

Alma Mater Studiorum - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E
TECNOLOGIE ALIMENTARI

EVOLUZIONE DELLA QUALITÀ DELLE CARNI AVICOLE DURANTE LA CONSERVAZIONE REFRIGERATA

Tesi in

Innovazioni nella filiera dei prodotti carnei e ovoprodotti
(Innovazioni e sicurezza dei prodotti di origine animale c.i.)

Relatore:

Prof. Massimiliano Petracchi

Presentata da:

Simona Colella

Correlatore:

Dott.ssa Giorgia Gozzi

Dott.ssa Francesca Soglia

Sessione III

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

CAPITOLO 1

Composizione e caratteristiche delle carni

1.1 Introduzione	- 1 -
1.2 Struttura e organizzazione del tessuto muscolare	- 2 -
1.1.1 Struttura del tessuto muscolare scheletrico	- 2 -
1.1.2 Organizzazione del sarcomero	- 2 -
1.3 Composizione della carne	- 4 -
1.4 Componenti chimici principali della carne	- 6 -
1.4.1 Umidità (acqua).....	- 6 -
1.4.2 Proteine e composti del nitrogeno non proteici	- 6 -
1.4.3 Lipidi	- 10 -
1.4.4 Carboidrati.....	- 11 -
1.4.5 Ceneri (minerali)	- 12 -
1.5 Proprietà funzionali delle proteine muscolari	- 12 -
1.5.1 Capacità di ritenzione idrica)	- 14 -
1.5.2 Solubilità	- 17 -
1.6 Colore della carne	- 19 -
1.6.1 Colore della carne cruda.....	- 20 -
1.7 Alterazioni della carne	- 21 -
1.7.1 Ossidazione lipidica	- 21 -

CAPITOLO 2

Microbiologia del pollame

2.1 Microbiologia del pollame	- 25 -
2.1.1 Microflora della carne conservata in condizioni aerobiche	- 27 -
2.1.2 Microflora della carne refrigerata in sottovuoto e atmosfera modificata	- 28 -
2.2 Microbiologia delle carni avicole marinate	- 29 -

2.2.1 Ecologia microbica dei prodotti avicoli marinati.....	- 30 -
2.3 Microrganismi patogeni nella carne di pollo	- 30 -
2.3.1 Gli agenti patogeni	- 31 -
2.3.1.1 Salmonella e Campylobacter	- 32 -
2.3.1.2 Clostridium perfringens	- 34 -
2.3.1.3 Escherichia coli	- 34 -
2.3.1.4 Listeria monocytogenes	- 35 -
2.4 Principali alterazioni della carne da parte dei microrganismi.....	- 36 -
2.4.1 Alterazioni della frazione proteica.....	- 37 -
2.4.2 Componenti volatili delle carni di pollo confezionate.....	- 37 -

CAPITOLO 3

Anomalie delle carni di pollo

3.1 Introduzione	- 41 -
3.2 Le miopatie e la moderna industria della carne avicola.....	- 42 -
3.3 Confronto tra miopatie	- 44 -
3.3.1 Distrofia muscolare ereditaria.....	- 44 -
3.3.2 Miopatia nutrizionale	- 45 -
3.3.3 Miopatia del muscolo pettorale profondo	- 46 -
3.3.4 Miopatie tossiche	- 47 -
3.3.5 Carni pallide, soffici ed essudative (PSE).....	- 49 -
3.3.6 Comparazione tra accumulo di lipidi intramuscolare e WS	- 50 -
3.4 Miopatie emergenti: possibili scenari futuri	- 51 -

CAPITOLO 4

Sperimentazione

4.1 Argomento e scopo dello studio.....	- 53 -
4.2 Materiali e metodi	- 54 -

4.2.1 Colore.....	- 56 -
4.2.2 pH.....	- 56 -
4.2.3 Perdite di liquido per sgocciolamento (drip loss).....	- 56 -
4.2.4 Analisi microbiologiche.....	- 57 -
4.2.5 Umidità.....	- 57 -
4.2.6 Perdite di liquido per cottura (cooking loss).....	- 57 -
4.2.7 Ossidazione lipidica.....	- 58 -
4.2.8 Solubilità proteica.....	- 58 -
4.3 Analisi statistica.....	- 59 -
4.4 Risultati e discussione.....	- 60 -
4.4.1 Colore.....	- 60 -
4.4.2 pH.....	- 62 -
4.4.3 Perdite di liquido per sgocciolamento (drip loss).....	- 64 -
4.4.4 Analisi microbiologiche.....	- 64 -
4.4.5 Umidità.....	- 66 -
4.4.6 Perdite di liquido per cottura (cooking loss).....	- 67 -
4.4.7 Ossidazione lipidica.....	- 68 -
4.4.8 Solubilità proteica.....	- 69 -
4.5 Conclusioni.....	- 72 -
BIBLIOGRAFIA.....	- 73 -

CAPITOLO I

COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE DELLE CARNI

1.1 Introduzione

In tempi recenti, il settore delle carni ha orientato la filiera produttiva verso l'allevamento di tipi genetici caratterizzati da un rapido tasso di crescita, elevata efficienza di conversione dell'alimento e una maggiore resa in tagli magri. Questo mutamento non è altro che la risposta alla sempre maggiore richiesta da parte dei consumatori moderni di prodotti trasformati ready-to-cook con elevati livelli di convenienza (Barbut *et al.*, 2008).

Delle dinamiche appena descritte va sottolineato la maggiore consapevolezza, da parte delle aziende operanti nel settore carni, dell'importante ruolo svolto dalle proprietà sensoriali e tecnologiche della carne; e di quanto esse incidano sulle successive fasi di trasformazione della stessa. Consapevolezza che, soprattutto alla luce della crescente attività di sviluppo di prodotti innovativi, permette di valutare e ottimizzare le caratteristiche qualitative della carne. La qualità, dunque, sta assumendo un'importanza ancora più ragguardevole, senza compromettere la standardizzazione dei prodotti né le rese di trasformazione.

Nonostante gli esiti positivi della selezione genetica e il miglioramento delle tecniche di allevamento, c'è stato un incremento dell'insorgenza di miopatie e anomalie delle carni (Barbut *et al.*, 2008). Nel settore delle carni avicole, le anomalie emergenti sono petto legnoso (wooden breast - WB) e striature bianche (white striping - WS). Queste anomalie possono comparire separatamente, ma spesso si manifestano insieme e, ambedue, compromettono le caratteristiche qualitative delle carni al punto che non possono essere vendute sul mercato fresco. In alcuni casi, l'unica strategia possibile è il declassamento delle carni anomale con conseguente perdita economica.

Nella seguente tesi si è voluto indagare su alcuni aspetti microbiologici e chimico-fisici correlati alla qualità della carne di petto di pollo affette da anomalia white-striping durante la fase di conservazione.

1.2 Struttura e organizzazione del tessuto muscolare

1.1.1 Struttura del tessuto muscolare scheletrico

La variabilità tra i muscoli è alquanto elevata, ma i muscoli delle specie animali di interesse zootecnico presentano, in generale, la stessa struttura anatomica e funzione. La carne è ottenuta dal tessuto muscolare striato, o scheletrico, che è caratterizzato da contrazione di tipo volontario.

Ciascun muscolo è ricoperto da una guaina di tessuto connettivo, chiamato epimisio, nel quale sono abbondantemente distribuiti vasi sanguigni, nervi e cellule adipose. Il tessuto connettivo ha la funzione di conferire robustezza e tenere insieme i fasci di fibre. Quest'ultima funzione è svolta dal perimisio, mentre le singole fibre muscolari, sono avvolte dall'endomisio. All'interno delle fibre, si trovano le miofibrille. Queste ultime rappresentano le unità funzionali che si stendono e permettono la contrattilità del muscolo.

Le fibre muscolari, vengono descritte come “lunghe cellule cilindriche” (lunghezza variabile da pochi mm a diversi cm, con diametro che va dai 10 a 100 μm) polinucleate. Esse rappresentano le unità morfologiche del muscolo scheletrico, e sono costituite, andando dall'esterno verso l'interno, dal sarcolemma (membrana cellulare), sarcoplasma (citosol) che ospita numerosi le miofibrille (circa mille miofibrille per ogni fibra muscolare). Le miofibrille sono circondate da un complesso reticolo sarcoplasmatico (versione specializzata del reticolo endoplasmatico) di vescicole e tubuli che permette l'accumulo di calcio indispensabile per la contrazione muscolare.

1.1.2 Organizzazione del sarcomero

Le miofibrille contengono unità strutturali chiamate sarcomeri che, per la loro organizzazione interna, conferiscono l'aspetto striato al muscolo, e rappresentano la più piccola unità contrattile del tessuto muscolare striato. All'interno di ogni miofibrilla, i vari sarcomeri si susseguono l'uno dopo l'altro, ciascuno dei quali presenta un alternarsi regolare di bande chiare (isotrope alla luce polarizzata), dette bande I costituite da filamenti sottili di actina; e di bande scure (anisotrope alla luce polarizzata), chiamate anche bande A formate da filamenti spessi di miosina interposti a filamenti di actina.

Ciascuna banda I risulta suddivisa in due da una linea Z, mentre la banda A viene ripartita da una stria centrale, detta H, che a sua volta presenta al centro una linea scura (linea M) costituita da proteine che interconnettono i filamenti di miosina. Dunque, con il termine sarcomero si intende un segmento di miofibrilla compreso tra due linee Z adiacenti e che contiene nel mezzo una linea M (Figura 1.1).

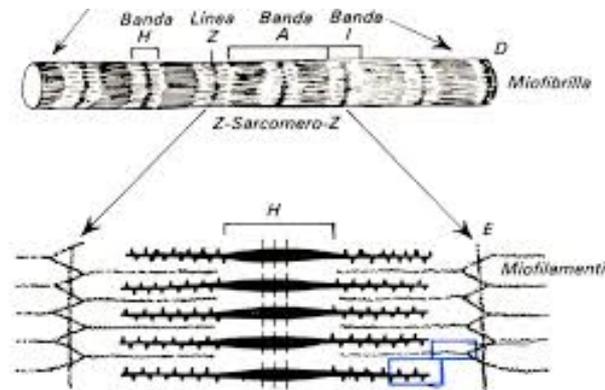


Figura 1.1 *Rappresentazione schematica delle unità di base (sarcomeri) di una miofibrilla.*

La miosina, costituita da circa 4500 amminoacidi, presenta una struttura fibrosa composta da sei subunità (due catene pesanti identiche, molto grandi; due paia di catene leggere, molto piccole) che sono associate in modo da creare una catena idrofila elicoidale, detta coda, e due teste globulari idrofobiche. Le due catene proteiche leggere sono associate alle catene pesanti di ogni testa. Mentre, l'actina è una proteina globulare costituita da due filamenti elicoidali di actina-F avvolti tra loro, a sua volta associata alla tropomiosina (ospitata nel solco tra i due filamenti di actina) e alla troponina (giunta alla tropomiosina, permettendo l'aggancio con la miosina). Il meccanismo della contrazione muscolare prevede, prima, la fase di aggancio con formazione di ponti trasversali tra filamenti spessi e sottili, più precisamente tra le teste della miosina e le proteine regolatrici presenti sulle catene di actina. Segue la fase di scorrimento dei filamenti di miosina sui filamenti di actina che comporta una trazione dei filamenti di actina verso il centro della cellula muscolare che tende così ad accorciarsi. La contrazione avviene per il rilassamento (estensione dei filamenti) tra le linee Z.

Gli ioni calcio (Ca^{2+}) giocano un ruolo importante nel controllo della contrazione muscolare, poiché, legandosi con la troponina, lasciano libero il sito d'attacco per la miosina sull'actina. Tuttavia, gli ioni calcio devono essere assorbiti dal reticolo sarcoplasmatico per consentire al muscolo di rilassarsi in seguito alla contrazione; e per poter essere rilasciati dallo stesso reticolo sarcoplasmatico, in seguito a stimolo nervoso, per le successive contrazioni.

Nella carne in fase di *post rigor* (o fase di frollatura), la miosina e l'actina si interconnettono formando una struttura nota come actomiosina. Quest'ultima rappresenta il complesso proteico funzionale dominante nelle carni trasformate con un basso contenuto in sale. Nelle miofibrille sono presenti anche altre proteine, tra cui titina e nebulina, tropomiosina, troponina, α -actinina, desmina, C-, M-, e X-proteine, e molti altri polipeptidi minori (Asghar *et al.*, 1985; Xiong, 1997). Nella maggior parte casi, i ruoli svolti negli alimenti da queste proteine muscolari secondarie non sono pienamente conosciuti.

1.3 Composizione della carne

Con il termine carne, comunemente, si indicano le parti degli animali usate a fini alimentari che comprendono le masse muscolari commestibili e gli altri tessuti che vi aderiscono (grasso, ossa, vasi sanguigni e linfatici ecc.) degli animali da macello, da cortile e selvaggina. La carne rappresenta uno degli alimenti di maggior pregio per il suo elevato valore biologico e l'alto contenuto in sostanze azotate. La carne è composta, in termini generali, da circa 75-78% di acqua, 20-22% di proteine, 2-5% di lipidi, 1% ceneri (principalmente rappresentati dagli elementi di potassio, fosforo, sodio, cloro, magnesio, calcio, e ferro), 0,5% carboidrati (principalmente sotto forma di glicogeno nelle fasi *pre-mortem* e di acido lattico *post mortem*) e tracce di vitamine liposolubili e idrosolubili. L'elemento che incide di più sulla variabilità della composizione muscolare è l'accumulo di lipidi. Alcuni muscoli possono contenere fino al 15% di lipidi (rispetto al peso fresco), mentre altri possono contenere inferiori al 2%. Indipendentemente dal

contenuto lipidico, il rapporto proteine/umidità (circa 0.,3) rimane abbastanza costante nei muscoli degli animali adulti.

I fattori che influenzano le quantità relative dei componenti chimici principali (acqua, proteine e lipidi) e, di conseguenza, le caratteristiche chimico-fisiche delle carni possono essere riassunte in:

- Specie: le carni rosse sono più grasse rispetto alle carni magre.
- Tipo genetico e genere degli animali: ad esempio, la Mora Romagnola risulta molto ricca in grasso rispetto agli ibridi commerciali perché è una razza autoctona; gli individui di sesso maschile presentano una carne di colore più vivo.
- Età: il tessuto adiposo inizia a depositarsi dopo il raggiungimento della maturità sessuale con risvolto positivo su alcune proprietà organolettiche (es. tenerezza delle carni di animali adulti), ma incide negativamente sul valore nutrizionale.
- Modalità di allevamento: gli animali provenienti da allevamenti estensivi presentano un'inferiore accumulo di tessuto adiposo perché hanno un dispendio energetico superiore legato al movimento e alla termoregolazione.
- Regime alimentare
- Composizione delle diete
- Tipo di muscolo ed eventuale inclusione di pelle
- Presenza di tessuto adiposo: è un parametro fondamentale nella produzione di prosciutto.
- Addizione di ingredienti non carnei come sale, fosfati alcalini, zuccheri, spezie e condimenti

I composti presenti in piccole quantità nei tessuti carnei sono: acidi grassi liberi, glicerolo, trigliceridi, fosfolipidi, componenti azotati non proteici, quali DNA, RNA, ammoniaca, gruppi amminici, vitamine, granuli di glicogeno e ATP e mioglobina. Sono presenti anche 25 microelementi essenziali e non essenziali (i maggiormente presenti sono: ossigeno, carbonio, idrogeno e nitrogeno). Gli elementi essenziali necessari per il normale funzionamento metabolico sono cobalto, iodio, ferro e magnesio.

1.4 Componenti chimici principali della carne

1.4.1 Umidità (acqua)

L'acqua contenuta nel tessuto muscolare svolge ha molteplici ruoli: mezzo trasporto dei prodotti metabolici, componente di base delle cellule, termoregolatore, solvente e lubrificante. Essa, dunque, costituisce la maggior parte del sarcoplasma e delle miofibrille. Il rapporto normale tra acqua e proteine deve essere compreso tra 3,5 e 4; valori maggiori indicano trattamenti fraudolenti (immersione in acqua, iniezione di liquidi o somministrazione di estrogeni *in vivo*) al fine di incrementare il peso della carne.

L'acqua dei tessuti muscolari viene distinta, secondo la sua collocazione, in acqua intra-miofibrillare (situata nello spazio tra filamenti spessi e sottili) e in acqua extra-miofibrillare (ubicata tra le miofibrille, fibre muscolari e fasci di fibre). L'acqua intra-miofibrillare corrisponde a circa l'85% del totale e viene a sua volta suddivisa in acqua legata o costituzionale e in acqua immobilizzata. La prima ($\leq 0,1\%$ dell'acqua totale) è strettamente associata, mediante legami forti, con i siti polari accessibili della struttura nativa delle proteine e non ghiaccia a -40°C . L'acqua immobilizzata (circa 5% del totale) interagisce tramite legami chimici deboli con l'acqua legata per formare uno strato, poco mobile, di molecole d'acqua attorno alle proteine (concentrazione di 0,38g di acqua per g di proteine secca) che a -40°C ha un effetto plastificante sui soluti. Infine, l'acqua extra-miofibrillare, circa il 15% del totale, viene definita come acqua libera poiché trattenuta solo mediante effetti fisici quali, ad esempio, la forza capillare.

1.4.2 Proteine e composti del nitrogeno non proteici

La carne è ricca di proteine nobili dotate di elevato valore biologico, in quanto, contengono tutti gli amminoacidi essenziali. Le proteine della carne sono composte da più di 20 amminoacidi connessi mediante legami peptidici. Esse si suddividono, in base alla loro solubilità, in tre gruppi: proteine miofibrillari, sarcoplasmatiche e stromali. I suddetti gruppi rappresentano, rispettivamente, circa il 50-60, 25-30 e 10% delle proteine totali presenti nel

tessuto muscolare, stima rivelata da analisi proteomica di muscoli di individui adulti di varie specie in fase di *post rigor* (Lametsch e Bendixen, 2001).

Le proteine miofibrillari rappresentano la frazione proteica più abbondante miofibrille nel tessuto muscolare (50-56% del totale), sono solubili in soluzioni saline concentrate ($> 2\%$ o $\Gamma > 0.5$), quindi, all'aumentare dei legami con l'acqua, aumenta la loro capacità di ritenzione idrica. Una singola fibra muscolare può contenere da 1.000 a 2.000 miofibrille. Le proteine che costituiscono le miofibrille possono essere suddivise in tre gruppi in base alla loro funzione: (1) le proteine contrattili, che sono responsabili della contrazione muscolare (miosina e actina: rispettivamente 34,2 e 13,2% delle proteine totali miofibrillari); (2) proteine regolatrici, coinvolte nella regolazione della contrazione muscolare; e (3) proteine del citoscheletro, che sostengono e mantengono l'integrità strutturale del miofibrilla (tali proteine rientrano per caratteristiche chimiche in quelle dello stroma).

La proteina predominante del sarcomero è la miosina (circa il 50% delle proteine miofibrillari totali) che, a pH fisiologico, si aggrega spontaneamente per formare filamenti spessi. La miosina è una lunga molecola sottile (circa 150 nm di lunghezza) composta da 6 catene polipeptidiche o subunità (Figura 1.2). Le subunità comprendono due catene pesanti ciascuna di circa 222 kDa e due coppie di catene leggere da 17 a 23 kDa. Ogni catena pesante ha una regione globulare, detta testa, e una regione fibrosa, chiamata coda. Le catene leggere sono catene leggere alcaline associate alla regione globulare (testa). La testa globulare della catena pesante contiene il sito di legame dell'actina. La regione coda comprende un alfa elica avvolta a spirale responsabile della formazione dei filamenti in condizioni fisiologiche.

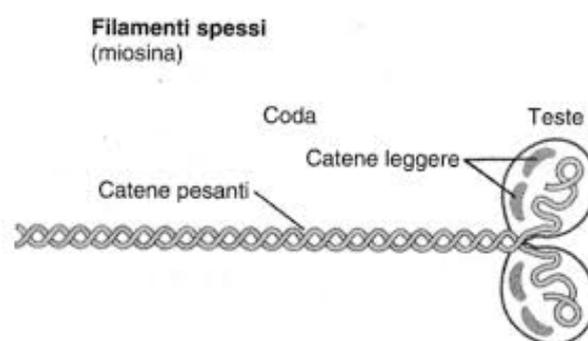


Figura 1.2 Rappresentazione schematica della miosina.

Le diverse regioni della miosina (testa e coda) presentano differenti caratteristiche biochimiche e funzionali. La miosina dei muscoli scheletrici del pollo contiene 43 gruppi sulfidrilici ed è priva di legami disolfuro. Il punto isoelettrico (pI) della miosina, ovvero il pH al quale la proteina non ha carica netta in soluzione, è di circa 5,3.

La seconda proteina miofibrillare più abbondante è l'actina rappresentando circa il 20-25% del totale di questa frazione. La G-actina è una proteina globulare con una massa molecolare di circa 42 kDa e con punto isoelettrico di circa 4,8. L'actina unitamente ad altre proteine (troponina e tropomiosina) costituiscono i filamenti sottili del sarcomero. La contrazione muscolare nel muscolo *in vivo* avviene per legame reversibilmente della miosina con l'actina. Nel muscolo *post rigor*, il legame tra la regione globulare della miosina e l'actina è irreversibile per la formazione di un complesso noto come actomiosina.

Dal punto di vista tecnologico, le proteine miofibrillari determinano la capacità di ritenzione idrica e la tenerezza della carne; e una loro attenta manipolazione è fondamentale nella lavorazione delle carni soprattutto nei prodotti a muscolo integro disossati e ricostituiti.

La frazione proteica sarcoplasmatica (circa il 25-30% del totale proteine muscolari) si trovano all'interno del sarcoplasma delle cellule muscolari e comprende molti enzimi ossidativi, enzimi lisosomiali e glicolitici, proteasi endogene ed emepigmenti. Rientra in questo gruppo proteico la miogloblina, nota per essere la principale proteina responsabile della pigmentazione delle carni fresche. Le proteine sarcoplasmatiche sono solubili in acqua e in soluzione saline diluite (forza ionica bassa $\Gamma=0-0,2$) (Pearson e Young, 1989) e possiedono un'ottima funzionalità proteica. La maggior parte delle proteine sarcoplasmatiche presentano una struttura globulare con un'alta densità di catene laterali polari e rappresentano la frazione proteica persa nel liquido di sgocciolamento.

Il terzo gruppo di proteine muscolari sono le proteine stromali che, nutrizionalmente, hanno minor valore biologico rispetto alle proteine

miofibrillari e alle sarcoplasmatiche. Esse sono insolubili in acqua e in soluzioni saline. Le proteine stromali sono spesso definite come le proteine del tessuto connettivo poiché collocate, principalmente, nello spazio interstiziale delle cellule muscolari, dove svolgono la funzione di sostenere la struttura che circonda le fibre muscolari. Esse sono, generalmente, distinte in proteine del citoscheletro, responsabili del mantenimento dell'integrità e della struttura delle cellule muscolari (miofibrille), e in proteine connettivali (collagene ed elastina) che determinano l'integrità strutturale del muscolo, nonché, il collegamento con altri elementi anatomici. Il collagene, proteina fibrosa che conferisce resistenza ai tessuti, e l'elastina, presente soprattutto nei tendini per le sue proprietà elastiche, sono responsabili dell'indurimento della carne degli animali adulti; fenomeno che si verifica in seguito alla formazione di legami forti, detti crociati, nel tempo che irrigidiscono i tessuti muscolari. Queste proteine vengono sintetizzate dalle cellule fibroblastiche immerse in una sostanza fondamentale amorfa ricca in proteoglicani, glicoproteine. Nei prodotti trasformati un'eccessiva presenza di tessuto connettivo ne causa un decadimento della texture.

Le proteine del tessuto connettivo maggiormente studiate sono: il collagene, la reticolina, e l'elastina (Pearson e Young, 1989). Rientrano nella famiglia delle proteine stromali anche altre proteine stromali insolubili in soluzioni acquose e saline, ma a causa delle limitate quantità non incidono sulla qualità e sulle caratteristiche organolettiche della carne e dei suoi derivati.

Il collagene è il principale costituente del tessuto connettivo, la cui unità di base è il tropocollagene, molecola fibrosa dalla struttura a tripla elica composta da tre catene polipeptidiche associate tra di loro mediante legami a idrogeno grazie alla presenza di glicine e delle modifiche *post*-traduzionali di lisina e prolina (Gross, 1961). Tutte le catene di tropocollagene presentano, nella struttura primaria, la stessa sequenza amminoacidica ripetuta: X-glicina-prolina-idrossiprolina-glicina-X (dove per X si intende un amminoacido qualsiasi). La quantità e il tipo di legami crociati che si formano tra le fibre di collagene determinano la solubilità e la digeribilità del collagene. I muscoli

locomotori sono dotati di un numero maggiore di legami crociati rispetto ai muscoli posturali. Con l'avanzare dell'età degli animali, incrementa il numero di legami crociati stabili nel collagene e, di conseguenza, la durezza della carne. Questi legami crociati risultano più stabili ai trattamenti con acidi (il collagene non è attaccabile dalle proteasi dello stomaco) e calore; dunque, non riducibili e più difficili da idratare e solubilizzare rispetto a quelli presenti negli animali giovani. Tuttavia, la carne negli animali sottoposti ad un periodo di finissaggio mostra un miglioramento della tenerezza in seguito alla deposizione di lipidi tra le fibre di collagene a livello perimisiale. Il collagene, insolubile in soluzione salina nelle normali condizioni di lavorazione della carne, può essere reso solubile tramite riscaldamento in acqua per tempi lunghi o tramite limitati idrolisi acida/alcalina. Queste condizioni di trattamento permettono la rottura delle fibrille di collagene e la dissociazione del tropocollagene, che facilitano, così, l'interazione dei singoli peptidi del collagene con l'acqua. Infatti, durante il trattamento termico prolungato in acqua, come il caso dei bolliti, il collagene inizialmente si irrigidisce per poi gelatinizzare, intenerendo la carne. Sono stati identificati almeno dieci tipi genetici di collagene negli animali da carne. Le tipologie I, III e IV sono quelle maggiormente presenti nei tre strati di tessuto connettivo, e pertanto sono responsabili della cosiddetta durezza di base della carne (Bailey *et al.*, 1979).

1.4.3 Lipidi

Il tessuto adiposo è definito come un insieme di cellule adipose disperse in una matrice di tessuto connettivo (i componenti predominanti sono trigliceridi e i fosfolipidi), acqua e altri componenti in piccole quantità, quali, ad esempio, acidi grassi liberi, cere, mono e di-gliceridi, steroli e vitamine liposolubili. I lipidi sono composti non polari solubili in solventi organici, ma insolubili in acqua. Il triacilglicerolo si trova prevalentemente nel grasso depositato a livello intermuscolare, mentre, i fosfolipidi sono principalmente localizzati nel grasso strutturale (membrane cellulari).

La composizione e il contenuto dei lipidi nei tessuti adiposi della carne varia in funzione della dieta e della fase di sviluppo dell'animale nella quale i lipidi sono depositati. Tale variazione è dovuta a fattori quali genetica, genere e entità di esercizio fisico durante la fase di allevamento. Quando negli animali adulti, i muscoli smettono di crescere, il grasso intramuscolare inizia ad accumularsi attorno al sistema vascolare, diminuendo così la massa relativa degli altri componenti. La natura della matrice del tessuto connettivo influenza anche l'accumulo di grasso.

Generalizzando, i lipidi della carne sono prevalentemente costituiti da acidi grassi saturi, tuttavia, le carni magre hanno una concentrazione prevalente di acidi grassi insaturi. Oltre a ciò, nella carne si trovano anche altre forme di lipidi quali steroli e componenti del colesterolo. L'ampia varietà di tipologie di lipidi è dovuta alle loro numerose funzioni svolte; infatti, essi fungono da fonte di energia per la cellula, componente strutturale e funzionale della membrana cellulare, mezzo d'isolamento o protezione per organi vitali e agenti necessari per sintetizzare determinati ormoni e vitamine (A, D, E, K). La quantità di grasso e la sua composizione in acidi grassi influenzano, in modo considerevole, i componenti principali dell'appetibilità, ossia, la sensazione in bocca e il sapore della carne. Inoltre, i tipi di acidi grassi presenti nella carne e il loro contenuto in colesterolo influenzano la salubrità percepita della carne.

La composizione della dieta somministrata agli animali influenza la composizione chimica ed in particolare l'accumulo di lipidi e può moderatamente condizionare anche il contenuto di minerali e vitamine dei muscoli.

1.4.4 Carboidrati

L'unico carboidrato del muscolo è il glicogeno che funge da riserva energetica specialmente nel metabolismo anaerobico. Esso è un polisaccaride ramificato composto da catene di α -D-glucosio associate mediate legami α -1,6 glucosidici e α -1,4 glucosidici. È il carboidrato più abbondante nei tessuti muscolari scheletrici degli animali (0,5-1,5%) ed è localizzato soprattutto nel

fegato. Il contenuto iniziale di glicogeno nei muscoli al momento della macellazione (destinato a calare dopo la macellazione per il metabolismo anaerobico) influenza il colore finale del muscolo, la compattezza, la capacità di ritenzione idrica, la capacità emulsionante e la shelf-life del tessuto.

1.4.5 Ceneri (minerali)

Con il termine ceneri si indica la materia inorganica presente sono in forma di ossidi, solfati, fosfati, nitrati, cloruri e altri alogenuri. Il calcolo della percentuale di ceneri nei tessuti carnei rappresenta una stima del contenuto totale di minerali coinvolti come componenti di costituenti cellulari (mioglobina, emoglobina, enzimi), di ossa (frammenti di ossa, tessuti separate meccanicamente, sistemi di recupero carne avanzati) o negli ingredienti (cloruro di sodio, cloruro di potassio, fosfatasi, sali, spezie, panature) utilizzati nella lavorazione. Le funzioni biologiche dipendono dall'eventuale interazione con gruppi prostetico degli enzimi o dal ruolo svolto come cofattori.

Nelle ossa si trovano soprattutto calcio e fosforo, mentre il tessuto muscolare è povero di calcio, ma abbondante – in ordine decrescente – di potassio, fosforo, sodio, magnesio, zinco, ferro e rame. Il ferro-eme dalla carne costituisce il 40-60% del ferro totale. Calcio, magnesio, sodio e potassio sono direttamente coinvolti nella contrazione nel muscolo *in vivo*, mentre il magnesio e il calcio continuano a contribuire alla contrazione del muscolo *post mortem*.

1.5 Proprietà funzionali delle proteine muscolari

Le proteine degli alimenti carnei, a differenza di tutte le altre proteine alimentari e degli ingredienti funzionali non proteici, godono di molteplici proprietà funzionali. Per proprietà funzionali si intendono le proprietà chimico-fisiche che determinano il comportamento e le prestazioni delle proteine all'interno degli alimenti durante le fasi di lavorazione, conservazione, distribuzione e consumo.

Le proteine per la loro influenza sulle proprietà strutturali e sensoriali delle carni e dei prodotti a base di carne, rappresentano un elemento essenziale

per lo sviluppo di alimenti carnei di alta qualità. Ciò acquista maggior rilievo se viene riferito all'impiego insoddisfacente di tecnologie sofisticate di estrusione e idonee formulazioni, nei prodotti sostitutivi della carne a base di proteine vegetali non sono in grado di replicare efficacemente la struttura e la sensazione in bocca dei prodotti carnei.

Le proteine di costituzione (miofibrillari, sarcoplasmatiche e stromali) e quelle aggiunte come ingredienti proteici in fase di formulazione (miofibrillari, collagene, gelatina, surimi e plasmatiche) conferiscono specifiche proprietà:

- Capacità di ritenzione idrica: capacità di “legare” l’acqua e di rigonfiamento delle fibre (swelling);
- Solubilità proteica;
- Gelificante: formazione di un gel in seguito a cottura;
- Emulsionante: capacità di emulsionare i lipidi;
- Caratterizzazione delle proprietà generali correlate alla texture della carne e dei suoi derivati: consistenza; aspetto; sensazione in bocca, tenerezza e la succulenza;
- Azione legante nei confronti di altri componenti della carne;
- Contribuiscono alla stabilità fisica in fase di conservazione.

I fattori che incidono sulla funzionalità proteica sono numerosi e dagli effetti notevolmente variabili. La variabilità è determinata dall'uso di diversi ingredienti non carnei e da fattori intrinseci delle proteine muscolari (es. composizione e sequenza amminoacidica, la disposizione spaziale della struttura proteica, la dimensione e forma delle molecole proteiche, le caratteristiche di solubilità, superfici idrofobiche) impartisce in determinate condizioni di lavorazione.

Come già descritto in precedenza, le proteine muscolari sono divise in tre gruppi – proteine sarcoplasmatiche (idrosolubili), proteine miofibrillari (solubili in soluzioni con forza ionica $>0,5$) e proteine stromali (solubili in soluzioni acide o alcaline) – che svolgono ruoli differenti durante la lavorazione della carne. Sintetizzando, le proteine sarcoplasmatiche possiedono eccellenti capacità di formare schiume per le piccole dimensioni e

l'elevata superficie di attività. Le proteine stromali svolgono un ruolo nei confronti della texture nelle carni finemente macinate (es. wurstel). Le proteine miofibrillari, d'altra parte, possiedono molteplici proprietà funzionali, quali capacità di formare un gel in seguito a cottura, emulsionante e di ritenzione dell'acqua.

Una corretta gestione dei fattori di processo (ad es. metodo, temperatura e tempo di triturazione; variabili di zangolatura; tempo di stoccaggio; e variabili di cottura) e di altri parametri (es. origine della carne; pH della carne; tipo e concentrazione di sale; tenore in umidità, grasso e proteine; agenti ossidanti, e altri ingredienti non carnei), risultano fondamentali al fine di ottenere prodotti ricchi in proteine e con le peculiarità fisiche desiderate; caratteristiche che determinano le proprietà qualitative del prodotto (reologia, attributi sensoriali, aspetto e resa), e che sono intimamente connesse alla sensibilità delle proprietà funzionali delle proteine ai fattori ambientali e di processo.

La relazione struttura-funzione delle proteine e le varie condizioni di lavorazione delle carni influenzano notevolmente le varie proprietà funzionali delle proteine, e di conseguenza, una chiara e approfondita comprensione delle stesse risulta essenziale per un utilizzo efficace delle proteine muscolari nell'industria alimentare e nello sviluppo di nuovi prodotti alimentari.

1.5.1 Capacità di ritenzione idrica

La capacità di ritenzione idrica (Water Holding Capacity, WHC), intesa come la capacità dei tessuti muscolari di trattenere o di perdere umidità, è una proprietà chiave delle proteine muscolari in quanto determina la succulenza e la tenerezza della carne e dei suoi derivati. L'acqua della carne rappresenta circa il 75% del peso fresco (fino all'85% per le carni con soluzioni acquose iniettate o pompate) e può presentarsi associata oppure allo stato libero. Come già descritto in precedenza, l'acqua legata è strettamente associata alle proteine tramite legami idrogeno, che sono influenzati dalla carica superficiale e la polarità delle proteine. L'acqua libera, costituisce la maggior parte dell'acqua nella carne, è trattenuta per capillarità in differenti compartimenti

del tessuto muscolare (negli spazi tra miofilamenti, tra miofibrille e all'esterno delle fibre). La WHC è fortemente influenzata dal pH dell'ambiente, dalla disponibilità di specifici cationi e anioni e dal grado di contrazione delle proteine miofibrillari. La manipolazione della WHC è finalizzata al controllo delle perdite durante la cottura (cooking loss) e delle perdite di liquidi durante la lavorazione e conservazione (drip loss).

Durante la fase *post mortem*, si osserva un'acidificazione del tessuto muscolare (pH 5,6-5,8) a causa dell'accumulo di acido lattico, con conseguente riduzione della capacità di ritenzione idrica da parte delle proteine miofibrillari. Il processo di acidificazione muscolare *post mortem*, soprattutto se avviene rapidamente in corrispondenza di temperature elevata, può determinare un'elevata denaturazione proteica e causare perdite di acqua nella carne. Nelle carni suine e avicole (tacchino e pollo), andamenti particolare anomali danno origine all'anomalia denominata con l'acronimo PSE ("pallida, molle, essudativa").

L'impiego di sostanze o di mezzi fisici in grado di espandere gli spazi tra le miofibrille dove si trova la maggior parte dell'acqua muscolare (confinata negli spazi tra i filamenti spessi e i sottili delle miofibrille), può portare ad un incremento di acqua legata nella carne a muscolo integro e a un miglioramento dell'intrappolamento dell'acqua aggiunta nelle carni lavorate. Su questo principio vengono comunemente aggiunte (per immersione, iniezione, zangolatura e massaggio) alle carni fresche soluzioni contenenti sali e/o composti funzionali al fine di aumentare le rese di lavorazione e migliorare le caratteristiche organolettiche (tenerezza, succosità e aroma) del prodotto.

L'impiego di soluzioni con alte concentrazioni in sali monovalenti (NaCl o KCl), comunemente incorporate alla carne mediante iniezione o zangolatura, induce l'espansione delle miofibrille (a partire dell'aumento della repulsione elettrostatica indotta dal NaCl) e la loro successiva idratazione. In questo modo, si verifica un rigonfiamento trasversale delle miofibrille e il miglioramento della ritenzione idrica della carne (Offer e Trinick, 1983; Hamm, 1986). I polifosfati, come sodio pirofosfato, tripolifosfato e esametafosfato, vengono utilizzati in combinazione con il sale per migliorare

la capacità di ritenzione idrica della carne. I fosfati alcalini innalzano il pH della carne da circa 5,5-5,6 (vicino al punto isoelettrico dell'actomiosina, pH ~ 5,0) a valori di 5,8-6,0. In corrispondenza di tali valori, le proteine muscolari immobilizzano l'acqua supplementare grazie all'aumento delle cariche disponibili sulle proteine unitamente all'espansione degli spazi fra i miofilamenti.

Soluzioni con alte concentrazioni di NaCl (generalmente superiore a 2,5% o 0,6 M), oltre ad aumentare le repulsioni elettrostatiche tra i miofilamenti adiacenti, aumentano la forza ionica dei liquidi cellulari che favorisce la dissociazione dei filamenti di miosina in una matrice polipeptidica in grado di inglobare una maggiore quantità di acqua. Inoltre, la maggiore forza ionica determina lo spostamento del punto isoelettrico della miosina (pH ~ 5,0) a un valore di pH inferiore attraverso "l'effetto cloruro" (Hamm, 1986). Questo effetto, dovuto all'associazione degli ioni Cl^- con i gruppi delle proteine carichi positivamente, aumenta le forze di repulsione e, di conseguenza, aumenta gli spazi tra i miofilamenti. Inoltre, si verifica un incremento del numero di cariche sulla superficie delle proteine miofibrillari che permette anche una più ampia idratazione delle miofibrille. Riassumendo, il meccanismo d'azione del cloruro di sodio comporta un elevato aumento della forza ionica, dello scambio ionico e del rigonfiamento delle fibre mediante "l'effetto cloruro".

Le basse concentrazioni di pirofosfato e tripolifosfato (<0,5% o 5 ± 15 mM) sono in grado di dissociare il complesso actomiosina. In presenza di magnesio, l'effetto del pirofosfato sulla dissociazione proteica è molto simile a quello esercitato dall'adenosina tripolifosfato (ATP) (Gränicher e Portzehl, 1964). Questi processi biochimici provocano l'indebolimento della struttura miofibrillare, poiché determinano la dissociazione del legame actina-miosina a causa del sequestro di ioni calcio necessari al mantenimento del legame actina-miosina. In questo modo, si libera della miosina dotata di maggiore capacità di legare l'acqua, aumenta lo spazio intramuscolare perché cresce il numero dei siti di legame liberi e le molecole di acqua riescono a diffondersi più facilmente negli spazi tra i filamenti.

Con l'incremento della concentrazione di NaCl da 0,1 M a circa 0,6 M in assenza di fosfato, o fino a 0,4 M in presenza di fosfato, si verifica un significativo rigonfiamento della fibra muscolare (Xiong *et al.*, 1999). Il grado di rigonfiamento e idratazione continua fino a 1,0 M NaCl dove raggiunge valori prossimi al 4% del peso muscolare (Parsons e Knight, 1990). Elevate concentrazioni di sale nella carne (> 7%) causano l'aggregazione delle proteine e la loro precipitazione (effetto chiamato *salting-out*) e ciò comporta un peggioramento della WHC. Il fenomeno di *salting-out* è dovuto agli ioni in eccesso apportati dal sale, che competono con le proteine per l'interazione con le molecole di acqua. Gli ioni sequestrano l'acqua di solvatazione delle proteine e le fanno precipitare a causa della mancanza di forze di repulsione.

L'aggiunta di NaCl e polifosfati determina pertanto una parziale estrazione delle proteine miofibrillari. Infatti, osservazioni mediante microscopia a contrasto di fase rivela che, in una soluzione di $0,6 \pm 1,0$ M NaCl, il rigonfiamento della miofibrilla è accompagnato dalla simultanea estrazione selettiva di proteine (filamenti spessi di miosina) dalla miofibrilla (Offer e Trinick, 1983; Xiong *et al.*, 2000). Ciò può creare sufficiente spazio per la diffusione dell'acqua nella matrice proteica. Inoltre, alcuni polipeptidi strutturali trasversali (ad es. proteina M, X-proteine, e C-proteina,) che contribuiscono nel mantenere l'integrità della miofibrilla, possono fungere da vincolo strutturale all'estrazione della miosina.

1.5.2 Solubilità

Per solubilità proteica si intende la percentuale (% w/w) di proteina dissolta in una soluzione acquosa in condizioni specifiche di estrazione. È una manifestazione dell'equilibrio tra il soluto (proteine) e il solvente (acqua) e dipende dalla presenza di gruppi ionizzabili, polari e idrofobici sulla superficie delle proteine. La solubilità delle proteine è influenzata anche dalla concentrazione dei sali disciolti nel mezzo, dalla polarità del solvente, dal pH e dalla temperatura.

Nella lavorazione delle carni, molte proprietà funzionali delle proteine sono influenzate dalla loro solubilità. Ad esempio, la gelatinizzazione, la

capacità emulsionante, la capacità di ritenzione idrica e la coesione tra i vari pezzi di carne ricostituiti e ristrutturati sono il risultato di interazioni delle proteine miofibrillari solubili con i vari componenti della carne. Nella letteratura scientifica, le espressioni “solubilità delle proteine” ed “estraibilità delle proteine” vengono usate per indicare lo stesso processo, poiché le proteine una volta solubilizzate, in certo tampono, possono essere facilmente estratte.

Il fattore che maggiormente influenza le caratteristiche di solubilità proteica è la struttura della proteina. La maggior parte delle proteine sarcoplasmatiche presentano una struttura globulare di piccole dimensioni (la maggior parte fra 30 e 65 kDa) con un singolo dominio. Sulla superficie di queste proteine vi sono amminoacidi polari che a pH vicino alla neutralità, corrispondente al punto isoelettrico, mostrano solubilità minima. In generale, all'aumentare del numero di amminoacidi polari, aumenta la solubilità delle proteine in acqua. Per queste caratteristiche strutturali, le proteine sarcoplasmatiche sono naturalmente solubili in acqua, indipendentemente dalla forza ionica, mentre, le proteine miofibrillari sono insolubili in forza ionica fisiologica. I punti isoelettrici delle proteine miofibrillari e delle proteine sarcoplasmatiche sono relativamente bassi (rispettivamente pH 5,0-6,0) per consentire la disposizione strutturale e l'interazione tra i diversi segmenti dei polipeptidi.

La figura 1.3 illustra la relazione tra la forza ionica (Γ , concentrazione molare di NaCl) e la solubilità delle proteine miofibrillari. Nell'intervallo di forza ionica 0,03-0,2 la solubilità raggiunge il valore minimo perché le cariche superficiali della proteina sono protette da piccoli elementi ionici circostanti (ad es., Na^+ , Cl^-).

A valori superiori di forza ionica, le proteine miofibrillari diventano di nuovo solubili grazie all'indebolimento delle interazioni proteina-proteina e alla dissociazione dei miofilamenti. Nella formulazione di prodotti carnei, l'aggiunta di sale e polifosfati, in combinazione con il prolungamento del tempo di miscelazione (massaggio, burattatura o taglio) e all'innalzamento del pH della soluzione, provoca l'estrazione delle proteine miofibrillari. Oltre a

depolymerizzare i filamenti di miosina, il sale a concentrazioni elevate abbassa il punto isoelettrico della miosina apportando una maggiore carica netta nel normale intervallo di pH della carne (5,5-5,8). L'incremento del doppio strato elettronico che circonda la proteina ne migliora l'idratazione e la solubilità.

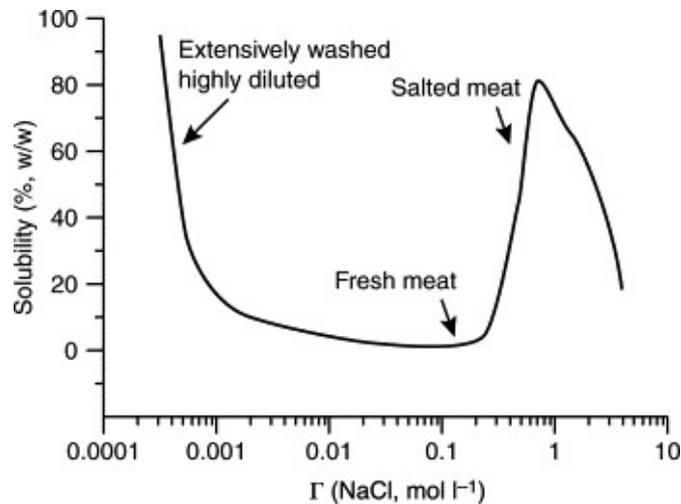


Figura 1.3. Rappresentazione schematica della relazione della forza ionica e solubilità delle proteine miofibrillari.

Anche il pirofosfato e il tripolifosfato hanno degli effetti notevoli, tra di loro simili, sulla solubilità delle proteine miofibrillari. In assenza di fosfato, l'estrazione della miosina parte dal centro delle bande scure delle miofibrille. Mentre in presenza del pirofosfato di sodio, l'estrazione delle proteine avviene a partire da entrambe le estremità della banda A (Figura 1). Poiché i ponti trasversali dell'actomiosina sono situati solo all'estremità della banda A, si può dedurre che il pirofosfato dissocia il complesso actomiosina in un modo analogo all'azione del ATP, e portando alla separazione dei miofilamenti spessi e sottili. Si ritiene che il tripolifosfato venga idrolizzato a partire dal pirofosfato per azione di una fosfatasi endogena prima di diventare funzionalmente attivo. Altri composti del fosfato, soprattutto quelli con una struttura ciclica o ad anello, sono generalmente meno efficienti dei fosfati a catena breve per l'estrazione delle proteine.

1.6 Colore della carne

Al momento dell'acquisto, presso i punti vendita al dettaglio, il fattore principale che incide sulla scelta di acquisto è sicuramente il colore della

carne. Il colore rosso brillante è infatti associato alla freschezza della carne cruda, mentre il colore grigio o marrone chiaro sono associati alla carne cotta.

Il principale pigmento dei tessuti muscolari è la mioglobina (Mb, 16 kDa). Si tratta di una proteina globulare costituita da una singola catena (circa 50 amminoacidi) e un gruppo prostetico “eme” inserito in una porzione idrofobica della proteina. Il colore dipende dalla concentrazione di Mb, dallo stato di ossidazione del Fe nel piano dell’anello porfirinico e dalla molecola legata al sesto sito di coordinazione del Fe. Lo stato di ossidazione del Fe, la forma del pigmento, la molecola legata e il colore del tessuto possono presentarsi nelle seguenti maniere: Fe^{2+} , mioglobina- H_2O (Mb, rosso porpora), Fe^{2+} , ossimioglobina- O_2 (MbO_2 , rosso vivo); Fe^{3+} , metamioglobina- H_2O (MbO_2 , bruno); Fe^{2+} , nitrosomioemocromogeno-NO (rosa) (Keeton e Eddy, 2004).

La capacità della mioglobina di assorbire la luce visibile è dovuta alla risonanza dei doppi legami coniugati del gruppo eme. La carne viene percepita di colore giallo, arancione e rosso perché la radiazione luminosa assorbita dalla mioglobina corrisponde al verde.

1.6.1 Colore della carne cruda

La complessa microstruttura della carne diffonde luce che la investe in maniera casuale (fenomeno dello scattering). La complessa microstruttura è data dai diversi stadi di distruzione *post mortem* delle membrane, miofilamenti con diverso grado di sovrapposizione con orientazioni differenti e dai vari indici di rifrazione dei liquidi presenti. La frazione di luce non assorbita dalla carne, esce e si rende visibile all’osservatore che ne percepisce il colore (Swetland, 2004).

Bassi gradi di scattering tendono ad ampliare la profondità di penetrazione della luce all’interno della carne e ciò determina un incremento dell’assorbimento da parte della mioglobina (si percepisce un colore “scuro”). Nel caso opposto, a elevati gradi di scattering si verifica una riduzione dell’assorbimento (si percepisce un colore “chiaro”) a causa della differenza tra gli indici di rifrazione del sarcoplasma e delle miofibrille.

I fattori che concorrono alla percezione del colore nella carne fresca sono:

- Concentrazione in emepigmenti (mioglobina, citocromi);
- Stato chimico degli emepigmenti (equilibrio ossidativo);
- Modalità ed entità della discesa *post mortem* del pH della carne (la denaturazione della Mb impedisce il passaggio della luce).

La superficie della carne appena tagliata presenta un colore rosso vivo (prevalenza di MbO₂), e colore rosso porpora in profondità (Mb nativa). Tagli carnei lasciati esposti all'atmosfera per lungo tempo mostrano un colore bruno in superficie (MetMb) e un colore rosso porpora-bruno in profondità (Mb e MetMb). Gli equilibri ossidoriduttivi della mioglobina sono riportati nella figura 1.4.

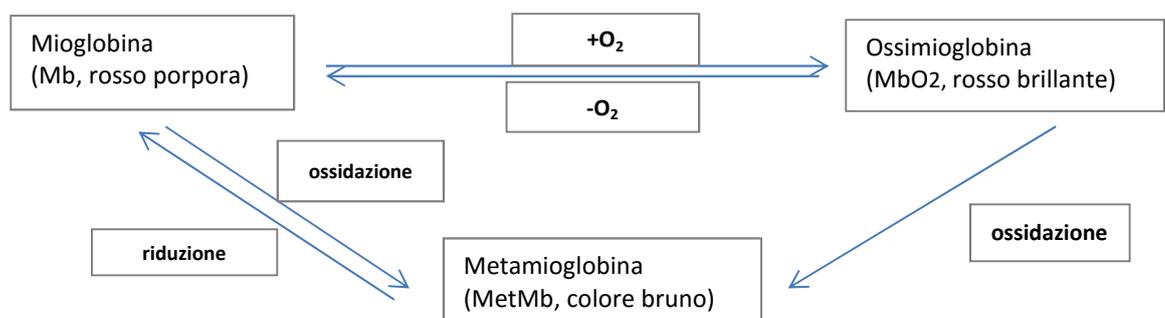


Figura 1.4. *Equilibri ossidoriduttivi della mioglobina.*

1.7 Alterazioni della carne

Il deterioramento della carne può essere di natura chimica, fisica, enzimatica o microbiologica e si manifesta con alterazioni di odore, sapore, colore o struttura della carne. A causa dei cambiamenti negativi associati all'ossidazione, nel settore della carne sono state condotte molte ricerche finalizzate al rallentamento delle reazioni ossidative.

1.7.1 Ossidazione lipidica

L'ossidazione dei lipidi è la principale forma di alterazione della qualità (sapore, odore, colore, texture e aspetto) di prodotti carnei e ittici, anche quando il contenuto di lipidi è piuttosto basso. Viene percepita dai

consumatori mediante lo sviluppo di odori e sapori rancidi e aroma di “over-warmed” nelle carni e nei prodotti carnei precotti.

Questi odori e sapori rancidi sono i prodotti dell'autossidazione degli acidi grassi insaturi, come acido oleico, linoleico, linolenico e acido arachidonico. I fosfolipidi si trovano nelle membrane e vengono generalmente coinvolti nelle reazioni iniziali di ossidazione nella carne per il loro elevato livello di insaturazione. Il processo di autossidazione consiste in tre fasi: inizio, propagazione e terminazione (Figura 1.5). Nella fase iniziale un acido grasso insaturo reagisce con l'ossigeno molecolare (O_2) producendo un radicale libero per rimozione di un idrogeno labile dall'atomo di carbonio adiacente al doppio legame. Il radicale libero reagisce con l'ossigeno per formare un radicale perossido, che a sua volta può sottrarre un altro atomo d'idrogeno da un'altra molecola di acido grasso, propagando la reazione a catena. La fase di terminazione si verifica quando due radicali liberi reagiscono tra di loro, ad esempio quando un radicale perossido reagisce con un radicale libero, oppure quando reagiscono due radicali perossidici o quando i radicali reagiscono con altri costituenti della carne (vitamine, aminoacidi, dipeptidi, etc.). Gli idroperossidi formati durante la propagazione si decompongono e formano prodotti secondari in gran parte responsabili dello sviluppo di sapori e odori rancidi nelle carni. Il grado di irrancidimento dei grassi viene, diffusamente, misurato attraverso la determinazione della malonaldeide dopo aver reagito con l'acido tiobarbiturico (test TBARS). Tuttavia, in alcuni casi il test TBARS è stato sovrastimato il contenuto di malonaldeide fino a nove volte. Quindi, sono preferibili saggi specifici per la determinazione di malonaldeide e/o altre aldeidi sviluppate durante l'irrancidimento delle carni. Inoltre, il confronto di stabilità ossidativa tra carni grasse o con composizione lipidica differente può non essere valido perché la maggior parte dei reattivi TBARS sono prodotti dell'ossidazione degli acidi grassi n-3 (ad esempio malonaldeide).

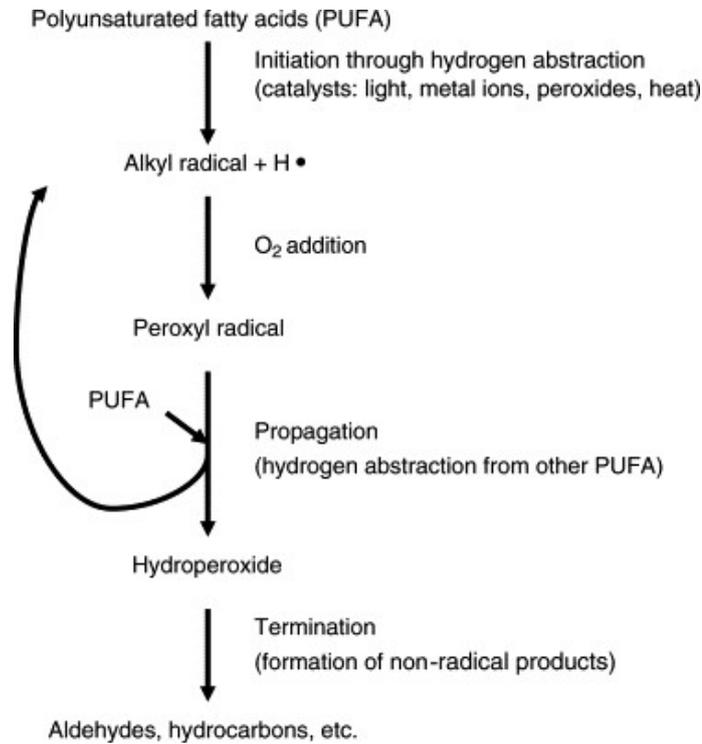


Figura 1.5. *Processo di autossidazione.*

I fattori che influenzano la suscettibilità all'ossidazione lipidica sono:

- Tenore in lipidi e composizione in acidi grassi;
- Concentrazione in antiossidanti e in emepigmenti;
- Livello di lavorazione;
- Esposizione all'ossigeno e alla luce.

La carne di pollo è particolarmente sensibile all'ossidazione a causa dei suoi livelli elevati di fosfolipidi polinsaturi e i bassi livelli di antiossidanti. L'ossidazione lipidica delle membrane cellulari danneggiate, durante la trasformazione e lavorazione e/o conservazione, determina un aumento delle perdite di liquido per sgocciolamento (drip loss) e riduce, di conseguenza, la capacità di ritenzione idrica delle carni. In aggiunta, la suscettibilità all'ossidazione dei lipidi può influire negativamente sulla stabilità del colore della carne durante la conservazione.

Sono numerose le strategie da poter attuare per il controllo dell'ossidazione lungo tutta la filiera; quali ad esempio l'incorporazione di antiossidanti nell'alimentazione animale, idonei sistemi di confezionamento, il controllo della temperatura, protezione dalla luce o l'aggiunta di antiossidanti, ecc.

CAPITOLO II

MICROBIOLOGIA DEL POLLAME

2.1 Microbiologia del pollame

Le complesse caratteristiche chimiche e chimico-fisiche della carne permettono la colonizzazione e lo sviluppo di numerosi e diversi microrganismi, soprattutto batteri, alcuni dei quali sono classificati come utili o indifferenti, altri come indesiderati, per la loro patogenicità e/o azione alterante. I fattori che influenzano fortemente la microflora della carne sono la sua composizione chimica, le condizioni di allevamento e trasformazione, conservazione, distribuzione e consumo (Villani F., 2011).

Dopo la macellazione, la contaminazione delle carcasse con i microrganismi provenienti dall'ambiente, dagli operatori e dalle strutture di lavorazione, raggiunge livelli compresi tra 10^2 e 10^4 batteri/cm². Nonostante la flora batterica della carne (tipo e numero di microrganismi) sia soggetta a numerosi fattori, in generale, presenta una prevalenza di batteri Gram-negativi riconducibili all'ambiente di macellazione e di trasformazione. Tra i Gram-positivi, invece, gli enterococchi insieme ai lattobacilli costituiscono i generi batterici rinvenuti con maggiore frequenza (Jay. *et al.*, 2009). La presenza nelle carni di muffe appartenenti ai generi *Penicillium*, *Mucor* e *Cladosporium* sono attribuite alla loro ampia diffusione negli ambienti di macellazione e trasformazione. I lieviti più diffusi nelle carni di pollame appartengono ai generi *Candida* e *Rhodotorula*.

La tabella 2.1 riporta i principali generi di batteri Gram-positivi e Gram-negativi rinvenuti con maggiore frequenza nelle carni avicole prima del loro deterioramento.

Tabella 2.1 Generi di batteri isolati con maggiore frequenza in carni di pollo (Jay J. et al., 2009)

Genere	Colorazione di Gram	Carni fresche	Fegati freschi	Pollame
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X	XX
<i>Aeromonas</i>	-	XX		X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	X	X
<i>Arcobacter</i>	-	X		
<i>Bacillus</i>	+	X		X
<i>Brachothrix</i>	+	X	X	X
<i>Campylobacter</i>	-			XX
<i>Carnobacterium</i>	+	X		
<i>Caseobacter</i>	+	X		
<i>Citrobacter</i>	-	X		X
<i>Clostridium</i>	+	X		X
<i>Corynebacterium</i>	+	X	X	XX
<i>Enterobacter</i>	-	X		X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X	X
<i>Erysipelothrix</i>	+	X		X
<i>Escherichia</i>	-	X	X	
<i>Flavobacterium</i>	-	X	X	X
<i>Hafnia</i>	-	X		
<i>Kocuria</i>	+	X	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X		
<i>Lactobacillus</i>	+	X		
<i>Lactococcus</i>	+	X		
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X	
<i>Listeria</i>	+	X		XX
<i>Microbacterium</i>	+	X		X
<i>Micrococcus</i>	+	X	XX	XX
<i>Moraxella</i>	-	XX	X	X
<i>Paenibacillus</i>	+	X		X
<i>Pantoea</i>	-	X		X
<i>Pediococcus</i>	+	X		
<i>Proteus</i>	-	X		X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX		XX
<i>Psychrobacter</i>	-	XX		X
<i>Salmonella</i>	-	X		X
<i>Serratia</i>	-	X		X
<i>Shewanella</i>	-	X		
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X	X
<i>Vagococcus</i>	+			XX
<i>Weissella</i>	+	X	X	
<i>Yersinia</i>	-	X		

X = rinvenuto.
XX = rinvenuto frequentemente.

La durata e le modalità con cui vengono condotte le fasi di condizionamento delle carcasse (ad esempio, taglio e conservazione) possono modificare quantità e tipologia di microrganismi in grado di crescere e determinare alterazioni. Per permettere la trasformazione del muscolo in carne le carcasse vengono maturate o frollate a temperature di refrigerazione, la cui durata è molto variabile. Durante questo periodo avvengono delle modificazioni delle proteine strutturali del muscolo scheletrico che si traducono in un aumento della tenerezza della carne. Dopo la fase di sezionamento, i tagli sono conservati e refrigerati in varie condizioni di atmosfera gassosa al fine di inibire la manifestazione di alterazioni, più a lungo possibile, nel prodotto prima del consumo.

Il numero e le tipologie di batteri inizialmente presenti e le condizioni di conservazione, soprattutto temperatura e atmosfera gassosa, determinano la

shelf-life dei prodotti carnei. Tuttavia, solo una frazione dei batteri che crescono nella fase di conservazione refrigerata a 4°C (il 10% della carica batterica iniziale) causa alterazioni nelle carni.

2.1.1 Microflora della carne conservata in condizioni aerobiche

L'elevata umidità e disponibilità di nutrienti in superficie, rende la carne uno degli alimenti più facilmente deteriorabili per la crescita di un'ampia varietà di batteri alterativi. La colonizzazione e la crescita microbica che avvengono sulla superficie della carne sono caratterizzate da più stadi: (1) adesione reversibile della cellula batterica alla superficie mediante forze di van der Waals; (2) adesione irreversibile della cellula batterica con formazione di uno strato adesivo di polisaccaridi esocellulari (glicocalice).

Tra le varie tipologie di confezionamento della carne, la più familiare al consumatore è il confezionamento in atmosfera ordinaria che consiste in un vassoio di polistirolo, avvolto con un film stretch e conservato in condizioni di refrigerazione a 4°C. La conservazione a temperature di refrigerazione determina il grado e la velocità dei cambiamenti organolettici indesiderati, poiché condiziona e seleziona lo sviluppo microbico nelle carni esposte ad atmosfera ordinaria. In generale, riducendo la temperatura di refrigerazione si diminuisce la crescita batterica e, di conseguenza, varia la composizione delle popolazioni microbiche. Nell'intervallo delle temperature di refrigerazione (da -1°C a +7°C) il tasso di crescita dei batteri alterativi psicrotrofi – la cui temperatura minima di crescita è -3°C – aumenta molto anche in seguito a piccoli incrementi di temperatura (Villani F., 2011).

Le principali popolazioni batteriche nella carne refrigerata sono, in ordine decrescente, specie appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Brochothrix thermospacta*, batteri lattici (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*) e alcuni membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* psicrotrofiche (*Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*).

Le specie dei generi *Moraxella*, *Psychrobacter* e *Acinetobacter* rappresentano una porzione rilevante della microflora della carne refrigerata, tuttavia, non svolgono un ruolo importante nell'alterazione della carne. Si

tratta di gram-negativi incapaci di utilizzare il glucosio, ma occasionalmente in grado di competere con successo con la microflora psicrotrofa della carne.

Alcune specie sono specifiche della carne, giacché isolate solo da essa e dagli ambienti di processo connessi:

- *Pseudomonas fragi*: caratterizzato da un alto tasso di crescita; rapida adesione alla superficie; utilizzazione di diverse fonti di ferro (creatina e cratinina).
- *Pseudomonas fluorescens* e *P. lundensis*: caratterizzati da un alto tasso di crescita; rapida adesione alla superficie.
- *Brochotrhnrix thermosphacta*: isolato solo nella carne; degrada il glucosio e il gluttamato della carne. In aerobiosi, il glucosio viene convertito principalmente ad acido lattico, mentre in anaerobiosi ad acido lattico ed etanolo.

2.1.2 Microflora della carne refrigerata in sottovuoto e atmosfera modificata

La composizione dell'atmosfera gassosa nell'ambiente di confezionamento esercita, in concomitanza con la temperatura, una forte selezione sulle popolazioni microbiche presenti sulla superficie della carne.

Il confezionamento in atmosfera modificata è realizzato impiegando film con bassa permeabilità ai gas atmosferici. L'atmosfera all'interno della confezione può essere eliminata completamente (sotto-vuoto, SV), oppure, sostituita con miscele a concentrazione nota di CO₂, O₂ e N₂ (modified atmosphere packaging, MAP). Normalmente, all'aumentare della concentrazione di CO₂ si riduce quella di O₂, selezionando, così, una microflora dominata da batteri Gram-positivi.

La permeabilità del film di confezionamento, soprattutto nel caso del sotto-vuoto, influenza la shelf-life della carne; un incremento della permeabilità determina un aumento del tasso di crescita e del numero massimo finale di *Pseudomonas* e, in minor misura, di *B. thermosphacta*. L'odore anomalo di acido è dovuto al metabolismo dei batteri lattici (LAB) che convertono i carboidrati in acido lattico e acido acetico. Dopo il totale consumo dei carboidrati, inizia la produzione di acidi grassi, quali acido

lattico, acetico e butirrico (che conferiscono alla carne il tipico odore di caseario) a partire dagli aminoacidi. Nella carne SV non è raro assistere alla crescita di *B. thermosphacta* e di *Enterobacteriaceae*, seppur con tassi di crescita massima inferiori rispetto a quelli dei LAB.

Nel corso della conservazione prolungata sotto vuoto o MAP della carne la microflora, inizialmente eterogenea, diventa omogenea e la predominanza di LAB determina l'abbassamento del pH (Jay *et al.*, 2009).

2.2 Microbiologia delle carni avicole marinate

La crescente domanda dei consumatori per prodotti semplici e veloci da preparare e la contemporanea integrazione e ampliamento del settore del pollame, ha fornito un mercato in espansione per i prodotti a valore aggiunto. Rientrano in questa categoria di prodotti anche le carni marinate che per i consumatori, presentano due vantaggi: facilità di preparazione dei pasti con il prodotto tal quale (necessita solo di trattamento termico senza altra manipolazione o aromatizzazione) e maneggevolezza del prodotto.

Il significato attribuito all'espressione "prodotto marinato" varia da paese a paese. In generale, per marinatura si intende carne destinata alla cottura, che è stata precedentemente immersa più o meno a lungo in un bagno di aceto o vino o superalcolici, variamente salata e aromatizzata (con odori, aglio, spezie).

Gli obiettivi principali della marinatura sono favorire l'intenerimento della carne, aromatizzarla e migliorarne la sicurezza e la shelf-life mediante l'inibizione della crescita microbica. La presenza di sorbati e benzoati nelle soluzioni di marinatura, in modo congiunto al pH acido, inibisce fortemente la crescita microbica.

Nella selvaggina o carni destinate a lunga cottura, la marinatura favorisce la frollatura e "l'insaporimento". Per questo motivo, alcune procedure di marinatura sono mirate all'intenerimento di carne qualitativamente inferiore (Young & Lyon, 1997a, 1997b). La quantità di soluzione di marinatura aggiunta alla carne varia in base alla tipologia del prodotto, ma è abbastanza comune un'addizione del 20-30% (peso/peso).

2.2.1 Ecologia microbica dei prodotti avicoli marinati

La composizione della microflora della carne conservata in MAP, costituita da miscele a diversi livelli di O₂ (60-80%) e di CO₂ (20-40%), è strettamente dipendente dalla temperatura di conservazione e dal tipo di carne. A temperature di 0°C predominano i batteri lattici, mentre altri microrganismi come *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* ed *Enterobacteriaceae* mostrano temperature ottimali di crescita a 5-6°C.

In uno studio condotto nel 2000 (Björkroth *et al.*, 2000), su campioni di petti di pollo marinati conservati in MAP, è stata identificata una popolazione mista di LAB responsabile del deterioramento. Questa popolazione era dominata da una specie *Leuconostoc* somigliante a *Leuconostoc gelidum*. Altri microrganismi presenti e responsabili del deterioramento identificati sono *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* (Gram-positivi, fenotipicamente simile agli eterofermentanti della specie *Lactobacillus*). È stato dimostrato che questi LAB non sono in grado di decarbossilare i principali amminoacidi associati alla carne, quindi, l'aumento del pH è correlato alla capacità tampone della carne (Björkroth *et al.*, 2005).

In un altro studio (Susiluoto *et al.*, 2002) è stato osservato come *L. gasicomitatum* sia presente comunemente in prodotti avicoli marinati confezionati in MAP, mentre *B. thermosphacta* non rappresenta una parte significativa della popolazione batterica perché non supera il livello soglia di deterioramento pari a 10⁵ CFU/g.

In generale, dal confronto tra popolazione LAB inizialmente presente e popolazione LAB deteriorante nei prodotti di carne di pollo marinata si evince il passaggio da predominanza di cocchi omofermentanti verso carnobacteria, *L. sakei/curvatus* ed eterofermentanti (*L. oligofermentans*).

2.3 **Microrganismi patogeni nella carne di pollo**

Un importante problema che riguarda la salute pubblica sono le tossinfezioni alimentari, causate da diversi agenti principalmente batteri, ma anche virus e parassiti. Le tossinfezioni alimentari hanno un tempo di

incubazione solito di 12-48 ore e si manifestano con differenti sintomi che interessano per lo più il sistema gastrointestinale, possono derivare dall'infezione diretta di microrganismi patogeni in grado di colonizzare le mucose una volta ingeriti con gli alimenti oppure dalle loro tossine microbiche prodotte all'interno del tratto gastroenterico. Generalmente, le tossine prodotte manifestano le loro azioni a livello gastrointestinale con nausea, vomito, crampi addominali e diarrea.

Le modalità di contaminazione dei cibi possono essere varie. In alcuni casi i microrganismi sono presenti negli intestini di animali sani e vengono in contatto con le carni in fase di macellazione. A volte, le infezioni possono essere trasmesse al cibo, da parte degli operatori durante le fasi di manipolazione degli alimenti per contatto con strumenti non adeguatamente disinfettati e con le mani degli operatori. Altri aspetti importanti sono le condizioni di conservazione e il rispetto della catena del freddo come mezzo per prevenire lo sviluppo e la moltiplicazione microbica. Dato che la maggior parte dei microrganismi non resiste a temperature superiori a 60-70°C, la contaminazione dei prodotti cotti è da attribuire al contatto con alimenti crudi.

2.3.1 Gli agenti patogeni

Numericamente, gli agenti patogeni più importanti associati al pollo sono *Salmonella* e *Campylobacter* spp. Altri patogeni nel pollo sono *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, insieme a quelli riconosciuti più di recente, come *Arcobacter* e *Helicobacter* spp. (Corry & Atabay, 2001).

I dati dell'Unione europea (UE) mostrano che, nel 2001, ci sono stati 157.822 casi di salmonellosi umana e 156.232 casi di *Campylobacter enteriti* (Cavitte, 2003). Sebbene il pollo non sia l'unica fonte di tossinfezioni, rappresenta un importante serbatoio contaminante. Questo fenomeno è accentuato dalle moderne condizioni di allevamento intensivo e dalle rapide operazioni di manipolazione delle carcasse che favoriscono la diffusione di eventuali agenti patogeni all'interno degli allevamenti e delle sedi di trasformazione. In aggiunta, la somministrazione di antimicrobici al pollame

(per profilassi, scopi terapeutici o per migliorare le prestazioni) contribuisce allo sviluppo dell'antibioticoresistenza da parte dei patogeni, con gravi conseguenze per il trattamento delle malattie umane.

2.3.1.1 *Salmonella e Campylobacter*

Il genere *Campylobacter* appartiene alla famiglia della *Campylobacteraceae* ed è caratterizzato da batteri Gram-negativi, di forma spirillata, microaerofili, termofili.

Le specie di *Campylobacter* possono essere convenzionalmente separate in tre gruppi sulla base delle caratteristiche fenotipiche:

- 1) Specie termofile enteropatogene: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. helveticus*.
- 2) Specie patogene o commensali in animali di allevamento: *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. fetus* e *C. mucosalis*.
- 3) Specie di primario interesse della medicina umana: *C. concisus*, *C. curvus* etc. (Kos *et al.*, 2006).

L'ingestione di cibi o bevande contaminate da *Campylobacter* genera una patologia chiamata campylobatteriosi caratterizzata da diarrea, febbre, nausea e crampi addominali.

Tra le specie citate sopra, *Campylobacter jejuni*, è ritenuto la più importante causa di enterite nell'uomo essendo isolato nel 36,4% di casi clinici di patologie gastro-enteriche. *Campylobacter coli* è la seconda principale causa di campylobatteriosi (0,19%), seguito da *Campylobacter lari* (0,01%) (EFSA, 2011).

I fattori di rischio per contrarre il patogeno sono rappresentati, soprattutto, dal consumo e dalla manipolazione di carni avicole crude o poco cotte (Zhao *et al.*, 2001) con una contaminazione superficiale tipica relativamente alte, fino a 10^9 UFC/carcassa, prodotti avicoli, cibi crudi che hanno subito una contaminazione crociata con carni avicole contaminate, acqua contaminate dal microrganismo, pervenuto tramite scarichi derivanti da impianti di macellazione di avicoli (Rosef *et al.*, 2001).

Campylobacter è in grado di penetrare gli organi interni e i tessuti profondi dell'animale e per provocare l'infezione nell'uomo è sufficiente una dose infettante bassa (poche centinaia di cellule vitali).

Salmonella è un batterio appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* phylum dei *Proteobacteria*, microrganismo Gram-negativo, asporigeno, anaerobio facoltativo, dal metabolismo fermentativo (produce acido solfidrico a partire dal glucosio). I ceppi più frequentemente diffusi nell'uomo e nelle specie animali, in particolare in quelle allevate per la catena alimentare sono *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, alcuni sierotipi sono patogeni esclusivamente solo per l'uomo come *S. typhi* e *S. paratyphi* A e C, altri anche per gli animali come *S. typhimurium*.

Come per la campylobatteriosi, la trasmissione dell'infezione provocata da *Salmonella* (salmonellosi) avviene per via oro-fecale. I sintomi della salmonellosi sono dolore addominale, nausea, vomito, febbre e malessere generale. *Salmonella* è un microrganismo ubiquitario e, per questo, riscontrabile in ambienti umidi, ricchi d'acqua come fiumi, terreni paludosi, canali e ruscelli, ma soprattutto lo si trova nell'intestino dell'uomo e di diversi animali come rettili, uccelli e mammiferi dove vive da saprofita, per poi essere eliminato con le feci. A differenza di *Campylobacter*, è in grado di sopravvivere negli ambienti esterni.

Sia *Salmonella* che *Campylobacter* crescono solo in condizioni di elevata umidità, ossigeno ridotto e temperatura ambiente superiore a 30°C. Entrambi i microrganismi sono sensibili all'essiccazione e resistenti al congelamento. Cicli di congelamento e scongelamento possono causare una riduzione di 1-2 log del livello di contaminazione nella carne di pollo (Mead, 2004). Tuttavia, *Campylobacter* può sopravvivere nei prodotti avicoli durante tutta la filiera produttiva. Un fattore chiave per la sopravvivenza di entrambi i microrganismi è la loro capacità di ancoraggio ai tessuti del pollo durante le fasi di manipolazione delle carcasse. Questo fenomeno ne aumenta notevolmente la resistenza alle condizioni di processo che potrebbero rimuovere o ridurre la carica microbica.

2.3.1.2 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens è un batterio Gram-positivo, a forma di bastoncello, anaerobio e sporigeno appartenente alla famiglia delle *Clostridiaceae*. A differenza delle cellule batteriche vegetative, le spore non sono necessariamente distrutte dai normali trattamenti termici e, se le fasi postume alla cottura sono inadeguate, possono germinare. Infatti, i focolai sono provocati da ceppi che producono spore molto resistenti al calore. Tuttavia, l'estesa diffusione nella popolazione degli anticorpi contro la tossina ha fatto sì che la maggior parte delle tossinfezioni da *C. perfringens* rimangono subclinici.

C. perfringens, essendo un anaerobio obbligato con certa capacità ossigeno-tollerante, può crescere nelle fessure della carne in quanto l'ossigeno viene dissipato durante la cottura. In generale, la crescita di questo microrganismo nella carne viene inibita dalla conservazione a temperature di refrigerazione.

2.3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, gruppo dei Coliformi, ed è un bacillo di forma allungata, gram-positivo, non sporigeno, ospite naturale dell'intestino, dotato di flagelli peritrichi.

La specie *E. coli* ha come ambiente enteropatogeni e possono causare gravi gastroenteriti nei bambini piccoli. Questi ceppi producono due enterotossine, una resistente al calore e una sensibile, molto simile a quella del vibrione del colera. Tra gli alimenti incriminati quali vettori di *Escherichia coli* e delle rispettive enterotossine vi è la carne ed in particolare quella di pollame. Sono necessarie molte cellule di *E. coli* (10^6 - 10^8 UFC/g) per produrre tossine in quantità sufficiente a determinare la gastroenterite, soprattutto in bambini, anziani e individui immuno-compromessi.

I ceppi di *E. coli* coinvolti nelle gastroenteriti possono essere raggruppati in cinque gruppi (Galli Volonterio A., 2005):

- 1) EPEC: *E. coli* enteropatogeni non produttori di tossina, ma hanno un fattore di aderenza mediato da plasmide, sono perciò

enteropatogeni, solo per alcuni ceppi è stata dimostrata una tossina citoletale;

- 2) EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, non producono tossine e la loro patogenicità è simile a quella delle *Shigelle*;
- 3) ETEC: *E. coli* enterotossigenici, producono due tossine, una termolabile (Lt) e una termostabile (St); la Lt ha proprietà immunologiche simile alla tossina dei vibrioni del colera; i ceppi ETEC posseggono fimbrie o pili che permettono di aderire alla cellule epiteliali.
- 4) EAEC: *E. coli* enteroaggregativo, associati a casi sporadici di diarrea persistenti nei paesi in via di sviluppo, una delle principali cause di mortalità infantile;
- 5) VTEC: producono due tossine, la vero tossina (o tossina Shiga-like) e la tossina SLT II, tutte citotossiche per le cellule Vero e letali per i topi.

Tra i numerosi sierotipi VTEC, individuati attraverso gli antigeni somatico O e flagellare H, quello responsabile delle tossinfezioni alimentari nell'uomo è il sierotipo 0157.

Il sierotipo VTEC 0157 è piuttosto raro nella carne di pollo sia negli animali vivi che nei prodotti trasformati. Malgrado ciò, questo batterio è in grado di colonizzare il pollame senza provocare la malattia nell'animale. L'estensione della colonizzazione dipende dalla dose, età, razza e tempo di esposizione (Mead, 2004). Inoltre, VTEC 0157 è in grado di sopravvivere nel suolo e di crescere nel letame di pollo lasciato a temperatura ambiente. La dose infettiva è estremamente bassa, in alcuni casi pari a 10 cellule. I trattamenti termici sono la via preferenziale per ridurre il rischio di VTEC negli alimenti sia per pastorizzazione o raggiungendo una temperatura di cottura intorno ai 70°C per la carne.

2.3.1.4 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes è un batterio ubiquitario appartenente alla famiglia delle *Corynebacteriaceae*, ordine degli *Eubacteriales*, Gram-positivo,

asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, termoresistente. Questo microrganismo è diffuso in numerosi ambienti e contamina diversi alimenti, come latte, verdure, formaggi molli e carni avicole crude.

In particolare, diversi focolai di listeriosi sono stati associati al consumo di prodotti minimamente trattati e ai cosiddetti “ready to eat foods” in cui la carica microbica del patogeno superava appena 100UFC/g (Chen *et al.*, 2003). A questo proposito, la Food and Drug Administration (FDA) ha stabilito una tolleranza zero nei confronti di questo patogeno, soprattutto negli alimenti pronti al consumo.

A causa della sua capacità di adattarsi a una vasta serie di condizioni avverse, è in grado di superare facilmente le condizioni chimico-fisiche e compositive che rappresentano una barriera allo sviluppo di microrganismi patogeni, e può quindi costituire un potenziale rischio per la salute del consumatore.

I pericoli principali associati al *L. monocytogenes* sono la contaminazione crociata da alimenti contaminanti, di solito crudi, verso altri alimenti cotti o pronti per il consumo. Infatti, la contaminazione durante le fasi successive alla cottura risulta particolarmente pericolosa poiché *L. monocytogenes* è in grado di crescere in condizioni di refrigerazione, ad un intervallo di pH ampio (5,6-9) e cresce anche in presenza di concentrazioni di NaCl fino al 10% e a valori di attività dell'acqua (A_w) anche minori di 0.93 (Rocourt e Buchrieser, 2007).

2.4 Principali alterazioni della carne da parte dei microrganismi

Gli odori sgradevoli che si generano nella carne di pollo sono percepiti con una carica microbica pari a circa $\log_{10}7,2-8,0/\text{cm}^2$, mentre quando i microrganismi raggiungono un numero di circa $\log_{10}8/\text{cm}^2$ compare una patina superficiale, chiamata biofilm (Ayres *et al.*, 1950). Il biofilm è prodotto dal raggruppamento di piccole colonie di *Pseudomonadaceae*.

Le popolazioni microbiche responsabili delle alterazioni sono depositate sulle superfici della carne dall'acqua di lavorazione. Inizialmente la crescita microbica è limitata all'area superficiale della carcassa, solo in una fase

successiva avviene la penetrazione dei batteri nei tessuti sottostanti (solitamente sterili o con una carica microbica abbastanza bassa e incapace di crescere a basse temperature). Questo fenomeno provoca un incremento della capacità d'idratazione delle proteine muscolari.

Dagli studi condotti da May *et al.*, (1961) è stato dimostrato come la pelle del pollame favorisca la crescita della microflora alterante più del tessuto muscolare. Infatti, la conservazione di carne di pollo in ambienti con elevata umidità facilita lo sviluppo, sulle superfici, di vari batteri aerobi, tra i quali le *Pseudomonadaceae*. Le alterazioni di carne di pollo che avvengono a 1°C sono dominate dalle *Pseudomonadaceae*, mentre tra i 10-15°C predominano batteri enterici e di altro tipo (Byun *et al.*, 2003). La fluorescenza alla luce ultravioletta della superficie del pollo, in stadi avanzati di alterazione, è attribuita a un numero elevato di *Pseudomonadaceae* fluorescenti.

2.4.1 Alterazioni della frazione proteica

In passato le molecole responsabili dei sapori e odori sgradevoli (off-flavours) erano state attribuite alle attività proteolitiche dei batteri degradativi con liberazione di peptidi e aminoacidi (precursori degli off-flavours). In seguito è stato dimostrato da Lerke (Jay JM, 1996) che i fenomeni alterativi, in una fase iniziale, sono a carico della sola frazione non proteica con peso molecolare inferiore a 5000 Da; in una seconda fase, in altre parole quando questa frazione non proteica è completamente esaurita, iniziano i fenomeni proteolitici a carico delle proteine muscolari da parte delle proteasi extracellulari microbiche.

2.4.2 Componenti volatili delle carni di pollo confezionate

I cattivi odori e sapori delle carni sono causati dai componenti volatili prodotti dal metabolismo microbico. I cosiddetti off-flavours compaiono con una carica microbica tra 10^5 e 10^6 UFC/g (Jay, 1996). Si parla di off-odours per cariche microbiche superiori a 10^8 UFC/g che causano anche un cambiamento strutturale e la comparsa di una patina viscosa della superficie del prodotto.

Come già detto in precedenza, i principali responsabili microbici del deterioramento dei prodotti carnei, conservati sotto-vuoto o in atmosfera modificata a temperatura di refrigerazione, sono i LAB (Blicksath *et al.*, 1983). L'ampia variabilità dei composti aromatici riscontrabile nelle carni alterate è dovuta alle caratteristiche specie-specifica o ceppo-specifica dei LAB (Van Kranenburg *et al.*, 2002).

I batteri lattici convertono parte del piruvato, per via glicolitica, in acido acetico e acetaldeide; prodotti secondari del metabolismo dei LAB (soprattutto del genere *Carnobacterium*) sono diacetile e acetoino che conferiscono tipico aroma di burro. La complessa attività proteolitica dei LAB contribuisce alla formazione del profilo aromatico di un prodotto; tali processi comprendono la generazione e l'assorbimento di aminoacidi, la loro conversione ad alcoli, aldeidi, esteri, tioesteri, composti solforati e la regolazione di tali meccanismi da parte della cellula.

La limitata attività lipolitica dei LAB e *B. thermosphacta* produce acidi grassi a corta catena precursori di componenti aromatici responsabili di odori pungenti, quali metilchetoni, alcoli, lattoni ed esteri (Molimard *et al.*, 1996). Nella tabella 2.2 sono riassunti i principali composti prodotti dalla microflora alterante che conferiscono odori e sapori anomali ai prodotti carnei confezionati sotto-vuoto.

Tabella 2.2 Componenti volatili della microflora alterante di carne di pollo (Jay J. *et al.*, 2009)

Microrganismo/ inoculo	Substrato/ condizioni	Composti volatili principali
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Carne sterile di pesce, 1-2 °C per 15 giorni	Dimetildisolfuro, dimetiltrisolfuro, metilmercaptano, trimetilammina, propionaldeide, 1-penten-3-olo, H ₂ S ecc.
" <i>Achromobacter</i> " sp.	Come sopra	Come sopra, tranne per dimetiltrisolfuro o H ₂ S
<i>P. fluorescens</i>	Come sopra	Metilsolfuro, dimetilsolfuro
<i>P. perolens</i>	Come sopra	Metilsolfuro, dimetildisolfuro, dimetiltrisolfuro, metilmercaptano, 2-metossi-3-isopropilpirazina (odore di patata)
<i>Moraxella</i> spp.	TSY agar, 2-4 °C per 14 giorni	16 composti, tra cui dimetildisolfuro, dimetiltrisolfuro, metilisobutirrato e metil-2-metil butirrato
<i>P. fluorescens</i>	Come sopra	Tutti i composti di cui sopra a eccezione del metilisobutirrato
<i>P. putida</i>	Come sopra	14 composti: gli stessi indicati per <i>Moraxella</i> spp., a eccezione del metilisobutirrato e del metil-2-metil butirrato
<i>B. thermosphacta</i>	Carne di manzo in scatola sotto vuoto inoculata, 5 °C	7 composti, tra cui diacetile, acetoino, nonano, 3-metil-butanale e 2-metil-butanolo
	Fette di manzo inoculate conservate in condizioni aerobiche a 1°C per 14 giorni, pH 5,5-5,8	Acetoino, acido acetico, acido isobutirrico/isovalerico: l'acido acetico aumentava di circa 4 volte dopo 28 giorni
	Come sopra, pH 6,2-6,6	Acido acetico, acido isobutirrico, acido isovalerico e acido n-butirrico
	APT broth a pH 6,5 e 0,2% di glucosio;	Acetoino, acido acetico, acido isobutirrico e acido isovalerico
	APT broth a pH 6,5, senza glucosio;	Come sopra ma senza acetoino
<i>B. thermosphacta</i> (15 ceppi)	APT broth a pH 6,5, 0,2% di glucosio;	Acetoino, acido acetico, acido isobutirrico, acido isovalerico, tracce di 3-metilbutanolo
<i>S. putrefaciens</i>	Crescita in pollo radappertizzato, 5 giorni a 10 °C	H ₂ S, metilmercaptano, dimetildisolfuro, metanolo, etanolo
<i>P. fragi</i>	Come sopra	Metanolo, etanolo, metilacetato, etilacetato, dimetilsolfuro
<i>B. thermosphacta</i>	Come sopra	Metanolo, etanolo
Microflora	Pollame alterato	Composti dell'idrogeno compreso H ₂ S, metanolo, etanolo, metilmercaptano, dimetilsolfuro e dimetildisolfuro

Da studi condotti da Freeman *et al.*, 1976), su campioni di pollo conservati per tempi prolungati (superiori a 5 giorni a 10°C), si assiste alla formazione di molecole che derivano dalla decomposizione lipidica e dal metabolismo della cisteina e metionina. A partire dalla metionina, mediante

deamminazione e demetilizzazione, si forma metantiolo che, se ossidato, si trasforma in dimetilsolfuro.

Gli enzimi che svolgono un ruolo importante nel catabolismo degli aminoacidi sono deaminasi, decarbossilasi e transaminasi. Per azione di quest'ultima si formano α -cheto-acidi, che possono essere decarbossilati ad aldeidi e in seguito deidrogenati ad alcoli e acidi carbossilici, molecole che contribuiscono all'aroma del prodotto. Nel caso di diretta deidrogenazione degli α -cheto-acidi, si formano idrossi-acidi che non contribuiscono al profilo aromatico del prodotto (Van Kranenburg *et al.*, 1989).

I fenomeni degradativi sono causati dal metabolismo dell'ampio gruppo delle *Enterobacteriaceae* per lo sviluppo di acetoino, diacetile e 3-metilbutanolo che conferiscono aroma di formaggio, burro o malto (Dainty, *et al.*, 1989).

CAPITOLO III

ANOMALIE DELLE CARNI DI POLLO

3.1 Introduzione

L'incremento dell'incidenza di anomalie delle carni di pollo – in particolare comparsa delle striature bianche (White Striping, WS) e petto legnoso (Wooden Breast, WB) (Ferreira, 2012;. Kuttappan *et al.*, 2012c; Petracci *et al.*, 2013b) – sta acquisendo particolare importanza per produttori di carne avicola di tutto il mondo, perché compromette l'aspetto visivo del prodotto e quindi la propensione all'acquisto delle confezioni vendute a servizio libero (Kuttappan *et al.*, 2012c) e una riduzione delle proprietà funzionali delle proteine nei prodotti trasformati (Mudallal *et al.*, 2014, 2015; Tijare *et al.*, 2015).

In termini istologici, WS e WB sono caratterizzate entrambe da degenerazioni delle fibre muscolari, necrosi, fibrosi e lipidosi (Sihvo *et al.*, 2014), tuttavia, al momento, manca uno studio istologico approfondito di comparazione diretta di queste due anomalie. L'anomalia WS è caratterizzata dalla presenza di striature bianche costituite dai depositi intramuscolari paralleli alla direzione delle fibre muscolari e riguardano diversi tagli quali muscoli pettorali e, coscia (Kuttappan *et al.*, 2013b). Al contrario, WB altera le caratteristiche tattili della carne e aumenta la durezza del petto di pollo (Sihvo *et al.*, 2014). Entrambe le anomalie possono presentarsi ad uno stadio di gravità moderato o severo, in maniera separata, ma spesso compaiono insieme sullo stesso filetto. Nei casi più gravi, le miopatie sono associate ad altre alterazioni come rigonfiamento superficiale nell'area caudale del filetto, presenza di liquido viscoso di colore chiaro e/o lesioni multifocali sulla superficie del filetto (Sihvo *et al.*, 2014).

La comparsa di queste miopatie è stato associato da diversi ricercatori all'incremento della velocità di crescita degli ibridi commerciali attualmente allevati per la produzione del pollo da carne. Dal 2009 è stato segnalato ed oggetto di diversi studi l'anomalia WS, mentre quella WB è stata segnalata in tempi relativamente più recenti (Bilgili *et al.*, 2014). Studi condotti da due

gruppi di ricerca indipendenti negli Stati Uniti e in Italia, hanno evidenziato un aumento dell'incidenza di WS allo stadio grave dall'1,4-8,7% nel 2012 (Kuttappan *et al.*, 2012;. Petracci *et al.*, 2013) al 32,3-68,9% nel 2015 (Tijare *et al.*, 2015; Kuttappan *et al.*, 2015), anche se i dati potrebbero essere stati influenzati da altri fattori di allevamento come gli stress ante-mortem, l'età, il sesso, l'alimentazione ecc.

Al momento le ragioni precise che portano al verificarsi di queste miopatie sono ancora oggetto di studio, ma sono state elaborate delle ipotesi plausibili. Diversi studi hanno evidenziato che l'incidenza maggiore di WS si presenta nei filetti dotati di peso più elevato (Kuttappan *et al.*, 2013c; 2012b) e più densi (Kuttappan *et al.*, 2013c) rispetto a quelli normali. In aggiunta, anche la somministrazione di diete ad alta energia e livello proteico (Kuttappan *et al.*, 2012b), l'età alla macellazione (Bauermeister *et al.*, 2009), il genere (Kuttappan *et al.*, 2013c) e il tipo genetico (Kuttappan *et al.*, 2013 c; Petracci *et al.*, 2013a) sono stati associati a una maggiore incidenza di WS. Un recente studio ha preso in considerazione l'analisi del RNA di carni affette da WB, ha ipotizzato che fattori associati alla crescita rapida dei polli da carne quali l'ipossia, lo stress ossidativo, elevati livelli di calcio intracellulare e tipo di fibra muscolare (Mutryn *et al.*, 2015), potrebbero essere coinvolti nell'induzione di queste miopatie.

3.2 Le miopatie e la moderna industria della carne avicola

Negli ultimi anni, il consumo di carne di pollame è aumentato in virtù delle sue proprietà nutrizionali, della versatilità in cucina e del costo competitivo rispetto alle carni rosse (Haley, 2001; Davis e Stewart, 2002). Per soddisfare l'aumento della domanda, l'industria avicola ha aumentato la produzione, riducendone i costi e i tempi. Ciò ha portato alla selezione di polli da carne (broiler) caratterizzati dal raggiungimento di elevato peso corporeo ad età molto precoce. Nel 1925, il peso medio di un broiler era di 1,1 kg e veniva raggiunto in 112 giorni; mentre nel 2010, il peso di 2,6 kg è conseguito in appena 47 giorni (Consiglio Nazionale del pollo, 2011b). A ciò ha seguito un aumento delle esigenze metaboliche associate alla rapida crescita del

pollame, con conseguente incremento del rischio d'insorgenza di malattie e conseguenti perdite economiche e riduzione del benessere animale (Julian, 2005).

La selezione ha permesso di conseguire l'aumento del peso corporeo, delle rese in tagli magri e dell'efficienza di conversione alimentare, tuttavia ha favorito un peggioramento della qualità della carne, in termini di consistenza e sapore (Anthony, 1998). Secondo Mahon (1999), la selezione ha favorito la comparsa e l'aumento dell'incidenza di miopatie soprattutto in relazione alla diminuzione del livello di capillarizzazione delle fibre muscolari. Diversi studi hanno messo in relazione l'aumento del tasso di crescita del pollame con la comparsa di diverse problematiche, quali la bassa densità capillare e unitamente a stress di tipo metabolico (Hoving-Bolink *et al.*, 2000; Macrae *et al.*, 2006), alterazione della regolazione cationica nelle cellule muscolari (Sandercock *et al.*, 2009), aumentano danni muscolari (Velleman e Nestor, 2003), incidenza di PSE (Wang *et al.*, 1999) e comparsa di miopatia focale (Wilson *et al.*, 1990). Nonostante la relazione tra elevato tasso di crescita e insorgenza delle miopatie sono ancora insufficientemente approfonditi, diversi studi hanno evidenziato una maggiore incidenza di WS nei broiler con elevata velocità di crescita.

Il petto di pollo è un prodotto molto consumato perché è una fonte economica di carne magra. Le miopatie ne alterano l'aspetto e, di conseguenza, provocano gravi perdite economiche, soprattutto laddove i consumatori al momento dell'acquisto, sono fortemente influenzati dall'aspetto della carne (es. nella vendita di petti di pollo freschi). I maggiori depositi di grasso percepiti nei petti di pollo affetti da WS rappresentano un fattore indesiderato per i consumatori che percepiscono la carne come "poco sana" dal punto di vista nutrizionale (Kuttappan *et al.*, 2012c). Infatti, il maggiore contenuto in grassi nei petti di pollo WS corrisponde ad una diminuzione percentuale di proteine (Kuttappan *et al.*, 2012b; 2013a; 2013b; Petracci *et al.*, 2014). Gli studi condotti su filetti con WB hanno riportato modifiche simili a quelle riscontrate nei petti WS (Soglia *et al.*, 2015). Tali variazioni determinano importanti riflessi nei prodotti carnei trasformati in

funzione soprattutto della diminuzione del tenore proteico. In particolare, i petti di pollo con WS e WB hanno maggiori perdite in cottura (cooking loss), inferiori livelli di assorbimento delle soluzioni di marinatura ed una minore tenerezza (Petracci *et al.*, 2013b; Tijare *et al.*, 2015; Mudalal *et al.*, 2015).

3.3 Confronto tra miopatie

Tra le diverse miopatie esistenti nell'industria avicola, molte presentano caratteristiche simili a WS e WB; distrofia muscolare ereditaria (Julian e Asmundson, 1963; McMurtry *et al.*, 1972; Julian, 1973), miopatia nutrizionale (Dam *et al.*, 1952; Machlin e Shalkop, 1956, Klasing, 2008), miopatia del muscolo pettorale profondo (Wight e Siller, 1980) e miopatia tossica (Chalmers, 1981; Dowling, 1992; Roder, 2011). Per quanto riguarda l'anomalia WS, la comparsa delle striature bianche può essere associata al deposito del grasso a livello intramuscolare (grasso di marezzatura) (USDA-FSIS, 2008).

3.3.1 Distrofia muscolare ereditaria

La distrofia muscolare ereditaria è una patologia riscontrata nei polli domestici con tratti simili alla distrofia muscolare umana (Julian e Asmundson, 1963), che origina da un gene omozigote autosomale recessivo (*am*); e la cui espressione fenotipica è funzione di vari geni modificati (Asmundson e Julian, 1956; Wilson *et al.*, 1988). Gli avicoli colpiti da questa patologia denotano un limitato sviluppo corporeo, arti con ossa corte che possono impedire agli animali di assumere la posizione eretta e possono causare la caduta sulla schiena (Wilson *et al.*, 1979). Negli individui con WS sono stati riscontrati elevati livelli di creatina chinasi sierici (Kuttappan *et al.*, 2013a), maggiore deposito lipidico intramuscolare sotto forma di striature bianche in direzione parallela rispetto a quella delle fibre muscolari (Kuttappan *et al.*, 2012b, 2013b; Petracci *et al.*, 2014), e ipertrofia del muscolo pettorale simile a quella riscontrata nella distrofia muscolare ereditaria (Asmundson e Julian, 1956; Julian e Asmundson, 1963).

In generale, gli avicoli affetti da distrofia muscolare ereditaria, rispetto ai polli normali, mostrano un più esteso sistema sarco-tubulare, livelli più elevati di catepsine muscolari e attività enzimatica mitocondriale, mentre i livelli di lattato deidrogenasi sono inferiori (Wilson *et al.*, 1979). Nei muscoli pettorali di uccelli geneticamente distrofici rispetto ai polli normali sono stati rilevati una diminuzione del contenuto in proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari (miosina e actina) (Barany *et al.* 1966). Inoltre, è stata osservata un'influenza negativa della distrofia sull'aspetto della carne (a causa delle striature bianche), ed una modificazione di tenerezza (Scholtyssek *et al.*, 1967; Peterson e Lilyblade, 1969), contenuto di grassi, e profilo degli acidi grassi (Jordan *et al.*, 1959; Jordan *et al.*, 1964; Chio *et al.*, 1972).

La maggior parte degli studi sulla distrofia muscolare avicola è stata condotta su polli di razza New Hampshire, mentre non è mai stata riscontrata negli ibridi commerciali. Al contrario, rispetto alla distrofia muscolare ereditaria, WS presenta una maggiore incidenza nei tipi genetici attualmente impiegati per la produzione del broiler (Bauermeister *et al.*, 2009; 2011; Kuttappan *et al.*, 2013 c; Petracci *et al.*, 2013a). Le percentuali elevate di WS allo stadio grave sono ricondotte al maggiore peso corporeo degli animali, piuttosto che a una predisposizione genetica. Infatti, un recente studio ha riportato l'esistenza di una forte componente non-genetica nella comparsa di WS e WB in tutti i muscoli del petto (Bailey *et al.*, 2015). Questi studi dimostrano una scarsa associazione fra distrofia muscolare ereditaria e miopatie di recente comparsa, ma non escludono affatto la possibile associazione del difetto genetico con la selezione per l'accrescimento rapido.

3.3.2 Miopatia nutrizionale

Le carenze di vitamina E o di minerali (selenio e zolfo) nella dieta degli avicoli possono compromettere l'integrità delle cellule e condurre a condizioni patologiche quali l'encefalomalacia, diatesi essudativa e miopatia nutrizionale nei pulcini, anatre e tacchini (Klasing, 2008).

La miopatia nutrizionale favorisce la comparsa di striature bianche nei muscoli del petto e nelle cosce; e le analisi istopatologiche rivelano

degenerazione delle fibre muscolari simili alle lesioni osservate in WS e WB (Kuttappan *et al.*, 2013b; Sihvo *et al.*, 2013) con segni di frammentazione, perdita di striature, moltiplicazione delle cellule del sarcolemma e aggregazione delle fibre in masse eosinofile (Dam *et al.*, 1952; Machlin e Shalkop, 1956).

Nonostante la similarità tra le lesioni di miopatia nutrizionale e quelle provocate dalle miopatie moderne, l'eziologia sembra tuttavia differente. Diversi studi hanno dimostrato come livelli adeguati di acetato di dl- α -tocoferolo (0,01%), l-cistina (0,24%) e dl-metionina (0,5%) nella razione alimentare (Dam *et al.*, 1952, Machlin e Shalkop, 1956) o livelli di 900-1025 mcg/100ml di tocoferolo totale nel plasma (Scott e Desai, 1964) possano prevenire quasi completamente l'incidenza di miopatia nutrizionale. Infatti, grazie all'impiego di adeguati livelli di vitamina E (>10 IU/kg di mangime, NRC 1994) nella dieta degli avicoli non sono state segnalate negli tempi decenni, miopatie di tipo nutrizionale. Recentemente, studi condotti da Kuttappan *et al.* (2012a; 2013a; 2013c) hanno dimostrato che l'impiego di livelli adeguati o superiori di vitamina E (dose di 400 IU di vitamina E/kg di mangime) non è in grado di impedire l'insorgenza di WB e WS. Tuttavia, le patologie associate alle carenze di vitamina E, come encefalomalacia e diatesi essudativa, non sono mai state segnalate in soggetti con WS e WB. Ciò sottolinea la scarsa probabilità di relazione tra una carenza di vitamina E e insorgenza di WS e WB. Tuttavia, sono necessari altri studi volti a stabilire l'adeguatezza dei livelli raccomandati di vitamina E per i ceppi genetici a rapida crescita; e studi riguardanti l'effetto del selenio e degli aminoacidi solforati, impiegati da soli o in combinazione con la vitamina E, sull'incidenza delle miopatie emergenti.

3.3.3 Miopatia del muscolo pettorale profondo

La miopatia del muscolo pettorale profondo (DPM), nota anche come miopatia dell'Oregon, è una patologia che colpisce il muscolo supracoracoide nei polli pesanti e tacchini con un'incidenza di 0-1,88% (media 0,06%) nei broiler (Kijowski e Konstanczak, 2009). La contrazione del muscolo

supracoracoideo consente un'espansione del tessuto muscolare fino al 20% del suo peso. Nei casi in cui lo spazio sia insufficiente per l'espansione del muscolo, avviene un'ischemia muscolare (Siller, 1985; Mitchell, 1999; Bilgili e Hess, 2002).

Si parla di stadio severo di DPM per miopatie rilevate dopo tre giorni dall'evento ischemico; il muscolo risulta di colore verde e dotato di consistenza più dura e fibrosa (detta "legnosa"). Nello stadio iniziale, rilevabile ad una distanza temporale inferiore ai tre giorni dall'evento ischemico, il muscolo presenta un colore rosa intenso. Secondo Wight e Siller (1980), tali lesioni sono la conseguenza di un edema acuto seguito da una necrosi di colore verde e dalla sostituzione nella regione caudale con del tessuto fibro-adiposo. Studi istopatologici delle lesioni verdi mostrano fibre muscolari necrotiche, prive di nucleo circondate da una capsula fibrosa esterna racchiusa, a sua volta, da una regione muscolare normale o da un tessuto fibro-adiposo rigenerato. Osservazioni delle lesioni necrotiche ischemiche al microscopio elettronico mostrano una perdita precoce di glicogeno e la disintegrazione del reticolo sarcoplasmatico, dei mitocondri, dei nuclei e delle linee Z. Siller (1985) ha suggerito che la consistenza legnosa dei livelli severi DPM potrebbe essere il risultato della selezione per migliorare la crescita muscolare, e ha ipotizzato che la selezione sulla base dei livelli di creatina chinasi plasma potrebbe ridurre l'incidenza.

Benché la DPM sia confinata al muscolo colpito e appaia chiaramente diversa dalle miopatie moderne, provoca alcune lesioni muscolari microscopiche simili a quelle causate da WS e WB (Wight e Siller, 1980) e, ciò suggerisce che l'ischemia può presentarsi associata alle miopatie emergenti. Infine, non è stato segnalato nessun rischio di natura microbiologica nei muscoli colpiti da DPM, pertanto questa carne, dopo un'adeguata rimozione delle zone danneggiate, è idonea al consumo umano.

3.3.4 Miopatie tossiche

Tra le miopatie tossiche, quella più frequentemente riscontrata negli avicoli è causata dall'impiego di ionofori. Gli ionofori sono molecole

organiche, spesso antibiotici, ad ampio spettro d'azione che aumentano la permeabilità della membrana cellulare e/o membrana mitocondriale ad alcuni ioni metallici, portando all'interno delle cellule gruppi polari in grado di legare cationi monovalenti (es. Na^+ e K^+).

Sono diversi i farmaci contenenti ionofori impiegati nell'industria avicola, e fra questi quello maggiormente studiato è il Monensin (dose d'impiego da 100 a 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$) la cui tossicità può causare lesioni miopatiche nei polli da carne, galline ovaiole e tacchini (Mitchell, 1999). I segni clinici d'intossicazione da ionoforo sono il rifiuto dell'assunzione di mangime, il rallentamento della crescita, la mancanza di coordinazione, diarrea color crema, la dispnea, debilitazione degli arti, rigidità e/o debolezza muscolare e decubito sternale. Dalle analisi condotte in fase *post mortem* non si evincono lesioni evidenti specifiche (Chalmers, 1981; VanderKop *et al.*, 1989), bensì si osservano vaste aree di muscoli scheletrici caratterizzate da lesioni miopatiche microscopiche (Chalmers, 1981). Le lesioni istopatologiche associate all'intossicazione da ionofori mostrano molta variabilità e di solito includono necrosi e frammentazione miofibrillare, masse eosinofili granulari di sarcoplasma interrotto e infiltrazione grassa intermiofibrillare (Dowling, 1992). Secondo Sandercock e Mitchell (1999), la selezione per l'accrescimento rapido e l'aumento delle rese in carne ha aumentato la suscettibilità nei confronti della miopatia indotta da Monensin.

Per la capacità degli ionofori di portare all'interno delle cellule gruppi polari in grado di legare cationi monovalenti, è stato ipotizzato che gli ionofori provochino uno squilibrio sodio-potassio e un aumento dell'ingresso di calcio. Quest'ultimo attraverso l'attivazione di vari enzimi, come la fosfolipasi intracellulare e le proteasi calcio-dipendenti, può danneggiare la struttura interna della fibra muscolare e la membrana plasmatica (Jackson *et al.*, 1984; Sandercock e Mitchell, 2003, 2004; Alderton e Steinhardt, 2000; Whitehead *et al.*, 2006). L'intossicazione da ionoforo può essere aggravata dalla sua interazione con altri farmaci come tiamulina, antibiotici macrolidi, cloramfenicolo, sulfamidici, ecc (Dowling, 1992; Roder, 2011).

Diverse specie avicole presentano lesioni dovute a intossicazione da gossipolo – presente nella farina di semi di cotone e anche in altre piante, tra le quali, la *Cassia occidentalis* (senna) – simili a quelle causate dall'intossicazione da ionoforo (Roder, 2011). Livelli elevati di gossipolo nelle diete (> 400mg/kg di mangime) possono ridurre l'assunzione di cibo e l'efficienza della crescita, provocando alterazioni nella milza, ingrossamento della cistifellea e danni al fegato (Silva *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2001). Inoltre, la presenza di *C. occidentalis* causa nei polli lesioni ai muscoli pettorali e degli arti simili a quelle provocati dall'intossicazione da ionofori (Mahon, 1999). Secondo Graziano *et al.* (1983) la somministrazione di *C. occidentalis* potrebbe provocare nell'animale perdita di peso, debolezza muscolare, lesioni istopatologiche degenerative dei muscoli scheletrici e cardiaco.

Alcune delle lesioni causate dalla miopatia tossica presentano somiglianze con le miopatie emergenti. Tuttavia, la mancanza dei tipici sintomi clinici dell'intossicazione da ionoforo come l'inappetenza, rallentamento della crescita e diarrea color crema (VanderKop *et al.*, 1989), implica un'improbabilità eziologica con la miopatia tossica.

3.3.5 Carni pallide, soffici ed essudative (PSE)

Con l'acronimo PSE s'intendono carni che presentano un colore pallido, una consistenza più soffice del normale ed una scarsa capacità di ritenzione idrica. La carne PSE è stata segnalata prima nella carne suina, e in seguito nei polli da carne (Van Laack *et al.*, 2000). Le cause possono essere di natura genetica e/o legate a fattori ambientali relativi allo stress in fase di pre-macellazione. L'anomalia si verifica nel periodo post-mortem in animali che *in vivo* hanno muscoli pettorali con alto potenziale glicolitico. La PSE è caratterizzata dal rapido declino del pH ($\text{pH}_u < 5,8$) in fase *post mortem*, quando la temperatura della carne è alta. La comparsa della PSE potrebbe essere dovuta a un eccessivo rilascio di ioni calcio nella fibra muscolare da parte del reticolo sarcoplasmatico a causa di recettori rianodinici difettosi. La presenza di ioni di calcio stimola, nei muscoli, l'attività di vari enzimi con

conseguente possibile denaturazione proteica (Jackson *et al.*, 1984; Alderton e Steinhardt, 2000; Sandercock e Mitchell, 2003, 2004; Whitehead *et al.*, 2006).

I petti PSE oltre a mostrare un pH più basso, ridotta capacità di ritenzione idrica e in alcuni casi minore sforzo di taglio, presentano un colore decisamente più chiaro (più alto valore L*), valori superiori di indice di frammentazione miofibrillare (MFI) e perdite di liquido in fase di cottura. Inoltre, secondo gli stessi autori, la carne PSE mostra, al microscopio elettronico, lesioni come contrazione e depolimerizzazione dei filamenti e disorganizzazione delle linee Z. Lo studio condotto da Garcia *et al.*(2010) ha mostrato che per i consumatori non ci sono differenze significative in termini di tenerezza e sapore tra carne normale e PSE. Tuttavia, nella carne PSE, la ridotta capacità di ritenzione idrica e l'aspetto anomalo causato dal colore pallido possono causare perdite economiche per le aziende produttrici. Si stima che dal 5 fino al 40% della carne nell'industria avicola presenti caratteristiche simili alla PSE e una perdita economica. Gli studi condotti da Petracci *et al.*(2015) suggeriscono che, nonostante WS e WB non presentino nessuna relazione diretta con i cambiamenti indotti da PSE, l'accumulo di ioni calcio potrebbe avere un ruolo importante nello sviluppo di lesioni associate alle miopatie emergenti in analogia con la PSE.

3.3.6 Comparazione tra accumulo di lipidi intramuscolare e WS

L'accumulo lipidico intramuscolare visibile nella carne cruda sotto forma di macchie bianche è definito “marezzatura” della carne. Questo fenomeno è influenzato da molti fattori: specie; razza; sesso; età; tasso di crescita; taglio e il livello di nutrizione (Hocquette *et al.*, 2010). In generale, la deposizione di grasso intramuscolare è inversamente proporzionale alla massa muscolare (Hocquette *et al.*, 2010). Tuttavia, la marezzatura essendo in grado di esaltare il sapore e la succosità della carne è considerata come una caratteristica positiva per la classificazione di carni ovine e bovine (USDA-FSIS, 2008). La carne di pollame è considerata dai consumatori la carne più magra sul mercato (Davis e Stewart, 2002), perché la maggior parte del grasso

è depositata a livello sottocutaneo o addominale, mentre è scarsa la presenza di grasso intramuscolare (Sams e Alvarado, 2010).

Nelle carni con WS, l'aumento di grasso intramuscolare potrebbe essere percepito presenza di grasso di marezzatura. In realtà, la marezzatura è principalmente associata a un aumentato deposito di grasso nello strato perimisiale dei muscoli dotati prevalentemente di fibre rosse (Moody e Cassens, 1968; Judge *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 1999; Hocquette *et al.*, 2010); mentre nel WS, la deposizione di lipidi sembra dovuta alla sostituzione delle fibre muscolari danneggiate, e avviene principalmente nei muscoli a fibre bianche (Kuttappan *et al.*, 2013b). Confrontando ulteriormente la marezzatura con l'anomalia WS, si evince che essa è fortemente in relazione alla razza nelle specie ovina, suina e bovina (Crouse *et al.*, 1989; Albrecht *et al.*, 2006). Viceversa, WS non mostra alcuna relazione con il tipo genetico (Kuttappan *et al.* 2013c; Petracci *et al.*, 2013a), ma è segnalata principalmente nei broiler pesanti o nei soggetti dotati di petti con pesi maggiori nell'ambito dello stesso lotto di produzione (Kuttappan *et al.*, 2013c; Bauermeister *et al.*, 2011). Alla luce di queste osservazioni, i ricercatori ritengono che WS nei polli e la marezzatura delle carni rosse siano due condizioni diverse; ciononostante l'assenza di conoscenze approfondite sui meccanismi che regolano la marezzatura e la comparsa della WS ne rende difficile la comparazione.

3.4 Miopatie emergenti: possibili scenari futuri

La principale problematica riguardante WS e WB è l'assenza di uno strumento in grado di prevedere la comparsa di queste miopatie negli animali *in vivo*; anche se recentemente Mutryn *et al.*, (2015), mediante sequenziamento del RNA su avicoli con WB, ha identificato un gene che potrebbe essere associato a questa miopatia. È quindi auspicabile che altri studi "omici" condotti su soggetti a diverso stadio di sviluppo potrebbero permetterebbe di differenziarne l'origine e, di conseguenza, utili a individuare biomarcatori specifici. Ciò sarebbe un notevole progresso, poiché permetterebbe di identificare la presenza delle miopatie negli animali *in vivo* e

di valutare con precisione l'effetto degli ingredienti impiegati nella dieta , delle condizioni ambientali e di gestione e dell'influenza delle diverse genetiche.

Un'altra problematica da affrontare per il mondo della ricerca è la mancanza di criteri di classificazione oggettivi e condivisi per WS e WB. Nel caso di WS, la classificazione proposta da Kuttappan *et al.* (2012c) è stata ampiamente adottata in diversi studi. Tuttavia, questo metodo può essere soggetto a interferenze dovute ai fattori ambientali del luogo di campionamento (temperatura, umidità, sorgente luminosa, intensità della luce, tempo *post mortem*, temperatura dei campioni e umidità della superficie). È importante almeno porsi in condizioni omogenee nell'ambito dello stesso studio: per esempio impiegare uno sfondo bianco e le stesse persone adatte alla classificazione, al fine di ottenere risultati comparabili.

Tecniche oggettive di classificazione basate sull'analisi delle immagini risolverebbe la questione relativa al campionamento (Kuttappan *et al.*, 2012c). I criteri di classificazione per WB, rispetto a quelli per WS, sono ancora di più difficile definizione e standardizzazione dal momento che attualmente si adottano metodi di tipo tattile. Tiare *et al.* (2015) hanno descritto dei metodi di palpazione manuale basati sul livello di durezza in funzione della posizione (craniale vs, intero filetto). Con questo sistema, l'ideale sarebbe usare una o due persone per la classificazione in modo da mantenere una maggiore coerenza tra i punteggi. Dal punto di vista strumentale, è stato proposto l'impiego di un metodo basato sull'analisi della texture e in particolare della forza di compressione (Mudalal *et al.*; 2015).

CAPITOLO IV

SPERIMENTAZIONE

4.1 Argomento e scopo dello studio

In Europa la domanda da parte dei consumatori di prodotti preconfezionati a base di carne marinata, sotto forma di prodotti trasformati ready-to-cook con elevati livelli di convenience (Barbut *et al.*, 2008), è in continua crescita. I fattori che ne hanno favorito la commercializzazione sono: le caratteristiche nutrizionali; versatilità d'impiego; possibilità di prolungare la *shelf-life*; caratteristiche qualitative simili a quelle del prodotto fresco; facilità di stoccaggio e di esposizione dei prodotti nelle aree/isole refrigerate dei punti vendita (Dawson, 2010).

Una delle tecniche che permette di migliorarne le caratteristiche organolettiche (tenerezza, succulenza e aroma) e aumentare le rese di lavorazione è la marinatura della carne. Con questo termine si intende un processo in cui una soluzione, in genere, a base di acqua e aromi viene incorporata nella carne mediante immersione, zangolatura, massaggio o iniezione. Le soluzioni di marinatura comunemente impiegate a livello commerciale, di solito, comprendono acqua, sale, polifosfati, aromi e altri ingredienti. La marinatura, dunque, è una tecnologia di conversione dei muscoli in carne significativa e impiegata nel settore avicolo da diversi decenni (Xiong, 2004; Zheng *et al.*, 1999).

Le prestazioni di marinatura sono generalmente valutate attraverso l'assorbimento e la ritenzione della soluzione di marinatura (Detienne *et al.*, 2000; Samuel e Trabelsi, 2012), resa in cottura capacità di ritenzione idrica (WHC) (Smith, 1999), tenerezza (Alvarado *et al.*, 2003), colore della carne (Alvarado *et al.*, 2007) e la shelf life (Carlos e Harrison, 1999). Tra i vari metodi di marinatura, quello per iniezione della soluzione mediante aghi o siringhe è il metodo maggiormente impiegato per i pezzi di carne di grosse dimensioni perché permette dosaggi precisi degli ingredienti e standardizzazione dei prodotti. La marinatura della carne avicola avviene, generalmente, per iniezione o zangolatura. Queste operazioni permettono di

aumentare la resa della carne cruda, facilitano la penetrazione e distribuzione omogenea della soluzione di marinatura, nonché l'ottimizzazione dell'estrazione proteica nei prodotti interi o in pezzi. Inoltre, l'idrolisi dell'actomiosina in actina e miosina che avviene durante la zangolatura o massaggio favoriscono la coesione tra i vari pezzi di carne nel corso del successivo trattamento termico (Alvarado & McKee, 2007). L'iniezione di differenti ingredienti non carnei (principalmente sale e fosfati) permette alle industrie produttrici di sviluppare una vasta gamma di prodotti (Smith, 1999). Inoltre, è stato dimostrato che questi ingredienti aumentano la resa in carne e la WHC, migliorano il colore e la consistenza (Smith, 1999, 2001; Alvarado e McKee, 2007), influenzano le proprietà funzionali delle proteine della carne (Smith, 1999). Sebbene l'impiego di fosfati nelle soluzioni di marinatura sia diffuso in ragione della sua capacità di migliorare gli attributi di qualità e appetibilità dei prodotti; il suo impiego è limitato per soddisfare il crescente numero di consumatori che desiderano un ridotto apporto di sodio nella dieta (Detienne et al, 2000;. Desmond, 2006) e l'impiego di ingredienti naturali.

Nel mercato italiano i prodotti carnei marinati, come i petti di pollo marinati confezionati in sottovuoto e commercializzati a temperature di refrigerazione, sono relativamente nuovi e si stanno diffondendo in riferimento alla sempre maggiore richiesta del consumatore di un ampliamento della gamma di prodotti dotati di elevati livelli di convenienza.

Lo studio ha lo scopo di valutare l'influenza della marinatura su alcuni aspetti microbiologici e chimico-fisici correlati alla qualità della carne di petto di pollo confezionata sottovuoto durante un periodo di stoccaggio di 14 giorni in condizioni refrigerate.

4.2 Materiali e metodi

Per la prova, sono stati utilizzati 30 campioni di petto di pollo (*Pectoralis major*) affetti da anomalia white-stripping (WS) appartenenti ad animali dello stesso lotto di produzione macellati presso uno stabilimento di macellazione industriale.

Durante il trasporto, dallo stabilimento ai laboratori del Campus di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna (Cesena), i petti di polli sono stati confezionati in atmosfera ordinaria. All'arrivo in laboratorio, i campioni sono stati privati di eventuali depositi di grasso superficiali e di tessuto connettivo, dopodiché sono stati suddivisi in due gruppi:

- Petti di pollo (muscoli *Pectoralis major* interi) non marinati (gruppo NM n. tot. = 15).
- Petti di pollo (muscoli *Pectoralis major* interi) marinati (gruppo M n. tot. = 15): petti sottoposti a marinatura

Il gruppo M è stato sottoposto a marinatura mediante una zangola di capacità massima di 10 kg di carne (modello MGH-20, Vakona Qualitat, Lienen, Germania) in condizioni di vuoto (-0,95 bar) e di temperatura pari a 2-4°C utilizzando una soluzione al 15-20% calcolata sulla base del peso della carne contenente bicarbonato di potassio, bicarbonato di sodio, lattato di potassio, sale e aromi. La durata della zangolatura è stata di 46 minuti (tre cicli di lavoro da 13 minuti ciascuno e due cicli di pausa di 3 minuti ciascuno) adottando una velocità di rotazione pari a 20 rpm (Figura 4.2).



Figura 4.2 Zangola impiegata per il processo di marinatura dei campioni di carne (modello MGH-20, Vakona Qualitat, Lienen, Germania).

In seguito, tutti i campioni (NM e M) sono stati pesati individualmente e confezionati sottovuoto all'interno di sacchetti di materiale plastico in condizioni di refrigerazione ($4\pm 1^\circ\text{C}$) fino al momento dell'analisi dopo 0, 3, 7, 10 e 14 giorni di stoccaggio.

In corrispondenza di ciascun tempo di conservazione, 3 campioni per trattamento sono stati rimossi dalla confezione ed utilizzati per la determinazione del colore, pH e perdite di sgocciolamento. Dopodiché, è stato prelevato un campione destinato alle analisi microbiologiche (conta dei mesofili e psicrotrofi totali) ed un altro per la determinazione delle perdite di cottura e le analisi chimiche previa omogeneizzazione (umidità, ossidazione lipidica e solubilità proteica). La parte rimanente è stata sottoposta a cottura per la determinazione delle relative perdite di liquido e del pH.

4.2.1 Colore

Il colore dei campioni è stato determinato mediante colorimetro Minolta CR-400, mediante i parametri di luminosità (L^*), indice di rosso (a^*) e indice di giallo (b^*) effettuando la misura sulla superficie esterna del muscolo pettorale superficiale (CIE, 1976).

Per ciascun muscolo, sono state effettuate 6 repliche: 3 misurazioni sulla sezione destra e altrettante sulla sezione sinistra.

4.2.2 pH

Per la misurazione del pH sia sui campioni crudi che cotti, è stata impiegata la metodica in fase dispersa (Jeacocke, 1977): circa 2,5 g di carne sminuzzata sono stati omogeneizzati per 30 secondi attraverso Ultraturrax in 25 mL di una soluzione, precedentemente equilibrata a pH 7, di 5mM di iodoacetato e 150 mM di KCl. Per ciascun campione sono state effettuate 3 repliche. In seguito, il pH dei campioni omogeneizzati è stato determinato con l'impiego di un pH-metro (mod Jenway 3510; Elettrodo 924001), previamente tarato con soluzioni tampone a pH 4,00 e 7,00.

4.2.3 Perdite di liquido per sgocciolamento (drip loss)

Le perdite per sgocciolamento sono state determinate al momento dell'apertura delle confezioni. I campioni sono stati asciugati con carta assorbente e pesati. Il quantitativo di liquido perso per sgocciolamento è stato calcolato secondo la formula:

Drip loss (%) = [(peso del campione prima del confezionamento-peso del campione dopo la fase di conservazione)/peso del campione crudo]x100.

4.2.4 Analisi microbiologiche

La qualità microbiologica è stata valutata monitorando la crescita dei batteri mesofili e psicrotrofi. Campioni di circa 10g sono stati trasferiti in un sacchetto di plastica sterile contenente 90mL di soluzione fisiologica sterile (0,9% w/v) e omogeneizzati per 2 minuti mediante un omogeneizzatore Stomacher (Lab. Blander Seward, PBI International, UK). Da aliquote di 1 mL sono state preparate diluizioni seriali decimali. Successivamente, da ciascuna diluizione sono stati inoculati 0,1 mL su piastre agar con terreno PCA e incubate, rispettivamente, per 48 ore a 30°C e 10 giorni a 4°C. Al termine dei tempi d'incubazione sono state contate le cellule vitali totali di batteri mesofili e psicrotrofi. I risultati sono stati espressi come log di CFU.

La composizione per 1 litro di terreno PCA (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire England) è stata la seguente: 5g di peptone universale; 2,5g di estratto di lievito; 1g di glucosio e 18 g di agar.

4.2.5 Umidità

La determinazione del contenuto di umidità dei campioni è stata condotta ponendo campioni di carne finemente sminuzzata, ciascuno del peso di 5 g circa, in stufa a temperatura di 105°C per 16 ore. Il contenuto di umidità è stato espresso in percentuale come la differenza di peso tra il campione fresco e dopo essiccamento (AOAC, 1990).

4.2.6 Perdite di liquido per cottura (cooking loss)

Per la determinazione della perdita di liquido dopo cottura, i petti di pollo crudi sono stati pesati e confezionati singolarmente in sacchetti di materiale plastico ad alta barriera e termoresistente. Ciascuna confezione è stata sigillata in sottovuoto (99,9%).

La cottura dei campioni è avvenuta in acqua a 90°C per 15 minuti. Successivamente, i campioni sono stati riportati a temperatura ambiente in

acqua fredda. In seguito, i campioni sono stati pesati nuovamente, previa rimozione dai sacchetti e asciugatura mediante carte assorbente. Le perdite di liquido durante la cottura sono state calcolate secondo la seguente formula:

Cooking loss (%) = [(peso del campione crudo-peso del campione dopo cottura)/peso del campione crudo]x100.

4.2.7 Ossidazione lipidica

L'ossidazione lipidica è stata determinata mediante il test dell'acido tiobarbiturico (TBARS) secondo la metodica descritta da Buege e Aust (1978). Campioni del peso circa 2,0 g di carne finemente sminuzzata, sono stati ulteriormente omogeneizzati in 10 mL di una soluzione contenente 3,29 mM di acido tiobarbiturico , acido tricloroacetico 15% (w/v) e 0,25 M di HCl. La miscela campione-soluzione è stata riscaldata in un bagno d'acqua calda a 90°C per 10 minuti, al fine di favorire il cambiamento di colore della soluzione. Al termine del riscaldamento, i campioni sono stati raffreddati fino a temperatura ambiente in acqua fredda; dopodiché, sono stati centrifugati a 3,600g per 15 minuti a 25°C. Per la rilevazione dell'assorbanza a 532 nm è stata preparata una curva standard con 1,1,3,3-tetraetossipropene (TEP) in concentrazioni variabili da 0 a 5mg/ml. Il valore TBARS è stato espresso come:

TBARS= malanaldeide (MDA) in mg/ peso del campione in kg

4.2.8 Solubilità proteica

La solubilità proteica è stata determinata in base alle differenze di estraibilità delle proteine in soluzioni con diversa forza ionica (Warner *et al.*, 1997).

Per la solubilità delle proteine sarcoplasmatiche, campioni di circa 1 g, omogeneizzati in 10 mL di una soluzione fredda 25 mM di fosfato di potassio, previamente equilibrata a pH=7,2. Ciascuna operazione di omogeneizzazione è stata condotta immergendo i campioni in una camicia esterna di ghiaccio al fine di inibire la denaturazione proteica indotta dall'energia meccanica. Successivamente, i campioni omogeneizzati sono stati tenuti in condizioni di

refrigerazione ($4\pm 1^\circ\text{C}$) per 20 ore, dopodiché sono stati centrifugati a 2,600g per 30 minuti a 2°C . Una volta separato il surnatante, la concentrazione proteica è stata misurata mediante il metodo Bradford (Bradford, 1976), usando il siero albumina bovino come standard e misurando l'assorbanza a 595 nm.

La solubilità delle proteine totali è stata determinata, in modo simile, omogeneizzando campioni di circa 1g in una soluzione di 1,1 M di potassio iodato e 0,1 M fosfato di potassio (pH= 7,2). Anche in questo caso, ciascuna operazione di omogeneizzazione è stata condotta con l'ausilio del ghiaccio. Al termine della fase di refrigerazione ($4\pm 1^\circ\text{C}$ per 20 ore), i campioni sono stati centrifugati a 2,600g per 30 minuti a 2°C .

Infine, la solubilità delle proteine miofibrillari è stata calcolata per differenza di solubilità fra le proteine totali e sarcoplasmatiche.

4.3 Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad ANOVA a due vie considerando come effetti principali la marinatura (NM e M) e il tempo di conservazione (0, 3, 7, 10 e 14 d) e la relativa interazione. La differenza fra le medie è stata saggiata mediante il test di confronto multiplo Tukey.

Prima di eseguire l'Analisi della Varianza, tutti i valori espressi in termini percentuali, nonché i dati caratterizzati da una distribuzione non "normale" e da eteroschedasticità, sono stati opportunamente trasformati.

4.4 Risultati e discussione

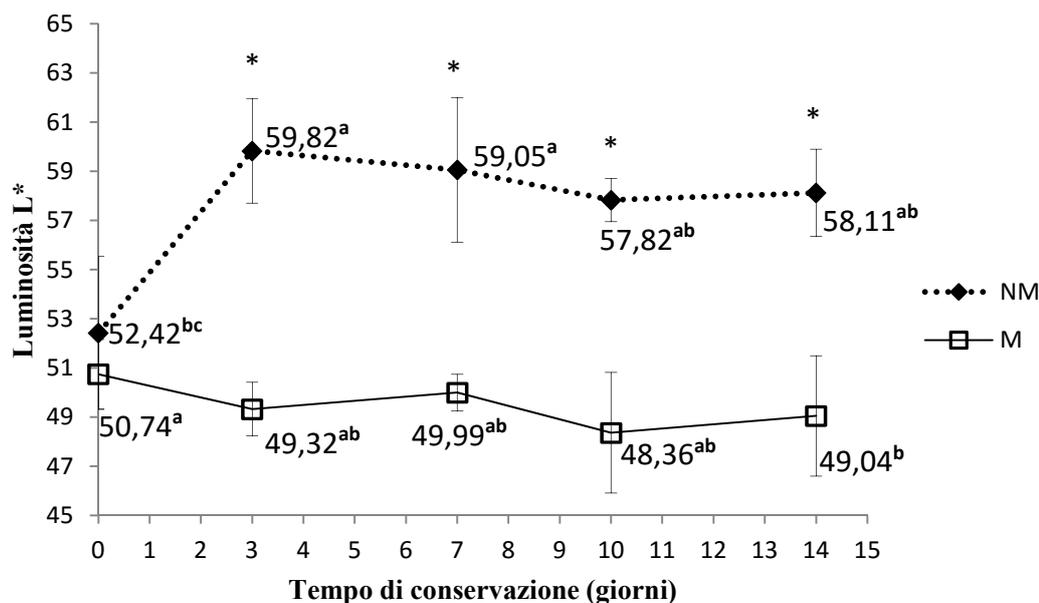
4.4.1 Colore

Il colore è un parametro fisico che dipende da diversi fattori, fra i quali la concentrazione dei pigmenti presenti nella carne (principalmente mioglobina), il loro stato chimico (equilibrio ossido-riduttivo) e la modalità di discesa del pH nella fase *post-mortem*.

In accordo con altri studi (Alvarado *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2005; Petracci *et al.*, 2012), i campioni M presentano un colore più scuro e una inferiore intensità di giallo (minori valori di L^* e b^*) rispetto ai NM (figure 4.3-4.5). L'indice di rosso (a^* , figura 4.4) non ha presentazioni al contrario variazioni significative sia fra i gruppi N e NM che nel corso della conservazione.

Per quanto riguarda la luminosità, ad eccezione dei valori riscontrati al tempo 0, risulta ben evidente il trattamento di marinatura determina un inscurimento dei campioni M (figura 4.3). Per entrambi i gruppi, il colore non ha subito variazioni e conferma che il confezionamento sottovuoto è in grado di preservare la stabilità dei pigmenti della carne al contrario di quanto avviene nei prodotti confezionati in atmosfera ordinaria o protettiva. L'indice di giallo (b^*) ha presentato un andamento analogo (figura 4.5) e ciò corrobora quanto osservato in precedenti studi nei quali è stata registrata una correlazione positiva fra i parametri L^* e b^* nelle carni di pollo (Petracci *et al.*, 2004).

L'effetto di inscurimento della marinatura con soluzioni contenenti cloruro di sodio e bicarbonato conferma quanto riscontrato da Sen *et al.* (2005) e Petracci *et al.* (2012). Tale effetto è presumibilmente dovuto all'aumento di pH conseguente all'impiego del bicarbonato così come osservato anche nel presente lavoro di tesi (figura 4.6). Infatti, carni dotate di pH elevati appaiono più scure perché la sua struttura favorisce la penetrazione della luce e quindi un maggiore assorbimento della radiazione luminosa da parte della mioglobina. Al contrario, carne che presentano pH più acidi tendono a disperdere maggiormente la luce impedendo la penetrazione negli strati più profondi e quindi il colore risulta più chiaro (Swatland, 2008).



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti (P<0,05)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) (P < 0,05).

Figura 4.3 Andamento della luminosità (L*) nei petti di pollo marinati (M) e non marinati (NM)

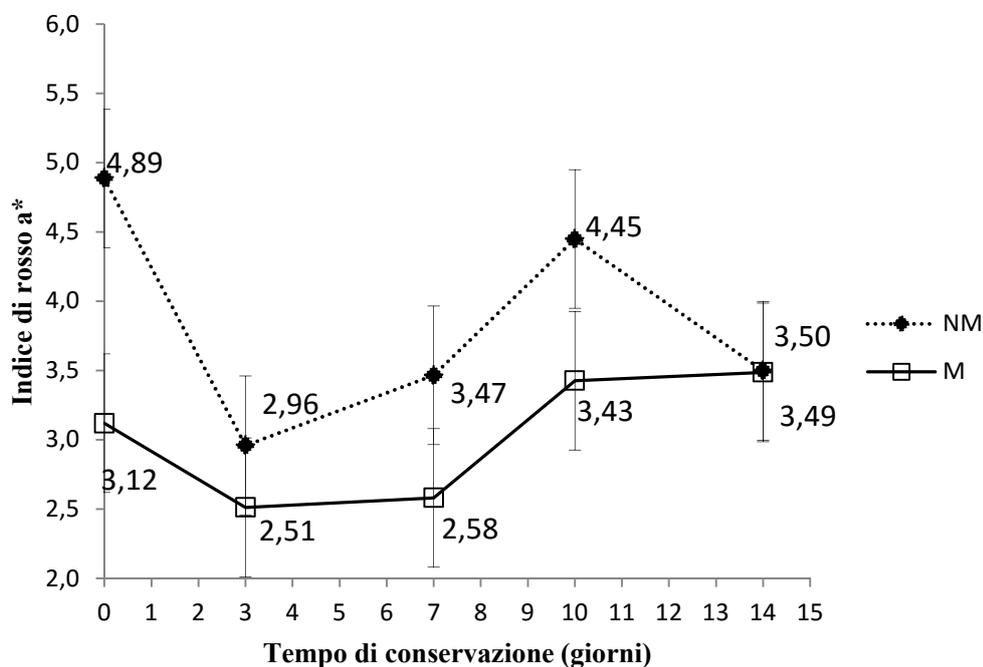
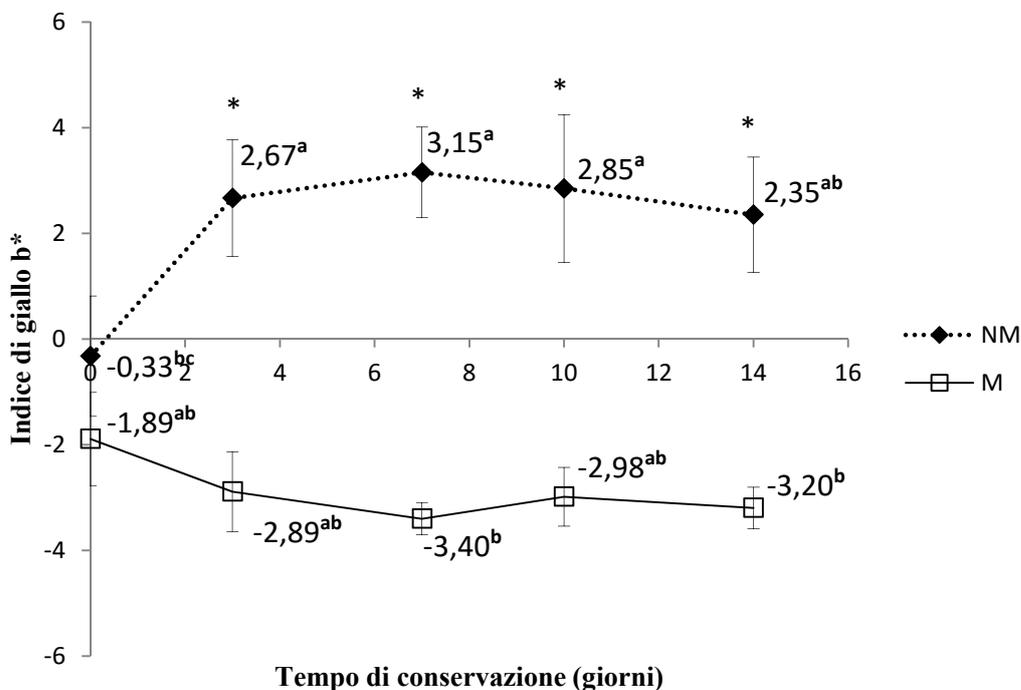


Figura 4.4 Andamento dell'indice di rosso (a*) nei petti di pollo marinati (M) e non marinati (NM)



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

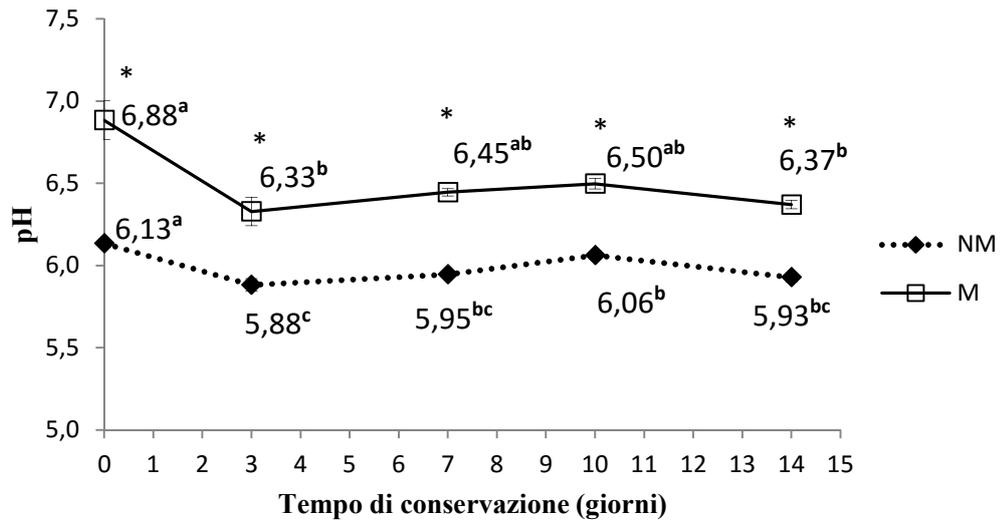
Figura 4.5 Andamento dell'indice di giallo (b^*) nei petti di pollo marinati (M) e non marinati (NM)

4.4.2 pH

In generale, a valori di pH superiori a 6 corrisponde un'elevata capacità della carne di trattenere l'acqua. Tuttavia, bassi valori di pH (inferiori 5,8-6,0) garantiscono maggiore stabilità microbiologica e inibiscono la crescita dei microrganismi degradatori (Allen *et al.*, 1996).

Nelle figure 4.6 e 4.7 sono riportati, rispettivamente, gli andamenti del pH dei campioni prima e dopo la cottura. Come atteso, i valori di pH per il gruppo M risultano notevolmente superiori rispetto a quelli del gruppo NM sia nelle carni fresche che dopo cottura. In particolare, nelle carni fresche la differenza è stata di circa 0,4-0,5 unità di pH e si è ridotta a 0,2-0,3 nei campioni cotti. Questi risultati sono in accordo con precedenti studi (Sen *et al.*, 2005; Petracci *et al.*, 2012, 2014), e sono dovuti al ben noto effetto alcalinizzante del bicarbonato.

Prima della cottura

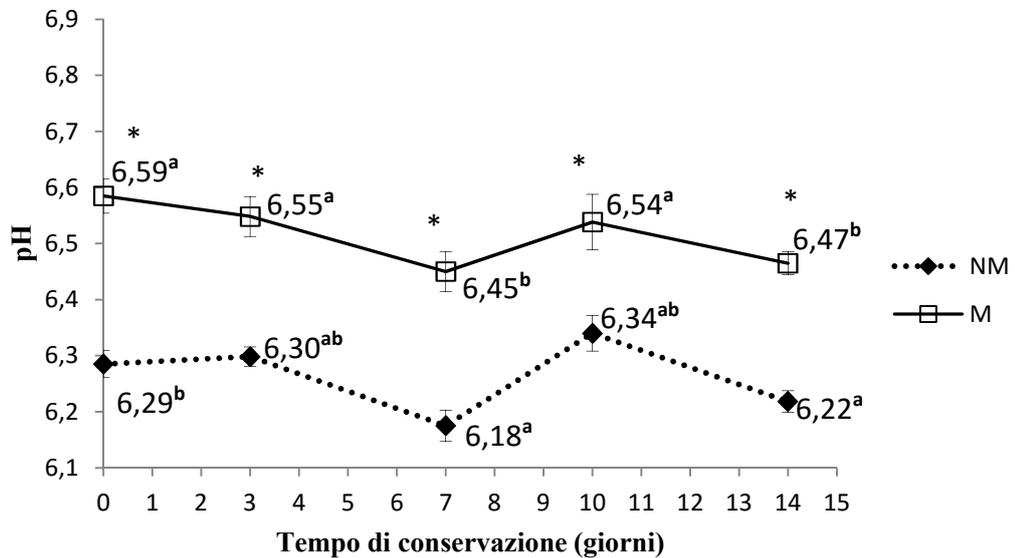


*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.6 Andamento del pH prima della cottura nei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

Dopo la cottura



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

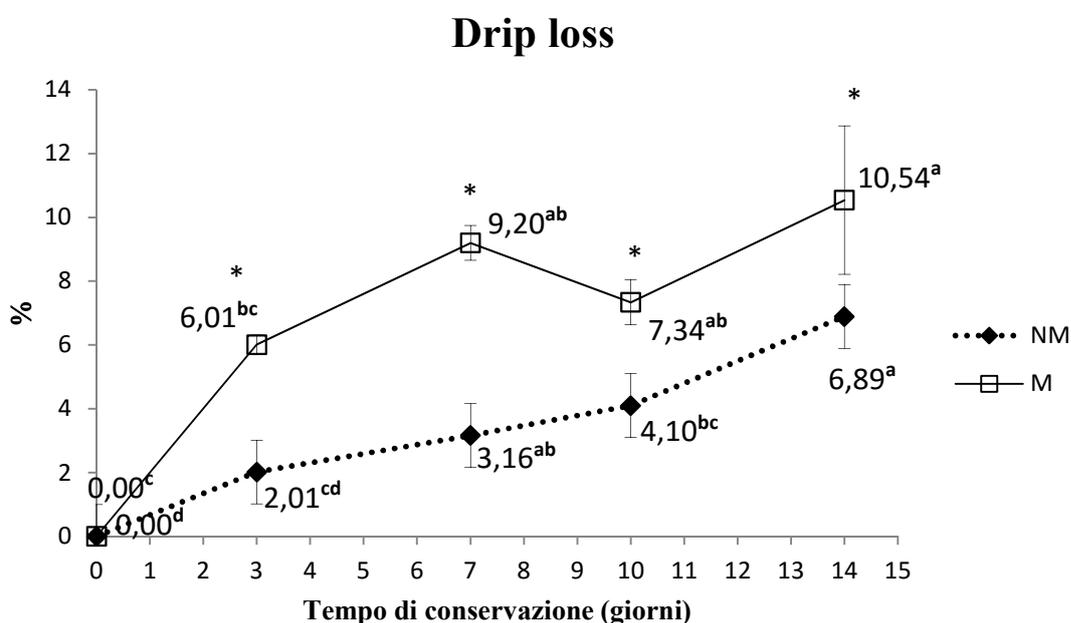
^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.7 Andamento del pH dopo cottura nei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

4.4.3 Perdite di liquido per sgocciolamento (drip loss)

Le perdite di liquido per sgocciolamento, riportate nella figura 4.8, risultano superiori nei campioni del gruppo M. Le differenze sono più marcate nell'intervallo di tempo tra il 3° e 7° giorno, mentre risultano più limitate successivamente. Tali differenze sono dovute al fatto che i campioni marinati tendono a cedere parte del liquido aggiunto, mentre nei campioni non marinati la cessione di liquidi è limitata all'acqua di costituzione.

(drip loss) nei campioni marinati (M) e non marinati (NM)



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.8 Andamento delle perdite di liquido per sgocciolamento

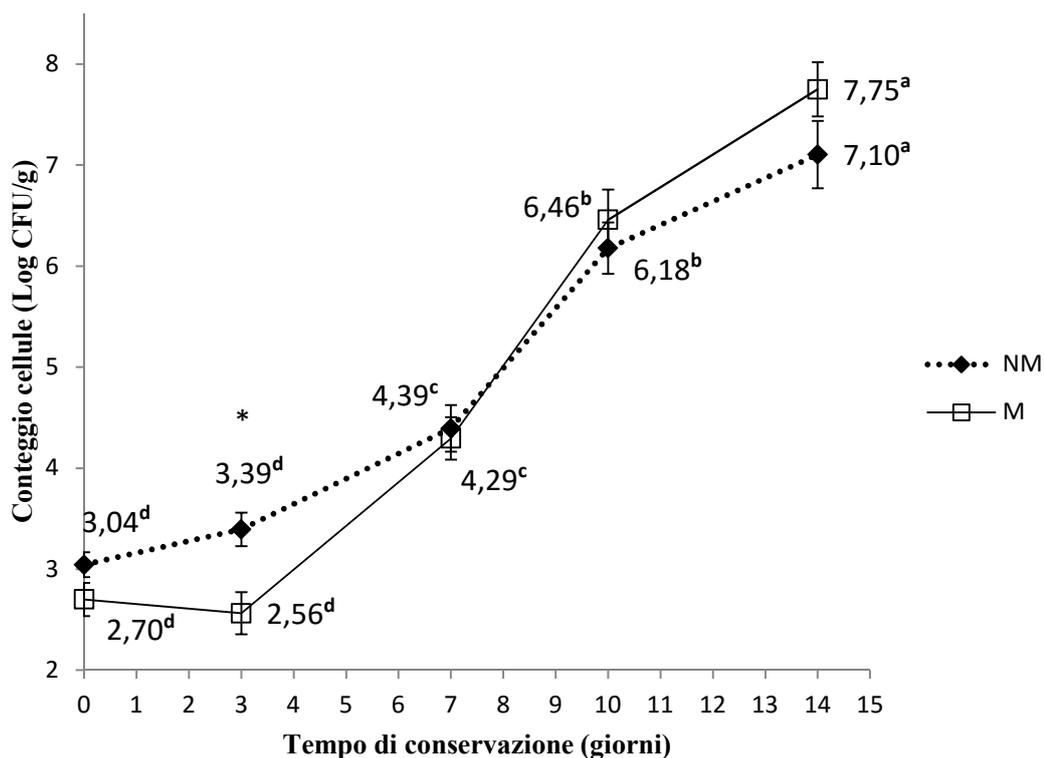
4.4.4 Analisi microbiologiche

Gli andamenti dei batteri mesofili totali (figura 4.9) non differiscono in maniera apprezzabile tra il gruppo M e NM. Dal grafico, si evince infatti che, per entrambi i gruppi, la crescita ha presentato andamenti analoghi lungo il periodo di conservazione considerato.

Anche le variazioni per i batteri psicotrofi totali sono piuttosto limitate tra i due gruppi (figura 4.10).

Pertanto, nonostante i valori di pH superiori dei campioni marinati potessero fare presupporre una shelf-life microbica inferiore, tale ipotesi non è stata confermata dai rilievi microbiologici. Probabilmente, gli altri componenti della soluzione di marinatura hanno compensato l'effetto negativo dell'aumento di pH.

Batteri mesofili totali

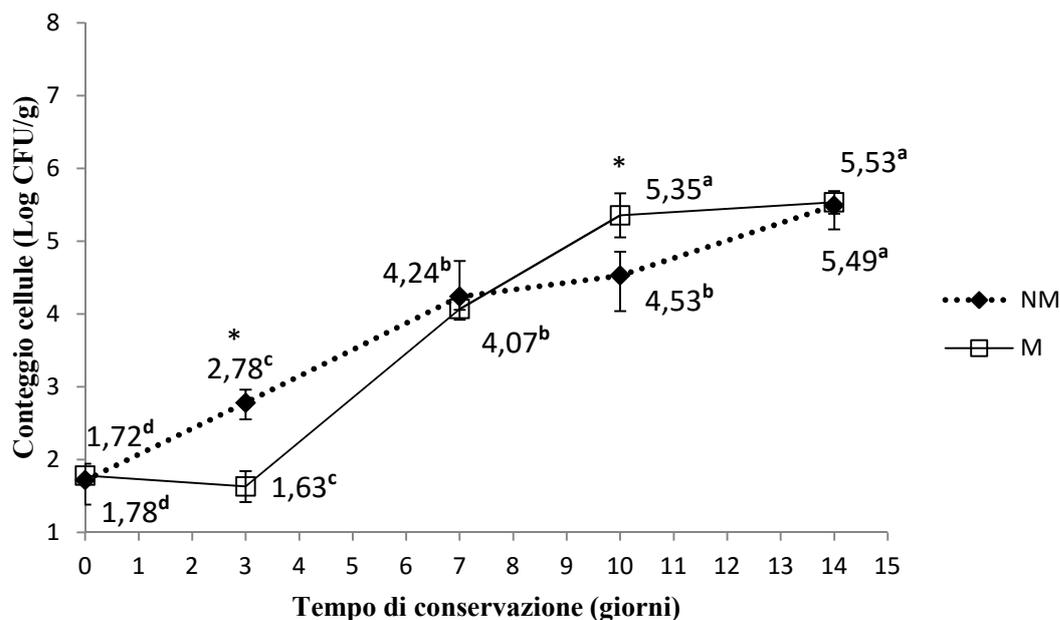


*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.9 Andamento dei batteri mesofili totali nei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

Batteri psicrotrofi totali



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

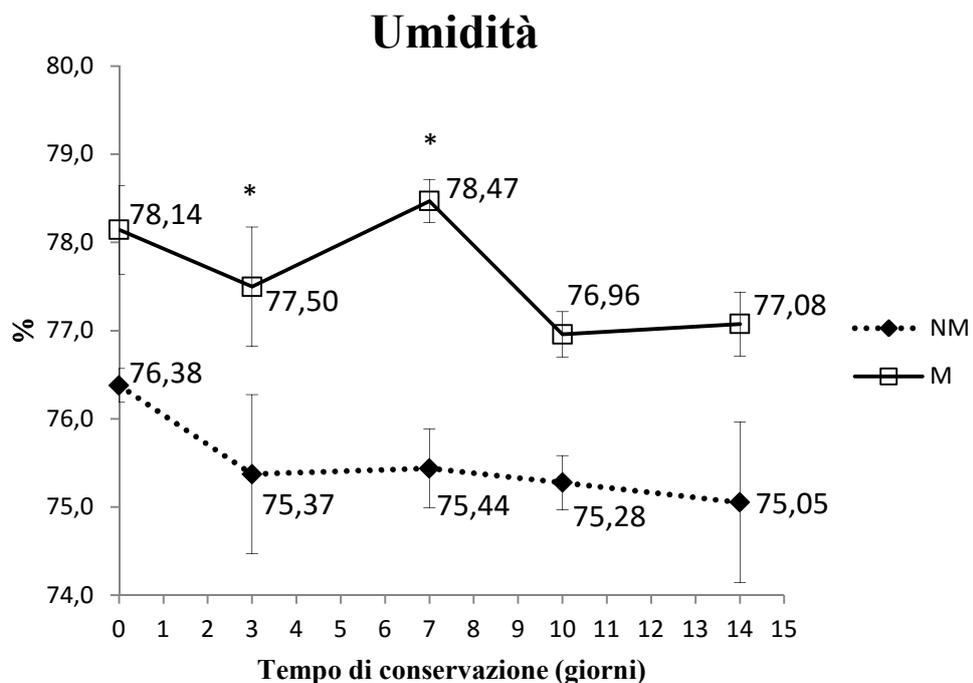
^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.10 Andamento dei batteri psicrotrofi totali nei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

4.4.5 Umidità

In figura 4.11 è mostrato l'andamento del tenore di umidità. Tali andamenti sono decrescenti, eccezion fatta per il campione marinato al tempo 7. Il gruppo M ha evidenziati valori di umidità nel complesso superiori di circa il 2%, tuttavia le differenze sono risultate significative solo in corrispondenza del 3° e del 7° giorno di conservazione. Tale risultato ovviamente è dovuto all'aggiunta di liquido durante la fase di zangolatura.

Sia nei campioni M che NM, il tenore di umidità risulta piuttosto costante durante la conservazione dopo il 3° giorno di conservazione nonostante le perdite di liquido per sgocciolamento siano risultate più abbondanti dopo il 7° giorno di conservazione come discusso in precedenza (figura 4.8).



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

Figura 4.11 Tenore di umidità dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

4.4.6 Perdite di liquido per cottura (cooking loss)

Le perdite di liquido durante cottura possono dipendere da diversi fattori (pH, composizione, proteolisi ecc.). Dai risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, non sono emerse differenze significative né per l'effetto del trattamento e né per quello del tempo di conservazione (figura 4.12).

Ciò è particolarmente interessante soprattutto per quanto riguarda l'effetto del trattamento di marinatura. Infatti, nonostante i campioni M abbiano un tenore di umidità notevolmente superiore dovuto all'aggiunta di acqua tramite zangolatura (figura 4.11), l'azione legante degli ingredienti presenti nella soluzione di marinatura (cloruro di sodio e bicarbonato di sodio) ha consentito di limitare le perdite di cottura che sono risultate analoghe a quelle dei campioni NM. Infatti, come riportato da Petracci *et al.* (2012), la combinazione di sale e bicarbonato migliora non solo la capacità di assorbimento della soluzione di marinatura durante la zangolatura, ma è in grado di minimizzare le perdite di liquido per cottura. Questo fenomeno è correlato all'effetto alcalinizzante del bicarbonato che allontana il pH dal punto isoelettrico delle proteine miofibrillari (aumentano delle cariche

negative nette) e porta a un'espansione delle fibre muscolari per repulsione elettrostatica. L'espansione permette una maggiore capacità di ritenzione idrica da parte del reticolo miofibrillare.

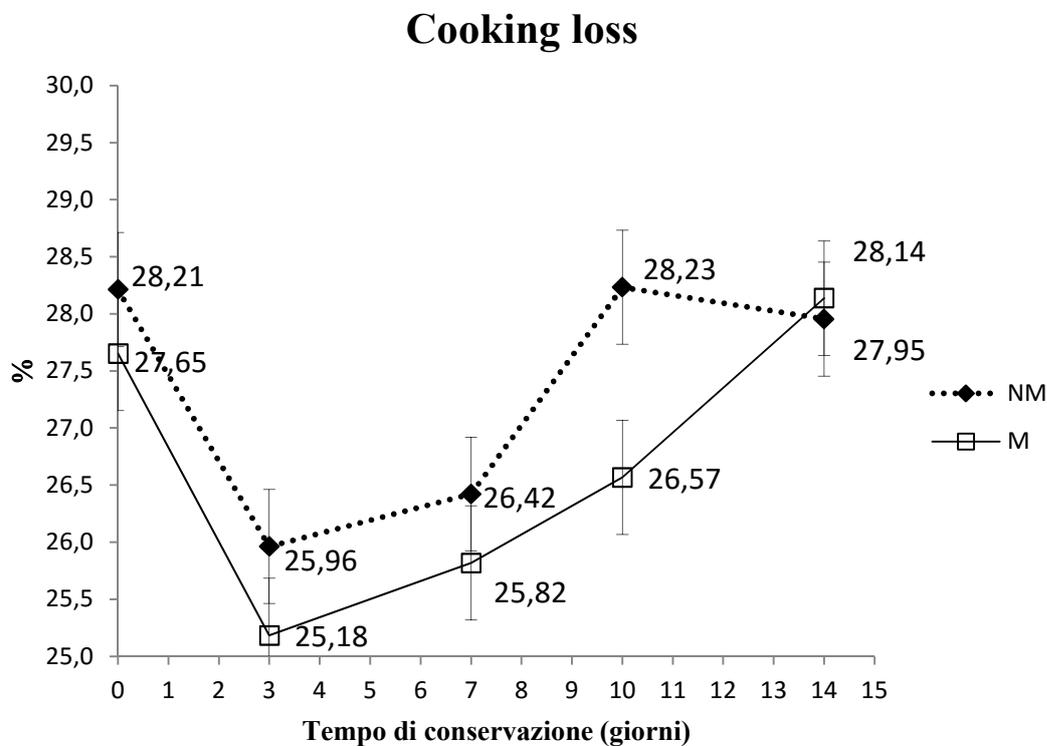
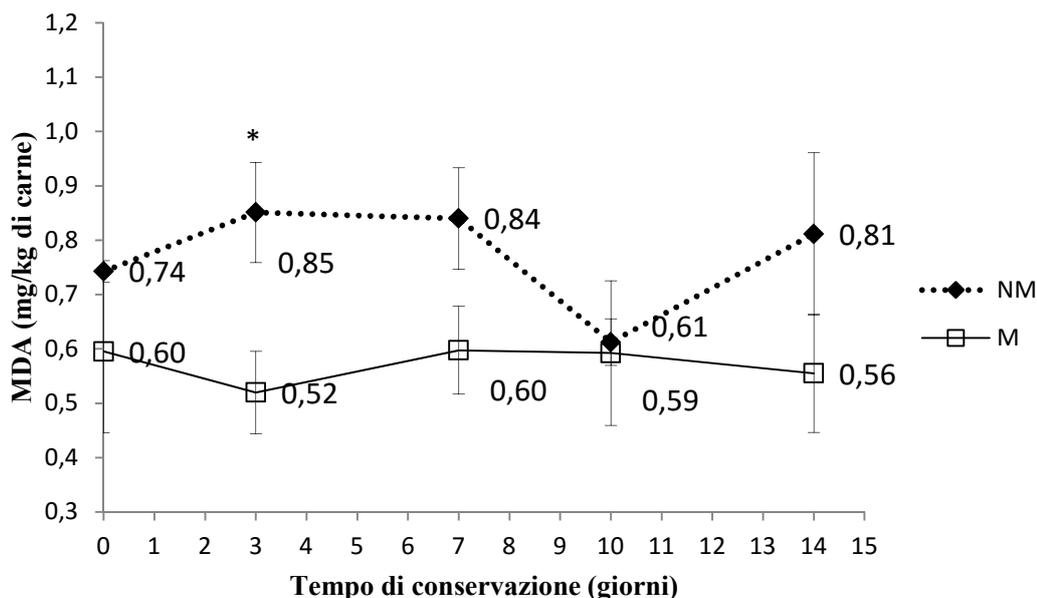


Figura 4.12 Percentuali di perdita di liquido per cottura dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

4.4.7 Ossidazione lipidica

In figura 4.13, sono riportati gli andamenti dell'ossidazione lipidica che nel complesso mostrano valori piuttosto bassi che dimostrano livelli di ossidazione molto limitati. L'effetto della marinatura non è risultato significativo ad eccezione del 3° giorno nel quale ha presentato valori inferiori ($P < 0,05$).

Ossidazione lipidica



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

Figura 4.13 Andamenti dell'ossidazione lipidica dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

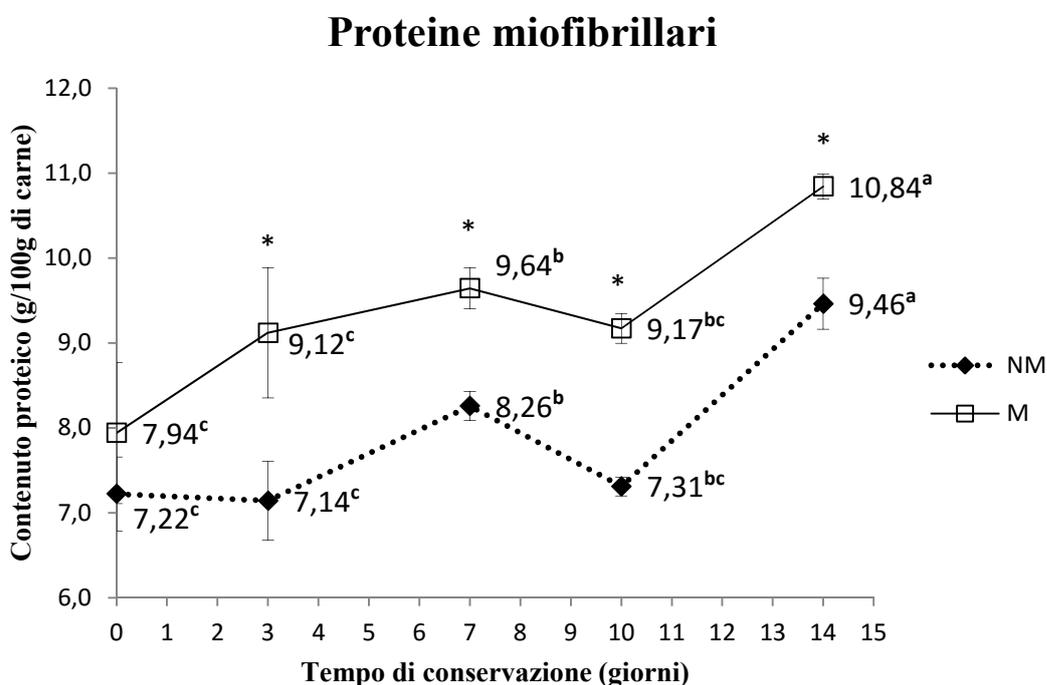
4.4.8 Solubilità proteica

Gli andamenti della solubilità delle proteine miofibrillari, sarcoplasmatiche e totali sono mostrati rispettivamente, in figura 4.14, 4.15 e 4.16.

Per quanto riguarda l'effetto della marinatura, non è stata osservata alcuna differenza nella solubilità delle proteine sarcoplasmatiche, al contrario i campioni M hanno mostrato un notevole aumento della solubilità della frazione miofibrillare. Tale aumento è dovuto verosimilmente all'aggiunta di cloruro di sodio e bicarbonato che inducono una maggiore solubilizzazione di tali proteine. Il cloruro di sodio promuove l'estrazione delle proteine miofibrillari attraverso l'aumento della forza ionica e mediante il cosiddetto effetto cloruro. Questo effetto, dovuto all'associazione degli ioni Cl^- con i gruppi delle proteine carichi positivamente, aumenta le forze di repulsione e, di conseguenza, aumenta gli spazi tra i miofilamenti con effetti positivi sulla ritenzione idrica. Il bicarbonato svolge un'azione sinergica dovuta all'azione alcalinizzante che determina un allontanamento dal punto isoelettrico delle

proteine miofibrillari e quindi un aumento della loro solubilità in un sistema ricco di acqua. Da notare che ciò è in grado di mitigare anche gli effetti negativi della denaturazione proteica che avviene durante la cottura (Sheard e Tali, 2004; Bertram *et al.*, 2008; Petracci *et al.*, 2012). Come riportato in precedenza, non è stato rilevato alcun effetto della marinatura sulla frazione sarcoplasmatica. Al contrario, per effetto dell'incremento di solubilità delle proteine miofibrillari, è stato osservato un aumento della solubilità totale che però è risultata significativa solo al 3° e 10° giorno di conservazione.

Per quanto riguarda l'evoluzione durante il periodo di conservazione, la solubilità delle proteine miofibrillari ha mostrato nel complesso un andamento crescente nel tempo (figura 4.14). Diversamente, la solubilità delle proteine sarcoplasmatiche (figura 4.15) è risultata costante sino al 10° giorno, dopodiché è stato osservato una consistente diminuzione. Per effetto di questi andamenti, la solubilità delle proteine totali presenta un marcato incremento al 3° giorno che successivamente aumenta più gradualmente.

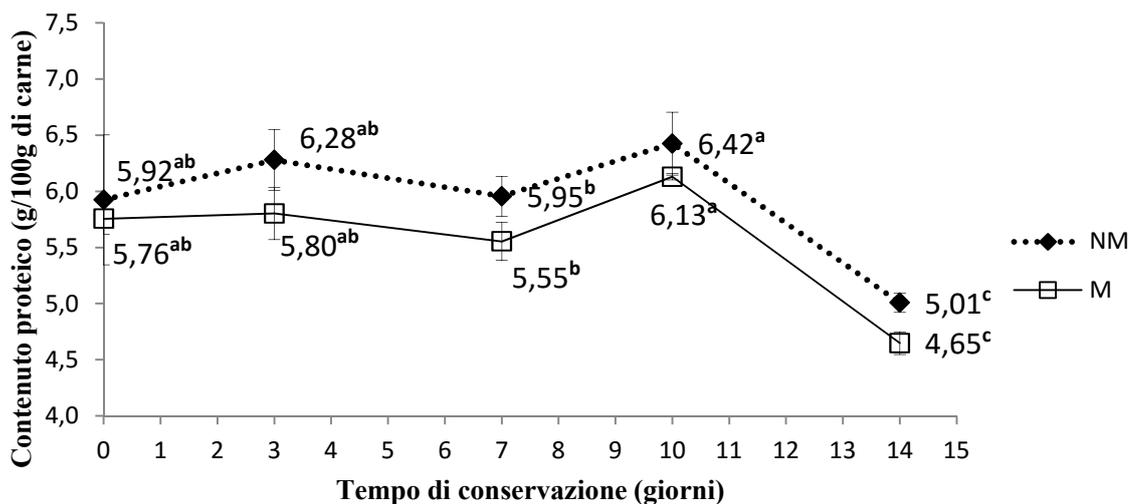


*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.14 Andamenti delle proteine miofibrillari dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

Proteine sarcoplasmatiche

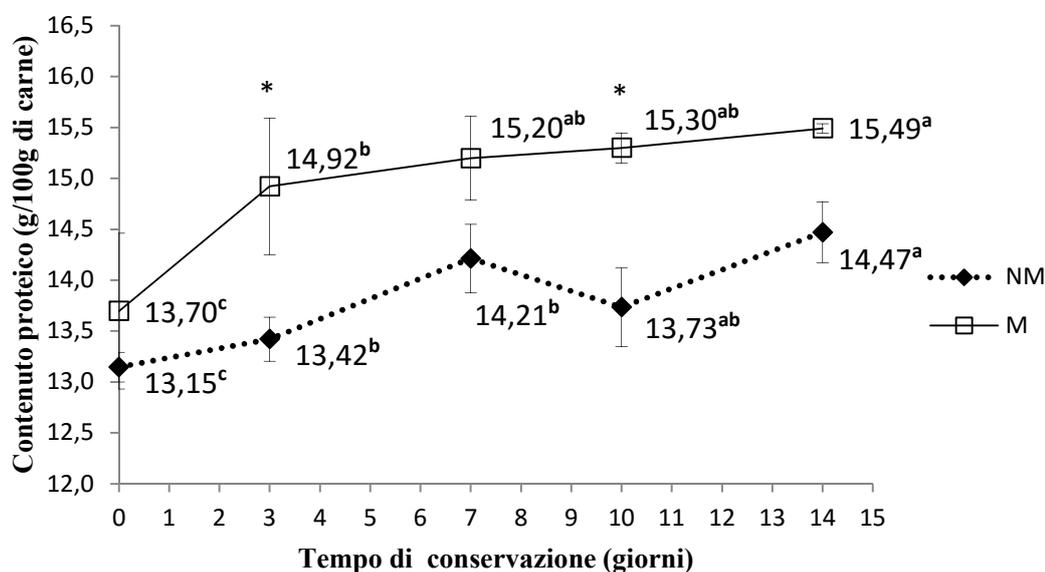


*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.15 Andamenti delle proteine sarcoplasmatiche dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

Proteine totali



*= Parametri contrassegnati con l'asterisco indicano una differenza significativa fra i due trattamenti ($P < 0,05$)

^{a-c}= Valori medi contrassegnati con lettere diverse differiscono significativamente nell'ambito dello stesso gruppo (NM e M) ($P < 0,05$).

Figura 4.16 Andamenti delle proteine totali dei campioni marinati (M) e non marinati (NM)

4.5 Conclusioni

Questo lavoro di tesi è stato finalizzato alla valutazione della possibilità di realizzare un prodotto avicolo marinato con una soluzione contenente cloruro di sodio e bicarbonato e confezionato sottovuoto.

Dalle analisi microbiologiche, è emerso che, nonostante l'aumento di pH dovuto all'azione alcalinizzante del bicarbonato, la shelf-life del prodotto marinato è rimasta invariata rispetto al gruppo di controllo non-marinato ed è stata pari a circa 14 giorni.

Dal punto di vista tecnologico, gli ingredienti funzionali aggiunti nella soluzione di marinatura hanno consentito di ottenere livelli di perdite di cottura nel prodotto finito simili a quelli delle carni non-marinate durante tutto il periodo di conservazione. Ciò è riconducibile al notevole aumento della solubilità delle proteine miofibrillari determinato dall'effetto sinergico di cloruro di sodio e bicarbonato. Tuttavia, i prodotti marinati hanno mostrato maggiori perdite di liquido nelle confezioni e questo aspetto può condizionare negativamente la propensione all'acquisto da parte del consumatore. Gli effetti rilevati sul colore non costituiscono invece un elemento determinante nella scelta dei prodotti avicoli confezionati sottovuoto. Infine, è stato escluso qualsiasi effetto negativo della marinatura nei confronti della stabilità ossidativa dei lipidi.

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno pertanto dimostrato che è possibile realizzare un prodotto marinato a base di carne di petto di pollo stabile durante la conservazione offrendo così al consumatore un alimento con caratteristiche sensoriali di succulenza e tenerezza superiori e con una maggiore facilità d'uso. Restano da ottimizzare alcuni aspetti legati alla presentazione del prodotto soprattutto in relazione alla presenza di liquido nelle confezioni.

BIBLIOGRAFIA

- Aalhus J.L., Dugan M.E.R. (2004). Oxidative and Enzymatic. Agric. and Agri-Food Canada, Lacombe, AB, Canada.
- Albrecht, E., Teuscher F., Ender K. and J. Wegner. (2006). Growth-and breed-related changes of marbling characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.* 84:1067-1075.
- Alderton J. M. and R. A. Steinhardt (2000). Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J. Biol. Chem.* 275:9452-9460.
- Allen C.D., Fletcher D.L., Northcutt J.K. and Russell SM. (1996). The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. *Poult. Sci.* 77:361-366.
- Alvarado C. and McKee S. (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *J. Appl. Poult. Res.* 16:113-120.
- Alvarado C. and Sams A. R. (2003). Injection marination strategies for remediation of pale, exudative broiler breast meat. *Poult. Sci.* 82:1332-1336.
- Anthony N.B. (1998). A review of genetic practices in poultry: Efforts to improve meat quality. *J. Muscle Foods* 9:25-33.
- AOAC (1990). Official methods of analysis. 15th ed. Washington, D.C.: Assoc. of Official Analytical Chemists.
- Asghar A, Samejima K. and Yasui T. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 22:27-106.
- Asmundson, V. S. and L. M. Julian (1956). Inherited muscle abnormality in the domestic fowl. *J. Hered.* 47:248-252.
- Bailey A.J., Restall D.J., Sims T.J. and Duance V.C. (1979). Meat tenderness: immunofluorescent location of isomorphous forms of collagen in bovine muscles of varying texture. *J. Sci. Food Agric.* 30:203-210.
- Bailey R.A., Watson K.A., Bilgili S.F. and Avendano S. (2015). The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poult. Sci.* <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev304>.
- Bárány M., Gaetjens E. and Bárány K. (1966). Myosin in hereditary muscular dystrophy of chickens. *Annals of the NY Acad. of Sci.* 138: 360-366.
- Barbut B., Sosnicki A.A., Lonergan S.M., Knapp T., Ciobanu D.C., Gatcliffe L.J., Huff-Lonergan E. and Wilson E.W. (2008). Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Sci.* 79:46-63.

- Bauermeister, L.J., Morey A., Owens C.M., Moran E.T. and McKee S.R. (2011). Occurrence of WS in two different fast growing strains of broilers. Poult. Sci. SPSS Meeting Abstr. 51.
- Bauermeister, L.J., Morey A.U., Moran E.T., Singh M., Owens C.M. and McKee S.R. (2009). Occurrence of WS in chicken breast fillets in relation to broiler size. Poult. Sci. 88 (Suppl.1): 104 (Abstr.).
- Bertram C., Meyer L., Wu Z., Zhou X. and Andersen J. (2008). Water distribution and microstructure in enhanced pork. J. Agric. Food Chem. 56:7201-7207.
- Bilgili, S.F. and Hess J.B. (2002). Green Muscle Disease in broilers increasing. World Poult. 18:42-43.
- Bilgili, S.F., Meloche K.J., Campasino A., Dozier W.A. (2014). The influence of carnitine and guanidine acetic acid supplementation of low and high amino acid density diets on Pectoralis major myopathies in broiler chickens. Poult. Sci. SPSS Meeting Abstr. 54.
- Björkroth J. (2004), Microbiological ecology of marinated meat products: a review. Meat Sci. 70:477-480.
- Björkroth J., Geisen R., Schillinger U., Weiss N., De Vos P. and Holzapfel W.H. (2000). Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov. associated with spoiled raw tomatomarinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. Appl. Environ. Microbiol. 66:3764–3772.
- Björkroth J., Ristiniemi M., Vandamme P. and Korkeala H. (2005). Enterococcus Species dominating in fresh modifiedatmosphere-packaged marinated broiler legs are overgrown by Carnobacterium and Lactobacillus speices during storage at 6°C. Intern. J. Food Microbiol. 97:267-276.
- Blaser M.J., Hopkins J.A. and Vasil M.L. (1984). *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins are antigenic for humans. Infect. Immun. 43:986-993.
- Blickstad E. and Molin G. (1983).The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stared in different atmospheres al 4°C. J. Applied Microbiol. 54:45-56.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Buege J.A. and Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation methods. Enzymology 52:302-310.
- Byun J.S., Min J.S., Kim I.S., Kim J.W., Chung M.S., Lee M. (2003) Comparison of indicators of microbial quality of meat during aerobic cold storage. J. Food Protect. 66:1733-1737.
- Carlos A. and M. Harrison (1999). Inhibition of selected microorganisms in marinated chicken by pimento leaf oil and clove oleoresin. J. Appl. Poult. Res. 8:100-109.

- Cavitte J.C. (2003). Present and future control of food-borne pathogens in poultry; revision of the European Community legislation on zoonoses. Proceedings of the XVI European Sym. on the Quality of Poul. Meat; Saint-Brieuc, France v.1 pp. 46-58.
- Chalmers, G.A. (1981). Monensin toxicity in broiler chickens. *Can. Vet. J.* 22:21-22.
- Chen Y., Ross W.H., Scott V.N. and Gombas D.E. (2003). *Listeria monocytogenes*: low level equals low risk. *J. Food Prot.* 66:570-577.
- Chio, L.F., Peterson D.W. and Kratzer F.H. (1972). Lipid composition and synthesis in the muscles of normal and dystrophic chickens. *Can. J. Biochem.* 50:1267-1272.
- CIE International Commission on Illumination (1976) Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No. 2, Bureau Central de la CIE, Paris, France.
- Corry J. and Atabay H. (2001). Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J. Applied Microb.* 90:96S-114S.
- Crouse J.D., Cundiff L.V., Koch R.M., Koohmaraie M. and Seideman S.C. (1989). Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. *J. Anim. Sci.* 67:2661-2668.
- Dainty R.H., Edwards R.A., Hibbard C.M., Marnewick J.J. (1989). Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *J. Appl. Bact.* 66:281-289.
- Dainty R.H., Edwards R.A., Hibbard C.M., Marnewick J.J. (1989). Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *J. Appl. Bact.* 66:281-289.
- Dam H., Phange I. and Sondergaard E. (1952). Muscular degeneration (white striation of muscles) in chicks reared on vitamin E deficient, low fat diets. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 31:172-184.
- Davis, D. E., and H. Stewart. 2002. Changing consumer demands create opportunities for US food system. *Food Rev.* 25:19-23.
- Dawson P.L. (2010) Packaging. Poultry meat processing (Chap. 6) pp. 101-121. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Desmond E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci.* 74:188-196.
- Detienne A., Zheng M., Barnes W. and Wicker L. (2000). Properties of chicken breasts injected with low methoxyl pectin. *Foodservice Res. Intl.* 12:151-161.
- Dowling L. (1992). Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnosis. *Avian Pathol.* 21:355-368.

- EFSA (2011). A quantitative microbiological risk assessment of *Campylobacter* in the broiler meat chain 1-71
- Ferreira T.Z. (2012). Características histopatológicas da miopatia WS de frangos de corte. <http://hdl.handle.net/10183/65931>. Accessed February 2013.
- Freeman L.R., Silverman G.J., Angelini P, Merritt C.Jr, Esselen W.B. (1976) Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. Appl. Environ. Microbiol. 32:222-231.
- Freeman L.R., Silverman G.J., Angelini P., Merritt C., Esselen W.B. (1976). Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. Appl. Environ. Microbiol. 32:222-231.
- Galli Volonterio A. (2005). Microbiologia degli alimenti, Milano, Casa Editrice Ambrosiana.
- Garcia R.G.; Freitas L.W.; Schwingel A.W.; Farias R.M.; Caldara F.R.; Gabriel A.M.A.; Graciano J.D.; Komiyama C.M. and Almeida Paz I.C.L. (2010). Incidence and physical properties of PSE chicken meat in a commercial processing plant. Rev. Bras. Cienc. Avic.vol.12, no.4 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2010000400003>
- Gordon A. and Barbut A. (1990) The role of the interfacial protein film in meat batter stabilization. Food Struct. 9:77.
- Granicher D. and Portzehl H. (1964). The influence of magnesium and calcium pyrophosphate chelates, of free magnesium ions, free calcium ions and free pyrophosphate ions on the dissociation of actomyosin in solution. Biochim. Biophys. Acta, 86:567-578.
- Graziano M.J., Flory W., Seger C.L. and Hebert C.D. (1983). Effects of a Cassia occidentalis extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). Am. J. Vet. Res. 44:1238-1244.
- Gross J. (1961). Collagen. Sci Am, 204:120-134.
- Haley M.M. (2001). Changing consumer demand for meat: The US example, 1970-2000. Pages 41-48 in 436 Changing Structure of Global Food Consumption and Trade. A. Regmi, ed. US Department of Agriculture, Economic Research Service, Agriculture and Trade Report, ERS WRS No. 01-1. May 2001, Washington, DC.
- Hamm R. (1986). Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. Bechtel P J, Muscle as Food, San Diego, CA, Academic Press, Inc., 135-199.
- Henry M.H., Pesti G.M. and Brown T.P. (2001). Pathology and histopathology of gossypol toxicity in broiler chicks. Avian Dis. 45:598-604.
- Hocquette J.F., Gondret F., Baéza E., Médale F., Jurie C. and Pethick D.W. (2010). Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, identification of putative markers. Animal 4:303-319.

- Hoving-Bolink A.H., Kranen R.W., Klont R.E., Gerritsen C.L.M. and de Greef K.H. (2000). Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites. *Meat Sci.* 56:397-402.
- Jackson, M. J., D. A. Jones, and R. H. T. Edwards. 1984. Experimental skeletal muscle damage: the nature of the calcium activated degenerative processes. *Eur. J. Clin. Invest.* 14:369-374.
- James M. Jay (2009) *Microbiologia degli alimenti*, Edizione italiana a cura di Andrea Pulvirenti, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia Dipartimento di Scienze Agrarie e degli Alimenti.
- Jay J.M. (1996) *Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology*. M.D. Pierson and N.J. Stern (Eds), Marcel Dekker, New York, NY.
- Jeacocke R.E. (1997) Continuous measurement of the pH of beef muscle in intact beef carcasses. *J. Food Tech.* 12:375386.
- Jordan J.P., Kratzer F.H. and Zarghami N.S. (1964). Lipid composition of the Pectoral muscles of chickens with inherited muscular dystrophy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116:243-246.
- Jordan J.P., Kratzer F.H., Johnson A.M. and Freeman R.L. (1959). Fat deposition in musculature of the genetically dystrophic chicken. *Exp. Biol. Med.* 101:449-451.
- Judge M.D., Aberle E.D., Forrest J.C., Hedrick H.B. and Merkel R.A. (1989). *Principles of meat science*. 2nd ed. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa.
- Julian L. and Asmundson V. (1963). Muscular dystrophy of the chicken. *Muscular Dystrophy in Man and Animals*, pp. 458-498.
- Julian R.J. (2005). Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry-A review. *Vet. J.* 169:350-369.
- Julian L.M. (1973). Animal model: Hereditary muscular dystrophy of chickens. *Am. J. Pathol.* 70:273-276.
- Kauffman R.G. (2012) *Meat Composition (Chap. 3)*, pp. 45-62. *Handbook of Meat and Meat Processing*, Second Edition (ed. Y. H. Hui). CRC Press
- Kijowaski J. and Konstanczak M. (2009). Deep pectoral myopathy in broiler chickens. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 53:487-491.
- Klasing K.C. (2008). Nutritional diseases. Pages 1027-1054 in *Diseases of Poultry*. 12th ed. Y. M. Saif, Fadley A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. and Swayne D.E., eds. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA.
- Kos V.N., Gibreel A., Keelan M., Taylor D.E. (2006), Species identification of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates and optimization of a duplex PCR for rapid detection. *Research Microbiol.* 157:503-507.

- Kuttappan V.A., Brewer V.B., Waldroup P.W. and Owens C.M. (2012b). Influence of growth rate on the occurrence of WS in broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91:2677-2685.
- Kuttappan V.A., Goodgame S.D., Bradley C.D., Mauromoustakos A., Hargis B.M., Waldroup P.W., Owens C.M. (2012b) Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- α -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91:3230-3235.
- Kuttappan V.A., Lee Y.S., Erf G.F., Meullenet J-F.C., McKee S.R. and Owens C.M. (2012c). Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of WS. *Poult. Sci.* 91:1240-1247.
- Kuttappan V.A., Shivaprasad H.L., Shaw D.P., Valentine B.A., Hargis B.M., Clark F.D., McKee S.R. and Owens C.M. (2013b). Pathological changes associated with WS in broiler breast muscles. *Poult. Sci.* 92:331-338.
- Kuttappan, V.A., Brewer V.B., Mauromoustakos A., McKee S.R., Emmert J.L., Meullenet J.F. and Owens C.M. (2013c). Estimation of factors associated with the occurrence of WS in broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 92:811-819.
- Kuttappan, V.A., Caldas J., Yang F.L., Tijare V., Hargis B.H., Coon C.N., Escobar J., Vazquez-Anon M., Owens C.M. (2015) White striping and woody breast: Effect on raw broiler breast fillet quality. Poultry Science Association Annual Meeting July 27-30, Louisville, KY. #521 (Abstr.)
- Kuttappan, V.A., Goodgame S.D., Bradley C.D., Mauromoustakos A., Hargis B.M., Waldroup P.W. and Owens C.M. (2012a). Effect of different levels of dietary vitamin E (DL- α -tocopherol acetate) on the occurrence of different degrees of WS on broiler breast fillets. *Poult. Sci.* 91:3230-3235.
- Kuttappan, V.A., Huff G.R., Huff W.E., Hargis B.M., Apple J.K., Coon C. and Owens C.M. (2013a). Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal (NORM) and severe (SEV) degrees of WS in breast fillets. *Poult. Sci.* 92:339-345.
- Lametsch R. and Bendixen E. (2001). Proteome analysis applied to meat science: characterizing post mortem changes in porcine muscle. *J. Agric. Food Chem.* 49:4531-4537.
- Machlin L.J. and Shalkop W.T. (1956). Muscular degeneration in chickens fed diets low in vitamin E and sulfur. *J. Nutr.* 60:87-96.
- Macrae V.E., Mahon M., Gilpin S., Sandercock D.A. and Mitchell M.A. (2006). Skeletal muscle fibre growth and growth associated myopathy in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Br. Poult. Sci.* 47:264-272.
- Mahon M. (1999). Muscle abnormalities: morphological aspects. Pages 19-64 in *Poultry Meat Science - Poultry Science Symposium Series Volume Twenty-Five*. Richardson R.I. and Mead G.C., eds. CABI Publishing, Wallingford; UK.

- May K.N., Irby J.D., Carmon J.L. (1961) Shelf life and bacterial counts of excised poultry tissue. *Food Technol.* 16:66-68.
- McMurtry S.L., Julian L.M. and Asmundson V.S. (1972). Hereditary muscular dystrophy of the chicken. Quantitative histopathological findings of the Pectoralis at 6 weeks of age. *Arch. Pathol.* 94:217-224.
- Mead G.C. (2004). Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian J. Poult. Sci.* 6:135-142.
- Mead G.C. (2004). Shelf-life and spoilage of poultry meat. IN: Mead GC, editor. *Poultry meat processing and quality*. Cambridge, UK, Woodhead, pp. 283-303.
- Mitchell M.A. (1999). Muscle abnormalities: pathophysiological mechanisms. Pages 65-98 in *Poul. Meat Sci. - Poul. Sci. Symposium Series Volume Twenty-Five*. Richardson R.I. and Mead G.C., eds. CABI Publishing, Wallingford; UK.
- Molimard P., Spinnler H.E. (1996). Compounds involved in the flavours of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79:169-184.
- Monin G. (2004). *Colour and Texture Deviations*. Istitute National de la Recherche Agronomique, St-Genès-Champanelle, France.
- Moody W.G. and Cassens R.G. (1968). A quantitative and morphological study of bovine longissimus fat cells. *J. Food Sci.* 33:47-52.
- Mudalal S., Babini E., Cavani C. and Petracci M. (2014). Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. *Poult. Sci.* 93:108-116.
- Mudalal S., Lorenzi M., Soglia F., Cavani C. and Petracci M. (2015). Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal* 9:728-734.
- Mutryn M.F., Brannick E.M., Fu W., Lee W.R. and Abasht B. (2015). Characterization of novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-524 sequencing. *BMC Genomics* 16: DOI 10.1186/s12864-015-1623-0.
- National Chicken Council (2011b). Statistics and research: U.S. Broiler Performance. 539 <http://www.nationalchickencouncil.org/about-the-industry/statistics/u-s-broiler-performance/> Accessed Apr, 26, 2012.
- Nishimura T., Hattori A. and Takahashi K. (1999). Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese Black cattle: effect of marbling on beef tenderization. *J. Anim. Sci.* 77:93-104.
- NRC National Research Council. (1994). *Nutrient requirements of poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, 532 Washington, DC.
- Offer G. and Trinick J. (1983). On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Sci.* 8:245-281.

- Parsons N. and Knight P. (1990). Origin of variable extraction of myosin from myofibrils treated with salt and pyrophosphate. *J. Sci. Food Agric.* 51:71-90.
- Pearson A.M. and Young R.B. (1989). *Muscle and Meat Biochemistry*, San Diego, CA, Academic Press, Inc.
- Peterson D.W. and Lilyblade A.L. (1969). Relative differences in tenderness of breast muscle in normal and two dystrophic mutant strains of chickens. *J. Food Sci.* 34:142-145.
- Petracci M., Bianchi M., Betti M. and Cavani C. (2004). Color variation and characterization of broiler breast meat during processing in Italy. *Poult. Sci.* 83:2086-2092.
- Petracci M., Mudalal S., Babini E. and Cavani C. (2014). Effect of WS on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Italian J. Anim. Sci.* 13:179-183
- Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A. and Cavani C. (2013b). Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92:1670-1675.
- Petracci M., Sirri F., Mazzoni M. and Meluzzi A. (2013a). Comparison of breast muscle traits and meat quality characteristics in 2 commercial chicken hybrids. *Poult. Sci.* 92:2438-2447
- Rocourt J., Buchrieser C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. (Ch 1) Ryser ET, Marth EH (eds) *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, pp. 1-20
- Roder J.D. (2011). Ionophore toxicity and tolerance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:305-314.
- Rosef O., Rettedal G., Lågeide L. (2001). Thermophilic campylobacters in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. *Int. J. Environ. Health Res.* 11:321-327.
- Sams A.R. and Alvarado C.Z. (2010). Introduction to poultry meat processing. Pages 1-3 in *Poultry Meat Processing*. 2nd ed. C. M. Owens, Alvarado C.Z. and Sams A.R., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Samuel D. and Trabelsi S. (2012). Measurement of dielectric properties of intact and ground broiler breast meat over the frequency range from 500 MHz to 50 GHz. *Intl. J. Poult. Sci.* 11.
- Sandercock D.A. and Mitchell M.A. (1999). Differential sensitivity to monensin-induced myopathy in fast and slow growing lines of broiler chicken? *Br. Poult. Sci.* 40:S55-S56.
- Sandercock D.A. and Mitchell M.A. (2003). Myopathy in broiler chickens: a role for Ca (2+)-activated phospholipase A2? *Poult. Sci.* 82:1307-1312.

- Sandercock D.A. and Mitchell M.A. (2004). The role of sodium ions in the pathogenesis of skeletal muscle damage in broiler chickens. *Poult. Sci.* 83:701-706.
- Sandercock D.A., Barker Z. E., Mitchell M.A. and Hocking P.M. (2009). Changes in muscle cell cation regulation and meat quality traits are associated with genetic selection for high body weight and meat yield in broiler chickens. *Genet. Sel. Evol.* 41:1-8.
- Scholtyssek S., Bele L.M., Sayre R.N., Klose A.A. and Peterson D.W. (1967). Tenderness of dystrophic chicken meat. *Poult. Sci.* 46:1050-1053.
- Scott M.L. and Desai I.D. (1964). The relative anti-muscular dystrophy activity of the d- and l- epimers of α -tocopherol and of other tocopherols in the chick. *J. Nutr.* 83:39-43.
- Sen A., Naveena B., Muthukumar M., Babji Y. and Murthy T. (2005). Effect of chilling, polyphosphate and bicarbonate on quality characteristics of broiler breast meat. *Br. Poult. Sci.* 46:451–456.
- Sihvo H.K., Immonen, K., Puolanne, E. (2014) Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet. Pathol.* 51:619-623.
- Siller W.G. (1985). Deep pectoral myopathy: A penalty of successful selection for muscle growth. *Poult. Sci.* 64:1591-1595.
- Silva T.C., Gorniak S.L., Oloris S.C.S., Raspantini P.C., Haraguchi M. and Dagli M.L.Z. (2003). Effects of *Senna occidentalis* on chick bursa of Fabricius. *Avian Pathol.* 32:633-637.
- Smith D. (1999). Marination: Tender to the bottom line. *Broiler Ind.* 6:22–25.
- Smith D.M. (2001). Functional properties of muscle proteins in processed poultry products. *Poultry Meat Processing* (ed. Alan R. Sams). CRC Press.
- Soglia F., Mudalal S., Sirri F., Cavani C. and Petracci M. (2015). Composition and texture of wooden breast meat. *World's Poult. Sci.* 71 (Suppl. 1): M1-02 (Abstr.)
- Susiluoto T., Korkeala H. and Björkroth J. (2002). *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strip products on sell by day. *International J. Food Microbiol.* 80:89-97.
- Swatland, H. J. (2008). How pH causes paleness or darkness in chicken breast meat. *Meat Sci.* 80:396-400.
- Tijare V., Yang F., Kuttappan V., Alvarado C., Coon C., Owens C. (2015). Meat Quality of Broiler Breast Fillets with White Striping and Woody Breast Muscle Myopathies. *Poult. Sci.* Submitted on 24-585 Sep-2015
- USDA-FSIS (2008). Production and inspection. United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service. http://www.fsis.usda.gov/factsheets/inspection_&_grading/index.asp. Accessed 12/12, 2010.

- Van Kranenburg R., Kleerebezem M., van Hylckama Vlieg J., Ursing B.M. (1989). Vegetale Oils. Rossell J.B. (ed) Oils and Fats, vol. 2, Animal carcass fats, Leatherhead Food Research Association. 123-146.
- Van Kranenburg R., Kleerebezem M., van Hylckama Vlieg J., Ursing B.M., Boekhost J., Smit B.A., Ayad E.H.E, Smit G., Siezen R.J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic bacteria: prediction from genome sequence analysis. *Intern. Dairy J.* 12:111-121.
- VanderKop P.A., MacNeil J.D. and VanderKop (1989). Monensin intoxication in broiler chicks: Is it really so easy to identify? *Can. Vet. J.* 30:823-824.
- Velleman S.G. and Nestor K.E. (2003). Effect of selection for growth rate on myosin heavy chain temporal and spatial localization during turkey breast muscle development. *Poult. Sci.* 82:1373-1377.
- Villani, F. (2011). Insegnamento di Microbiologia degli Alimenti, Corso di Laurea in Tecnologie Alimentari.
- Wang L.J., Byrem T.M., Zarosley J., Booren A.M. and Strasburg G.M. (1999). Skeletal muscle calcium channel ryanodine binding activity in genetically unimproved and commercial turkey populations. *Poult. Sci.* 78:792-797.
- Warner R.D., Kauffman R.G. and Greaser M.L. (1997). Muscle protein changes post mortem quality traits relation to pork quality traits. *Meat Sci.* 45:339-352.
- Whitehead N.P., Yeung E.W. and Allen D.G. (2006). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:657-662.
- Wight P.A.L. and Siller W.G. (1980). Pathology of deep pectoral myopathy of broilers. *Vet. Pathol.* 17:29-39.
- Wilson B.W., Abplanalp H., Buhr R.J., Entrikin R.K., Hooper M.J. and Nieberg P.S. (1988). Inbred crosses and inherited muscular dystrophy of the chicken. *Poult. Sci.* 67:367-374.
- Wilson B.W., Nieberg P.S. and Buhr R.J. (1990). Turkey muscle growth and focal myopathy. *Poult. Sci.* 69:1553-1562.
- Wilson B.W., Randall W.R., Patterson G.T. and Entrikin R.K. (1979). Major physiologic and histochemical characteristics of inherited dystrophy of the chicken. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 317:224-246.
- Xiong Y.L. (1997). Structure-functionality relationships of muscle proteins, in Damoradan S and Paraf A, *Food Proteins and Their Applications*, New York, Marcel Dekker, Inc., 341±392.
- Xiong Y.L. (2004). Muscle protein. Pages 100–122 in *Proteins in Food Processing*. R. Y. Yada, ed. Woodhead Publ. Ltd., London, UK.

- Xiong Y.L., Lou X., Harmon R.J., Wang C. and Moody W.G. (1999). Salt- and pyrophosphate-induced structural changes in myofibrils from chicken red and white muscle. *J. Sci. Food Agric.* 80:1176-1182.
- Xiong Y.L., Lou X., Wang C., Moody W.G. and Harmon R.J. (2000). Protein extraction from chicken myofibrils irrigated with various polyphosphate and NaCl solutions. *J. Food Sci.* 65:96-100.
- Young L.L. and Lyon C.E. (1997a). Effect of post-chill aging and sodium tripolyphosphate on moisture binding properties, color, and Warner-Bratzler shear values of chicken breast meat. *Poult. Sci.* 76:1587-1590.
- Young L.L. and Lyon C.E. (1997b). Effect of calcium marination on biochemical and textural properties of pre-rigor chicken breast meat. *Poult. Sci.* 76:197-201.
- Zhao C., Ge B., De Villena J., Sudler R., Yeh E., Zhao S., White D.G., Wagner D., Meng J. (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5431-5436.
- Zheng M., Detienne N.A., Barnes B.W. and Wicker L. (2001). Tenderness and yields of poultry breast are influenced by phosphate type and concentration of marinade. *J. Sci. Food Agric.* 81:82-87.