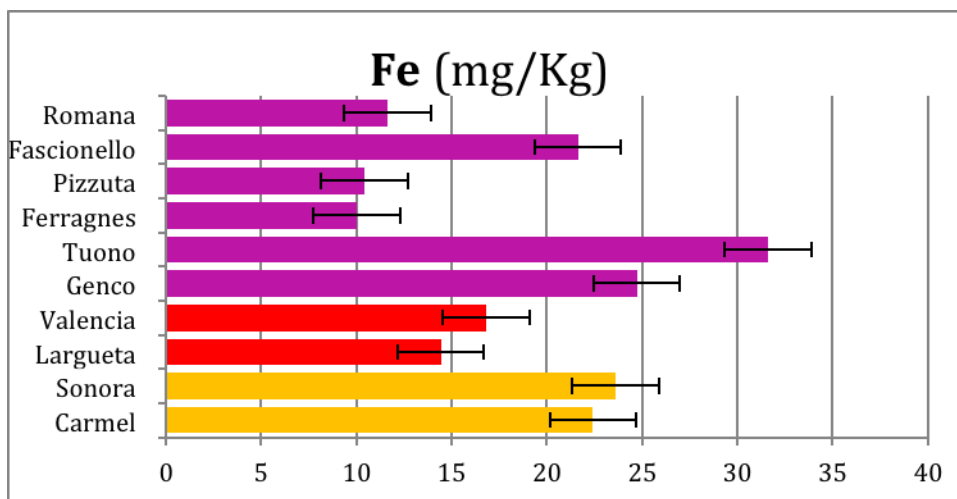


Figura 33. Quantità di Fe nelle diverse cultivar

Contenuto in Vitamina E

Il contenuto in Vitamina E non ha evidenziato differenze significative tra le cultivar, ha registrato i valori più alti nelle cultivar siciliane Romana, Genco e nella cultivar californiana Sonora, mentre la Ferragnes e la Tuono (entrambe cultivar siciliane) sono quelle che possiedono la quantità più bassa di Vitamina E con rispettivamente 210 e 221 mg/kg di tale quale (**Figura 34**).

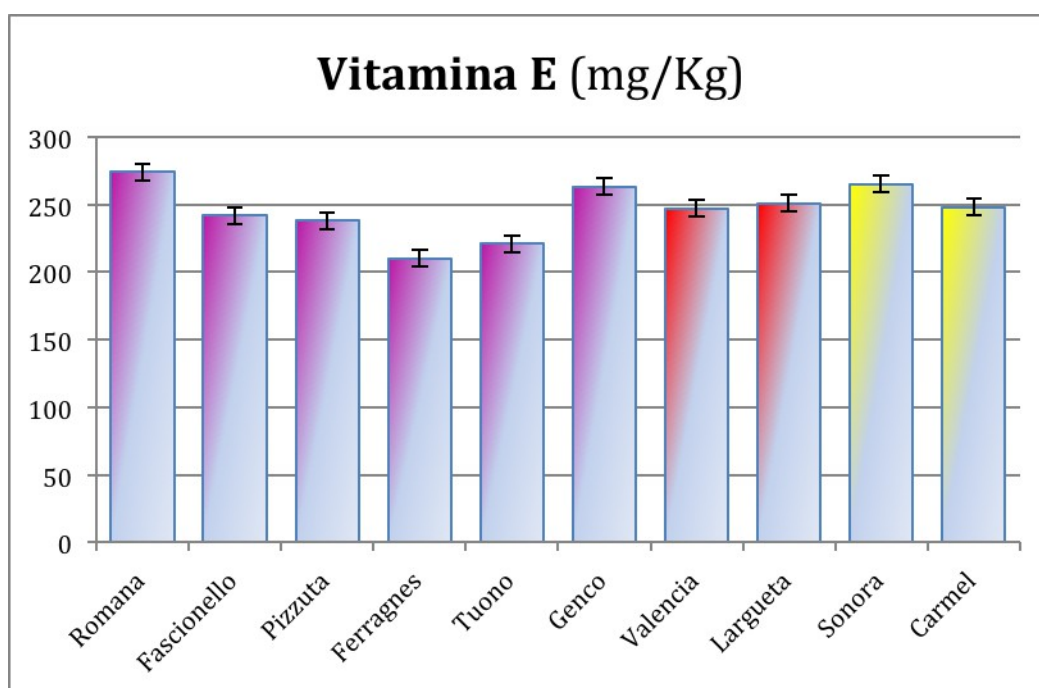


Figura 34. Contenuto di Vitamina E nelle diverse Cultivar

Conclusioni

Sulla base delle analisi effettuate e dei risultati ottenuti possiamo affermare che esiste una sostanziale differenza qualitativa tra le mandorle siciliane californiane e spagnole, sotto diversi profili.

Le analisi carpometriche hanno evidenziato come le cultivar siciliane siano facilmente distinguibili dalle cultivar californiane, sia per le dimensioni maggiori del seme, per la forma irregolare che le cultivar siciliane possiedono e per il colore più scuro dello skin. Le cultivar spagnole sono invece risultate un po' più simili nella forma alle cultivar siciliane anche se le dimensioni si sono rivelate inferiori rispetto a queste.

Il profilo polifenolico ha mostrato un contenuto maggiore nelle cultivar siciliane, in particolare per la Pizzuta e la Fascionello, mentre le cultivar californiane sono state quelle che hanno registrato il contenuto più basso.

Anche per la quantità di grassi le cultivar siciliane hanno mostrato il contenuto maggiore, soprattutto rispetto alle cultivar spagnole, potendo godere quindi di tutti i benefici che gli acidi grassi essenziali che queste possiedono apportano.

Tra tutte le cultivar quella siciliana Fascionello, è stata quella che ha registrato i valori più alti di Se, Ca, Cu, e modeste quantità di Fe e Zn. Le cultivar siciliane Tuono e Genco invece hanno registrato i valori più alti per il contenuto in K e Fe. Le cultivar straniere californiane e spagnole si sono rivelate le maggiori contenenti in Mg rispetto alle cultivar siciliane.

Nonostante la notevole diffusione delle cultivar di mandorle californiane nel mercato mondiale, le mandorle siciliane si sono rivelate superiori riguardo il profilo qualitativo. Sulla base di ciò, questo potrebbe essere un aspetto significativo per il rilancio della mandorlicoltura siciliana non solo nel mercato nazionale ma anche in quello internazionale.

7. Allegati

STRATEGIES FOR THE EXTENSION OF THE SHELF LIFE OF

READY TO EAT PRICKLY PEAR FRUITS

Scalone D., Stuto A., Licciardello F., Muratore G., Todaro A., Spagna G. (2012). Strategies for extension of the shelf life of ready to eat prickly pear fruits. In: 5th Shelf Life International Meeting - Book of Abstracts. Changwon, South Korea, May 30th - June 1st, 2012, p. 162, KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition
Stato: proceedings

RESEARCHES ON POLYPHENOLS AND AFLATOXIGENIC

RELATED MYCOFLORA PROFILE OF SICILIAN ALMOND DRIED FRUITS

Oliveri C., Scalone D., Muratore G., Spagna G., La Rosa R.
1st International Workshop, Plant Protection for the Quality and Safety of the Mediterranean Diet Bari, Italy, 25-27 October 2012
Stato: pubblicato in proceedings

INFLUENCE OF DEGRADATIVE ENZYMATIC ACTIVITIES ON

THE SHELF LIFE OF READY-TO-EAT PRICKLY PEAR FRUITS

Scalone D., Palmeri R., Licciardello F., Muratore G., Todaro A., Spagna G.
ICABBBE 2012: International Conference on Agricultural, Biotechnology, Biological and Biosystems Engineering; Penang, Malesia 6-7 Dicembre 2012.
Stato : accettato in proceedings

Research of the main indexes of freshness anchovy (*Engraulis engrasicolus* Linnaeus, 1758) and sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) of Mediterranean

Alberio G.R.A., Scalone D., Spagna G.

ICABBBE 2012: International Conference on Agricultural, Biotechnology, Biological and Biosystems Engineering; Penang, Malesia 6-7 Dicembre 2012.

Stato: accettato in proceedings

REMOVAL OF BITTER COMPOUNDS FROM CITRUS BYPRODUCTS

Todaro A., Palmeri R., Scalone D., Alberio G.R.A., Serafini M., Spagna G.
Journal of Agricultural and Food Chemistry

Stato: submitted

CHARACTERIZATION OF LIPOXYGENASE IN PRICKLY PEAR FRUITS AND INFLUENCE IN AROMATIC PROFILE

Scalone D., Palmeri R., Todaro A., Muratore G., Spagna G.
Postharvest Biology and Technology

Stato: submitted

Allegato 1

Strategies for the extension of the shelf life of ready to eat prickly pear fruits

D. Scalone¹, A. Stuto,¹ F. Licciardello¹, G. Muratore¹, A. Todaro², G. Spagna¹

The prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* L. Miller) belongs to the Cactaceae family. The fruit is a berry, composed by an epicarp and the pulp, which represents the edible portion. At maturation, the epicarp turns yellow, red or white, depending on the cultivar. In Italy, the prickly pear is mainly cultivated in Sicily (90% of the national production). The fruit is very sensitive to low storage temperatures (< 5°C) which cause chilling injuries. The fruits can be successfully commercialized as a ready-to-eat product, peeled and suitably packaged. The main limit to its production is the formation of off-flavours due to different factors, such as the growth of microorganism and the action of endogenous enzymes (lipid oxidation). In fact, the oxidoreductases are directly responsible for the lipid oxidation, which has influence on the production of off-flavours, on the structure and on the shelf-life of the fruit. The lipoxygenase (LOX) is a dioxygenase which catalyzes the oxidation of polyunsaturated fatty acids to hydroperoxides. The aim of this work was to compare different packaging technologies to extend the shelf life of ready-to-eat prickly pear fruits.

The LOX activity, microbial counts and gas composition were evaluated for not treated samples packed in ordinary atmosphere and in two modified atmospheres having different O₂ and CO₂ composition (MA1 5% O₂, 2%CO₂, 93%N₂; MA2 2%O₂, 5%CO₂, 93%N₂) and for samples treated either with a blanching or with a blanching followed by a dipping in a citric acid solution. The pretreatment conditions are essential for the LOX activity, in particular the blanching reduced its activity by at least 30% especially in combination with fruit acidification and limited the microbial proliferation. As a result of suitable pretreatment and packaging operations the shelf life of ready-to-eat prickly pears can be successfully extended.

Strategies for the extension of the shelf life of ready to eat prickly pear fruits

D. Scalone¹, A. Stuto,¹ F. Licciardello¹, G. Muratore¹, A. Todaro², G. Spagna¹

¹*Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), University of Catania, via Santa Sofia 98, 95123 Catania, Italy.*

²*Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA), University of Palermo, viale delle Scienze 13, 90128 Palermo, Italy.*

ABSTRACT

The prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* L. Miller) belongs to the Cactaceae family. The fruit is a berry, composed by an epicarp and the pulp, which represents the edible portion. At maturation, the epicarp turns yellow, red or white, depending on the cultivar. In Italy, the prickly pear is mainly cultivated in Sicily (90% of the national production). The fruit is very sensitive to low storage temperatures ($< 5^{\circ}\text{C}$) which cause chilling injuries. The fruits can be successfully commercialized as a ready-to-eat product, peeled and suitably packaged. The main limit to its production is the formation of off-flavours due to different factors, such as the growth of microorganism and the action of endogenous enzymes (lipid oxidation). In fact, the oxidoreductases are directly responsible for the lipid oxidation, which has influence on the production of off-flavours, on the structure and on the shelf-life of the fruit. The lipoxygenase (LOX) is a dioxygenase which catalyzes the oxidation of polyunsaturated fatty acids to hydroperoxides. The aim of this work was to compare different packaging technologies to extend the shelf life of ready-to-eat prickly pear fruits.

The LOX activity, microbial counts and gas composition were evaluated for not treated samples packed in ordinary atmosphere and in two modified atmospheres having different O_2 and CO_2 composition (MA1 5% O_2 , 2% CO_2 , 93% N_2 ; MA2 2% O_2 , 5% CO_2 , 93% N_2) and for samples treated either with a blanching or with a blanching followed by a dipping in a citric acid solution. The pretreatment conditions are essential for the LOX activity, in particular the blanching reduced its activity by at least 30% especially in combination with fruit acidification and limited the microbial proliferation. As a result of suitable pretreatment and packaging operations the shelf life of ready-to-eat prickly pears can be successfully extended.

Keywords: *blanching, LOX, packaging, prickly pear, shelf life;*

INTRODUCTION

Appearance, aroma, consistence and nutritional value are the four main aspects considered by consumers in the choice of a food product.

The transformation of fruits and vegetables can had two main goals: on one hand, to maintain the freshness of the produce without compromising its nutritional and sensory qualities, on the other hand, to obtain a shelf life sufficient to allow distribution and consumption in different geographical areas.

The issue of enzymatic degradations in minimally processed produces is of primary importance, as in the intact vegetable tissue the cellular components, such as enzymes, substrates, metabolites and reserve substances are located in separated compartments, not coming into contact with each other.

The eventual rupture of cellular structures during processing causes the outflow of such components and the subsequent contact between enzymes and substrates, with an enhanced decay of the quality characteristics of the product. Prickly pear fruits are highly perishable at room temperature and are highly sensitive (chilling injuries) to refrigerated storage temperatures (0-4 °C) (Di Cesare et al., 1993). The main limits to storability of prickly pear fruits, indeed, are the loss of consistency and the formation of off-flavours which are due to different factors, such as microbial proliferation, oxidation processes and cellular degradation by endogenous enzymes. Oxidation is the main cause of the off-flavour production in foods containing fatty acids, even during storage at low temperatures.

A recent literature survey has highlighted a lack of researches concerning the study of the enzymatic activities of prickly pear fruits, while no study at all has been carried out on minimally processed prickly pears. The aim of the research was to evaluate suitable packaging solutions for minimally processed prickly pears and to study the shelf life of such product taking into account microbiological and enzymatic aspects.

MATERIALS AND METHODS

Prickly pear fruits were harvested in the area of Paternò, in the province of Catania, Italy. Fruits were manually peeled and packaged in ordinary atmosphere with a barrier film (*Control*) (PET 30 Melinex 850, permeability O₂ cc/m²/24h: 56, permeability H₂O g/m²/24h: 13) and in two modified atmospheres having different O₂ and CO₂ composition (*MA1* 5% O₂, 2%CO₂, 93%N₂; *MA2* 2%O₂, 5%CO₂, 93%N₂) (Cantwell. et. al., 1995, Izumi et. al., 1996). Also, a part of the samples was treated with a blanching in water at 80°C for 10 min (*barrier+blanch*) or in water+ 2% citric acid (*barrier+blanch+citric ac.*) before packaging in ordinary atmosphere. Each tray contained four fruits.

Microbial counts were determined by the official Oxoid methods, lipoxygenase activity was assessed by the colorimetric method by Gordon et al. (2001).

RESULTS AND DISCUSSION

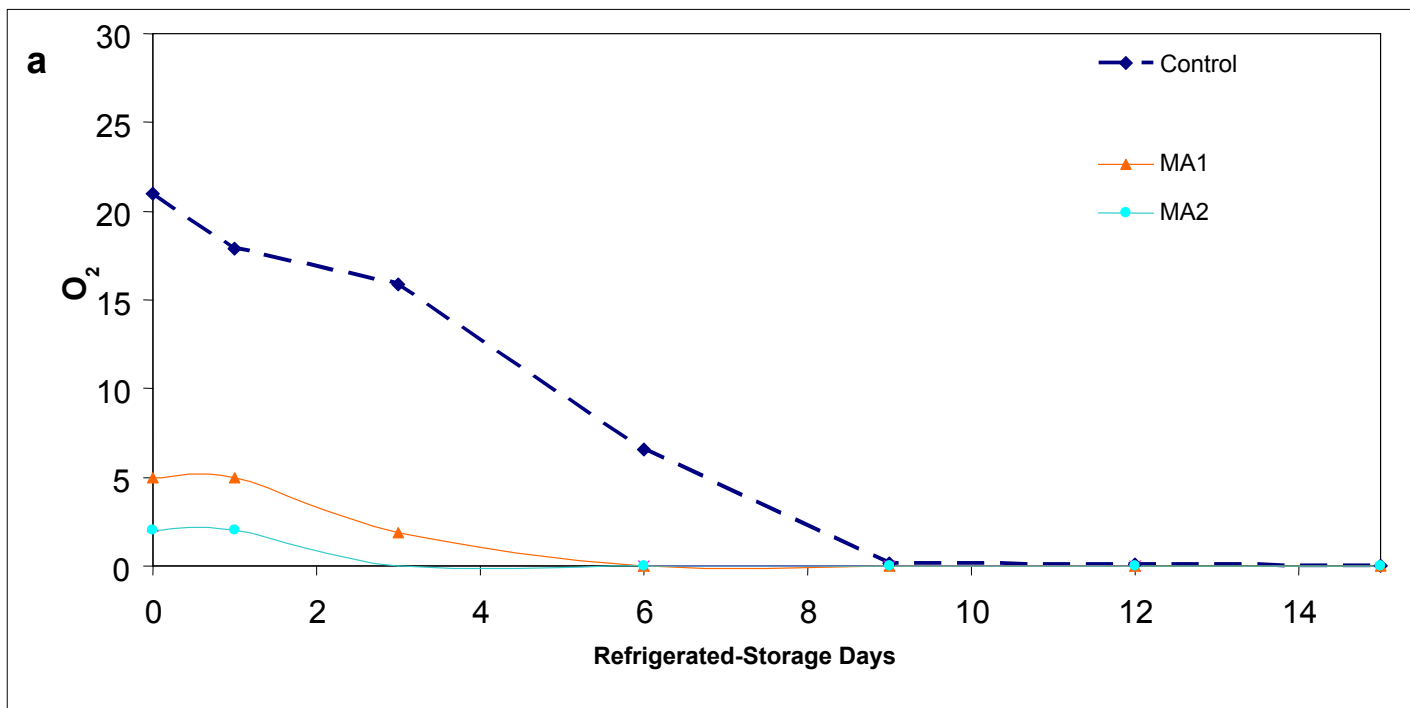
Figures 1a-b show the gas composition in the package headspace. It can be inferred that O₂ in *MA2* packages decreases to not detectable levels after 3 days of refrigerated storage, while the same happens after 6 days for *MA1*. A consequent increase of the CO₂ level was observed. *Figures 2a-b* show the gas trend inside packages containing fruits which had undergone blanching, in this case the O₂ level is close to zero after 9 days, while in fruits subject to blanching with ascorbic acid the same level is reached after 6 days. The CO₂ level increased up to about 26%.

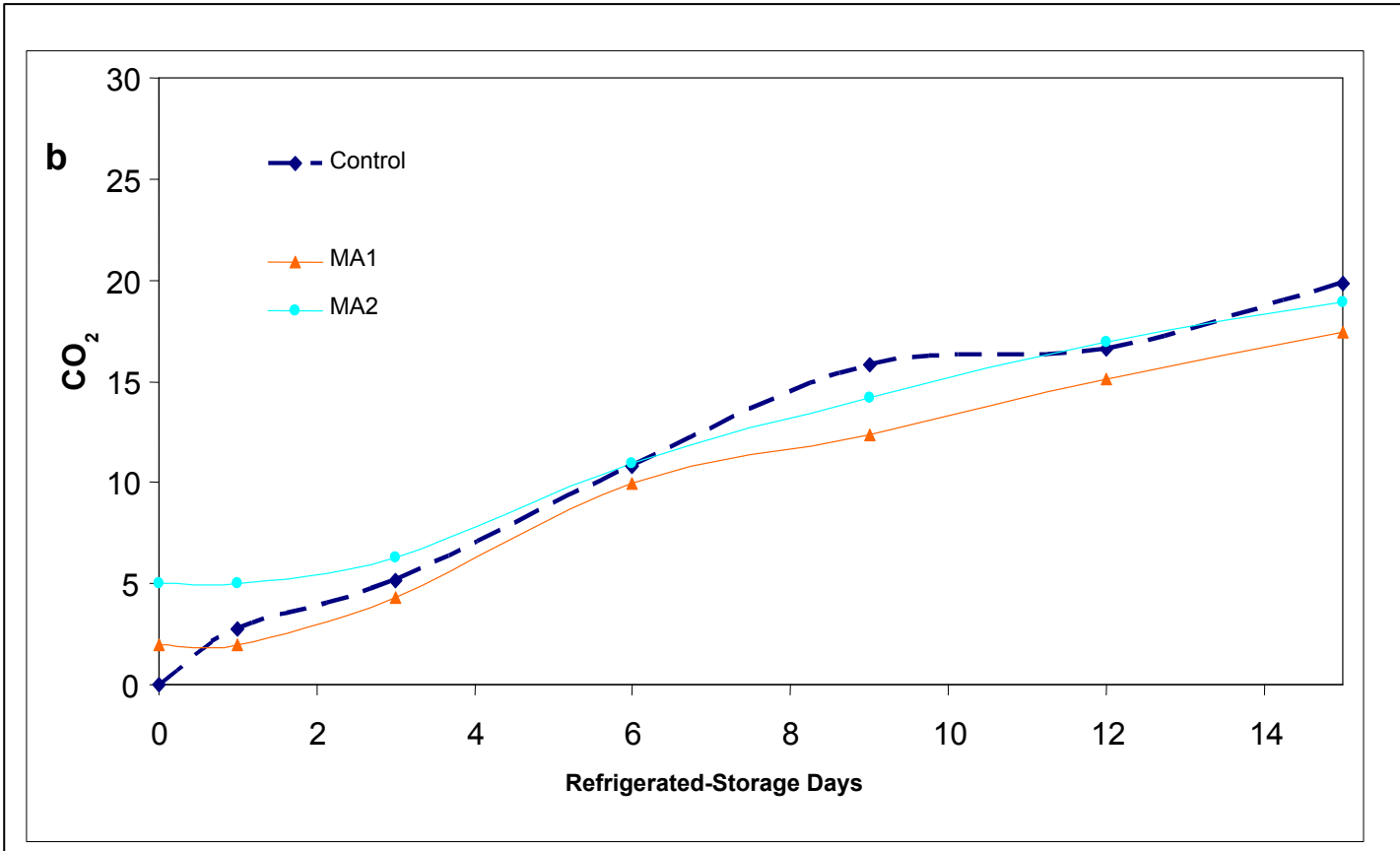
Figure 3 shows the microbiological counts for packed fruits during refrigerated storage.

The modified atmospheres (**MA1** and **MA2**) determined only a slight decrease of the total bacterial counts (PCA), but a significant decrease of yeasts and molds (SAB).

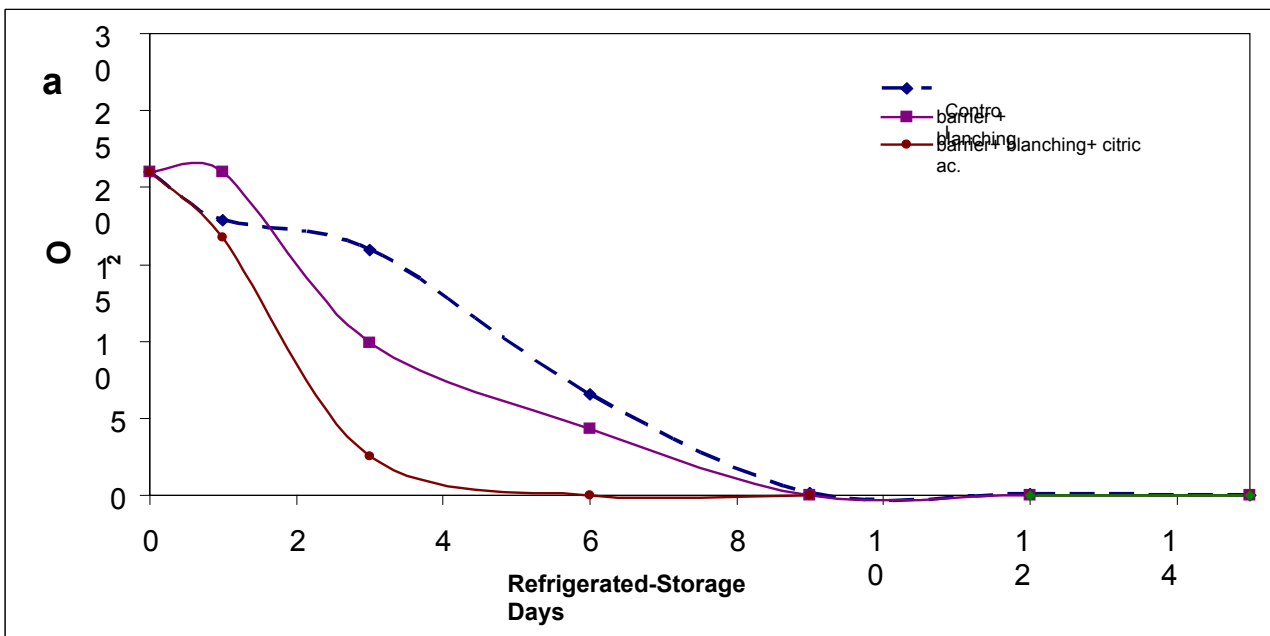
Figure 4 shows the time course for the LOX activity in the different packaging systems. The enzyme was inhibited with the thermal treatment, while the citric acid treatment does not seem to determine significant variations.

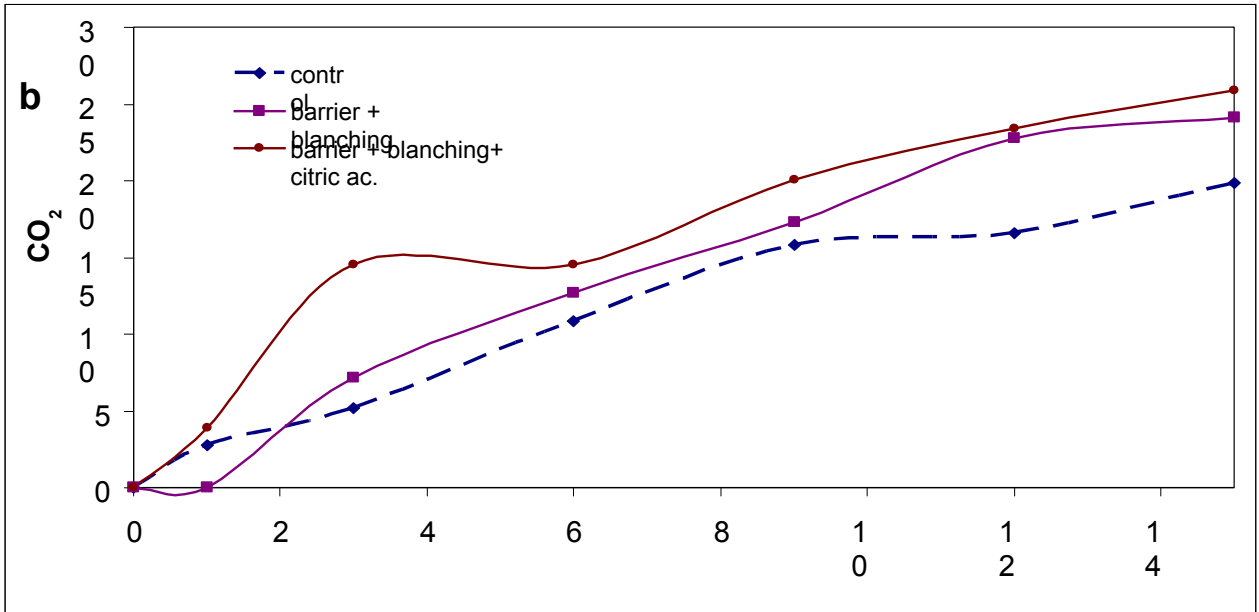
The MA-packed samples showed a higher lipoxygenase activity, which is probably due to the higher presence of O₂, which slowly decreases with storage together with the increase of the CO₂ level.





Figures 1 a-b. Headspace gas composition variations in packages with ordinary and modified atmosphere O₂ (a) and CO₂ (b).





Figures 2 a-b. Headspace gas composition variations inside packages, as a function of pre-treatment: O₂ (a) and CO₂ (b)

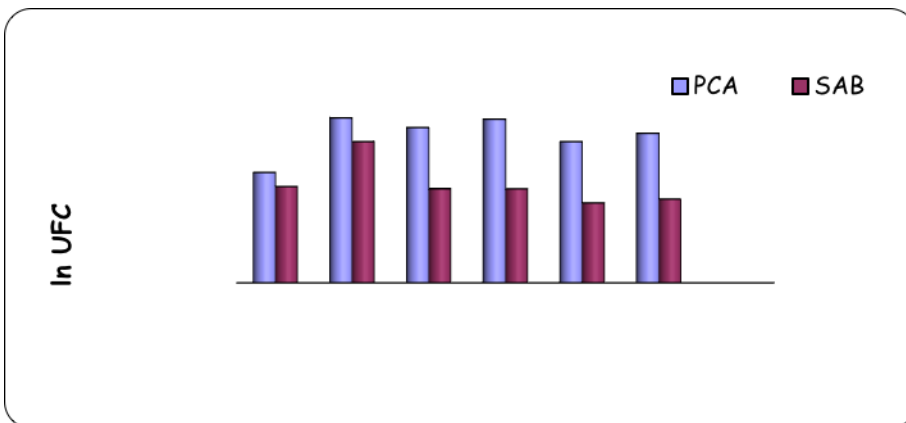


Figure 3. Total bacterial counts (PCA) and yeast and molds (SAB) in fresh and stored (12 days), yellow-flesh prickly pears.

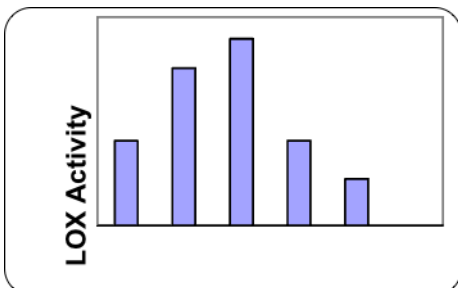


Figure 4. Total LOX activity during 12 days of storage in differently packed fruits, expressed as the curve integral.

REFERENCES

Cantwell, M. 1995. Fresh cut products. *Perish. Handli. Newsl.* 81, 2-3;

- Di Cesare, L.F., Testoni, A., Sansovini, G. 1993. Studio dei componenti volatili del fico d'india; *Industrie alimentari*. 32, 725-730;
- Gordon, E.A., Barret, D.M. 2001. Colorimetric Method for the determination of lipoxygenase activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 32-37;
- Izumi, H. ; Watada, A.E.; Douglas, W. 1996. Optimum O₂ or CO₂ atmosphere for storing broccoli florets at various temperatures. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121(1), 127-131.

Allegato 2

RESEARCHES ON POLYPHENOLS AND AFLATOXIGENIC-RELATED MYCOFLORA PROFILE OF SICILIAN ALMOND DRIED FRUITS

Oliveri C.¹, Scalone D.², Muratore G.², Spagna G.², La Rosa R.¹

*¹ Sez. Fitopatologia e genetica vegetale, ² Sez. Tecnologie Alimentari e Microbiologia
¹⁻² Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA)
Università di Catania, via Santa Sofia 98, 95123 Catania, Italia
c.oliveri@unict.it*

In the aim of a project funded by the Sicilian Region, entitled "Innovazione e valorizzazione della filiera mandorlicola" and finalized to highlight the dried fruits quality of Sicilian almond cultivars by studying their microbiological and nutritional total profile, seven sicilian autochthonous almond varieties (cvs) were microbiologically and chemically analyzed in comparison with four allochthonous (californian and Spanish) in Sicily grown cvs.

*For what concern the microbiological profile, investigations have been particularly orientated to look for the mycoflora, the aflatoxigenic fungi contamination and the related potential aflatoxigenic risk; for the purpose samples of dried, shelled almond fruits of each cultivar have been analyzed to isolate and identify the total mycoflora and thus the potentially aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strains. Among the different isolated fungi, *Penicillium* and *Aspergillus* spp. were morphologically the predominant, showing in the majority of the allochthonous almond cvs and just in a Sicilian one the presence of *Aspergillia* section *Nigri* as well as of *A. flavus* and *A. parasiticus* spp.*

whereas in other Sicilian cvs Aspergillia sect. Nigri or A. ochraceus were detected. PCR assays, carried out by species-specific primers, allowed to identify the different Aspergillus spp. The potential aflatoxin production of the A. flavus and A. parasiticus isolated strains was evaluated by either YES medium culture or HPLC analysis; obtained results showed that two A. parasiticus strains were producers of total aflatoxins being atoxigenic the remaining strains. By a quadruplex PCR-based assay, genes involved in the aflatoxin biosynthetic pathway (afl, nor-1, ver-1 and omtA genes) were investigated; the complete genes set was found just in the aflatoxigenic isolates.

Regarding to the nutritional profile, chemical researches started with the total polyphenols level (TP) evaluation in the dried fruits of the same almond cvs. The results showed that some of the sicilian cvs contain the highest polyphenol level compared to that of californial cvs and similar to one spanish cv. Moreover, by analyzing the fats, results showed that the Sicilian cvs present the highest content.

These preliminary results highlight a low risk of aflatoxins contamination in Sicilian almond dried fruits and a their generally high nutritional profile, characteristics necessary for the use in food or feed chains.

RESEARCHES ON POLYPHENOLS AND AFLATOXIGENIC-RELATED MYCOFLORA PROFILE OF SICILIAN ALMOND DRIED FRUITS



Oliveri C.¹, Scalone D.², Muratore G.², Spagna G.², La Rosa R.¹

¹ Sez. Fitopatologia e Genetica vegetale, ² Sez. Tecnologie Alimentari e Microbiologia
¹⁻² Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA)
 Università di Catania, via Santa Sofia 98, 95123 Catania, Italia
 c.oliveri@unicat.it

INTRODUCTION

Dried fruits consumption is a characteristic of the mediterranean diet that represents a nutritional model for what concern food quality and safety. Among the different dried fruits, almond (*Prunus amygdalus*) is one of the most famous and spread all over the world; particularly, in Sicily almond represent one of the oldest fruit tree grown and its fruits are the most characteristic ingredients for the preparation of very refreshing drinks, like almond milk or the "orzata". Furthermore, they are an important element of many cooking recipes and essential in confectionary for the preparation of almond biscuits, cakes, confetti, amaretti and torroni; finally they're very appreciated also in the field of cosmetics, perfumery and medicine.

In the aim of a project funded by the Sicilian Region, entitled "Innovazione e valorizzazione della filiera mandorlicola", and finalized to highlight the dried fruits quality of in Sicily grown almond cultivars by studying their mycological and nutritional profile, 7 sicilian autochthonous varieties (cvs), in comparison with four allochthonous Californian and Spanish cvs, were mycologically and chemically analyzed (Tab. 1).

Cultivar	Origin	Shelled (S)/ In shell (IS)
Pizzuta d'Avola	Sicily	IS
Fascionello		
Romana		
Tuono Siciliana		
Ferragnes		
Vindiciattuti		
Carmel		
Sonora		
Valencia	Spain	S
Largueta		

Tab. 1. Almond cultivars analyzed; shelled or in shell is referred to the sample before analysis

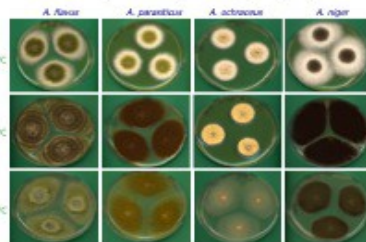


Fig. 1- Colony morphologies of *Aspergillus* spp. representative isolates grown on CYA and MEA plates for 7 d.

FUNGI ISOLATION AND IDENTIFICATION

Dried, shelled almond fruits of each cultivar (25 g) have been analyzed to isolate and identify the total mycoflora and thus the potentially aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* strains. After a preliminary total mycoflora isolation on appropriate culture media the fungal isolates were identified to section level by dichotomic keys [1; 2]. *Penicillium* and *Aspergillus* spp. were morphologically the predominant genera; *Aspergillus* section *Niger*, as well as *A. flavus* and *A. parasiticus* spp., were detected in 3 out of 4 allochthonous almond cvs and just in a Sicilian one (Tuono) whereas in the other Sicilian cvs *Aspergillus* sect. *Niger* or *A. ochraceus* were found (Fig. 1).

FUNGAL MOLECULAR CHARACTERIZATION

To molecularly characterize the *Aspergillus* spp. isolates their genomic DNA was purified by using the Fungi/Yeasts genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Canada) according to the manufacturer's instructions. The followed PCR assays, performed by using species-specific primers, allowed to identify isolates belonging to *A. niger* (ITS1/NIG), *A. ochraceus* (OCRA1/OCRA2) and *A. carbonarius* (CAR1/CAR2) [3; 4] confirming their previous morphological identification. By a quadruplex PCR-based assay, genes involved in the aflatoxin biosynthetic pathway (*afl*, *nor-1*, *ver1* and *omtA* genes) were investigated [5]. Non-aflatoxigenic (*A. flavus* MUCL 18820 and *A. parasiticus* MUCL 18822) and aflatoxigenic (*A. flavus* MUCL 18903 and *A. parasiticus* MUCL 18904) type strains were used as reference strains. The complete genes set was found just in two isolates (Tu3 and Val2) from Tuono and Valencia cvs (Fig. 2, see the yellow boxes). These results showed that, in the common mycoflora of the studied almond dried fruits, the aflatoxigenic *Aspergillus* presence, and the related hygienic-sanitary risk, is very low.

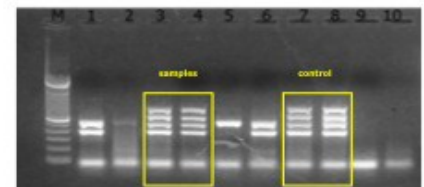


Fig. 2- Agarose gel electrophoretic pattern of quadruplex PCR products. M= 100 bp ladder; 1= *A. flavus* Tu3; 2= *A. flavus* Carm2; 3= *A. parasiticus* Val2; 4= *A. parasiticus* Tu3; 5= *A. flavus* MUCL18820 (non-aflatoxigenic); 6= *A. parasiticus* MUCL18822 (non-aflatoxigenic); 7= *A. flavus* MUCL18903 (aflatoxigenic); 8= *A. parasiticus* MUCL18904 (aflatoxigenic); 9= negative control; 10= distilled water

AFLATOXIN DETECTION AND PRODUCTION

Preliminary HPLC analyses of almond samples showed the absence of aflatoxin contamination. The potential aflatoxin production of the identified *A. flavus* and *A. parasiticus* strains was evaluated by either aflatoxin-inducing Yeast Extract Sucrose (YES) medium culture or HPLC analysis. Strains were inoculated on YES medium and dark incubated at 25-27°C for 7 days. Three agar plugs/colony were removed and extracted in methanol by HPLC according to Rodrigues et al., 2009 [6]. Only two strains (Tu3 and Val2), belonging to *A. parasiticus* and isolated from cvs Tuono and Valencia, were AFB producers. Two *A. flavus* strains (Tu1 and Carm2) produced residual amounts of AFG1, whereas the remaining isolates were atoxigenic.

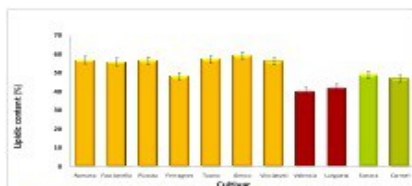


Fig. 3- Lipidic content percentage in the analyzed almond cvs

NUTRITIONAL PROFILE

The lipidic content was determined in the 11 almond cvs by soxhlet method [7]. For all cvs the total fat content ranged between 40 and 60% (referred to dried samples). Spanish cvs showed the lowest lipidic content (40%), followed by the californian one's (about 45%) while the highest lipid content was found in Genco and Tuono sicilian cvs as shown in Fig. 3.

Total Phenolic (TP) compounds were extracted by using three different solvents (ethanol, methanol and isopropanol) added with 1% HCl and determined by the folin-ciocalteu method [8] (Fig. 4). The best solvent, for what concern either operator safety or yield, was the ethanol.

Among the different cvs, Fascionello and Pizzuta showed the best performance followed by Tuono and Valencia while other cvs, among them the californian, showed a lower content (Fig. 5).

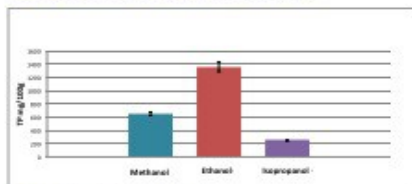


Fig. 4- TP extraction by different solvents

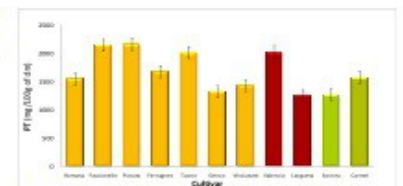


Fig. 5- Total phenolic compounds present in the analyzed almond cvs

CONCLUDING REMARKS

On the basis of the obtained results the sicilian almond cvs show a low hygienic-sanitary risk and an high nutritional content, referred to anti-oxidant and lipidic compounds, if compared to other cvs such as the californian or the spanish one's. The anti-oxidant and the lipidic content of these cvs has been for the first time in literature evaluated; this data, coupled with the lack of aflatoxin samples contamination and the low AFB-producers population, suggests that the sicilian almond cvs may be an important and appreciated component of the mediterranean diet in the global market.

Research carried out in the aim of the project financed by the Sicilian Region "Innovazione e valorizzazione della filiera mandorlicola"

1st International Workshop "Plant Protection for the Quality and Safety of the Mediterranean Diet", Bari, Italy, 24-26 October 2012

Allegato 3

Influence of Degradative Enzymatic Activities on the Shelf Life of Ready-to-Eat Prickly Pear Fruits

D. Scalone, R. Palmeri, F. Licciardello, G. Muratore, A. Todaro, G. Spagna

Abstract— Prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* L. Miller) belongs to the Cactaceae family. This species is very sensitive to low storage temperatures ($< 5^{\circ}\text{C}$) which cause damages. The fruits can be peeled, suitably packaged and successfully commercialized as a ready-to-eat product. The main limit to the extension of the shelf life is the production of off-flavors due to different factors, the growth of microorganisms and the action of endogenous enzymes. Lipoxygenase (LOX) and Pectinesterase (PE) are involved in fruit degradation. In particular, LOX pathway is directly responsible for lipid oxidation, and the subsequent production of off-flavours, while PE causes the softening of fruit during maturation. They act on the texture and shelf-life of post-harvest, packaged fruits, as a function of the the grown of microorganisms and packaging technologies used. The aim of this work is to compare the effect of different packaging technologies on the shelf life extension of ready-to-eat prickly pear fruits with regards for the enzymes activities.

Influence of Degradative Enzymatic Activities on the Shelf Life of Ready-to-Eat Prickly Pear Fruits

D. Scalone, R. Palmeri, F. Licciardello, G. Muratore, A. Todaro, G. Spagna

Abstract— Prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* L. Miller) belongs to the Cactaceae family. This species is very sensitive to low storage temperatures (< 5°C) which cause damages. The fruits can be peeled, suitably packaged and successfully commercialized as a ready-to-eat product. The main limit to the extension of the shelf life is the production of off-flavors due to different factors, the growth of microorganisms and the action of endogenous enzymes. Lipoxygenase (LOX) and Pectinesterase (PE) are involved in fruit degradation. In particular, LOX pathway is directly responsible for lipid oxidation, and the subsequent production of off-flavours, while PE causes the softening of fruit during maturation. They act on the texture and shelf-life of post-harvest, packaged fruits, as a function of the the grown of microorganisms and packaging technologies used. The aim of this work is to compare the effect of different packaging technologies on the shelf life extension of ready-to-eat prickly pear fruits with regards for the enzymes activities.

Keywords— Enzymes, packaging, prickly pear, shelf life;

INTRODUCTION

APPEARANCE, flavor, texture and nutritional value, are the factors considered by consumers. Consumers are increasingly demanding convenient, ready-to-use and ready-to-eat fruits and vegetables with a fresh-like quality, and containing only natural ingredients. Processing of fruits and vegetables into ready-to-use products aims at maintaining freshness without reducing nutritional and sensory quality, hence obtaining a longer shelf life which allows a wider distribution and consumption.

The problem of enzyme degradations in ready-to-use products, obtained following GMPs, is still of primary importance. In the entire vegetable tissues, cellular components such as enzymes, substrates, metabolites and reserve substances, are located in the subcellular organs and do not come in contact with each other. The eventual rupture of cell structures during processing and senescence can determine the out flow of substances and the subsequent onset of enzyme chain reactions, which speed up the decay of qualitative characteristics. Prickly pear is a fruit characterized by a high susceptibility to spoilage at ambient temperature and is sensitive to refrigerated storage temperatures (0 - 4°C) which cause chilling injuries (0 - 4°C) [1].

The main limits to storage of prickly pears are the loss of consistency and the development of off-flavors, due to different factors, such as microbial growth and oxidation and cellular degradation phenomena by endogenous enzymes, whose nature has not been fully clarified. However, basing on studies performed on other fruits [2]-[3], Pectinesterase (PE, EC 3.1.1.11) and Lipoxygenase (LOX, EC 1.13.11) were addressed.

PE is an index of pulp firmness during postharvest of fruits, it was extensively studied in fruits and vegetables by several authors.

In prickly pear fruits changes in the cell wall constituents and enzymes were observed, especially pectins and pectinases [4]. There were no changes in the pectin content of the pulp during ripening, whereas total pectin content of the peel was notably higher and decreased with ripening. The percentage of soluble pectin, however, remained relatively constant during ripening [5].

LOX, found in plants, animals and fungi, catalyzes the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids in lipids containing a cis, cis 1,4-pentadiene structure. LOX action changes the membrane composition, it has been implicated in membrane degradation during fruit ripening and senescence [6]-[7]. It is directly responsible of C6 aldehydes *n*-hexanal and (*E*)-2-

D. Scalone is with TS. Sofia 98, 95010 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 0957141960; e-mail: dscalone@unict.it). R. Palmeri is with Science and Technology Park of Sicily, Blocco Palma I stradale V. Lancia 57, 95010, Catania, (phone: +39 095 292390; fax: +39 095 292330; e-mail: rpalmeri@pstsicilia.it). F. Licciardello is with the University of Catania, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 095 7141960; e-mail: fabio.licciardello@unict.it). G. Muratore is with the University of Catania, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 0957141960; e-mail: gmurato@unict.it). A. Todaro is with the University of Palermo, Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA), Viale delle Scienze 13, 90128 Palermo, Italy. (e-mail: aldo.todaro@unipa.it). G. Spagna is with the University of Catania Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), , via S. Sofia 98, 95010 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 0957141960; e-mail: gspagna@unict.it).

hexenal production in ripe fruits associated to the production of ethylene during postharvest of fruit stored at 20°C [8]. The same was observed in ripe prickly pear fruits that are the object of the present work. LOX activity has been found to increase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during fruit ripening and senescence [9] resulting in a decrease in product quality and commercial value. In pear fruits was observed that LOX and PE were higher during maturation and harvesting. PE and LOX have never been investigated in prickly pear fruits. Aim of this work is to examine the effect of different treatments and packaging on PE and LOX activities.

Materials and Methods

Samples Preparation

Mature prickly pear fruits were harvested in Paternò (province of Catania, Italy), of these 150 were dethorned by removing the glochids and peeled. A part of fruits were used for physico-chemical determinations, as described below. The fruits were packaged, four in each drip, into a barrier film, PET 30 Melinex 850, permeability to O₂, cc/m²/24h: 56, permeability to H₂O vapour, g/m²/24h: 13 under normal atmospheric conditions (Control), and under two modified atmosphere having different O₂ and CO₂ composition (MA1: 5% O₂, 2% CO₂, 93% N₂; MA2: 2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂) [10, 11], the same gas concentrations are generally used for modified atmosphere. The other fruits were blanched at 80 °C for 10 minutes in water (Blanching Treated -BT), and in a solution of 2% citric acid (Blanching + Citric Acid Treated -BCT), and packaged, four in each drip, in the film described above. All samples were stored at 4°C and all analysis were carried out until 13 days from packaging.

B. Composition and nutritional characteristics of ripe fruits

The following determinations were carried out on fruits: weight, yields of pulp, peel, seeds and juice. Pulpes were homogenized by Ultraturrax (Janke & Kunkel) and the following determinations were performed: pH, acidity (expressed as mg citric acid/10 mL of pulp). The determination of pH was conducted by potenziometric method at 20°C, pHmeter (Inolab) was calibrated with buffer solutions. All determinations were carried out in triplicate and all not specified reagents were provided by Sigma.

C. Microbiological Analyses

The microbiological analyses of each trial were performed in triplicate at 0, 3, 5, 7, 9, days of storage at 4°C. Each sample was homogenised and serially diluted in sterile physiological solution (0.9 % NaCl) up to 10⁻⁹. Mesophilic Viable Counts were performed by inclusion in Plate Count Agar (PCA). Yeast and mould counts were carried out in Sabouraud Dextrose Agar (SAB) media. All media were provided by Oxoid.

D. Enzymatic determinations

1. Pectinesterase Assay

Pectinesterase (PE) extraction and quantitative determination was carried out on 20 g of homogenised pulp by a suitably modified method [12, 13], natural pectin from apple was used as substrate.

2. Lipoxygenase Assay

Lipoxygenase (LOX) extraction and quantitative determination was carried out on 20 g of homogenised pulp [14] – [15], and linoleic acid (free acid) 25 nM (Sigma) was used as substrate.

Results and Discussion

The chemical-physical characterization of fruits showed that some of the measured parameters are in agreement with data reported in literature [16]. The yield in edible fruit ranges from 61~8% and can be differentiated into two

fractions: pulp and juice, corresponding to 62 and 38%, while peels amounted to 38~5%. The major components of the fruit pulp are water, about 85%, carbohydrates, 10-12%, expressed as Brix. Soluble solids and total sugar content, generally, increase during ripening. pH and acidity of fruit was 6.0-6.5, as reported for ripe fruits, the acidity was 1.92 (mg citric acid/10 mL of pulp), also in accordance with literature [17].

The microbiological results show the microbiological degradation of packaged fruits during refrigerated storage. The modified atmospheres (*MA1* and *MA2*) determine only a slight decrease of the total bacterial counts on PCA, with a significative decrease of yeasts and molds on SAB (data not shown).

The most interesting results are related to enzymatic determinations, in the different packaged or treated samples during storage. Both enzyme activities, Pectinesterase (PE) and Lipoxygenase (LOX), are responsible for nutritional and sensorial degradation in ripe fruits. From a sensorial point of view, a correlation has been found among PE activity and loss of texture. Figure 1 shows that PE activity at zero is lower for Control, *MA2* and BT samples, compared with *MA1* and BCT samples, but their activity is similar during all the period of storage.

For *MA1*, the activity increases slightly until 8 days, then a sharp decrease of such activity was observed. This could be correlated with the higher initial CO₂ content and with the decrease of O₂ down to values proximate to 0 after 3 days of refrigerated storage. In figure 1 it is also possible to note that heated samples show higher PE activity respect to the control, this due, probably, to the breakdown of cell wall during heating. This result is confirmed in figure 2, in which BCT shows a low total activity, but higher compared with the control. Generally, PE activity does not affect the pectin content of the pulp during ripening. Studies reported few changes in pectin content during ripening until the prickly pear became over-ripe, when total pectin content increased.

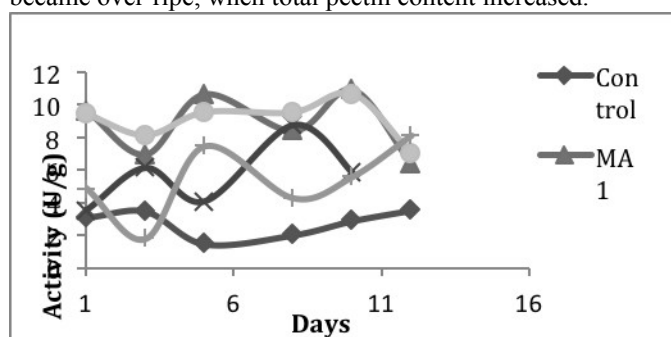


Fig. 1 PE activity (U/g) in different samples.

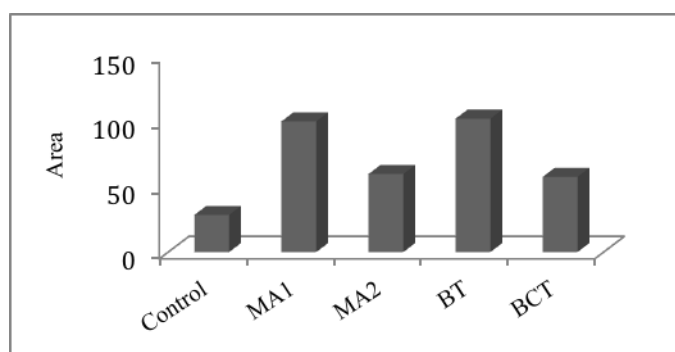


Fig. 2 Total Activity of PE for MA1, MA2, BT, BCT and Control.

Figures 3 and 4 show the course of LOX in the three atmospheres and in the thermally-treated and control samples, respectively. Figure 3 shows that LOX activity increases in both the samples in MA respect control, after nine days of storage the activity is lower. This is probably due to the inhibitory effect of CO₂ in correspondence to a decrease of O₂. In figure 4 LOX activity is lower in heated samples with respect to the control. The effect of blanching is more evident in the samples treated with citric acid. Figure 5 shows the total activity of LOX expressed as area and also this data confirms the above mentioned results.

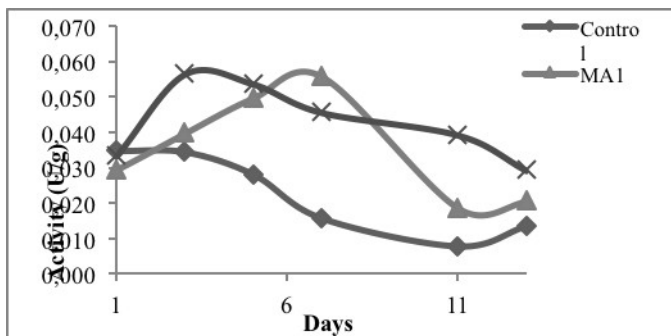


Fig. 3 LOX activity (U/g) in MA1, MA2 and Control.

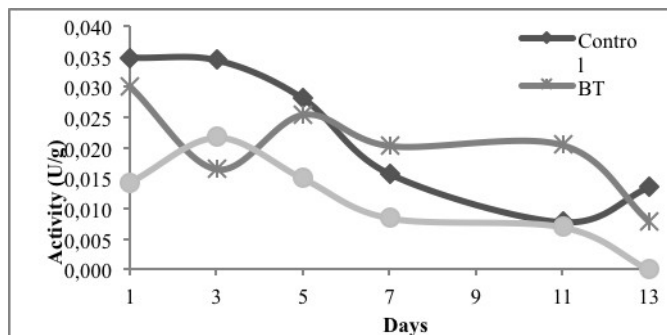


Fig. 4 LOX activity (U/g) in BT, BCT and Control.

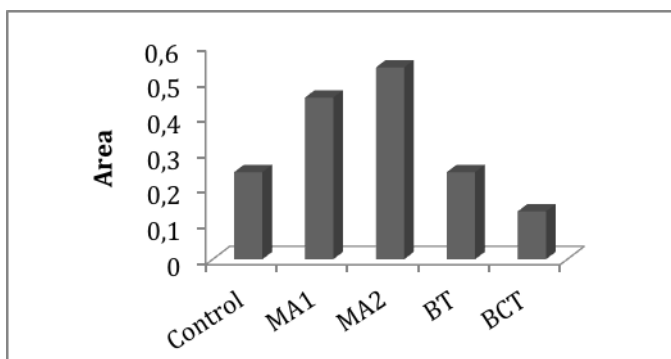


Fig. 5 Total Activity of LOX for MA1, MA2, BT, BCT and Control.

In conclusion, PE and LOX activities are involved in prickly pear shelf-life. Heating treatment and citric acid affect both enzymes, in particular the LOX activity. Results suggest that a chemical-physical characterization of LOX could indicate the best parameters for the control of LOX activity in association with a sensorial evaluation to increase the shelf-life of minimally processed fruits.

REFERENCES

- L.F. Di Cesare, A. Testoni, G. Sansovini, "Studio dei componenti volatili del fico d'india" in *Industrie alimentari*, vol 32 pp. 725-733. 1993.
- M. Chisari, R.N. Barbagallo, G. Spagna, F. Artes, "Improving the quality of fresh-cut melon through inactivation of degradative oxidase and pectinase enzymatic activities by UV-C treatment", *Int J Food Sci Tech*, vol 46, pp. 463-468, Feb. 2011.
- R.N. Barbagallo, M. Chisari, F. Branca, G. Spagna, "Pectin Methylesterase, polyphenol oxidase and physicochemical properties of typical long-storage cherry tomatoes cultivated under water stress regime", *J Sci Food Agr*, vol 88, pp. 389-396, Feb. 2008.
- G.A. Tucker, "Introduction", in *Biochemistry of Fruit Ripening*, In G.B. Seymour, J.E. Taylor, and G.A. Tucker, Ed Chapman & Hall, London, 1993, pp. 1-51.
- U. de O. Bicalho, M. de V. Camargo Pentead, "Estudio de fruto e do articuloda *Opuntia ficus indica* (L.) Miller cultivada em Valinhos, S.

P. Il. *Caracteristica bioquimicas*”, *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo* vol 18, pp.68-74, 1982.
 Y. Luo, “Effects of lipoxygenase on the postharvest physiology of tomato fruit” *Acta Hort. Sinica* vol 21, pp. 357-360, 1994.
 Y. Rogiers-Suzy, G.N.M. Kumar, and N.R. Knowles, “Maturation and ripening of Amelanchier Nutt. Are accompanied by increasing oxidative stress”, *Ann. Bot. London* vol 81, pp. 203-211, 1988.
 B. Zhang, X.-R. Yin, J.-Y. Shen, K.-S. Chen, “Volatiles production and lipoxygenase gene expression in kiwifruit peel and flesh during fruit ripening”, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 134, no 4, pp. 472-477, 2009.
 P.M. Ealing, “Lipoxygenase activity in ripening tomato fruit pericarp tissue”, *Phytochemistry*, vol 36, pp. 547-552.
 M. Cantwell, “Fresh cut products” *Perish. Handli. Newsl.*, vol 81, pp. 2-3, 1995.
 H. Izumi, A.E. Watada, W. Douglas, “Optimum O₂ or CO₂ Atmosphere for storing Broccoli Florets at Various Temperatures”, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol 121, no 1, pp. 127-131, 1996.
 A.E. Hagerman P.J. Austin, “Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase”, *J. Agric. Food Chem.*, vol 34, pp. 440-444.
 G. Spagna, R.N. Barbagallo, B. Ingallinera, “A specific method for determination of pectin esterase in blood oranges”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol 32, pp. 174-177.
 M. Ridolfi, S. Terenziani, M. Patumi, G. Fontanazza, “Characterization of Lipoxygenase in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation”, *J. Agric. Food Chem.*, vol 50, pp. 835-839, 2002.
 E. A Gordon, D.M. Barret, “Colorimetric Method for the determination of lipoxygenase activity”, *J. Agric. Food Chem.*, vol 49, pp. 32-37, 2001.
 R. Barbagallo, G. Spagna, A. Renda, G. Ruberto, “Determinazione di alcuni componenti chimici dei succhi e dell’olio di semi di fico d’india (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill)”, *Ricerca e Innovazioni nell’industria Alimentare*, Chirotti, Ed., Pinerolo, Italy 4, 1139.
 M. Cantwell, “Postharvest management of fruits and vegetable stems”, in *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*, G. Barbera, P. Inglese and P. Pimienta-Barrios, Ed. *FAO Plant Production and Protection Paper 132*, 1995, pp. 120-136.

Allegato 4

Research of the main indexes of freshness anchovy (*Engraulis engrasicolus* Linnaeus, 1758) and sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) of Mediterranean

G.R.A. Alberio, D. Scalone, G. Spagna

Abstract— Anchovy (*Engraulis Encrasicolus*) and sardine (*Sardina Pilchardus*) are blue fishes

linked to our alimentary tradition of Mediterranean. In our work, particularly, we tested for the first time physical and enzymatic methods to verify the freshness of species of blue fish, anchovy and sardine of Mediterranean. In connection with to the lowering of the pH after post-mortem stage we assisted to a increase in proteolytic activity of calpaine and catpsine. Already after 2 h in post-mortem there was a significant increase.

Research of the main indexes of freshness anchovy (*Engraulis engrasicolus* Linnaeus, 1758) and sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792) of Mediterranean

G.R.A. Alberio, D. Scalone, G. Spagna

Abstract— Anchovy (*Engraulis Encrasicolus*) and sardine (*Sardina Pilchardus*) are blue fishes linked to our

.R. A. Alberio DISPA, Department of Agriculturaland FoodScience, University of Catania E-mail: giusialberio@yahoo.it

alimentary tradition of Mediterranean. In our work, particularly, we tested for the first time physical and enzymatic methods to verify the freshness of species of blue fish, anchovy and sardine of Mediterranean. In connection with to the lowering of the pH after post-mortem stage we assisted to a increase in proteolytic activity of calpaine and catpsine. Already after 2 h in post-mortem there was a significant increase.

Keywords— *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus* , *freshness*, *index rigor*.

INTRODUCTION

ANCHOVY (*Engraulis Encrasicolus*) and sardine (*Sardina Pilchardus*) are always considered the food of the poor, but, slowly, they have been revalued for their high nutritional value. In fact they are highly nutritional products, for their contents in water and protein, rich in vitamins and poor in fat and saturated fat when compared with other protein-rich animal food. It is well known that fish oil is the major and the best source of polyunsaturated fatty acids (PUFA), called omega-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA) [1]. Nowadays blue fishes are used to prepare typical traditional products, generally marinated and salted and are parts of exquisite dishes. In fact their richness in water and protein make them suitable to the preparation of ready to eat like live, fresh, chilled, frozen, chopped, dried, salted, pickled, cooked, powder, etc . As seasonal products they must be preserved. One of the main problems related to the trade in fish products not preserved it is given from their easy perishability. After the death, the fish encounters rapidly numerous alterations because of the unstable structure and of the special chemical composition of their tissues [2]. The freshness is the distinctive element of a not damaged product , that does not show marks of alterations and maintains the property of the species unchanged. A fish product is defined fresh when it was caught up to 4 days before, was not damaged and was kept on ice in flakes .It is generally accepted that fresh fish (or fillets/portions) and frozen-thawed fish are types of products which should be differentiated [3]. Fresh fish is understood as being fish freshly caught or which has been chilled and stored for the a short period at normal refrigeration temperature prior to purchase or use. For storage over longer periods freezing is normally utilized. However, while frozen storage is effective in protecting against microbiological deterioration of fish meat, its physicochemical and sensorial properties suffer [4]. The methods developed for differentiating between fresh and thawed fish are evaluated by sensory methods, chemical, physical, biochemical and microbiological processes. In the available literature, there are various methods attempting to distinguish between chilled and thawed fish, used with variable success. In a comparative study with fish using organoleptic parameters, it was demonstrated that the distinction between frozen-thawed and fresh fish from the Gadidae family cod and whiting could be very difficult [5]. The microbiological methods of differentiation are based on the fact that thawed fish tissue is a more appropriate medium for growth of some microbial species. In respective comparative investigations, it was observed that after thawing, the number of microorganisms was higher compared to fresh chilled cod and this resulted in a shorter shelf life of thawed products [6]. The biochemical methods evaluate the enzymes released from the organelles contained in the cells of the fish product after freezings and defrostings. The test produced and optimized are about the search for cytochrome oxidase and glutamate aspartate aminotransferase (GO both present in the mitochondria) , succinate dehydrogenase and lysosomal enzymes. The aim of our research is to obtain the best methods for assessing the freshness of fresh bluefish. In our work, particularly, we tested for the first time physical and enzymatic methods to verify the freshness of species of blue fish, anchovy and sardine of Mediterranean.

II. Material and metods

Along this work selected blue fishes of Mediterranean species were used from anchovy *Engraulis encrasicolus* and sardine *Sardina pilchardus* given by “Cooperativa Ittica “of Catania. The samples of fish come from night fishing with seine (purse seine) in the marine areas of the Mediterranean. The samples were divided into n. 8 lots, identified by the letters S (sardines) and A (anchovies). Immediately after fishing, the samples were placed in tanks with salt water and ice until the death to "thermal shock". Monitoring physical indices was carried out on board. The transport to the laboratory was performed using polystyrene boxes containing ice flakes in a ratio of 2:1. In the laboratory, samples of fish have different destinations. . The samples were have been washed, decapitated, eviscerated, and fillets deliscati obtained, again washed and then dried. According to the method developed by Ho et al. (1999)[7] has been carried out the determination of calpain and cathepsin. In order to verify the freshness of samples was carried out the determination of rigor index in accordance with the method [8] . Statistical processing of data was performed using the program STATISTICA (ver. 6.1).

III. Results and discussion

This assessment is also reflected by the enzymatic data obtained by determining the pH. In fact after the death of the cell we assist to a considerable decrease of the pH of the samples around 4,0 in the citosol that activates such enzymes. To confirm the usefulness of the pH measurement in association to the enzymatic analysis, some authors report lower values than the normal one at the time of death, as a stress index in a lot of species: salmon, tuna, gleans and rumble . In literature, the average pH of sardines and anchovies are respectively 6,11 and 6,18 .When the fish undergoes a stressful death, with prolonged agony, values of lower pH are obtained, due to a greater accumulation of lactic acid. Low values of pH (inferior to 7) measured to the death and in the first hours after the death (until the rigor mortis), indicate that animal has undergone a significant stress. In contrast, pH values higher than 7.6 and superior to those observed to the death, generally indicate an animal "rested". After the rigor mortis the pH normally tends to decline rapidly by the first day of storage [9].

This decrease is linked to the accumulation of lactic acid produced by anaerobic glycolysis in post-mortem, the only way to produce ATP in such a situation. An excessive decrease of the pH would an intense denaturation of the proteins that tend to insolubilize and lose some capacity for water retention that will be released by the tissue. In connection with to the lowering of the pH after post-mortem stage we assisted to a increase in proteolytic activity of calpain and catpsine. Already after 2 h in post-mortem there was a significant increase. In fig. 1 and 2 the proteolytic activity was monitored over 12 h post mortem

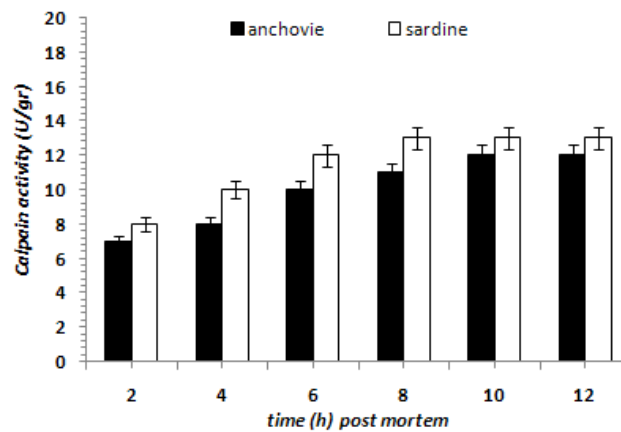


Fig. 1 Calpain activity monitored 12 hours after capture (post mortem)

We observed a maximum activity after 8 h in the sardines, then that value is stabilized. Sardines in a range of proteolytic activity more than anchovies (Fig.1). The mechanism of proteolysis post-mortem of calpain determined the separation of intact filaments of actin and myosin, possible substrates of the proteasome and cathepsins (Fig.2).

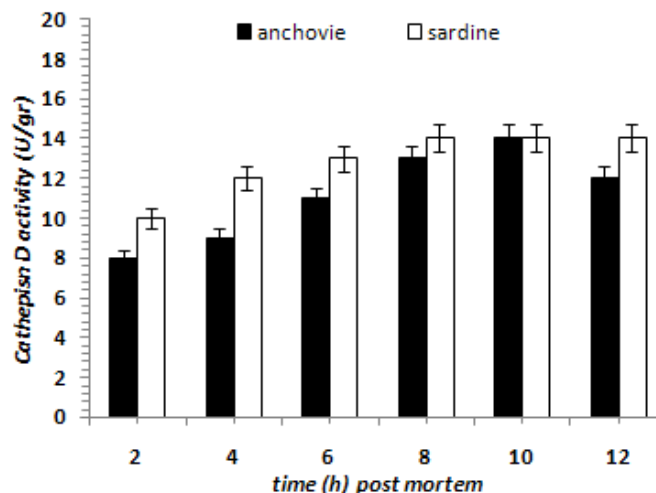


Fig.2 Cathepsin D activity monitored 12 hours after capture (post mortem)

This determined a consequent softening of meat and the consequent lowering of the index of freshness. Different authors have studied this phenomenon but in different species as tilapia[10], the salmon[11,12], the mackerel[13,14], the carp[15,16]. After the step of post-mortem we observed an increase in the index of rigor mortis (Fig.3). This increase was observed [17] in different species as plaice, parrot bass, yellowtail, carp, red sea-bream, striped grunt, tiger puffer and rainbow trout. The sardines had a rigor index less than anchovie.

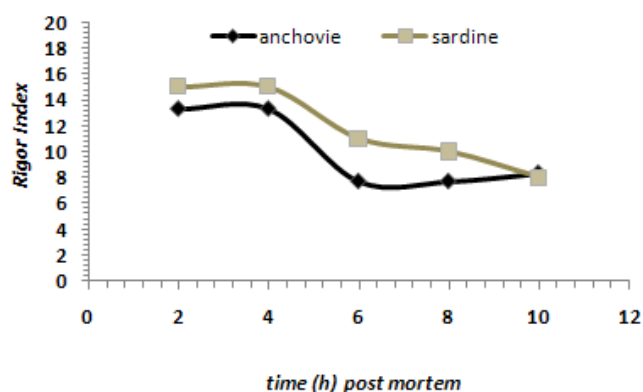


Fig.3 Rigor Index monitored 12 hours after capture (post mortem)

Conclusion

The analyzes show the use of indices of freshness applied for the first time in a species of blue fish. It could be a valid alternative to traditional methods. In particular the increase in the proteolytic activity of cathepsin D confirms the data in the bibliography of the biochemical mechanism of post-mortem. This process results in an increase of cathepsins and reduced activity of calpain, leading the greater calcium concentration in the tissues. The index of rigor mortis determined to those species of small size for the first time was very good. This could be used directly in the fish markets of the Mediterranean to check the freshness of the blue fish.

REFERENCES

- Ozogul, Y., Ozyurt, G., Ozogul, F., Kuley, E., and Polat, A. 2005. Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chimica and microbiological methods. *Food Chem.*, 92, 745-751.
- Ouali A. 1992. Proteolytic and physiochemical mechanism involved in meat texture development. *Biochimie*, 74, 251-265
- Rehbein H. 1979. Development of an enzymatic method to differenziate fresh and sea-frozen and thawed fish fillets. *Z Lebensm Unters-Forsch.* 169: 263-265
- Uddiin M, Okazaki E. 2004. Classificatin of fresh and frozen-thawed fish by near-infrared spectroscopy. *J Food Sci.* 69: C665-668.
- Bennett, R. & M. Hamilton, 1986. Consumer acceptability of cod and whiting after chilled storage and freezing and thawing. *Journal of Food Technology*, 21, 311-317.
- Vyncke, W., 1983. Shelf life of thawed cod fillet kept in ice. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 177,1921.
- Ho M.L., Chen G.H., Jiang S.T. 1999. Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation on mackerel surimi. *Fish. Sci.* 66: 558-568.
- Bito M., Yamada K., Mikuma Y., Amano K. (1983). *Tokay Reg. Fish. Res. Lab.*, No. 109, 89-96.
- Sigholt T., Erikson U., Rustad T., Johansen S., Nordvedt T.S., Seland A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.* 62: 898-905.
- Jiang S.T., Wang Y.T., Gau B.S., Chen C.S. (1990). Role of pepstatin-sensitive proteases on the postmortem changes of tilapia (*Tilapia nilotica X Tilapia aurea*) muscle myofibrils. *J. Agric. Food. Chem.* 38: 1464-1468.
- Yamashita M, Konagaya S. (1990). Partecipation of Cathepsin L into extensive softening of muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1271-1272.

- Geesink G.H., Morton J.D., Kent M.P., Bickerstaffe R. (2000). *Partial purification and characterization of Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis*. J. Food Sci. 65 1318–1324.
- Aoki T., Ueno R. (1997). *Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle*. Food Res. Int. 30: 585–591.
- Ho M.L., Chen G.H., Jiang S.T. (1999). *Effects of mackerel cathepsins L and L-like, and calpain on the degradation on mackerel surimi*. Fish. Sci. 66: 558-568.
- Ogata H., Aranishi F., Hara K., Osatomi K., Ishihara T. (1998). *Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L*. J Sci Food Agric, 76, 499-504.
- Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noël J., Fleurence J. (2002). *In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmatic proteins of white muscle of sea bass (Dicentrarchus labrax L.): effects of cathepsins B, D and L*. Food Chem. 81: 517-525
- Masashi A., Haruhiko T., Yutuka S., Morihiko S. (1991). *Post-Mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis*. Nippon Suisan Gakkashi 57(6), 1165-1169.

Allegato 5

Removal of bitter compounds from citrus byproducts

A. Todaro, R. Palmeri, D. Scalone, G.R.A. Alberio, M. Serafini, G. Spagna

Abstract – Bitter compounds like limonoids occur naturally in citrus, their derivatives products

and in citrus byproducts. Limonoids are chemically highly oxygenated triterpenoid compounds. Removal of limonoids from citrus is a fundamental topic in citrus industries. Several authors have worked on removal of limonoids using solvent or adsorbents directly used on juices. The aim of this work was to set a simple methods to removal limonoids from citrus byproducts applicable by industries.

Removal of bitter compounds from citrus by products

A. Todaro, R. Palmeri, D. Scalone, G.R.A. Alberio, M. Serafini, G. Spagna

Abstract – Bitter compounds like limonoids occur naturally in citrus, their derivatives products and in citrus byproducts. Limonoids are chemically highly oxygenated triterpenoid compounds. Removal of limonoids from citrus is a fundamental topic in

A. Todaro is with the University of Palermo, Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA), Viale delle Scienze 13, 90128 Palermo, Italy. (phone +39 09123897072; e-mail: aldo.todaro@unipa.it).

R. Palmeri is with Science and Technology Park of Sicily, Blocco Palma I stradale V. Lancia 57, 95010, Catania, (phone: +39 095 292390; fax: +39 095 292330; e-mail: rpalmeri@pstsicilia.it).

D. Scalone is with the University of Catania Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 0957141960; e-mail: dscalone@unict.it).

G.R.A. Alberio is with the University of Catania, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy (phone: +39 0957580201; fax: +39 095 7141960; e-mail: gusialberio@yahoo.it).

M. Serafini is with the INRAN, Director "Functional Food and Metabolic Stress Prevention" Program Rome, Italy and Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb University Croatia (e-mail: serafini_mauro@yahoo.it).

G. Spagna is with the University of Catania, Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy (phone: +39 0957580215; fax: +39 0957141960; e-mail: gspagna@unict.it).

citrus industries. Several authors have worked on removal of limonoids using solvent or adsorbents directly used on juices. The aim of this work was to set a simple methods to removal limonoids from citrus byproducts applicable by industries.

Keywords – limonoids, citrus byproducts, extraction;

INTRODUCTION

BITTERNESS is mainly ascribed to the presence of limonoids (triterpenes) and flavanone glycosides (flavonoids), namely limonin and naringin. Citrus waste management (about 350-420 thousands ton/year) represents an environmental and economic problem because pulp, pulp wash and yellow water are hard-to-digest and relatively resistant to microbial degradation (high COD and BOD5 indexes) due to their high content of bioactive compounds with antimicrobial activity. These latter included ascorbic acid, limonoids and polyphenols. Although some works in literature started to investigate about their potential pharmacological proprieties and activities, their study could be considered as still open topic in experimental food research. As far as limonoids, few studies deal with their recovery in vitro just from peel waste, while main are related to their extraction from citrus juice and citrus pulp (respectively for human and animal foodstuffs) to avoid bitter taste development. Citrus waste pulp is a natural source of polymeric pectin which could be used as substrate to bio ethanol production, after enzymatic hydrolysis by using bioethanol yeasts. Natural waste compound such as limonoids could oppose this digestion as described before. Their extraction and recovery could be a good expedient to increase waste bio decomposition and to produce compounds (the aglycone derivatives) with potential pharmacological proprieties and activities; in particularly studies investigated their positive effect on plasma cholesterol reduction, on prevention of cancer in humans and on insecticidal effect. Limonoids are absolutely no toxic and safe for use on human nutrition, even at high concentrations, as confirmed by their use in organic crops productions as natural extract from Rutaceae and Meliaceae vegetal families.

Citrus byproducts are a good source of limonoids. Limonin and nomilin are the most prevalent of the citrus limonoids. Limonin's formation is due to low pH and to limonin D-ring lactone hydrolase activity that is an endogenous enzyme [...]. Limonin's presence conferred a bitter taste to juices and byproducts at 6 ppm concentration (Guadagni et al., 1973). Limonin's presence in juices is unwanted so many authors are tried to remove limonoids from juices and molasses (Pifferi et al 1993; Bianchi et al. 1995).

Limonoid's bioactivity was demonstrated recently by many authors. Limonoids are natural products of fruits normally present in the nutrition of humans and animals which are highly biocompatible and without negative effects (Cui B et al 1997) (Manners GD et al 2004).

Recently it has been proposed that biological active compounds extracted by citrus may exert an immunomodulatory and an anti-inflammatory activity. These effects may be partly due to flavonoids content (naringenin, esperidin, nobiletin and tangeretin) and involve inhibitory effects on both macrophages (Li et al. 2008, Bodet et al. 2008) and lymphocytes (Fang et al. 2010, Li et al. 2008) responses. Literature results on immunomodulatory effects of terpenic compounds in citrus (limonoids) are contrasting. In particular, limonin shows anti-inflammatory effects in animal model in vivo (Matsuda et al. 1998) and on lymphocytes' proliferation in vitro (Kimet al. 2009a). Recently it has been reported, in a skin graft model in mice, that obaculacton inhibited Th1 effector cells and enhanced the percentage of regulatory T cells (Treg) (Gong et al. 2010).

Also the effects on lymphocytes proliferation are contrasting and dose-dependent; at concentration between 5-50 µg/ml increases significantly lymphocytes proliferation, while higher concentration (1000 µg/ml) inhibits lymphocytes proliferation (Roberto et al. 2010). Results on mice models suggest for limonoids a possible pharmacological application as anti-inflammatory and immunosuppressive agents, however evidences on human cells are missing; therefore the aim of the

study is to analyze the effect of limonoids in vitro on leukocytes from healthy subjects.

Limonin has been tested as inhibitor of colon cancer (Guthrie et al., 2000). Others tests have been reported limonin's effect on activities of the phase I cytochrome P450 enzyme system and the phase II enzyme glutathione S-transferase (GST) in the liver and small intestine of the rat (Kelly et al., 2003). Citrus limonoids might be useful for the prevention of different human cancers.

Materials and Methods

Samples preparation

Citrus byproducts (orange peel from orange juices industries) were obtained from local industries.

Analysis of raw material, products, citrus byproducts

Several orange cultivars were transformed and juices and byproducts were analyzed. Acidity, °Brix, dried weight were determined. It was quantified and characterized the bioactive recovered compounds and their precursors, in particularly limonoid aglycones and limonoid glycoside.

All determinations were carried out in triplicate and all not specified reagents were provided by Sigma.

Limonoids extraction.

Limonoids extraction from byproducts was carried out using aqueous solution of sodium hydroxide at different pH.

Limonoids determination.

The limonoids determination was carried out by HPLC-DAD in according to Rouseff [...] with the following condition: HPLC (Shimadzu, Japan) using two pumps (LC-10A), a control system (SCL-10A), an injector (Rheodyne with 20 µl loop), a photodiode detector (SPD-M10A), a C18 Alltima ODS Hypersil column 250 mm 4.6 mm I.D. (Milan, Italy) and a similarly packed pre-column. The mobile phase consisted of acetonitrile water 65:35. Sample elution used the isocratic programme. All chromatographic tests were carried out at 25 °C with 1 mL/min flow. The samples were filtered with PTFE 0.45 µm filters before HPLC injection. The peaks were identified by comparison with retention times of the limonin standards. Samples were quantified by the internal standard method.

Results and Discussion

The composition of orange peel is showed in table 1. The extraction methods of limonin set, was applicable to industry because solvent free. In fact, the limonin that was the main limonoids present in byproducts, it is insoluble at low pH (<5) but it is soluble at high pH (around 8) because it is in form of limonate A-ring lactone (Fig. 1). The ratio of extraction was about 80% of total limonin as showed in figure 2.

	composition of orange peel		
	(% of DW)		
	mean	range	
Ash	6.39	2.55	13.22
Sugar	7.69	3.52	10.07
Fat	1.77	0.52	4.00
Protein	8.92	6.55	12.51
Flavonoid	5.32	1.51	11.00
Pectin	11.97	2.58	23.02
Lignin	10.12	7.52	14.73
Cellulose	28.92	20.74	39.00
Hemicellulose	8.36	5.59	11.05

Table 1- Analysis on orange byproducts

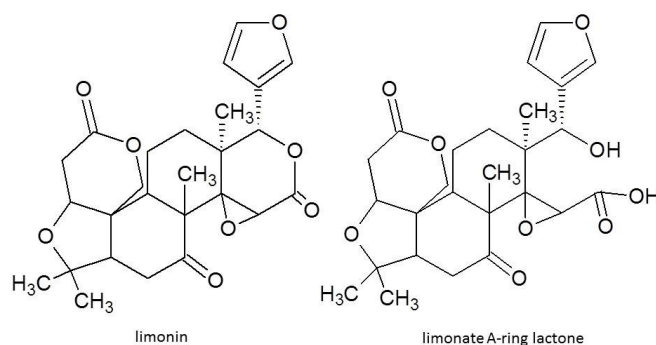


Fig. 1 – Limonin and limonate A-ring lactone structure.

REFERENCES

- Ribeiro, M.H.L.; Dirce Silveira Suzana Ferreira-Dias Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents *Eur Food Res Technol* (2002) 215:462–471
- Manners G.D. Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity, and Biomedical Prospects. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 8285–8294.
- Karel Grohmann, John A. Manthey, Randall G. Cameron, and Bela S. Buslig. Purification of Citrus Peel Juice and Molasses. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4859–4867
- Battinelli, L.; Mazzanti, G.; Mengoni, F.; Lichtner, M.; Mastroianni, C. M.; Vullo, V.; Saija, A. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells. *Planta Med.* 2003, 69, 910-913.
- Bianchi G., Setti L., Piffèri P.G., Spagna G. (1995). Limonin removal by free and immobilized cells. *Cerevisia*, 2, 41-46
- Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res.* 2008 Aug;43(4):400-7.
- Boix-Fayos C., Calvo-Cases A., Imeson A.C., Soriano-Soto M.D. Influence of soil properties on the aggregation of some Mediterranean soils and the use of aggregate size and stability as land degradation indicators. *Catena* (2001) 44, 47-67
- Breksa A.P., Dragull K., Wong R.Y. Isolation and Identification of the First C-17 Limonin Epimer, Epilimonin. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (14), 5595-5598.
- ChongDe Sun, KunSong Chen, Yang Chen, QingJun Chen. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry* 93 (2005) 599-605.

Conforti F, Tundis R, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, De Cindio B, Menichini F, Houghton PJ. Protective effect of *Pimpinella anisoides* ethanolic extract and its constituents on oxidative damage and its inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Med Food*. 2010 Feb;13(1):137-41.

Dan A. Kimball. Processing Effects during Commercial Debitting of California Navel Orange Juice. *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 1396-1400

El-Readi M.Z., Hamdan D., Farrag N., El-Shazly A., Wink M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from Citrus species in human colon and leukaemia cell lines. *European Journal of Pharmacology* 626 (2010) 139-145.

Fang F, Tang Y, Gao Z, Xu Q. A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 13.

Gong F, Shen Y, Zhang Q, Sun Y, Tang J, Tao F, Xu Q. Obaculactone suppresses Th1 effector cell function through down-regulation of T-bet and prolongs skin graft survival in mice. *Biochem Pharmacol*. 2010 Jul 15;80(2):218-25.

Guadagni DG, Maier VP, Turnbaugh JG. Effect of some citrus juice constituents on taste thresholds for limonin and naringin bitterness. *J Sci Food Agric* 24:1277-1288 (1973).

Guthrie, N.; Morley, K.; Hasegawa, S.; Manners, G. D.; Vandenberg, T. Inhibition of human breast cancer cells by citrus limonoids. In *Citrus Limonoids s Functional Chemicals in Agriculture and Foods*; Berhow, M. A., Hasegawa, S., Manners, G. D., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2000; pp 164-174.

Herman Z., Fong C.H., Ou P., Hasegawa S. Limonoid Glucosides in Orange Juices by HPLC. *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 1860-1861.

Herman Z., Hasegawa S., Fong C.H., Ou P. Limonoids in Citrus ichangensis. *J. Agric. Food Chem*. 1989, 37, 850-851.

Imrich A, Ning YY, Kobzik L. Intracellular oxidant production and cytokine responses in lung macrophages: evaluation of fluorescent probes. *J Leukoc Biol*. 1999 Apr;65(4):499-507.

Karim M.R., Hashinaga F. Preparation and properties of immobilized pummelo limonoid glucosyltransferase. *Process Biochemistry* 38 (2002) 809-814

Karim M.R., Hashinaga F. Isolation and characterization of limonoid glucosyltransferase from pummelo albedo tissue. *Food Chemistry* 76 (2002) 431-436

Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009;3(1):73-80.

Kelly C., Jewell C., O'Brien N.M. The effect of dietary supplementation with the citrus limonoids, limonin and nomilin on xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat. *Nutrition Research* 23 (2003) 681-690

Kim JH, Park YM, Shin JS, Park SJ, Choi JH, Jung HJ, Park HJ, Lee KT. Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages cells. *Biol Pharm Bull*. 2009b Jun;32(6):1062-8.

Kim W, Fan YY, Smith R, Patil B, Jayaprakasha GK, McMurray DN, Chapkin RS. Dietary curcumin and limonin suppress CD4+ T-cell proliferation and interleukin-2 production in mice. *J Nutr*. 2009a May;139(5):1042-8.

Kumar G.H., Chandra Mohan K.V.P., Jagannadha Rao A., Nagin S. Nimbolide a limonoid from *Azadirachta indica* inhibits proliferation and induces apoptosis of human choriocarcinoma (BeWo) cells. *Invest New Drugs* (2009) 27:246-252.

Li R, Li J, Cai L, Hu CM, Zhang L. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J Pharm Pharmacol*. 2008 Feb;60(2):221-8.

Maneerata W., Laphookhieoa S., Koysomboonb S., Chantraprommac K.. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine* 15 (2008) 1130-1134.

Matsuda H, Yoshikawa M, Iinuma M, Kubo M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*. *Planta Med*. 1998 May;64(4):339-42.

Patil J.R., Jayaprakasha G.K., Murthy K.N.C., Chetti M.B., Patil B.S. Characterization of Citrus aurantifolia bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis. *Microchemical Journal* 94 (2010) 108-117

Pifferi P.G., Manenti I., Morselli L., Spagna G. Isolation and purification of limonin from lemon seeds. *J. Food Sci*. 3 (1983), pp. 269-276

Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H2O2 modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010; 106(1):38-44.

Rouseff R.L., Fisher J.F. Determination of Limonin and Related Limonoids in Citrus Juices by High Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem*. 1980, 52, 1228-1233

Schoch T.K., Manners G.D., Hasegawa S. Recovery of Limonoid Glucosides from Citrus Molasses. 2002 *Journal of Food Science* Vol. 67, Nr. 8, 3159-3163

Sunil VR, Laumbach RJ, Patel KJ, Turpin BJ, Lim HJ, Kipen HM, Laskin JD, Laskin DL. Pulmonary effects of inhaled limonene ozone reaction products in elderly rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 15;222(2):211-20.

Tian Q., Miller E.G., Jayaprakasha G.K., Patil B.S.. An improved HPLC method for the analysis of citrus limonoids in culture media. *Journal of Chromatography B*, 846 (2007) 385-390.

Vikram A., Jayaprakasha G.K., Patil B.S. Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 590 (2007) 180-186

Wallace PK, Tario JD Jr, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, Muirhead KA. Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry A*. 2008 Nov;73(11):1019-34.

Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*. 2003 May;331(1-2):103-10

Yan Liang, Lin Xie, Xiao-Dong Liu, Tong Lu, Guang-Ji Wang, Yu-Zhu Hu. Determination of limonin in rat plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 1031-1035

Yu J., Dandekar D.V., Toledo R.T., Singh R.K., Patil B.S.. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food Chemistry* 105 (2007) 1026-1031 .

Allegato 6

Characterization of Lipoxygenase in prickly pear fruits and influence in aromatic profile

D. Scalone, R. Palmeri, A. Todaro, G. Muratore, G. Spagna

Abstract – Lipoxygenase from three prickly pear cultivars was established, through a continuous and discontinuous assay, yellow prickly pear shows the higher enzyme activity. The continuous assay allows greater sensitivity and accuracy of enzyme activity, and for lipoxygenase from yellow prickly pear pulp a characterization was conducted. Optimal pH and temperature, inhibition from glucose and EDTA, thermal stability and at ethanol were established. An SDS-PAGE electrophoresis was conducted in order to estimate the molecular weight of enzyme from prickly pear in comparison to lipoxygenase from soybean. Finally, the volatile compounds were determined and a correlation with lipoxygenase activity was reported.

Characterization of Lipoxygenase in prickly pear fruits and influence in aromatic profile

D. Scalone¹, R. Palmeri^{1*}, A. Todaro², G. Muratore¹, G. Spagna¹

¹ University of Catania Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), via S. Sofia 98, 95010 Catania via S. Sofia 98, 95010 Catania, Italy.

² University of Palermo, Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali (SAGA) viale delle Scienze 13, 90128 Palermo, Italy.

*Corresponding author. Tel.: + 39 0957580201 fax: + 39 095 7141960

E-mail: rpalmeri@unict.it

Abstract

Lipoxygenase from three prickly pear cultivars was established, through a continuous and discontinuous assay, yellow prickly pear shows the higher enzyme activity. The continuous assay allows greater sensitivity and accuracy of enzyme activity, and for lipoxygenase from yellow prickly pear pulp a characterization was conducted. Optimal pH and temperature, inhibition from glucose and EDTA, thermal stability and at ethanol were established. An SDS-PAGE electrophoresis was conducted in order to estimate the molecular weight of enzyme from prickly pear in comparison to lipoxygenase from soybean. Finally, the volatile compounds were determined and a correlation with lipoxygenase activity was reported.

Keywords— Lipoxygenase, prickly pear, characterization, volatile compounds.

1. Introduction

Prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* L. Miller) belongs to family of Cactaceae, due to their remarkable genetic variability, *Opuntia* plants show a high adaptivity (Moffhammer et al., 2006) at maturation the epicarp takes on the characteristic color white, yellow or red.

The prickly pear fruit, called tuna, consisting of a thick fleshy skin or rind (30-40 percent of total fruit weight), which contains many hard-coated seeds (5-10 percent of the pulp weight). Each *Opuntia* specie produces fruits of different shapes, colours and delicate flavours. The major components of the fruit pulp are water (85%) and carbohydrates (10-15%) the majority of sugars are the reducing, about 53% is glucose and the rest is fructose. Besides with important amounts of vitamin C, that varied from less than 10 to more than 40 mg /100 g of pulp among different *Opuntia* species (Cantwell, 1995). Prickly pear fruit is very perishable at environmental temperature and sensitive to cold damages, when the storage temperature is lower than 10 °C (Corbo et al., 2004)

Recently, prickly pear LOX was detected in the membrane fraction of the fruits extracts at various stage of ripening, its activity increased with fruit ripening (Schirra et al., 1997; De Gregorio et al., 2010).

Oxidoreductase enzymes are the direct responsible for lipid oxidation, which cause the production of off-flavours and consequently the shelf-life of fruits. Among these Lipoxygenases (linoleate: oxygen oxydoreductase, EC 1.3.11.12, LOX) assumes an important role, it is a dioxygenase that catalyzed the oxygenation of the polyunsaturated fatty acids (PUFA) to form fatty acid hydroperoxides (Baysal and Demirdoveni, 2007).

Lipoxygenases are ubiquitous enzymes in plants, they have been mainly described in seeds and in storage organs, fruits and embryos (Hildebrand, 1989), several LOX cDNAs and genes have been isolated from plant species (soybean, pea, rice) and animal tissues.

Plant LOXs are generally classified according to their positional specificity for linoleic acid oxygenation, mainly at carbon atom 9 (9-LOX) and at carbon atom 13 (13-LOX). Among the various plant sources, soybean, pea, and cucumber contain 13-LOX activity. Potato, tomato, and almond, contain 9-LOX activity. Green macroalga contains both 9- and 13-LOX. The C-6 and C-9 volatile flavor compounds were derived from the action of 13- and 9-LOX, respectively (Kuo et al. 2006).

Even if LOX activity has been reported by numerous researcher in a wide range of plant species, our knowledge of the type of LOX in a particular process is still limited, at the biochemical level three different forms of the enzyme from soybean were distinguished by comparing such properties as pH optimum, substrate specificity, product formation and enzyme stability (Axelrod et al., 1981). It is known that LOX from different sources may differ for substrate specificity, optimum pH and activity.

In many vegetables the limiting quality attribute during postharvest storage is off-flavor development, which is most often catalyzed by LOX.

LOX pathway is the first step for the formation of volatile compounds and consequent of off-flavors in fruits and color loss during frozen storage vegetables (Barrett and Theerakulkait, 1995).

Generally, flavor formation is a result of breakdown of complex molecules into low molecular weight structures (Aharoni et al. 2005). Some of the flavor compounds may be the products of non-enzymatic interactions such as the reaction of an alcohol and an acid (Zabetakis and Holden, 1997). Precursors of the non-enzymatic reactants and some of the flavor compounds are formed by serial enzyme reactions such as the lipoxygenase pathway (Aparicio et al., 2000, De Pooter et al., 1989, Luning et al., 1995, Zabetakis and Holden 1997).

Lipids are one of the most important main substrates for flavor formation, and linoleic and linolenic acid are the precursors of most aldehydes, acids, alcohols and esters (Perez et al., 1999). Formation of the volatile compounds in these groups is a result of the lipid oxidation pathway with involvement of a series of enzymes such as lipase, lipoxygenase, lyase, isomerase and alcohol dehydrogenase (Brauss et al., 1998). Hexanoic acid is one of the green odor compounds. Hexanoic acid is formed by hexanal from oxidation (De Pooter and Schamp, 1989). De Gregori et al., (2010)

reported a relation between LOX activity and the stage of ripening of the fruit. These authors supposed also the involvement of LOX from prickly pear in flavor biosynthesis of the fruit.

Researchers have concluded that LOX as a quality indicator in blanched, frozen stored vegetables, but the greatest hindrance is that a rapid assay is not yet available (Barrett and Theerakulkait, 1995).

Aim of this work is the kinetic and physico-chemical characterization of LOX from prickly pear through a continuous assay, developed by spectrophotometric method, and the correlation of LOX activity with aromatic components in prickly pear fruits.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH), 3-(dimethylamino)benzoic acid (DMAB), Hemoglobin, Linoleic acid, Tween 80, Sodium lauryl sulfate 1%, Polyvinylpyrrolidone (PVP), Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), Ferrous Sulphate, Ammonium Sulphate, Triton X-100, Dithiothreitol (DTT), Ethanol, EDTA, Glucose and Sigmamarker, were purchased from Sigma Chemicals. Acrilamide/Bis 40%, Sodium dodecil sulphate (SDS), Temed, Ammonium persulphate (PSA) were purchased from Biorad. All reagents not specified were purchased from Carlo Erba.

2.2 Lipoxygenase extraction/isolation

LOX extraction was conducted on three different prickly pear varieties red, yellow and white, that were picked from Catania farms. Prickly pear pulp (20 g) was homogenized in 60 mL ice-cold sodium phosphate buffer (Na-P, 0.05 M, pH 6.5), containing dithiothreitol (DTT) and EDTA in accordance with Ridolfi et al. (2002), using a Turrax homogenizer. Polyvinylpyrrolidone (PVP) and Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) were added and the homogenate was centrifuged at 9,000 g for 15 min at 4 °C, the pellet was resuspended in Na-P buffer.

2.3 Quantitative Lipoxygenase assay

LOX activity was assayed in the extract by a discontinuous simplified method, as described by Gordon et al., (2001). For the assay were mixed phosphate buffer 100 mM pH 8.0, 400 µl substrate solution (8.6 mM linoleic acid, 0.25% (v/v) Tween-20, 10 mM NaOH, in 0.1 M phosphate, pH 8.0), and 100 µl enzyme extract. The reaction was carried out for 20 min at 25 °C and was stopped by sodium lauryl sulfate solution 1% (w/v), absorbance at 598 nm was then determined.

Activity in the crude extract was measured, also, by following spectrophotometrically the increase in absorbance at 598 nm, due to formation of hydroperoxides from linoleic acid during the catalytic reaction. The solution absorbance containing the same composition described before, was measured in a thermostated and stirred spectrophotometer cuvette at 25 °C at 6-s intervals for 20 min.

One activity unit (U) was defined as the increase in one unit of absorbance at 234 nm min⁻¹, and the results were expressed as specific activity (U mg protein⁻¹) determined in accordance to Bradford (1976).

2.4 Characterization of Lox from prickly pear pulp

LOX activity was determined in the three cultivars in order to identify the differences, the yellow showed the highest activity, so it was characterised. The kinetic behaviour and the physico-chemical parameters were established: concentration of substrate at saturation, optimum pH, optimum temperature, inhibitions from glucose and EDTA, thermal and ethanol stability.

2.4.1 Kinetic parameters determination

Substrate solutions were prepared by increasing concentration up to saturation point (from 5 mM to 80 mM), the assay was conducted on prickly pear yellow pulp in triplicate by both continuous and discontinuous method.

For the determination of optimum pH were used sodium-phosphate buffer solutions (Na-P) 50 mM, under different pH conditions from 3.0 to 9.0, in such a way as to assess the enzyme behaviour even in very different conditions to those prickly pear.

For the determination of optimum temperature, LOX activity of prickly pear yellow pulp, was assayed from 4 to 60 °C in order to determine optimum temperature, using the method already described under different temperatures. The assays were conducted by continuous method.

2.4.2 Inhibition from glucose and EDTA

Glucose inhibition test was conducted using sugar concentrations from 20 to 80 % (w/v), in order to evaluate the effect of glucose on LOX activity.

The effect of EDTA on LOX activity was also evaluated, at this scope was used different EDTA solutions, from 0.1 to 0.8 mM, with the respect to the total volume of the assay.

The assays were carried out as previously described, except as regards sugar and EDTA concentrations, these being added in proportionate amounts so as to ensure a constant final volume.

2.4.3 Thermal and ethanol stability of LOX

Thermal stability of enzyme was tested at six different times (5, 10, 20, 30, 60 and 90 min) for three different temperatures (20 °C, 30 °C and 40 °C).

The effect of ethanol in the time on LOX activity was tested, at this scope different solutions of ethanol and enzyme (1:1 v/v) were prepared, varying ethanol concentration from 5 to 40% in the assay. The assays were conducted as already described.

2.5 SDS - PAGE electrophoresis

The enzyme obtained from prickly pear yellow pulp extraction was used for SDS-PAGE electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis) to determine the molecular weight, in accordance to Schagger and von Jagow (1987).

SDS electrophoresis was conducted on polyacilamide gel 14% (w/v), in accordance to Laemmli (1970), Sigmamarker (Sigma Chemical-Co, USA) was used as internal standard and LOX from soybean (Sigma) was used as referement.

The samples previously partially purified by ammonium sulohate precipitation (80% saturation) were put in touch with a 14 % (w/v) polyacrilamide gel, the samples were dissolved according to the protein content determined by Bradford method . The run was conducted at 20 mA for one hour. Blue Comassie R-250 (Biorad) was used for revelation of protein bands.

2.6 Determiation of aromatic compounds

Volatile compounds of red, yellow and white prickly pear pulp were analysed by Solid Phase Micro Extraction (SPME) method, they were identified by using GC–MS instrument (HP GC6890; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), and an MS detector (HP MS5973). The gas chromatograph was equipped with a 60 m · 0Æ25-mm internal diameter · 0Æ25-lm film thickness fused-silica capillary column (Alltech AT-WAX, Milan, Italy) and the injector temperature was 250 °C. The conditions were as follows: carrier gas, helium; column flow rate, 1Æ0 ml min) 1; over temperature program 1min at 50 °C, increased at 3 °C min)1 to 250 °C and 1 min at 250 °C. The injector was operated in the split mode with the purge activation time adjusted to 5 min. The transfer line was held at 280 °C. The ionization was by EI at 70 eV. Ion source was held at 230 °C, quadruple at 150 °C and calibration was by auto-tuning. A ChemStation data system (G1701CA; Hewlett Packard) was used for data processing. Peak identification was accomplished by comparison of the retention times with those of the reference compounds (NIST/EPA/MSDC Mass Spectral Database, T.G. House, Cambridge, UK). A Supelco SPME (Bellefonte, PA, USA) fibre holder and a 100-lm polydimethylsiloxane-coated fused-silica fibre were used. Prior to the first extraction, the fibre was conditioned in the GC injector port at 300 °C for 1 h according to the manufacturer’s recom- mendations. Ten grams of pulp sample were added to a 35-mL vial. Extraction temperature of head-space and time were 35 °C and 15 min, respectively. Samples were agitated during extraction using a magnetic stirrer. Thermal desorption was performed in the injector at 250 °C for 3 min. All analyses were performed in triplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Quantitative Lipoxygenase assay

LOX activity was assayed and quantified in the extracts obtained from the three cultivars, the assays were conducted by a discontinuous spectrophotometric assay in accordance to Gordon and Barret, 2001. From the comparison of three varieties (Fig. 1), the results show that the yellow pulp extract showing the highest activity, with respect to the red (73%) and white (63%), which could be related to the increased amount of antioxidants in the red variety (Gordon and Barret, 2001).

3.2 Characterization of Lox from prickly pear pulp

3.2.1 Kinetic parameters

Chemical-physical characterization of LOX was conducted on yellow pulp extract, and the enzymatic activity was tested by "continuous" and "discontinuous" method, then kinetic behaviour was studied.

The "continuous method" as suggested by Gordon and Barrett (2001) shows several advantages, compared to conventional methods, is more rapid and selective, this can be observed in figure 2a, which reports the comparison of absorbance respect the time for continuous and discontinuous assay.

The continuous assay allows to avoid interference from any impurities that may alter the actual value of the reading, moreover it was developed to quantify LOX in crude homogenates.

It is based on the determination of reaction products (hydroperoxides) through the oxidation of 3-methyl-2-benzothiazolinone (MBTH) and 3-(dimethylamino)benzoic acid (DMAB) catalyzed by hemoglobin. This method is comparable with that of conjugated dienes that absorb at 234 nm, they are formed by the action of LOX on polyunsaturated fatty acids (linoleic and linolenic acids) of fruit and vegetables, its use is limited by the presence of co-extracted compounds with the enzyme that can absorb ultraviolet.

The kinetic behaviour of the enzyme, both continuous and discontinuous, can not be explained by the equation of Michaelis-Menten (Fig. 2b) it is similar to a typical behaviour from non-productive binding, under conditions of substrate concentration higher than that of saturation (Eisenthal and Danson 1998).

The optimum pH was at 7.0, the enzyme was inactivated at pH further than 9.0 (data not shown). The optimum temperature was also determined and the resulting curve peaked at 30 °C (Fig. 3), while the activity was rather low for temperatures lower than 10 °C and more than 50 °C.

3.2.4 Glucose and EDTA inhibitions

LOX activity was inhibited by glucose, the figure 4a shows that glucose inhibit the enzyme yet at 10% of glucose, and at 40% the activity of enzyme is reduced of 70%.

EDTA reduces the LOX activity at low concentrations, at 0.1 mM the activity is reduced of 80%, this is probably due to its chelating action on the iron present in the protein (Fig. 4b).

3.2.6 Thermal and Ethanol stability

The thermal properties of LOX were established. Stability at temperature was conducted at temperatures at which the activity of LOX is higher, as reported in figure 5a, and was observed LOX activity as a function of time at different temperatures, 20; 30; 40 °C (Fig. xx). Subsequently, was determined the energy of inactivation, which is $E_a = 24.91$ (KJ/mol), con $D = 11.1$ min (Fig. 5a), this value is also confirmed by the figure 5b, with a rapid decrease of enzyme activity after about 7 minutes of incubation. In the figure it is possible observe that the decrease is constant, but after 30 minutes there is a loss of activity by about 80%, this is probably due to the low resistance of enzyme.

As regard ethanol stability LOX activity was tested from 5 to 40%, the results show that the enzyme is stable up to 15% of ethanol, over this concentration the enzyme activity is progressively reduced, and at a concentration of 20% the activity is a reduced of 30% (Fig. 6).

3.3 SDS-PAGE Electrophoresis

The isolation of yellow pulp LOX was detected by a 12% SDS-PAGE and showed two bands with a molecular weight of 30 and 40 kDa respectively (Fig. 7), LOX from soybean was used as internal control with a molecular weight of 98 kDa. The molecular mass of different land plants varying from 86.7 kDa for LOX from *Phaseolus vulgaris* to 182 kDa for microalgae. The molecular mass of LOX from prickly pear showed two bands, similar to the two isoenzymes from potato tuber both 120 kDa, but greater than those found in land plants.

3.4 Aroma

Table 1 shows the content of volatile components, obtained by SPME extraction, in prickly pear fruits. LOX pathway synthesizes the Green Leaf Volatiles (GLVs) that are involved in plant aromatic reactions. GLVs are metabolized from C_{18} -polyunsaturated fatty acids (including linoleic and linolenic acids) producing C_6 - and C_9 -aldehydes primarily responsible for the green-bean-like flavor (Gigot et al., 2010). The 2-hexenal is the aromatic compound prevalent in all three cultivars, but it is mostly present in cv yellow (Schirra et al., 1997) and as shown in table 1. This shows a correlation between LOX activity and the formation of 2-hexenal, since the yellow prickly pear pulp showed the highest activity (fig. 1) from the data shown in the table we can assume that the LOX from three varieties appears more specific towards the double bond in position C-13 rather than C9 of linoleic acid used as substrate. Was also evaluated the quantity of aldehydes and alcohols

during storage of fruits at 10 ± 2 ° C monthly (fig. 7), it is noted an inverse correlation between the aldehydes and the alcohols in the time.

4. CONCLUSIONS

In conclusion, results obtained put in evidence for the first time the evaluation of LOX activity in three varieties of prickly pears through the method developed by Gordon and Barret (2001), was also developed a continuous assay more sensitive for LOX activity. The higher activity was for LOX from yellow prickly pear pulp. The result of chemical-physical characterization show that LOX from yellow pulp does not have a behavior according to the Michaelis Menten kinetics, it is instead inhibited by substrate at a concentration greater than 0.35 mM and 0.1 mM, both for the discontinuous and continuous assay, respectively. The optimum temperature is at 30 °C, the enzyme is inactivated at temperatures of cold storage and is not very stable to temperatures above 30 °C. The study of the temperature stability provides insight into the behavior of lipoxygenase in prickly pears to be used in technological processes. Furthermore, it presents an optimum pH comparable with those reported in the literature for other fruits and vegetables (eg. olive, soybean), is inhibited both in the presence of EDTA and glucose. Electrophoresis in SDS-PAGE has allowed the estimation the molecular weight of the enzyme of 70 kDa.

Finally, The originality of this study is also related to the specific action of lipoxygenase and its correlation with the volatile components found in the pulp of prickly pears, not found among others in the literature. This could help to clarify the complicated mechanism for the formation of off-flavors in plant matrices, considered one of the four main attributes considered by consumers when choosing a food.

REFERENCES

- Aharoni, A., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J., Beekwilder, J., 2005. Fruit flavor formation in wild and cultivated strawberry. *Acta Hort.* 682, 233-235.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Luna, G., Aparicio-Ruiz, R., 2000. Biochemistry and chemistry of volatile compounds affecting consumers attitudes towards virgin olive oil. In: Lanzotti V, Tagliabate Scafati O, editors. *Flavour and Fragrance Chemistry*. Netherland:Kluwer Academic Publishers. 3-14.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laakso, S., 1981. Lipoxygenase from soybeans. *Meth Enzymol.* 71, 441-451.
- Barrett D.M., Theerakulkait C., 1995. Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technol.* 49, 1, 62-65.
- Baysal, T., Demirdoven A., 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 491-496.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-257.
- Brauss, M.S., Linforth, R.S., Taylor, A.J., 1998. Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*). *J Agric Food Chem.* 46, 2287-2292.
- Cantwell, M., 1995. Post-harvest management of fruits and vegetable stems. In: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta-Barrios, E. (Eds.), *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*, Fao Plant production and protection paper 132, pp. 120-141.
- Corbo, M.R., Altieri, C., D'Amato, D., Campaniello, D., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M., 2004. Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 31, 93-104.
- De Gregorio, A., Arena, N., Giuffrida, D., 2010., Lipoxygenase activity in prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica* [L.] Mill. cactaceae). *J. Food Biochem.* 34, 439-450.
- De Pooter, H.L., Schamp, N.M., 1989. Involvement of lipoxygenase-mediated lipid catabolism in the start of the autocatalytic ethylene production by apples (cv Golden Delicious): A Ripening Hypothesis. *Acta Horticulture.* 258, 47-53.
- Domoney, C., Firmin, J.L., Sidebottom C., Ealing, P.M., Slabas, A., Casey, R., 1990. Lipoxygenase eterogeneity in *Pisum sativum*. *Planta* 181, 35-43.
- Eisenthal, R., Danson M.J., 1998. *Enzyme Assays a practical approach*. Oxford University Press. 1; 25.
- Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M.L., Wathelet, J.P., Du Jardin P., Thonart P., 2010. The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 451-460.
- Gordon, E. A., Barret, D.M., 2001. Colorimetric Method for the determination of lipoxygenase activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 32-37.
- Hildebrand, D.F., 1989. Lipoxygenases. *Physiol. Plant.* 76, 249-253.
- [Kuo, J.M.](#), [Hwang, A.](#), [Yeh, D.B.](#), [Pan, M.H.](#), [Tsai, M.L.](#), [Pan, B.S.](#), 2006. Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation at the 9-position. *J Agric Food Chem.* 54, 3151-6.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.

- Luning, P.A., Carey, T.A., Roozen, P.J., Wichers-Harry, J., 1995. Characterization and occurrence of lipoxygenase in bell peppers at different ripening stages in relation to the formation of volatile flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1493–1500.
- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C., Carle, R., 2006. Cactus pear fruits (*Opuntia* spp.): a review of processing technologies and current uses. *J. Pacd.* 8, 1-25.
- Perez, A.G., Sanz, C., Olias, R., Olais, J.M., 1999. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 249-253.
- Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M., Fontanazza, G., 2002. Characterization of Lipoxygenase in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 835-839.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Bioch.* 166, 368-379.
- Schirra, M., Agabbio, M., D'Aquino, S., McCollum, T.G., 1997. Postharvest heat conditioning effects on early ripening “gialla” cactus pear fruit. *Hort Science* 32, 702-704.
- Zabetakis, I. and Holden, M.A., 1997. Strawberry flavor: Analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* 74, 421-434.

Table 1

Volatile compounds in the three prickly pear cultivars.

Volatile compound	Yellow	Red	White			
Alcohols	ppm	ppm	ppm			Odor description
hexan-1-ol	18.20	17.4	35.52	C 18:2	13-OOH	green
2-hexen-1-ol	30.4	34.5	31.98	C 18:3	13-OOH	green, leafy, walnut
3-hexen-1-ol	9.2	5.8	5.69	C 18:3	13-OOH	moss, fresh
2-penten-1-ol	0.6	0.3	0.71	C 18:3	13-OOH	fresh
2-nonen-1-ol	4.5	4.5	3.40	C 18:2	9-OOH	fat, green
3,6- nonadien-1-ol	0.2	0.4	0.41	C 18:3	9-OOH	fish
2,6nonadien-1-ol	1.8	1.7	1.01	C 18:3	9-OOH	cucumber
3-noneol	0.5	1.8	0.00	C 18:3	9-OOH	fatty ,green leafy (cis)
Total	65.4	66.2	78.72			
Aldehydes	ppm	ppm	ppm			
2 hexenal (E)	8.3	6.4	4.37	C 18:3	13-OOH	apple
2 hexenal (z)	4.2	5.0	1.69	C 18:3	13-OOH	leafy green, fruity
2,6-nonadienal	0.6	0.8	0.51	C 18:3	9-OOH	cucumber, like
2,4 nonadienale	1.3	1.8	1.22	C 18:3	9-OOH	geranium, pungent, watermelon
2,4hexadienal	0.0	2.7	3.10	C 18:3	13-OOH	green
2-nonenal	0.6	2.0	0.21	C 18:2	9-OOH	tallowy, cucumber (trans)
Total	34.6	33.8	21.28			
	100,0	100,0	100,00			

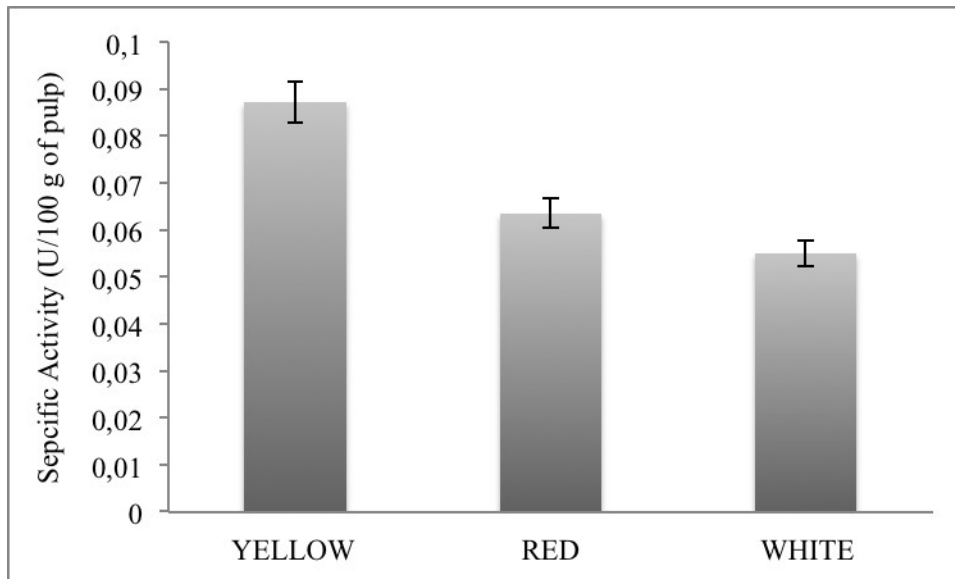


Figure 1– Specific activity of lipoxygenase

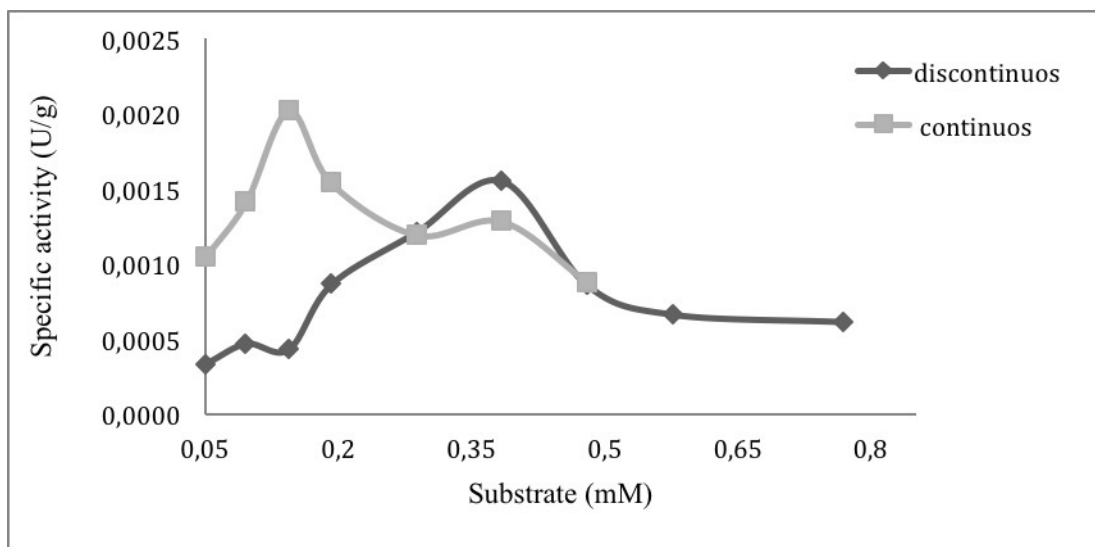


Figure 2a – Specific activity of lipoxygenase as function of substrate

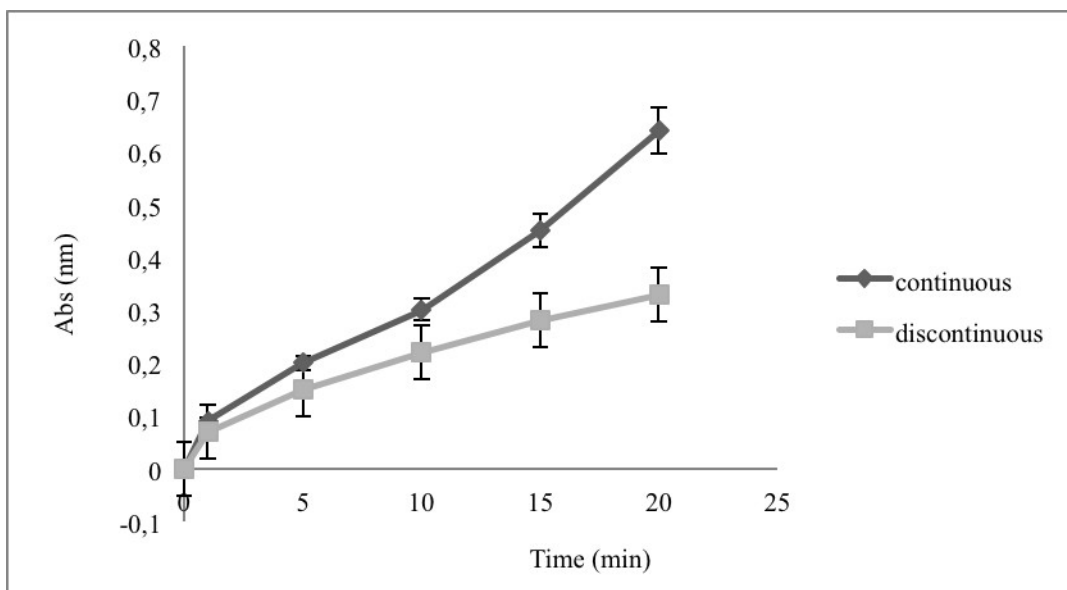


Figure 2b – Activity in continuous and discontinuous for lipooxygenase in the time

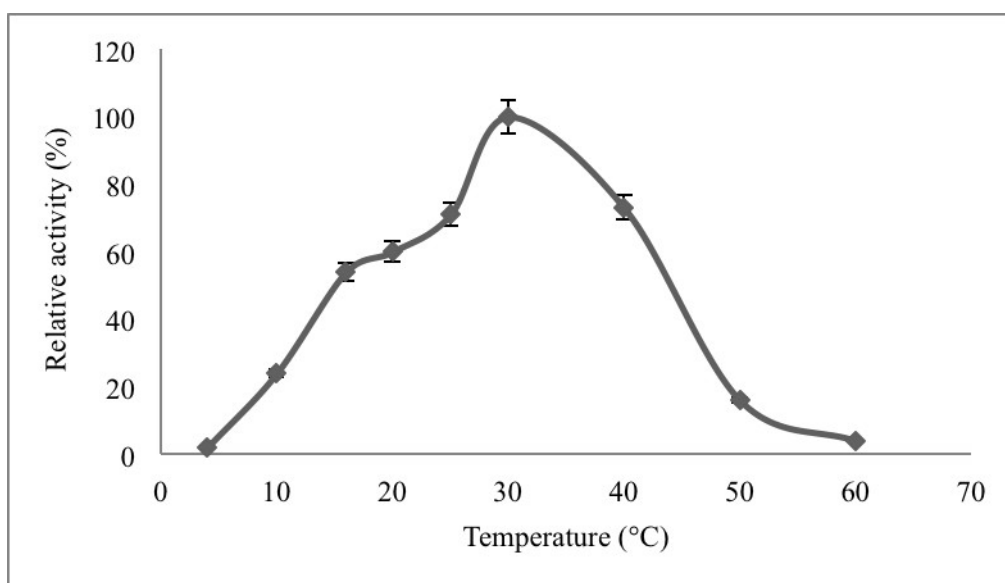


Figure 3 – Relative activity of LOX as function of temperature.

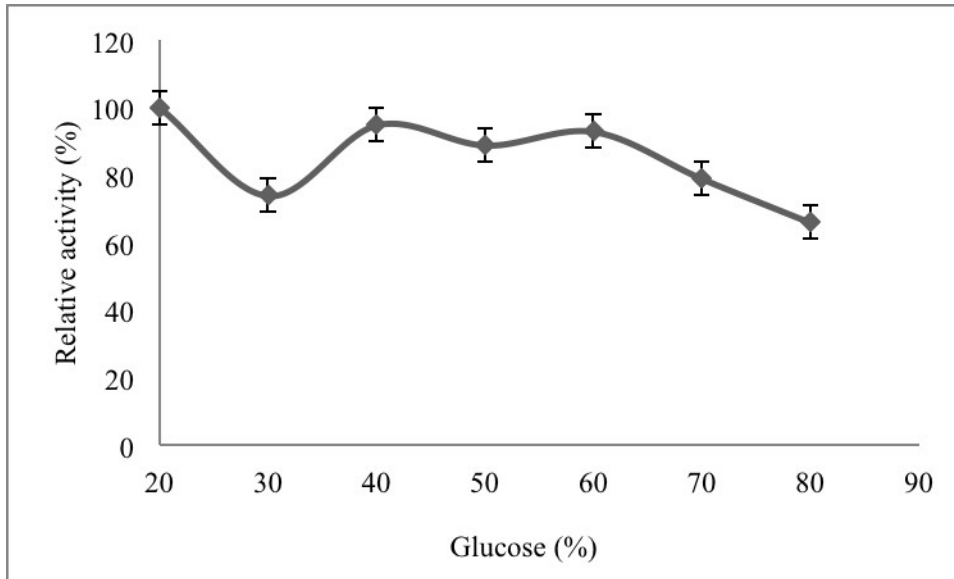


Figure 4a – Relative activity of LOX as function of glucose concentration.

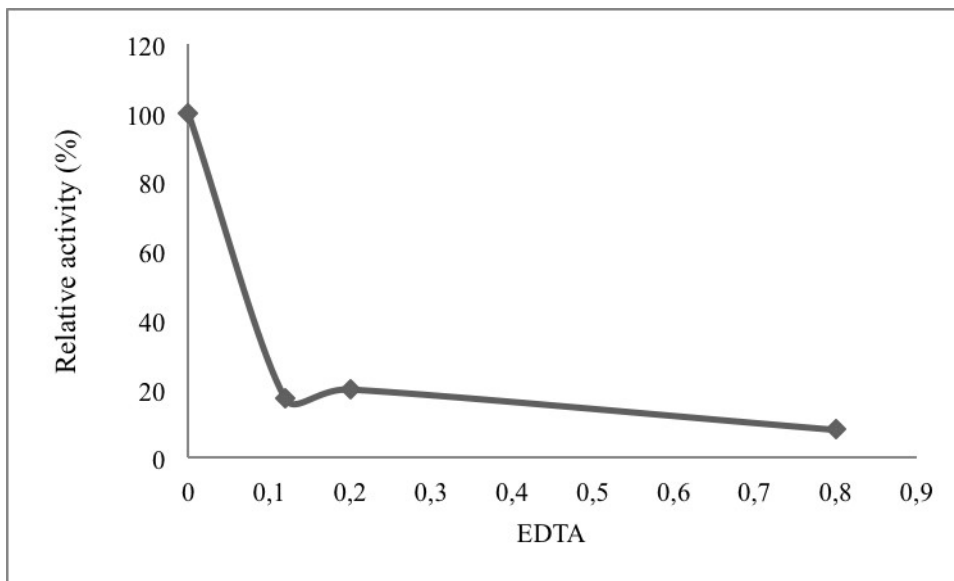


Figure 4b – Relative activity of LOX as function of EDTA concentration.

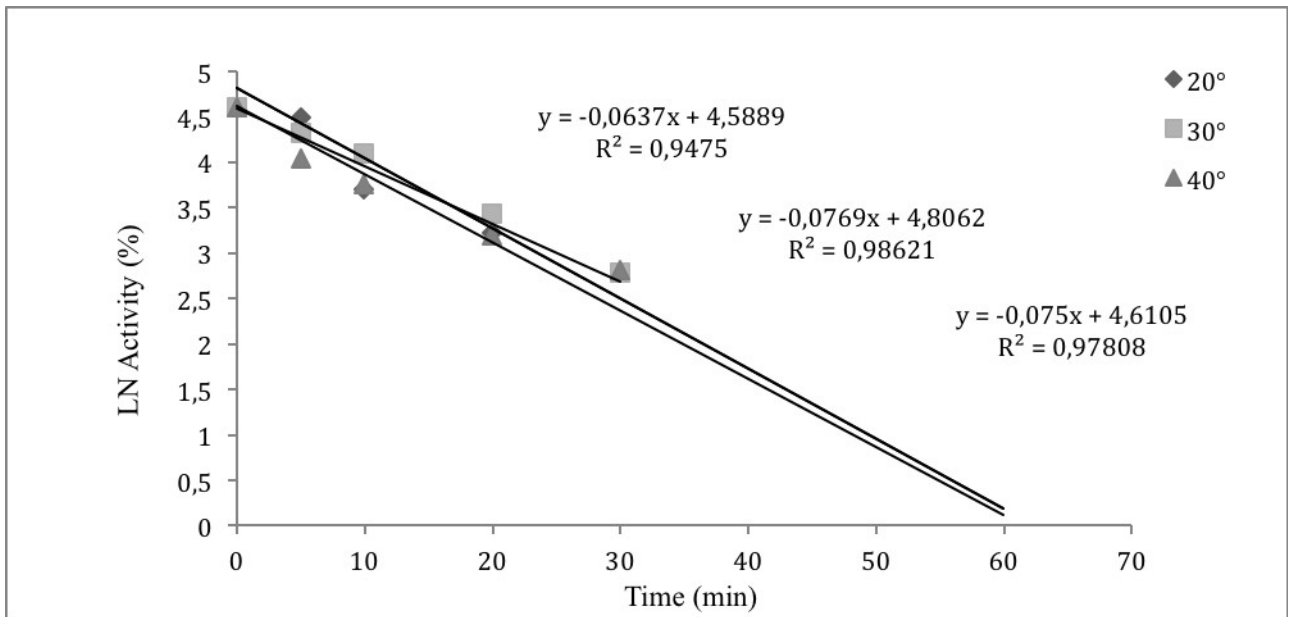


Figure 5a – Thermal stability of lipoxygenase.

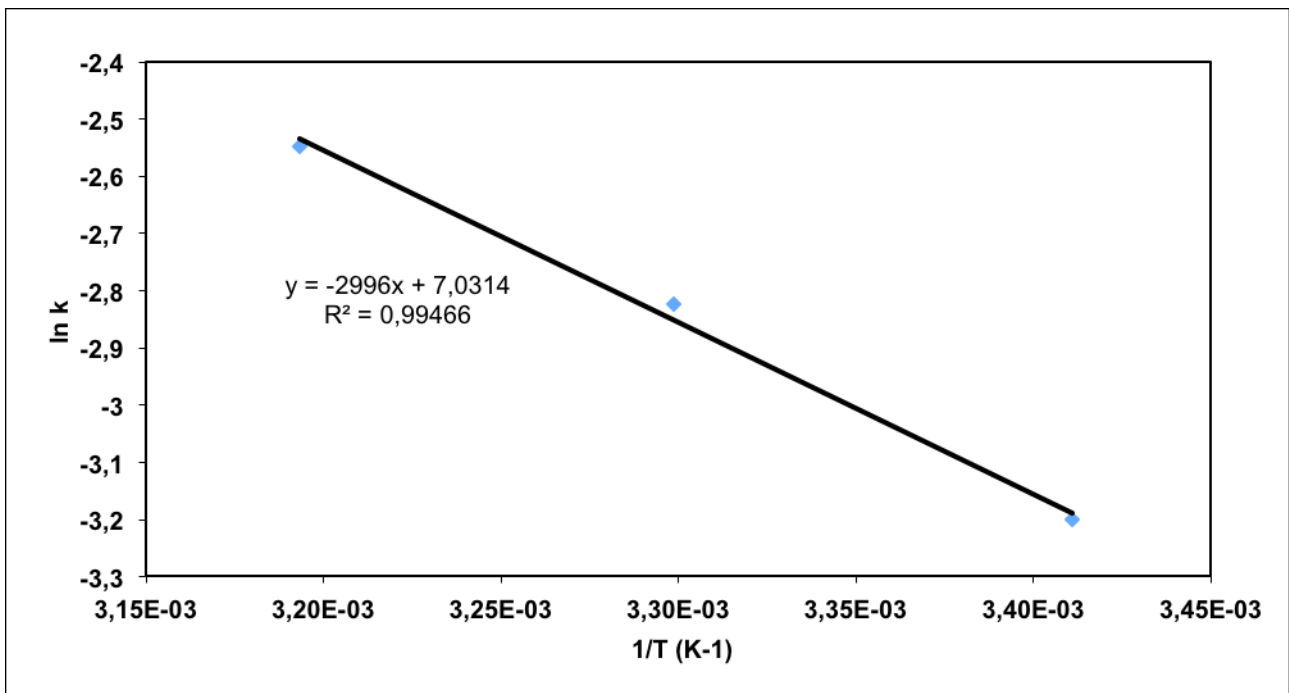


Figure 5b – Heat inactivation of lipoxygenase in yellow prickly pear pulp.

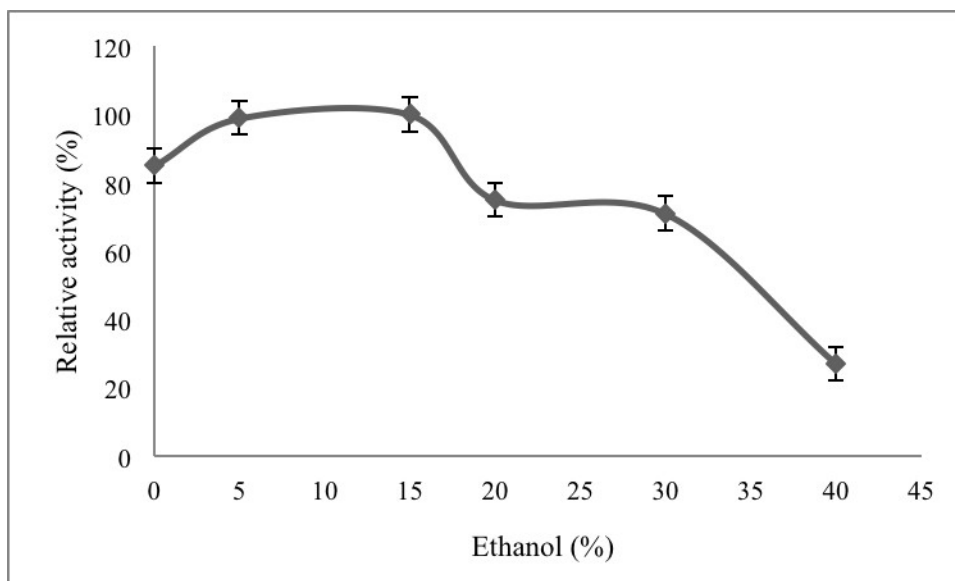


Figure 6 – Relative activity of LOX as function of ethanol concentration.

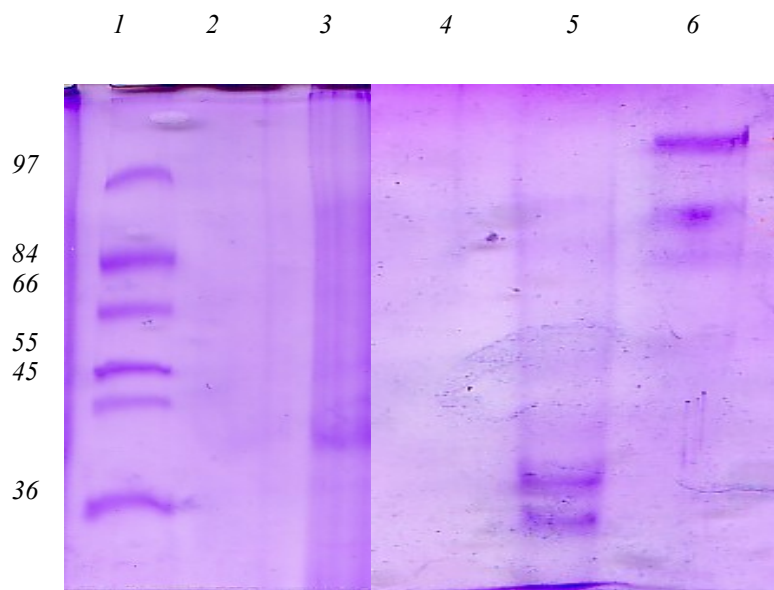


Figure 7 – SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of lipoxygenase from yellow pulp prickly pear
Lane 1: 10 μ L of protein molecular weight standard; Lane 5: Lipoxygenase from yellow prickly pear;
Lane 6: Lipoxygenase from soybean.

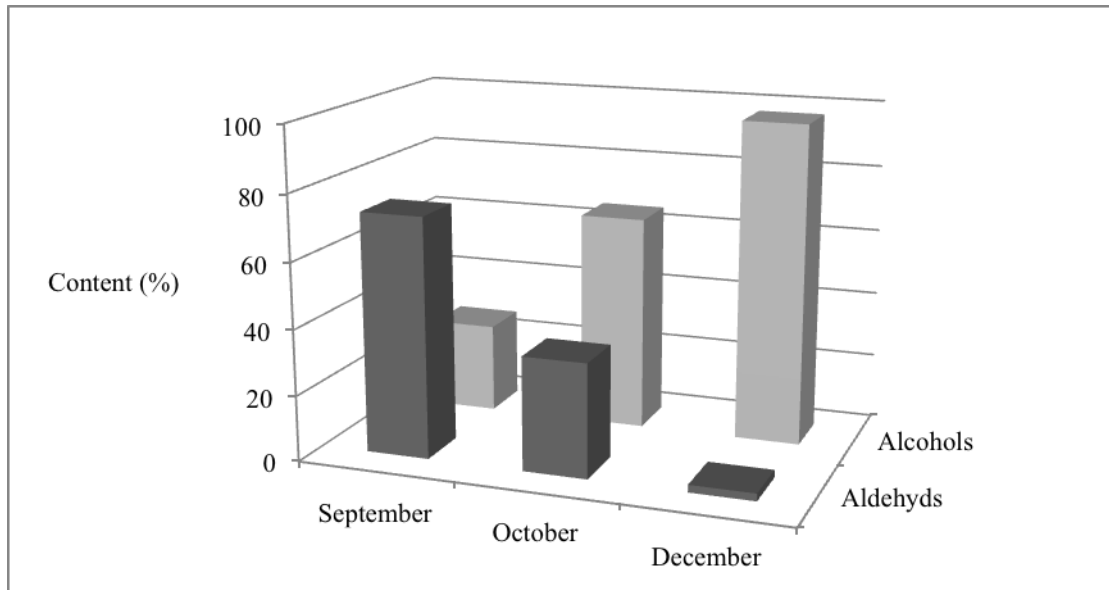


Figure 8 – Estimation of volatile compounds in yellow prickly pear in the time.

8. Bibliografia

- Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Lanza, M.C. e Maccarone, E.; 2001. Aroma value of volatile compounds of prickly pear (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Cactaceae. *Ital.J. Food Sci.* 3; **13**, 311-319.
- Askar, A. & El-Samahy, S.K.; 1981. Chemical composition of prickly pear fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 77: 279–281
- Askar, A. e Bielig, H.J.; 1976. Geschmacksverbesserung von lebensmitteln, *Alimenta*. **15**, 155.
- Axelrod B., Cheesebrough T; Laakso, S;1995. Lipoxygenase from Soybean; *Methods Enzymol*, **71**, 441-451.
- Aziz, S., Wu Z., Robinson D.S.;1999. Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of B-carotene. *Food Chem.* **64**, 227-230.
- Baracat-Pereira, M. C., Goretti de Almeida Oliveira, M., Goncalves de Barros, E., Alves Moreira, M., e Matos Santoro M.; 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenase: presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 91-98.
- Barbagallo, R., Papalardo, P. & Tornatore, G.;1998. Valutazione chimica e sensoriale di una purea concentrata di fichi d'india. *Industrie Alimentari*, XXXVII: 745–749.
- Barbagallo, R., Spagna G., Renda, A., Ruberto G.; 2000. Determinazione di alcuni componenti chimici dei succhi e dell'olio dei semi di fico d'india (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill), *Ricerca e Innovazioni nell'industria Alimentare*, Chiriotti Ed.,Pinerolo , *Italy.* **4**,1139.
- Barbera e Inglese; 1993. La coltura del ficodindia. *Ed agricole*
- Barbera, G. ;1995. History, economic and agro-ecological importance. In: *Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear* (ed. G. Barbera, P.P. Inglese & B. Pimienta), 1-8 FAO , Rome.
- Barret DM, Theerakulkait C.;1995. Quality Indicators in Blanched frozen, stored Vegetables. *Food Technology.* 1:64-65
- Berger; 1995. Aroma Biotechnology, Springer; **9**, pag 117.
- Berry, L.L.;1979. The Time-Buying Consumer, *Journal of Retailing*, 55(4), pp. 58-69
- Blandford, D.Bowlby, S., Foord, J. e Tillsley, C.; 1992. Changing Consumption Patterns: Impacts on Retailers and their Suppliers, *International Review*
- Bradford M.;1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

- Brunori, G., Di Iacovo, F. e Miele M.; 1988. *Agricoltura biologica: aspetti tecnici, di mercato e normativi*, *Rivista di Economia Agraria*, XLIII, n.3, pp. 547-564
- Cardello, A.V.;1995. "Food Quality : relativity , context and consumer expectations. *Food Quality and preference* n 6 pp 163-170
- Carrandi, L.; 1995. *Efecto de conservantes en la estabilidad de jugo de tuna pasteurizado. Memoria de Titulo. Ing. Agronomo. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad de Chile. 61*
- Castellar R., J.M. Obón, M. Alacid & J.A. Fernández- López;2003. *Color properties and stability of betacyanins from Opuntia fruits. J Agric Food Chem* 51, 2772–2776
- Censis;1982. *Consumi Italia '83. Tradizione e politeismo, Franco Angeli, Milano*
- Cheftel, J.C., Cheftel, H. & Besanion, P.;1983. *Introduccion a la bioquimica y tecnologia de los alimentos (1st Edn), Vol II. Acribia, Zaragoza, Espana. 404 pp*
- Civille, G.V. "Food Quality;2003. *Consumer acceptance and sensory attributes " J.of food quality, n.14 pp 1-18*
- Consumer Research*, 2(2), pp. 133-150
- Crouzet, J.;1977. *La regeneration enzymatique des aromes. Bios. 8, 29.*
- De Gregorio, A., Arena,N., Giuffrida, D.;2009. *Lipoxygenase Activity in Prickly Pear Fruit Opuntia Ficus Indica (L. Mill. Cactaceae), 439-450*
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Scrocco, C., Brescia, I.; 2008. *New Strategies for minimally processed cactus pear packaging. Innovative Food Sc Tech. 10:356-362*
- Di Cesare, L.F. & Nani, R.;1992. *Analysis of volatile constituents of prickly pear juice (Opuntia ficus indica var. Fructa sanguineo). Fruit Process, 2: 6–8.*
- Di Cesare, L.F., Testoni, A., Sansovini, G.; 1993. *Studio dei componenti volatili del fico d'india; Industrie alimentari.725-733.*
- Di Pino L. ;2010. *Analisi della filiera mandorlicola e delle preferenze dei consumatori in Sicilia. Tesi sperimentale di laurea.*
- Cesaretti G.P., Mariani A.C., Sodano V. (a cura di), *Sistema agroalimentare e mercati agricoli, Il Mulino, Bologna, pp. 209-232*
- Eisenthal R. e Danson M.J. ;1998. *Enzyme Assays a practical approach. Oxford University Press. 1; 25.*
- Ewaidah, E.H. & Hassan, B.H.; 1992. *Prickly pear sheets: a new fruit product. International Journal of Food Science and Technology, 27: 353–358.*
- Exploring Situational Influences on Food Choice, International Review of Retail, Distribution and Consumer Research, 3(3), pp. 279-301*

- Fielding JM, Rowley KG, Cooper P, O' Dea K.;2005. Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 14: 131 – 6
- Flath, A. e Takahashi, J.M.;1978. Volatile Constituents of prickly pear (*Opuntia ficus indica* Mill. De Castilla Variety); *J. Agric. Food Chem.* 26; 4, 835-837.
- Flath, R.A. & Takahashi, J.M. ;1978. Volatile constituents of prickly pear (*Opuntia ficus indica* Mill.), de Castilla variety. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26: 835–837
- Flores, V.V.C.;1995. Nopalitos production, processing marketing. In: *Agro-ecology, cultivation uses of cactus pear* (ed. G. Barbera, P.P. Inglese & B. Pimienta), 1-8 FAO , Rome.
- Galvez, F.C.F., Resurreccion A.V.A.;1992. "Reliability of the focus group technique in determining the quality characteristic of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) noodles" *J. Of sensory studies* n.7 pp 315-326
- Gamba, P. e Sabbadin, E.;1984. Processi di acquisto e segmentazione nel commercio, *Commercio*, n. 18, pp. 125-150
- Garber, L.L.Jr, Hyatt, E.M., Starr, R.G. Jr ;2003. Measuring consumer response to food products. *Food Quality and preference*, n.14, pp 3-15
- Gigot, C., Ongena, M., Fauconnier, M., Wathélet, J., Du Jardin, P., Thonart,P.; 2009. The lipoxygenase metabolic pathway in plants: potential for industrial production of natural green leaf volatiles, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14 (3): 451-460
- Gordon, E. A. e Barret, D.M.;2001. Colorimetric Method for the determination of lipoxygenase activity. *J.Agric. Food Chem.* 49, 32-37.
- Gould ,W.A.;1977. *Food Quality Assurance* . AVI Publishing , Westport CT
- Grossman S., Zakut R.1979, Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Methods Biochem. Anal.* 25, 303-329
- Gurrieri, S., Miceli, L., Lanza, M.C., Tomaselli, F., Bonomo, R. P. e Rizzarelli E.;2000. Chemical characterization of Sicilian Prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for te storage of its Juice. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5424-5431.
- Hewitt, E.J., MacKay, D.A.M., Konigsbacher, K. e Hasselstorm, T.;1956. The role of enzymes in food flavours. *Food Technol.* 10, 487.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Scale> (social sciences).
- Hu FB.;1995. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. in elderly people. *BMJ*.311:1457–60
- Joubert, E.;1993. Processing of the fruit of five prickly pear cultivars grown in south

- africa; *I. J. Food Sci. Tecn.* **28**, 377-387)
- Kant AK. *Indexes of overall diet quality: a review. J Am Diet Assoc*
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A et al.;2002. *Bioactive compounds in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med.* 113 Suppl 9B: 71-88
- Kuribayashi, T., Kaise, H., Uno, C., Hara, T., Hayakawa, T. e Joh, T.;2002. Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1247-1253.
- Kushi LH, Lenart EB, Willett WC.;1995. *Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. American Journal of Clinical Nutrition.* 61(Suppl): 1407S–15S
- Laemmli U.K.; 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**, 680-685.
- Licciardello F., Muratore G.;2009. "Role of Small-Sized Tomatoes in Carotenoids Uptake" In: *Leiv Haugen, Terje Bjornson. Beta Carotene: Dietary Sources, Cancer and Cognition. Hauppauge NY, USA, Nova Science Publisher Inc, Chapter 9, pp. 315-327.*
- Mackenzie, D.;1990. *The Green Consumer, Food Policy*, 15(6), pp. 461-466
- Markus R., Florian, Stintzing C., Carle.,R.;;2006. *Cactus Pear Fruits (Opuntia spp.). A Review of Processing Technologies and Current Use. J. PACD*, 1-25.
- Marshall, D.;1993. *Appropriate Meal Occasions: Understanding Conventions and Mediterranean diet and survival in a Greek population. N Engl J Med*
- mensional behavior. J Am Diet Assoc* 1994;94:57–64.
- Mertz W. ;1984. *Foods and nutrients. J Am Diet Assoc.*84:769–70.
- Muratore G., Rizzo V., Licciardello F., Maccarone E.;2008. "Partial dehydration of cherry tomato at different temperature, and nutritional quality of the products", *Food Chemistry*, 111 (4), 887-891.
- Muratore G., Licciardello F., Maccarone E.;2005. "Evaluation of the chemical quality of a new type of small-sized tomato cultivar, the plum tomato (*Lycopersicon lycopersicum*)", *Italian Journal of Food Science*, 17 (1), 75-81.
- Ngo T, Lenhoff H.;1980, A sensitive and versatile assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.*, **105**, 389-397.
- Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M.;2005. *Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. British Journal of Nutritio.* 93: 257 – 66.
- P.Andrewes et al.;2003. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1420-1445
- Panico AM, Cardile V, Garufi F, Puglia C, Bonina F, Ronsisvalle G.;2005. *Protective effect*

- of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life Sciences*. 77: 2479–88
- Paredes, O. & Rojo, R.;1973. Estudio para el enlatado del jugo de tuna. *Tecnologia de Alimentos* 8: 237–240
- Parish, J. & Felker, P. ;1997. Fruit quality and production of cactus pear (*Opuntia* spp) clones selected for increased frost hardiness. *Journal of Arid Environments*, 37: 123–143
- Patterson RE, Haines PS, Popkin BM. *Diet quality index: capturing a multidimensional construct*. *Journal of Nutrition*. 132: 1073–1077
- Pellegrini, L. ;1994. Crescita della grande distribuzione e nuovi assetti dei canali di vendita. *Alimentazione* 19: 10–14
- Perez-Tello, G.O., Silva-Espinoza, B.A., Vargas-Arispuro, I., Briceo-Torres, B.O., Martinez-Tellez, M.A.;2001. Effect of temperature on enzymatic and physiological factors related to chilling injury in carambola fruit (*Averrhoa carambola* L.), *Bioch. And Biophysical Research Comm.* 287 (4), 846-851.
- Pimienta, E. ;1990. *El Nopal tunero* (1st Edn). Jalisco, MeH xico: Universidad de Guadalajara. 246 pp
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, Stefanadis C.;2005. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 82: 694 – 9
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A.;2004. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80: 1012 – 8
- Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M. e Fontanazza, G.; 2002. Characterization of Lipoxygenase in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 835-839
- Riso P, Visioli F, Erba D, Testolin G, Porrini M.;2004. Lycopene and Vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr.* 58: 1350-1358
- Rodriguez-FeHlix, A., Cano-Ochoa, M.D., Villegas-Ochoa, M. & Santos-Becerril, V. ; 1997. Calidad sensorial y formas de consumo de nopal verdura. *Memorias: VII Congreso Nacional y V Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del nopal*. Monterrey, MeH xico. pp. 208–209
- Rodriguez, S., Orphee, C., Macias, S., Generoso, S. & Gomes GarcmHa, L.;1996. Tuna: Propiedades fisico-quimicas de dos variedades. *La Alimentacion Latinoamericana*, 210: 34–37

- Russel, C. & Felker, P.;1987. *The prickly-pears (Opuntia spp., Cactaceae): A source of human and animal food in semi-arid regions. Economic Botany, 41: 433–445*
- Saenz,;1998. *Aroma Value of volatile compounds of prickly pear (Opuntia ficus indica (Miller). J. Food Sci. 3; 13.*
- Sàenz, C.;1995). *Food Manufacture and by-products. In: Barbera, G., Inglese, P. & Pimienta-Barrios, E. (Eds), Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear, pp. 137–143. FAO Plant. Production and Protection Paper No. 132. 216 pp.*
- Saenz, C. & Costell, E.;1990. *Rheology of prickly pear (Opuntia ficus indica) concentrated juices. In: Spies, W.E.L. & Schubert, H. (Eds), Engineering and Food, Vol. I, pp. 133–137.England: Elsevier Applied Science. 944 pp*
- Saenz, C. & SepuH lveda, E.;1999. *Physical, chemical and sensory characteristics of juices from pomegranate and purple cactus pear fruit. Annals of the 22nd IFU Symposium, Paris. pp. 91–100*
- Samman S, Sivarajah G, Man JC, Ahmad ZI, Petocz P, Caterson ID.;2003. *A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. Journal of Nutrition. 133: 2188–93*
- Sawaya, W.N., Khalil, J.K. & Al-Mohammad, M.M.;1983. *Nutritive value of prickly pear seeds, Opuntia ficus indica. Plant Foods For Human Nutrition, 33: 91–97.*
- Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Safi, W.M. & Al-Hammad, H.M. ;1983. *Chemical characterization of prickly pear pulp, Opuntia ficus indica, and the manufacturing of prickly pear jam. Journal of Food Technology, 18: 183–193.*
- Scale (Social sciences). In. p. *From Wikipedia, the free encyclopedia.*
- Scales and indexes. In. p. <http://faculty.ncwc.edu/toconnor/308/lect05.htm>
- Schägger H. e von Jagow G.;1987. *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Bioch. 166, 368-379.*
- Schary, P.B.;1971 *Consumption and the Problem of Time, Journal of Marketing, vol. 35, april, pp. 50-55*
- Schilstra, M., Veldink, G. e Vliegenthart, J. F.;1993. *Kinetic analysis of the induction period in lipoxygenase catalysis. Biochemistry. 32, 7686-7691.*
- Schirra, M., Agabbio, M., D'Acquino, S., McCollum., T.G., *Postharvest Heat Condition;1997. Effects on Early Ripening "Gialla" Cactus Pear Fruit. Hort Science, 32(4):702-704*
- Schmidt-Hebbel, H., Pennacchiotti, I., Masson, L. & Mella, M.A.;1990. *Tabla de composicioHn qui&mica de alimentos chilenos (8th Edn). Facultad de Ciencias Quimicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 62 pp*

- Senauer, B.;1990. Major Consumer Trends Affecting the US Food System", *Journal of Agricultural Economics*, n. 41, pp. 422-430
- Sepulveda, E. & Saenz, C.;1990. Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) pulp. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 30: 551–555
- Serra L, García A, Ngo de la Cruz I.;2004. Dieta Mediterránea: características y beneficios para la salud. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54: 44–51
- Smith, W., Lands, W. 1972. Oxidation of unsaturated fatty acid by soybean lipoxygenase. *J: Biol. Chem.* **247**, 1038-1047.
- Trachtenberg, S. & Mayer, A.M.;1981. Composition and properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochemistry*, 20: 2665–2668.
- Trichopoulou A, Cretselis E.; 2004. Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev.* 13:453-456
- Visioli F, Borsani L, Galli C.;2000. Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res.* 47:419-425.
- Visioli F, Galli C.;2002. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr.*42: 209-221
- Visioli F, Grande S, Bogani P, Galli C.;2004. The role of Antioxidants in the mediterranean diets: focus on cancer. *Eur J Cancer Prev.* 13:337-343.
- Visioli F, Riso P, Grande S, Galli C, Porrini M.;2003. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur J Nutr.* 42: 201-206
- Visioli F.;2004. The roller coaster of antioxidant therapy. *Curr Med Chem.* 11: 3 p preceeding 1085.
- Weurman, C.;1961. Gas liquid chromatographic studies on the enzymatic formation of volatile compounds in raspberries. *Food Technol.* **15**, 531.
- Willet WC, Sacks F, Trichopoulou A et al.;1995. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 61: 1402S-1406S
- Williams, D.C., Lim, M.H., Chen, A.O., Pangborn, R.M., Whitaker, J.R.;1986. Blanching of vegetables for freezing- Which indicator enzyme to choose. *Food Technol.* 40(6): 130-140.
- Wong, W.S.;1995. Structure and Mechanism- Lipoxygenase. *Food Enzymes, International Thomson Publishing.* **8**, 237-261.