

PARTE A

Relazione finale riassuntiva delle attività svolte

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali

**Unità di Zootecnia e Produzioni animali
(Prof. Giuseppe Martino)**

1. **Introduzione.....pag. 3**
2. **Obiettivi del progetto.....pag. 3**
3. **Disegno sperimentale.....pag. 3**
4. **Risultati e discussionepag. 5**
5. **Conclusioni.....pag. 11**
6. **Prodotti della ricercapag. 12**

1. Introduzione

Oltre al tipo di alimentazione e alla genetica dell'animale, il sistema di allevamento rappresenta uno dei fattori che maggiormente influenza l'efficienza di conversione dei mangimi e quindi le performance produttive degli avicoli. La luce (intensità, fotoperiodo e lunghezza d'onda), essendo uno stimolo ambientale importante, ha effetti diretti su comportamento, fisiologia, immunità e prestazioni degli avicoli ed il suo ruolo è stato a lungo valutato per fronteggiare problemi di mortalità correlati a malattie metaboliche. L'impatto di varie intensità e lunghezze d'onda sulle prestazioni produttive dei polli è stato ampiamente studiato negli ultimi decenni; questo ha portato a testare negli allevamenti commerciali diversi sistemi di illuminazione, come ad esempio lampade a incandescenza e fluorescenti. Solo recentemente, le lampade a diodi a emissione di luce (LED) hanno acquisito crescente interesse per le attività avicole a causa della loro elevata efficienza energetica, lunga durata operativa, disponibilità in diverse lunghezze d'onda, basso consumo di elettricità con conseguente riduzione dell'emissione della CO₂ nell'atmosfera e bassi costi di allevamento (Parvin et al., 2014). Negli ultimi anni diversi studi sono stati condotti sull'effetto della luce monocromatica prodotta dalle lampade a LED sulle prestazioni produttive e sulla qualità della carne di pollo e, nonostante sia disponibile un'ampia gamma di tonalità, ci sono rapporti contrastanti sull'impatto dei diversi colori sulle prestazioni produttive. Quanto appena descritto, in aggiunta alla mancanza di ricerche specifiche sull'effetto della singola tonalità sulla crescita e il benessere dei polli, rendono necessarie ulteriori e più approfondite valutazioni.

2. Obiettivi del progetto

Il progetto si pone come obiettivo generale quello di valutare gli effetti di tre tonalità di luce LED (luce fredda, luce calda e luce neutra) sui parametri zootecnici, produttivi e qualitativi del pollo da carne.

3. Disegno sperimentale

Per la prova in campo sono stati individuati 3 capannoni, ognuno dei quali caratterizzato da due aree di allevamento separate (box). Ad ognuna delle 3 tesi di luce (neutra, fredda e calda) è stato quindi assegnato un determinato capannone, in cui è stato possibile eseguire un confronto diretto tra il box "controllo" (illuminazione convenzionale con lampade al neon) ed il box "trattato" (applicazione luce LED). Lo schema della prova in campo è schematizzato in figura 1.



Figura 1. Schema della prova in campo

Il giorno 21.11.2019, in ciascuno dei 6 box sono stati accasati circa 10.000 pulcini ed il ciclo produttivo ha avuto una durata complessiva di 48 giorni, durante i quali gli animali sono stati alimentati con una dieta standard ed allevati in accordo con i protocolli normalmente applicati dall'azienda per la produzione del pollo pesante.

All'inizio del ciclo produttivo, 30 broiler per ciascuno dei 6 gruppi sono stati selezionati in modo random ed identificati tramite fascette di plastica numerate. Questi animali sono stati poi seguiti per l'intero ciclo produttivo ai fini del monitoraggio del peso ad intervalli regolari. In fase di allevamento particolare attenzione è stata rivolta anche al monitoraggio della mortalità, dello stato della lettiera e del comportamento animale.

Al termine del normale ciclo produttivo, sono stati macellati 15 broiler per ogni box (selezionati in modo random all'interno dei 30 monitorati durante la prova). Al macello è stata valutata la resa della carcassa, nonché i valori di pH dopo 45 minuti e 24 ore dall'abbattimento.

Il prelievo di campioni di tessuto muscolare del petto è stato eseguito allo scopo di valutare l'umidità, la tendenza del campione a trattenere acqua, i lipidi totali, la composizione degli acidi grassi ed il profilo volatile su campioni di tessuto muscolare sottoposti a cottura e conservati a +4 °C fino a 7 giorni.

4. Risultati e Discussione

4.1 Valutazioni in allevamento del peso vivo e della mortalità

Durante la carriera produttiva dei broiler sono state eseguite valutazioni regolari del peso in ciascuno dei 6 gruppi di animali. Come mostrato in tabella 1, nessuno dei trattamenti con luce LED ha indotto variazioni significative rispetto al gruppo controllo. Questo dato è confermato anche dalla valutazione del peso vivo eseguita a fine ciclo sugli interi box, e quindi su un numero di animali molto più ampio e statisticamente più significativo.

Tabella 1. Valutazione del peso dei broiler durante la carriera produttiva.

Data	giorni di allevamento	Luce NEUTRA (g)		Luce FREDDA (g)		Luce CALDA (g)	
		Contr.	Tratt.	Contr.	Tratt.	Contr.	Tratt.
27/11/2019	6	153	147	164	155	163	163
05/12/2019	14	450	450	445	450	455	440
13/12/2019	22	1038	1006	1072	1019	1114	1066
23/12/2019	32	1941	1855	1919	1927	1839	1714
02/01/2020	42	3045	2905	2907	2983	2773	2687
07/01/2020	47	3515	3352	3367	3528	3342	3182
Peso medio intero box		3425	3257	3550	3518	3474	3479
Mortalità (% , scarti inclusi)		10.8	9.7	8.2	7.5	7.4	7.7

Le valutazioni periodiche eseguite su 30 animali per singolo box sono state molto utili per studiare un confronto dei trend di aumento del peso tra il box trattato con luce LED ed il rispettivo controllo allevato con illuminazione neon (Figura 2). Anche in questo caso non sono state evidenziate differenze significative; l'applicazione delle singole tonalità di luce LED ha infatti indotto un trend di crescita pressoché sovrapponibile al rispettivo controllo.

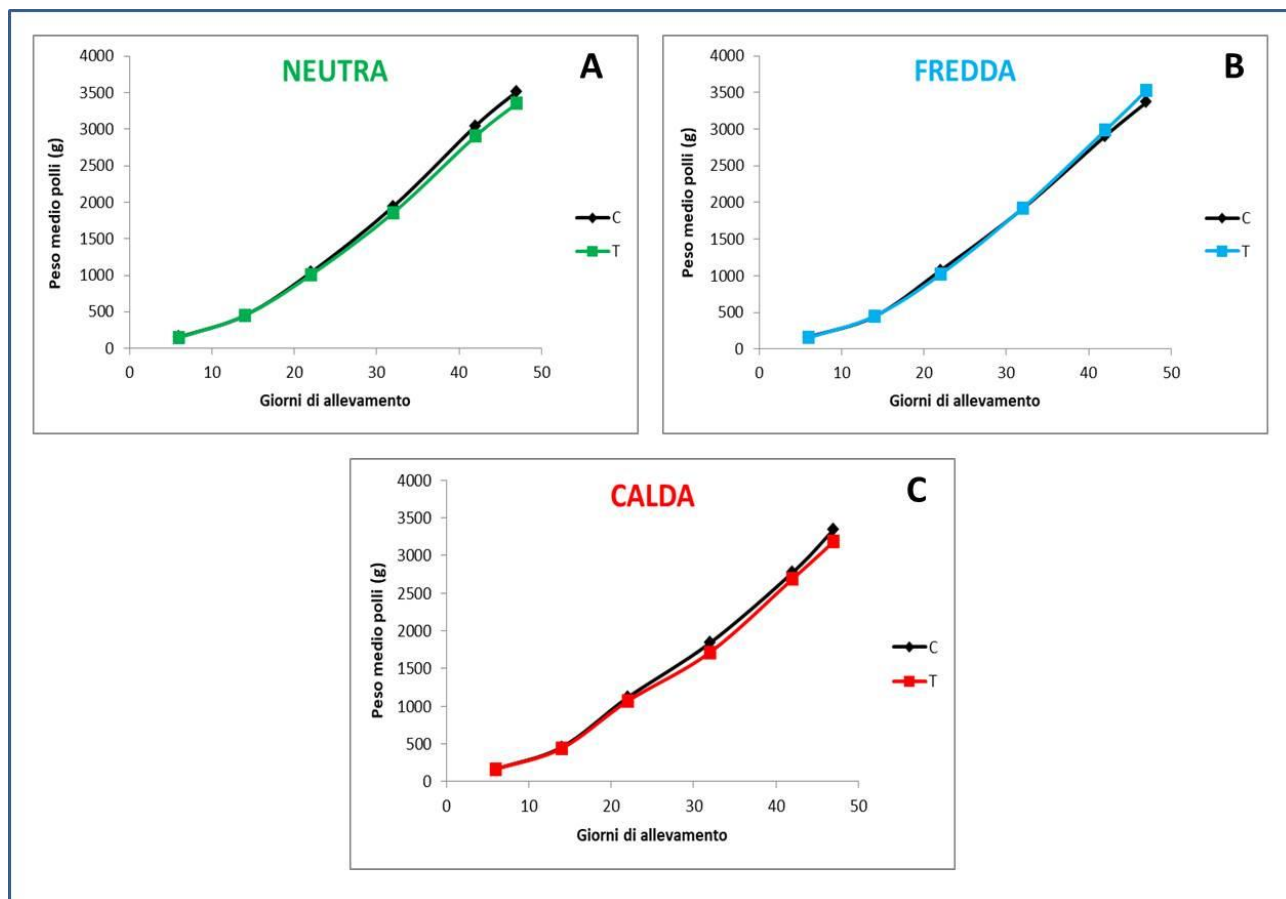


Figura 2. Confronto dei trend di crescita tra i gruppi di animali allevati con la singola tonalità di luce LED ed i rispettivi controlli sottoposti ad illuminazione con lampade standard al neon. (A) tesi di luce LED neutra, (B) tesi di luce LED fredda, (C) tesi di luce LED calda.

In Tabella 1 è riportato anche il dato della mortalità calcolato sull'intero box e comprensivo del

numero di animali scartati e soppressi. Anche in questo caso non si evidenziano differenze tra i gruppi trattati con luce LED ed i rispettivi gruppi controllo, tuttavia si nota una differenza della mortalità tra capannoni diversi e questo apre a considerazioni non associate alla differente illuminazione ma alle caratteristiche intrinseche dei singoli capannoni (disposizione spaziale, esposizione ai raggi solari nel corso del giorno, temperatura, umidità, ecc.).

4.2 Resa al macello e parametri qualitativi della carne

In Tabella 2 è riportata la resa delle carcasse e alcuni parametri qualitativi della carne, determinati su campioni di tessuto muscolare del petto. I valori attribuiti al gruppo “Controllo” rappresentano una media dei valori raccolti nei 3 gruppi di controllo allestiti per la prova in campo; tale scelta è stata eseguita poiché i gruppi “Controllo” hanno mostrato parametri fortemente omogenei tra loro. Per quanto riguarda lo studio dei singoli parametri, nessuna variazione è stata riscontrata nella valutazione della resa della carcassa, nel pH a 24 ore *post mortem*, nell’umidità della carne fresca e nella capacità del campione di trattenere acqua (sia da parte del campione fresco, che sottoposto a cottura). Anche i valori riguardanti i lipidi totali (s.t.q.) non hanno mostrato variazioni significative, tuttavia va messa in evidenza la tendenza dei campioni ottenuti dal trattamento con luce LED ad attestarsi su valori leggermente più bassi. Tale condizione andrebbe meglio caratterizzata e verificata su un numero maggiore di animali.

Tabella 2. Resa della carcassa e parametri qualitativi della carne fresca. I valori attribuiti al gruppo “Controllo” rappresentano una media dei valori raccolti nei 3 gruppi di controllo allestiti per la prova in campo.

	Controllo	Luce Neutra	Luce Calda	Luce Fredda
<i>Resa carcassa (%)</i>	73.85 ± 11.43	75.17 ± 9.42	75.46 ± 16.84	74.81 ± 10.47
<i>pH</i>	5.69 ± 0.07	5.64 ± 0.07	5.73 ± 0.07	5.68 ± 0.06
<i>Umidità (%)</i>	73.21 ± 1.70	75.85 ± 1.35	74.38 ± 2.00	74.58 ± 0.93
<i>Sostanza secca (%)</i>	26.79 ± 1.70	24.15 ± 1.35	25.62 ± 2.00	25.42 ± 0.93
<i>Drip loss (%)</i>	0.90 ± 0.11	1.22 ± 0.43	1.08 ± 0.34	1.10 ± 0.29
<i>Cooking loss (%)</i>	16.37 ± 0.42	17.73 ± 3.35	14.96 ± 2.20	16.22 ± 4.05
<i>Lipidi Totali stq (%)</i>	2.07 ± 0.84	1.94 ± 0.89	1.53 ± 0.42	1.54 ± 0.49

4.3 Profilo degli acidi grassi

La tabella 3 riporta la composizione dei singoli acidi grassi nei campioni di carne fresca. L'utilizzo dei LED non ha indotto variazioni significative nel contenuto totale di acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA). Per quanto riguarda i MUFA, un aumento seppur non significativo rispetto al controllo è stato comunque osservato in tutti e tre i gruppi sperimentali. Lo stesso trend può essere evidenziato anche a livello dei PUFA, per i quali, seppur in maniera non statisticamente significativa, si osservano valori più alti rispetto al controllo soprattutto nei gruppi "luce fredda" e "luce calda".

Tabella 3. Composizione degli acidi grassi. I valori attribuiti al gruppo "Controllo" rappresentano una media dei valori raccolti nei 3 gruppi di controllo. ^{a,b} Lettere differenti associate a valori diversi indicano differenza significativa ($p < 0.05$).

%	Controllo	Luce Neutra	Luce Calda	Luce Fredda
C14:0	0.47 ± 0.11	0.53 ± 0.13	0.45 ± 0.09	0.43 ± 0.06
C15:0	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
C16:0	19.52 ± 1.87	20.13 ± 1.48	19.83 ± 1.49	20.01 ± 2.17
C17:0	0.17 ± 0.05	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02
C18:0	8.72 ± 1.93	9.27 ± 1.61	8.04 ± 1.90	8.89 ± 1.23
C20:0	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.03
SFA	29.01 ± 3.52	30.26 ± 2.27	28.64 ± 2.38	29.61 ± 3.03
C14:1	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
C16:1	1.83 ± 0.58	1.72 ± 0.87	2.14 ± 0.79	1.86 ± 0.39
C18:1,c9	23.56 ± 2.69	23.82 ± 3.65	23.99 ± 2.64	23.72 ± 2.24
C18:1,c11	1.35^a ± 0.29	1.59^b ± 0.21	1.47^{a,b} ± 0.18	1.55^{a,b} ± 0.40
C22:1	0.13 ± 0.07	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.05
MUFA	26.90 ± 2.86	27.28 ± 4.61	27.75 ± 3.25	27.28 ± 2.44
C18:2	34.56 ± 3.40	32.72 ± 5.33	34.66 ± 1.74	33.12 ± 3.18
C18:3	3.35 ± 0.72	3.19 ± 0.87	3.37 ± 0.42	3.26 ± 0.60
C20:4	3.67 ± 1.97	3.98 ± 1.88	3.20 ± 1.88	4.07 ± 1.45
PUFA	39.04 ± 3.84	39.89 ± 5.79	41.23 ± 2.11	40.45 ± 2.81
Altri	2.52 ± 0.61	2.57 ± 0.56	2.66 ± 0.54	2.39 ± 0.59

L'unica variazione significativa riscontrata sul singolo acido grasso riguarda l'aumento dell'acido cis-vaccenico (C18:1, cis 11) nei campioni di carne derivanti dalla sperimentazione con luce neutra. La biosintesi più probabile di questo acido grasso avviene tramite elongasi dall'[acido palmitoleico \(C16:1\)](#), ma sono stati proposti percorsi alternativi che prevedono lo spostamento per via enzimatica del doppio legame dell'[acido oleico](#) dalla posizione 9 alla posizione 11 (C18:1 cis9 → C18:1 cis11). Questi meccanismi potrebbero essere giustificati, almeno parzialmente, da un probabile effetto della luce LED neutra sull'aumento dell'espressione genica delle forme enzimatiche direttamente

coinvolte (Liu et al., 2018). L'esatto meccanismo che conduce alla sintesi di questo composto richiede valutazioni più specifiche e mirate per poter essere adeguatamente caratterizzato; in ogni caso va puntualizzato che questa variazione non comporta alterazioni dirette della qualità del prodotto, ma rappresenta semplicemente il sintomo della capacità della luce di influenzare, seppur in minima parte, il metabolismo animale.

4.4 Profilo volatile della carne sottoposta a cottura

Il profilo volatile determinato su campioni di carne sottoposti a cottura e conservati per 7 giorni a +4 °C ha messo in evidenza interessanti differenze tra i vari gruppi sperimentali. Come mostrato in Tabella 4, la classe di composti maggiormente rappresentata è quella delle aldeidi, la cui formazione è generalmente associata ad eventi ossidativi soprattutto a carico della componente lipidica. In tutti i campioni l'aldeide presente in concentrazione maggiore è l'esanale, che tende ad attestarsi su valori significativamente più bassi nel gruppo "Luce Neutra", un fenomeno probabilmente correlato ad una migliore stabilità ossidativa e che è quindi indice di una migliore resistenza ai fenomeni di deterioramento del prodotto (Shaidi & Pegg, 1994).

Tabella 4. Profilo volatile su campioni di carne sottoposti a cottura e conservati per 7 giorni a +4 °C. I valori attribuiti al gruppo "Controllo" rappresentano una media dei valori raccolti nei 3 gruppi di controllo. ^{a,b} Lettere differenti associate a valori diversi indicano differenza significativa ($p < 0.05$).

	Controllo	Luce Neutra	Luce Calda	Luce Fredda
Aldeidi				
<i>Pentnale</i>	1.06 ^a ± 0.17	2.15 ^b ± 0.26	1.74 ^c ± 0.12	1.55 ^c ± 0.24
Esanale	62.68^a ± 1.55	52.23^b ± 4.98	67.21^a ± 4.22	62.29^a ± 3.34
<i>Eptanale</i>	3.09 ^a ± 0.22	3.17 ^a ± 0.24	1.98 ^b ± 0.28	1.99 ^b ± 0.30
<i>Ottanale</i>	2.07 ± 0.15	2.60 ± 0.33	2.10 ± 0.17	2.34 ± 0.12
<i>Nonanale</i>	2.78 ± 0.40	3.01 ± 0.31	2.89 ± 0.30	2.89 ± 0.31
Alcool				
<i>1-Pentanolo</i>	2.00 ^a ± 0.24	1.93 ^a ± 0.26	2.83 ^b ± 0.26	2.54 ^b ± 0.32
<i>1-Eptanolo</i>	0.90 ^a ± 0.15	0.98 ^a ± 0.12	0.68 ^b ± 0.13	0.70 ^b ± 0.14
1-Octen-3-olo	10.61^a ± 0.95	21.44^b ± 1.94	8.70^a ± 0.84	9.62^a ± 1.02
<i>2-Octen-1-olo</i>	1.34 ± 0.40	0.86 ± 0.14	0.89 ± 0.11	1.15 ± 0.14
<i>1-Octanolo</i>	0.45 ^a ± 0.06	0.52 ^a ± 0.08	0.20 ^b ± 0.06	0.38 ^b ± 0.05
Chetoni				
<i>2-Eptenale</i>	0.74 ^a ± 0.09	0.34 ^b ± 0.05	0.57 ^a ± 0.08	0.68 ^a ± 0.07
<i>2-Octenale</i>	0.51 ± 0.08	0.62 ± 0.10	0.84 ± 0.17	0.77 ± 0.08
<i>4-metil, 2-esanone</i>	0.24 ± 0.02	0.19 ± 0.12	0.23 ± 0.19	0.25 ± 0.17
<i>2-metil, 3 ottanone</i>	3.95 ± 0.41	4.03 ± 0.37	3.04 ± 0.27	3.18 ± 0.37

In aggiunta a quanto riportato, va necessariamente evidenziato il fatto che nel gruppo "Luce Nutra" è anche presente una maggior concentrazione di 1-Octen-3-olo, il quale è riconosciuto come uno

dei maggiori determinanti dell'aroma della carne cotta (Chen & Zhang, 2010). Questo dato permetterebbe di ipotizzare un effetto dell'illuminazione nella determinazione dell'aroma del prodotto, con conseguenti ripercussioni sull'accettabilità da parte del consumatore, sebbene tale aspetto dovrebbe essere ulteriormente caratterizzato tramite indagini sensoriali sul prodotto trasformato.

4.5 Analisi metagenomica dei campioni fecali

La ricerca di informazioni utili a definire lo stato di benessere animale ha incluso anche lo studio di parametri associati alla funzionalità intestinale. In primo luogo si è deciso di caratterizzare il microbioma fecale di un numero rappresentativo di animali appartenenti a tutti i gruppi sperimentali. Tale valutazione è stata condotta attraverso 4 fasi fondamentali: l'estrazione di tutto il materiale genetico presente nei campioni fecali, l'isolamento del materiale genetico batterico (separazione da quello appartenente al pollo), sequenziamento degli acidi nucleici isolati tramite tecniche molecolari di NGS (next-generation sequencing) e confronto delle sequenze ottenute con una "libreria" di sequenze batteriche note, allo scopo di definire le famiglie microbiche presenti in ogni campione nonché la loro abbondanza relativa.

L'analisi ha evidenziato la presenza in tutti i campioni di *Enterobacteriales*, *Lactobacillales* and *Bifidobacteriales*, senza riscontrare differenze significative tra i vari gruppi sperimentali.

4.6 Valutazione della presenza di mediatori della risposta antiossidante ed infiammatoria nel tessuto intestinale dei polli

Oltre al dato riguardante la caratterizzazione del microbioma intestinale, lo studio sulla funzionalità ed il benessere intestinale è stato quello di valutare anche la presenza e la funzione di fattori coinvolti nelle risposte antiossidanti ed infiammatorie. Per quanto riguarda la risposta antiossidante, l'attenzione è stata rivolta nei confronti di elementi già identificati nel fegato attraverso l'indagine proteomica, ossia la glutatione perossidasi, la superossido dismutasi e la catalasi; con riferimento invece al processo infiammatorio ci si è concentrati sull'interleuchina 6 (IL-6) che viene rilasciata a livello tissutale nelle fasi iniziali della risposta infiammatoria, e su due enzimi proteolitici, le gelatinasi (MMP-2 ed MMP-9), che intervengono nelle fasi tardive del processo infiammatorio allo scopo di degradare le fibrille di collagene danneggiate dall'infiammazione, permettendo la sintesi di collagene nuovo.

Tali valutazioni sono state condotte su estratti proteici ottenuti a livello del tratto cecale del tessuto intestinale ed hanno previsto l'utilizzo di diversi approcci metodologici. La glutatione perossidasi, la superossido dismutasi, la catalasi e l'IL-6 sono state dosate tramite saggio spettrofotometrico ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) che permette di riconoscere proteine specifiche

all'interno di un campione biologico in modo altamente selettivo attraverso l'utilizzo di anticorpi capaci di riconoscere la proteina di interesse e generare una reazione colorimetrica; la quantità di colore generato nel campione è proporzionale alla quantità di proteina legata dall'anticorpo. Per quanto riguarda invece le gelatinasi MMP-2 e MMP-9, si è deciso di dosare direttamente l'attività enzimatica a livello del campione, sfruttando una tecnica elettroforetica nota come gelatin-zymography. Questa tecnica permette di separare le proteine su un supporto semisolido contenente il substrato per gli enzimi di interesse. Nel punto in cui questi enzimi si andranno a stabilizzare si avrà la reazione enzimatica con degradazione del substrato; successivamente il supporto sarà colorato con un colorante capace di legare il substrato e quindi l'attività enzimatica sarà evidenziata attraverso la visualizzazione di aree chiare (non colorate) in cui il colorante non avrà potuto legare il substrato.

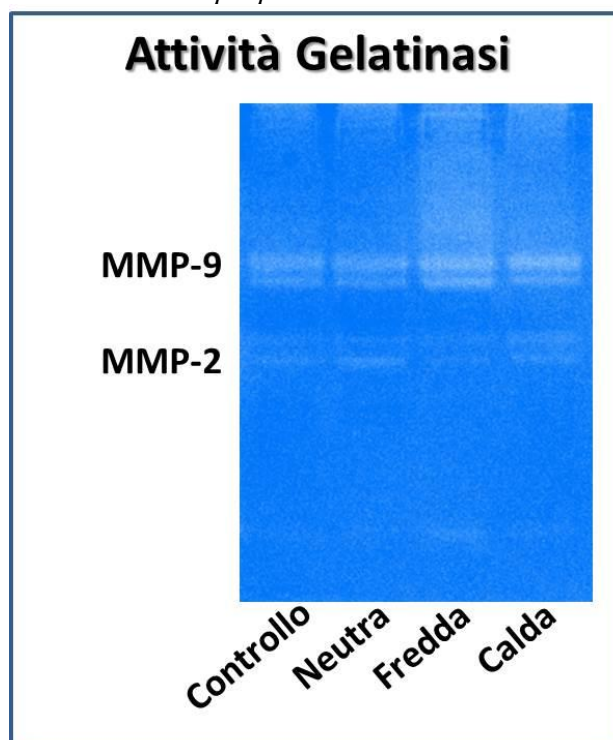
In Tabella 5 sono riportati i risultati ottenuti dal test ELISA, i quali non hanno mostrato nessuna variazione significativa a livello dei target valutati. Tuttavia va evidenziato il fatto che le deviazioni standard associate a ciascuna media sono particolarmente ampie, a testimonianza di una elevata variabilità tra i singoli campioni analizzati. Per questa ragione sarebbe auspicabile incrementare il numero di analisi al fine di confermare il dato ottenuto.

Tabella 5. Test ELISA su estratti proteici intestinali. L'analisi ha permesso di quantificare l'interleuchina 6 (IL-6), la glutatione perossidasi (GPX), la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT).

	IL-6 (ng/L)	GPX (ng/mL)	SOD U/mL	CAT (pg/mL)
CTR	11.83 ± 2.44	5.23 ± 0.67	47.42 ± 4.85	392.52 ± 6.78
NEUTRA	13.31 ± 3.65	5.32 ± 0.61	48.49 ± 4.48	385.19 ± 5.74
FREDDA	14.37 ± 3.26	5.66 ± 0.62	50.30 ± 4.80	394.33 ± 6.11
CALDA	12.16 ± 3.45	5.64 ± 0.24	47.62 ± 4.90	378.04 ± 5.50

Anche nel caso dell'attività delle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9), riportata in Figura 3, non si ravvisano particolari differenze sebbene, anche in questo caso, potrebbe essere utile approfondire l'indagine valutando l'attività enzimatica attraverso metodiche spettrofotometriche basate sull'utilizzo di substrati specifici.

Figura 3. Analisi zimografica delle attività enzimatiche attribuite alle gelatinasi (MMP-2 e MMP-9). L'avvenuta attività enzimatica è evidenziata dalla presenza di bande bianche su sfondo blu. L'entità delle bande è proporzionale all'attività dell'enzima.



5. Conclusioni

L'applicazione di 3 tonalità di illuminazione LED nell'allevamento del broiler non ha determinato variazioni significative dei parametri zootecnici e delle performance produttive. Anche i parametri valutati sul tessuto muscolare del petto non hanno messo in evidenza cambiamenti che possano giustificare un'alterazione qualitativa del prodotto. Il dato di maggior interesse riguarda il profilo volatile caratterizzato su campioni di carne sottoposti a cottura e conservati. Questo approccio ha indicato un miglioramento, seppur molto lieve, della stabilità ossidativa dei campioni ottenuti dal gruppo "Luce Neutra". Questi cambiamenti del profilo volatile si associano generalmente anche a variazioni dell'aroma e del gusto dei prodotti alimentari, quindi sarebbe auspicabile la messa a punto di valutazioni sensoriali, basate soprattutto sull'organizzazione di panel test, allo scopo di approfondire meglio questo aspetto.

Anche l'indagine metagenomica sui campioni fecali e le valutazioni biochimiche su tessuto intestinale non hanno evidenziato variazioni significative; resta tuttavia da approfondire lo studio relativo all'indagine proteomica che potrebbe dare informazioni aggiuntive sull'effetto della luce

LED su metabolismi specifici, contribuendo alla selezione di una tonalità di luce rispetto ad un'altra. Nel complesso quindi, i risultati ottenuti dall'utilizzo dell'illuminazione LED nell'allevamento del broiler hanno confermato non solo una produzione qualitativamente in linea con gli elevati standard aziendali, ma più sostenibile sia da un punto di vista economico che ambientale, essendo il LED una tecnologia con minor impatto sui consumi e quindi sul rilascio di CO₂.

Prodotti della ricerca:

F. Bennato, A. Ianni, C. Martino, L. Grotta, G. Martino. **Evaluation of Chemical Composition and Meat Quality of Breast Muscle in Broilers Reared under Light-Emitting Diode.** *Animals* 2021, Volume 11, Issue 6, 1505.

Andrea Ianni, Francesca Bennato, Marco Di Domenico, Martina Colapietro, Cesare Cammà, Giuseppe Martino. **Effects of Light-Emitting Diode on the Gut Health of Poultry**

In fase di sottomissione alla rivista Poultry Science

PARTE B

Relazione finale riassuntiva delle attività svolte

Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali

Unità di Chimica Analitica (Prof. Dario Compagnone) Unità di Tecnologie Alimentari (Prof.ssa Maria Martuscelli)

7. **PREMESSA**.....pag. 14
8. **STATO DELL'ARTE**.....pag. 14
- a. Carnosina e anserina
 - b. Vitamina B3
 - c. Amine biogene
 - d. Ossisteroli
9. **MATERIALI E METODI**.....pag. 16
- a. Campioni
 - b. Carnosina e anserina
 - i. estrazione
 - ii. analisi cromatografica
 - c. Vitamina B3
 - i. estrazione
 - ii. analisi cromatografica
 - d. Amine biogene
 - e. Ossisteroli
 - f. Analisi dei composti reattivi all'Acido Tiobarbiturico (TBARs)
 - g. Analisi statistica
4. **RISULTATI**pag. 23
- 4.1 Andamento di Carnosina e Anserina
 - 4.2 Andamento della Vitamina B3
 - 4.3 Andamento delle amine biogene
 - 4.4 Andamento dei processi di ossidazione secondo gli indici convenzionali (analisi TBARs) e confronto con indici innovativi
5. **CONCLUSIONI**pag. 31
6. **BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO**.....pag.33

VALUTAZIONE DELLA SHELF LIFE DELLA CARNE DI POLLO CONFEZIONATA E REFRIGERATA, MEDIANTE MONITORAGGIO DI *MARKERS* OSSIDATIVI *NON CONVENZIONALI*

1. PREMESSA

Gli alimenti di origine animale possono contenere una serie di costituenti, di natura nutrizionale ed extra-nutrizionale, che agiscono sul benessere psicofisico e nella prevenzione delle malattie cronicodegenerative dell'uomo. Tali costituenti possono essere naturalmente presenti nei prodotti di origine animale oppure il loro contenuto e la loro biodisponibilità negli alimenti possono essere opportunamente modificati da interventi di tipo zootecnico, tecnologico o biotecnologico. Anche la fase di conservazione modifica la concentrazione dei biocomposti, così la loro determinazione può essere utilizzata per il monitoraggio del decadimento della qualità e per la determinazione della shelf life dei prodotti.

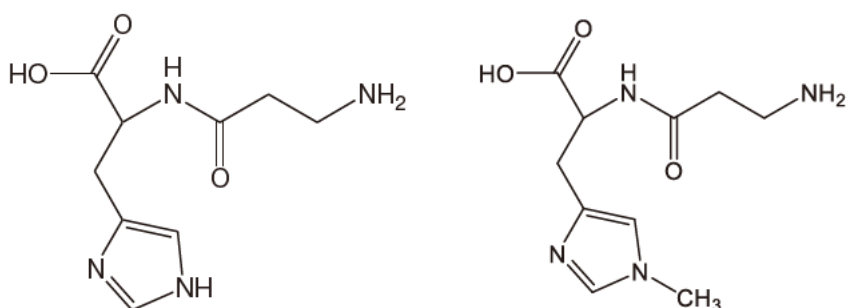
In linea con quanto previsto dal progetto, è stato svolto lo studio dell'effetto di tre diversi tipi di confezionamento (ATM, skin e stretch) sulla stabilità ossidativa e sulla qualità nutrizionale dei prodotti avicoli di diverso taglio in corso di conservazione alle condizioni commerciali (4°C).

Nel seguente studio sono considerati tre diversi tagli anatomici quali petto, coscia e sovracoscia. I metodi analitici sviluppati in tale lavoro sono stati utilizzati per il monitoraggio dei *markers* ossidativi non convenzionali (amine biogene, carnosina e anserina, Vitamina B3, ossisteroli), confrontati con i parametri convenzionali (TBARs), durante la *shelf-life* dei campioni (tempi di prelievo: 0, 3, 7, 15 gg).

L'attività che in totale ha permesso di analizzare circa 250 campioni (nel corso dello svolgimento del progetto, nel rispetto dei tempi previsti) ha permesso di fornire utili risultati rispetto ai parametri ricercati.

2. STATO DELL'ARTE

2.1 Carnosina e Anserina



La carnosina, un dipetide composto da b-alanina ed L-istidina; oltre alla carnosina vi sono molecole indicate dall'acronimo CRCs (*Carnosine Related Compounds*) tra cui l'anserina (b-alanil-1-metil-L-istidina) e l'omocarnosina (amminobutirril-c-L-istidina). I CRCs sono ampiamente presenti negli organismi vertebrati come uccelli, pesci e mammiferi, e particolarmente abbondanti nel cristallino, nel cervello (specialmente nelle vie olfattive primarie) e nella muscolatura scheletrica, ma non nel muscolo cardiaco dell'uomo. I tessuti dei mammiferi contengono carnosina ed anserina, mentre nei tessuti umani è presente solo la carnosina.

Figura 1: struttura chimica anserina e carnosina

La concentrazione di anserina e carnosina può differire tra le varie specie animali: nella carne di pollo l'anserina è il peptide più rappresentativo e viene trovata anche in quantità doppia rispetto alla carnosina. Il livello di anserina e carnosina dipende principalmente dall'età dell'animale al momento della macellazione, dai vari tagli anatomici considerati e dal sistema allevamento. La più alta concentrazione di carnosina viene trovata nel petto con un contenuto fino a sette volte maggiore rispetto ad altri tagli anatomici.

L'attività antiossidante dei CRCs è stata dimostrata da diversi studi in condizioni in vitro e viene esplicita attraverso differenti meccanismi; in particolare questi composti possono agire da *scavengers* nei confronti delle *Reactive Oxygen Species* (ROS) e radicali perossilici e da chelanti per metalli pro-ossidanti. L'attività antiossidante della carnosina viene esplicita anche grazie alla sua abilità di formare complessi con cationi metallici come Fe, Cu o Zn: è stato studiato come questa proprietà influenzi l'ossidazione lipidica catalizzata da questi metalli: in particolare è stato osservato come l'attività antiossidante della carnosina sia più elevata in caso di ossidazione catalizzata dal Cu rispetto al Fe. Questo potrebbe essere dovuto all'abilità della carnosina di formare complessi con il Cu che ne abbassano la reattività, a differenza del Fe dove il complesso formato con la carnosina non riduce in maniera significativa la sua attività pro-ossidante. L'efficacia di altri dipeptidi CRCs quali anserina e omocarnosina è stata dimostrata da diversi studi essere simile a quella della carnosina.

L'influenza sulla stabilità ossidativa delle carni dei CRCs è stata studiata da diversi autori, aggiungendo la carnosina come supplemento alla dieta degli animali; dagli studi effettuati riguardo l'ossidazione lipidica nella carne di pollo, si evince come l'implemento della carnosina nella dieta migliori effettivamente la stabilità ossidativa della carne, con un effetto dipendente dalla concentrazione. Per questi motivi ulteriori studi e ricerche sono necessari per comprendere l'effettivo ruolo di questi peptidi a concentrazioni fisiologiche nella stabilità ossidativa dei prodotti carnei.

2.2. Vitamina B3

La Niacina conosciuta come vitamina B3 è uno dei nutrienti fondamentali. Essa comprende acido nicotinico e nicotinammide, insieme ad altre forme enzimatiche. La nicotinammide adenina dinucleotide (NAD) e la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADP) sono due forme distinte di vitamina B3 e sono principalmente coinvolte nella produzione di energia da proteine alimentari, carboidrati e grassi. Un'insufficienza della niacina nella dieta può causare la malattia della pellagra, la quale è caratterizzata da sintomi come diarrea, dermatite e demenza.

Gli enzimi contenenti NAD e NADP possono agire da *scavenger* di radicali liberi, proteggendo i tessuti da danni ossidativi. La vitamina B3 svolge dunque un ruolo essenziale in un gran numero di reazioni redox e, in combinazione con altri composti, possono influenzare lo stato ossidativo degli alimenti.

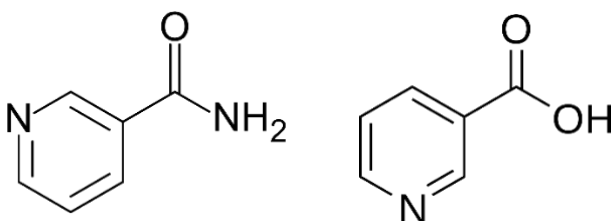


Figura 2. struttura chimica nicotinammide e acido nicotinic

La carne di pollo presenta un significativo contenuto di vitamine del gruppo B come tiamina, riboflavina e niacina. Il suo contenuto può variare dipendentemente da diversi fattori, quali la dieta dell'animale, lo stress *pre-mortem*, l'età, il sesso o l'esercizio fisico. In particolare, il petto è una fonte ricca di vitamina B3; 100 g di petto di pollo forniscono il 63% del PRI della niacina. Nella carne il contenuto di niacina è prevalentemente sotto forma di nicotinammide ed è questa la forma utilizzata per la fortificazione degli alimenti. Mentre nei tessuti vivi la nicotinammide è una componente dei co-enzimi NAD e NADP, nella carne si trova anche nella sua forma libera a causa dell'idrolisi post morte del NAD.

Diversi autori in letteratura hanno studiato e riportato la presenza della vitamina B3 in diversi tagli di

pollo, sia di carne bianca che di carne scura, provenienti da animali allevati in diverse aree geografiche; in tutti i casi considerati è stata riscontrata una maggiore concentrazione delle vitamine nel petto (carne bianca) rispetto a coscia e sovracoscia (carne scura). Questi risultati vengono confermati dal "USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27", dove viene riportato il petto avere una quantità doppia rispetto agli altri tagli considerati.

2.3 Amine biogene

Le amine biogene sono bio-composti naturalmente prodotti dal metabolismo cellulare di tutti gli esseri viventi (Martuscelli et al., 2021). La loro attività è fondamentale per la regolazione di innumerevoli processi cellulari e trasmissione neuronale. Questi composti comprendono una ampia lista di molecole, tra cui alcuni neurotrasmettitori (catecolamine come dopamina, serotonina e altre). Molte amine, oltre che essere proprie del metabolismo, possono essere introdotte attraverso il consumo di alimenti e di nutrienti. Nonostante la loro natura ubiquitaria, la presenza di queste è più comune nelle matrici proteiche, e in tutti i prodotti fermentati. La differenza tra amine e poliamine è di natura chimica; in queste ultime sono presenti due gruppi aminici invece che uno. Le amine biogene derivano da reazioni di trans e/o aminazione di aldeidi e chetoni o, più comunemente dall'attività catalitica dell'enzima decarbossilasi di alcuni batteri specialmente GRAM (-). L'azione di questo enzima è di eliminare il gruppo carbossile degli amminoacidi. Dunque, a seconda dell'amminoacido di partenza le amine sono divise in alifatiche, aromatiche ed eterocicliche (Doeum et al., 2017). Le poliamine sono una classe specifica di amine come putrescina, spermina e spermidina. Queste ultime sono molto abbondanti in quanto sono coinvolte nel rinnovamento cellulare (soprattutto dell'epitelio intestinale), svolgono importanti azioni antiossidanti e strutturali (Muñoz-Esparza et al., 2019). Nelle cellule adulte e in quelle ad alto rinnovamento cellulare, spesso la formazione endogena non è sufficiente e l'integrazione attraverso l'alimentazione si rivela fondamentale. In ogni caso, molte amine come istamina, tiramina e triptamina, possono rivelarsi pericolose per la sicurezza degli alimenti avendo possibili gravi effetti sulla salute umana; in particolare per istamina e tiramina sono riconosciute sintomatologie specifiche e sono normati dei limiti in Europa e in molti altri paesi del mondo. Al di là delle implicazioni sulla salute umana, le amine biogene, se analizzate in un indice complessivo che ne segua l'evoluzione nel tempo, possono rivelarsi utili per comprendere la qualità nutrizionale e sensoriale di alimenti e contribuire sensibilmente alla sicurezza alimentare. Non mancano esempi di questo tipo per matrici come il pesce (Mietz e Karmas 1957) alcune bevande (Loret et al., 2005) (birra) e formaggi (Ma et al., 2021).

2.4 Ossisteroli

Molti autori (ad esempio, Soriano e altri 2013) hanno dimostrato che il livello di colesterolo nella dieta non è correlato alla concentrazione di colesterolo nel sangue, così come correlazione tra forme ossidate di colesterolo e aterosclerosi. Le irregolarità dell'endotelio sono causate da residui di acidi grassi ossidati nei chilomicroni, che possono essere prodotti da alcune reazioni che si verificano nell'intestino o essere una conseguenza della presenza di ossisteroli nella dieta. Gli ossisteroli nelle lesioni aterosclerotiche includono principalmente 27OH e 7K (la loro concentrazione è circa l'1% del colesterolo presente nell'organismo), in misura minore anche 7OH. La maggioranza degli ossisteroli nel plasma si presenta come forma esterificata (Brown 1999). Una dieta contenente alimenti o prodotti preelaborati sono potenzialmente la più grande fonte di lipidi ossidati; Carne, prodotti lattiero-caseari e cereali vengono ossidati durante la lavorazione e lo stoccaggio, e i fattori che influenzano l'ossidazione dello sterolo includono: ossigeno, luce, temperatura elevata, tempo di riscaldamento, radiazione, presenza di acidi grassi insaturi, acqua, enzimi, ioni metallici (ad esempio, Fe, Cu, Co, Mg, Ni), coloranti naturali (ad esempio clorofilla), radicali liberi, condizioni di imballaggio e conservazione (Johnson 1996; Hur e altri 2007; Derewiaka e Obiedzinski 2009). Visti così tanti fattori influenti, il contenuto dei SOP nei prodotti dello stesso tipo può variare quindi notevolmente.

3. MATERIALI E METODI

Nei primi mesi di attività progettuale, sono stati messi a punto i metodi per valutare la presenza di ossisteroli, amine biogene e poliamine, di-peptidi (carnosina e anserina), Vitamina B3. Per tutti i metodi si è proceduto alla determinazione dei parametri analitici relativi agli standards puri e in sistemi modello; successivamente i metodi sono stati opportunamente validati su carne di pollo di diversi tagli. Infine, sono stati esaminati i campioni confezionati, nel corso della conservazione refrigerata.

3.1. Campioni

I campioni impiegati per lo studio, sono stati:

- fusi con osso e pelle (POLLO 10+)
- sovracosce con osso e pelle (POLLO 10+)
- petto a fette (POLLO 10+)

Le carni, ricevute direttamente dall'azienda produttrice, sono state conservate a +4°C e campionate a diversi tempi di conservazione. I tagli anatomici analizzati, coscia, petto e sovra-coscia, sono stati prelevati dal loro incarto ai tempi: T₀, T₃, T₇ e T₁₅; rispettivamente appena ricevuti, dopo 3 giorni di conservazione, dopo 7 giorni e dopo 15 giorni. Le tipologie di incarto indagate sono state: PACKAGING IN ATMOSFERA MODIFICATA (MAP) (CO₂:O₂ 70%:30%), STRETCH PACKAGING (incarto consistente in un vassoio di polistirolo e pellicola plastica) e SKIN PACK (sottovuoto).

Per quanto riguarda il tipo di film utilizzato per il LID, le specifiche sono riportate in tabella sotto:

Thickness 28 µm DIN 53370 (average)
Recommended sealing range 115 - 155 °C Südpack Test
Total weight 28 g/m² ISO 2286-2
Tensile strength (MD) >120 N/mm² ISO 527-3
Tensile strength (TD) >120 N/mm² ISO 527-3
Elongation at break (MD) >150 % ISO 527-3
Elongation at break (TD) >100 % ISO 527-3
Haze <6 % ASTM D 1003
Clarity >90 % ASTM D 1003
Total transmission >90 % ASTM D 1003
Shrink >15 % Südpack Test [90°C]
Oxygen-permeability < 15 cm³/m² d bar 23°C 50 % r.F. DIN 53380
Width s.order mm SPO +1
Reel length s.order m SPO

La composizione dei gas all'interno delle confezioni dei campioni è stata monitorata durante il periodo di osservazione (15 gg) mediante lo strumento Dansensor CM9900.

Al momento del prelievo, sono stati selezionati e porzionati e conservati (a -40°C) fino ad analisi. I campioni di pollo sono stati trattati con le procedure di seguito descritte, per l'estrazione e l'analisi dei diversi marcatori di interesse.

3.2 Anserina e Carnosina

3.2.1 Estrazione

Dopo la rimozione di tessuto connettivo e grasso 0.5±0,05 g di pollo sono stati pesati in una falcon da 15 ml e aggiunti di 5 mL di acido tricloroacetico 0.07% e omogeneizzati con Ultraturrex per 1 minuto. Dopo

centrifugazione a 4000 rpm per 15 minuti 2 mL di surnatante sono stati recuperati e centrifugati a 10000 rpm per 15 minuti. Dopo diluizione 1:20 con fase mobile, 20 µL sono stati iniettati nel sistema cromatografico.

3.2.2 *Analisi cromatografica*

L'analisi cromatografica è stata condotta con sistema HPLC Perkin Elmer series 200 equipaggiato con autocampionatore, pompa e detector UV VIS. La colonna utilizzata per la separazione è stata Agilent Zorbax Bonus RP 3.5µm, 4.6x150 mm. La fase mobile utilizzata è stata 10 mM tampone acetato 5% acetonitrile acido 5 mM octansulfonico. La corsa isocratica ha una durata di 10 minuti al flusso di 1 mL/min e con detector settato alla lunghezza d'onda di 124 nm.

3.3 **Vitamina B3**

3.3.1 *Estrazione*

Dopo la rimozione del tessuto connettivo e grasso 0.5±0.05 g di pollo sono stati pesati in una falcon da 15 mL e aggiunti di 4,5 mL di HCl 0.1 M, omogeneizzati con Ultraturrax per 1 minuto e posti in bagno termostato a 100°C per 1 h. Dopo raffreddamento il pH è stato portato a 4-4.5 con sodio acetato 2.5 M e sono stati aggiunti 0.5 mL di enzima taka-diasiasi 10%. Dopo un'incubazione di 3 h a 48°C i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti. Il surnatante è stato recuperato e portato a volume fino a 5 mL. Dopo ulteriore centrifugazione a 4°C gradi 10000 rpm per 5 minuti e diluizione 1:20 con fase mobile, 20 uL sono stati iniettati nel sistema cromatografico.

3.3.2 *Analisi cromatografica*

L'analisi cromatografica è stata condotta con sistema HPLC Perkin Elmer series 200 equipaggiato con autocampionatore, pompa e detector UV VIS. La colonna utilizzata per la separazione è stata Luna Omega Polar 3 um 4,6x150. Le fasi mobili utilizzate sono state: A (acetato di ammonio 0.01 M; metanolo 0.01 %) B (metanolo). Il gradiente utilizzato è stato lineare variando A da 100% a 30 % in 30 minuti. La lunghezza d'onda utilizzata è stata 260 nm.

3.4 **Amine biogene**

Sui campioni di alimenti solidi o liquidi sono state determinate le amine biogene, come indice di qualità igienico-sanitaria dei prodotti; in particolare, sono state ricercate le poliamine (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina), oltre ad amine aromatiche (feniletilamina) ed eterocicliche (istamina, tiramina e triptamina).

La valutazione qualitativa della presenza o meno degli analiti è effettuata mediante il confronto tra i tempi di ritenzione e la mappa spettrale dei picchi delle amine presenti nelle soluzioni dei campioni e dei campioni fortificati con quelli relativi a soluzioni standard di riferimento a concentrazione nota delle amine biogene derivatizzate e risolte cromatograficamente, nelle stesse condizioni dei campioni.

La valutazione quantitativa delle amine biogene riscontrate nei campioni è condotta utilizzando curve di calibrazione costruite mediante il metodo dei minimi quadrati e ottenute dalle soluzioni standard derivatizzate e risolte cromatograficamente nelle stesse condizioni dei campioni.

L'accuratezza del metodo è stata stabilita allestendo prove di recupero fortificando campioni con quantità note delle ammine biogene indagate putrescina, cadaverina, spermidina e spermina), ottenendo i recuperi (mediamente compresi tra il 90 e il 100% per tutti gli analiti di interesse).

La precisione del metodo, valutata mediante prove di ripetibilità ed espressa come la deviazione standard relativa dei replicati (inferiore al 5% per tutte le ammine).

Con il rivelatore a serie di diodi è possibile valutare l'omogeneità di picco e identificare e confermare i componenti.

La linearità della risposta strumentale è stata verificata (tra 1 e 20 ppm per tutte le amine in oggetto).

Il limite di rivelazione è stato calcolato sui campioni fortificati per un rapporto S/N pari a 3 (putrescina, cadaverina, spermidina e spermina: 2.0 mg/kg).

Reagenti analisi HPLC:

- Standard: putrescina, cadaverina, spermina e spermidina, feniletilamina, istamina, tiramina e triptamina. (Fluka)
- soluzione di Acido Tri-Cloro Acetico (TCA) al 5%
- KOH o NaOH 1N
- soluzione di NaHCO₃ satura
- soluzione di Dansilcloruro (10 mg DC /mL di acetone)
- NH₃ 30% (Carlo Erba)
- Acetonitrile per HPLC, Acqua per HPLC
-

Apparecchiature per analisi HPLC:

- Colonna Spherisorb S3ODS Waters C18-2 (3 μ m, 150 mm x 4,6 mm ID), con precolonna Spherisorb Waters S5ODS-2.

Condizioni cromatografiche:

- flusso: 0,8 mL/min
- gradiente lineare di acetonitrile (solvente A) e acqua (solvente B) come segue: 0-1 min, 35% B isocratica; 1-5 min, 35-20% B lineare; 5-6 min, 20-10% B lineare; 6-15 min, 10% B isocratica; 15-18 min, 35% B lineare; 18-20 min, 35% B isocratica.
- loop: 10 μ L

Estrazione acida delle amine

- Tagliare il campione in piccoli pezzi; eventualmente conservare a -20°C)
- omogenizzazione
- Pesare 2g di campione omogenizzato (annotare il peso)
- 3.bis aggiungere soluzione STD (solo per campioni fortificati)
- Estrarre in ultraturrax 1 min;
- Centrifugare 10 min a 8000 rpm.
- recuperare il surnatante in un matraccio tarato da 50 mL.
- Aggiungere al residuo solido 20 mL di acido tricloroacetico al 5%.
- Estrarre in ultraturrax 1 min.
- Centrifugare per 10 min a 8000 rpm.
- Recuperare il surnatante nel matraccio da 50 mL contenente il campione ottenuto al passaggio 6.
- Portare a volume (50 mL) con acido tricloroacetico al 5%.
- Filtrare prima di derivatizzare.

In questa prima fase si ottiene l'estratto acido dei campioni. Gli estratti acidi sono stabili fino a tre giorni a 4°C.

Derivatizzazione dell'estratto acido

- In un matraccio tarato da 5 mL aggiungere 0.5 mL di estratto acido.
- aggiungere 150 μ L di NaHCO₃ saturo e aggiustare a pH pari a 11.5 ± 0.01 con NaOH 1N.
- Aggiungere 2mL di soluzione di dansilcloruro (20 mg/ 2 mL di acetone); la soluzione di dansilcloruro in acetone dev'essere preparata fresca per ogni analisi; inoltre deve essere protetta dalla luce fino al momento dell'utilizzo.
- Trasferire la miscela in incubatore a 40°C per 60 min sotto agitazione (195 strokes).
- Aggiungere 200 μ L di ammoniaca (NH₃ 30 %) (Carlo Erba).
- Sostare per 30 min a T_{amb} ed al buio.
- Portare a volume (5 mL) con acetonitrile per HPLC.

- Filtrare il surnatante (filtri Whatman in PTFE, 0.22 μm).

In questa seconda fase si ottiene il campione pronto per l'analisi HPLC. I campioni per l'analisi HPLC, conservati a -20°C in vials di vetro ambrato (max 1 settimana) fino ad analisi HPLC.

3.5 Ossisteroli

Per l'analisi di ossisteroli è stato impiegato un metodo UHPLC-MS/MS (già usato in matrice alimentare) per il quale è stato messo a punto un metodo *ad hoc* per carne di pollo.

Le analisi sono state effettuate con l'ausilio di uno spettrometro di massa Sciex QTrap 4500, uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo con trappola ionica lineare, operante in modalità Multi Reaction Monitoring (MRM), operante in modalità ESI positiva. Per la corsa cromatografica è stato utilizzato uno Shimadzu Nexera LC20, la colonna utilizzata è stata una Kinetex XB C18 100x2.1mm impaccata con particelle da 2.6 μm . È stato sviluppato un metodo di analisi per la determinazione dei seguenti ossisteroli:

- 22(R)-Hydroxycholesterol;
- 25(S)-Hydroxycholesterol;
- 24(R)-Hydroxycholesterol;
- 27(S)-Hydroxycholesterol;
- 20d-Hydroxycholesterol;
- 19(R)-Hydroxycholesterol;
- 7 β -Hydroxycholesterol;
- 7 α -Hydroxycholesterol;
- 4 β -Hydroxycholesterol;
- 6 α -Hydroxycholesterol;

Inizialmente sono stati ottimizzati i parametri MRM iniettando tramite siringa una soluzione in metanolo alla concentrazione di 100 ng/mL per ogni analita, di essi sono stati ottimizzati i seguenti parametri: declustering potential (DP), entrance potencial (EP), collision energy (CE), collision exit potencial (CXP). I parametri sono riportati in tabella. Gli analiti presentano tutti le stesse transizioni MRM ed inoltre vengono prodotti 2 diversi ioni precursore a 385 m/z e 367 m/z, questo ci ha portato a focalizzarci nella separazione cromatografica. Sono state provate diverse colonne con fasi stazionarie diverse, la migliore in termini di ritenzione e separazione cromatografica sono state due colonne con particelle C18: una Kinetex Luna OMEGA C18 100x2.1mm impaccata con particelle da 1.6 μm e una Kinetex XB C18 100x2.1mm con particelle da 2.6 μm ; la seconda colonna è risultata la scelta migliore perché ci ha permesso di avere una separazione cromatografica equiparabile alla Luna OMEGA utilizzando un flusso di fase mobile, per la Luna il flusso utilizzato è stata 0.3 mL/min mentre per la XB il flusso utilizzato è stato 0.6 mL/min, questo ci ha permesso di dimezzare il tempo di analisi avendo comunque una buona separazione cromatografica, inoltre particelle più grandi di diametro ci hanno permesso di iniettare un volume più grande di campione (siamo passati da 3 μL a 8 μL).

Tabella 1. Nella tabella sono riportati i parametri MRM ottimizzati.

ID	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
OXI+	385,5	367,3	19,5	8	20	14
OXII+	385,5	109,1	19,5	8	30	5
OXV+	385,5	159,0	19,5	8	35	6
OXVI+	385,5	161,0	19,5	8	30	13
OXIII	367,6	158,9	15,3	6	31	12
OXIV	367,6	147,0	15,3	6	29	13
OXV	367,6	161,1	15,3	6	30	6

OXVI	367,6	133,0	15,3	6	40	13
OXDII	374,6	159,1	12,0	5	34	8
OXDII	374,6	147,0	12,0	5	33	9
OXDIII	374,6	213,0	12,0	5	35	8
OXDIV	374,6	172,8	12,0	5	35	12
OXDI+	392,6	374,6	12,2	5	22	11
OXIV+	392,6	159,1	12,2	5	35	12

In contemporanea sono stati comparati vari gradienti cromatografici per migliorare la separazione degli analiti, e sono state valutate anche diverse composizioni di fasi mobili. Di questi la migliore composizione di fase mobile è stata H₂O 25mM HCOOH per la fase A e ACN/MeOH 80/20 25mM HCOOH, che permette sia un'ottima separazione cromatografica aumentando considerevolmente la ionizzazione tramite aggiunta di ioni H⁺ ai nostri analiti, mentre il gradiente migliore è riportato in figura 1, e il cromatogramma risultante è riportato in figura 2.

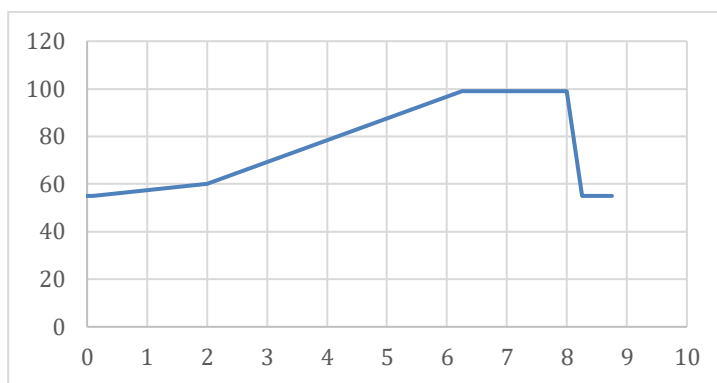


Figura 1. Nella figura è riportato il gradiente utilizzato

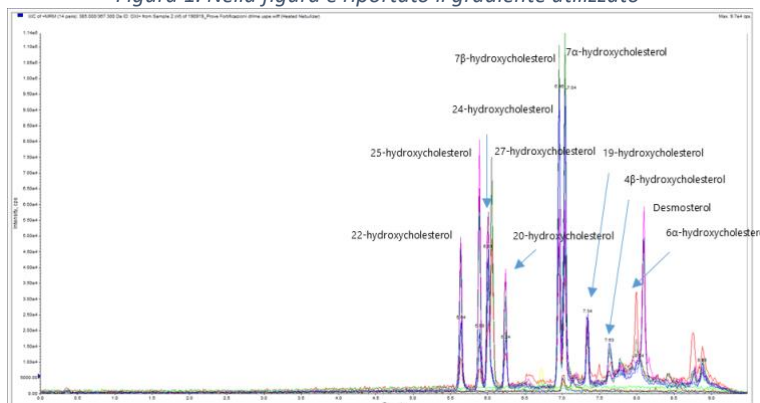


Figura 2. Il cromatogramma riporta tutti gli analiti presenti nel metodo

Finito con a ottimizzazione strumentale si è passati a sviluppare una metodica di estrazione e clean up, vista la natura estremamente lipofila dei composti la scelta migliore è stata un'estrazione in cloroformio, allo scopo di migliorarne l'efficienza è stato provata sia un'estrazione assistita da bagnetto ad ultrasuoni che da agitatore orbitale, quest'ultimo è risultato essere il migliore metodo come riportato in figura 3. L'estrazione viene eseguita nella seguente maniera: 1 g di campione viene messo in 100mL di H₂O milliQ e omogenizzato tramite frullatore, usando 3 cicli da 7 secondi di rotazione delle lame così da non scaldare troppo il campione, di questo vengono prese 3 differenti aliquote da 300μL e posti in eppendorf, aggiunto lo standard interno (7β Hydroxysterol-d₇) a cui vengono aggiunti in rapporto 1:1 con il campione 300μL di MeOH e 300μL di CHCl₃, la soluzione viene quindi passata al vortex e messa in agitatore orbitale per 30 min, dopo di che vengono aggiunti 300μL di CHCl₃ e il campione viene rimesso per 30 minuti in agitatore, infine vengono aggiunti 300μL di H₂O milliQ e fatto un ultimo ciclo da 30 min di agitatore. Le eppendorf

vengono quindi centrifugate a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C e prelevata la porzione di CHCl₃, ed infine portata a secco con N₂. Il campione viene risospeso in 112 µL una soluzione precipitante contenente ACN/MeOH/H₂O in proporzioni 60/15/25, prelevata la surnatante si porta al volume di 200 µL, e si carica in cartuccia µSPE per il clean up del campione.

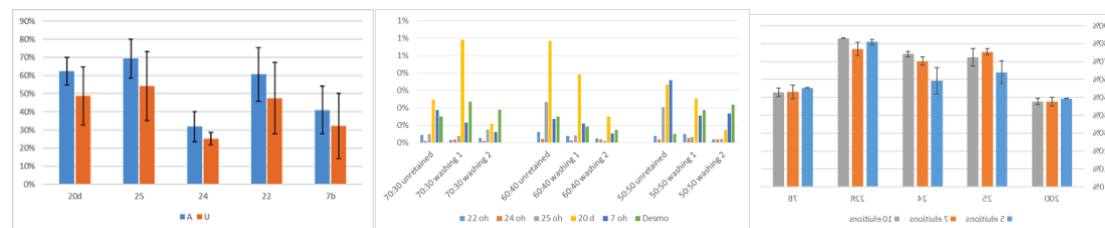


Figura 3. Possiamo vedere la comparazione dei due metodi di estrazione (a); le ottimizzazioni dei parametri di clean up di carico e lavaggio (b); ed infine i recuperi in soluzione modello (c)

Anche a procedura di clean up è stata ottimizzata, in particolare le condizioni di condizionamento, carico ed eluizione. Per il clean up sono state utilizzate delle micro tips OMIX C18, i recuperi delle condizioni ottimali sono riportate in figura3. Le tips µSPE ci permettono di effettuare sia un clean up che aggiungere un fattore di concentrazione al metodo di estrazione. La procedura si effettua con il seguente protocollo:

1. Attivazione con ACN 200µL x 5 volte;
2. Condizionamento con una soluzione al 53% di soluzione precipitante e 47% di H₂O x 5 volte;
3. Carico del campione x 5 volte;
4. Lavaggio con 100 µL di H₂O x 3 volte;
5. Eluizione con 50 µL di fase mobile B x 7 volte;

L'eluato viene poi depositato in una vial da 250 µL e posto nell'autocampionatore. I campioni vengono successivamente quantificati mediante il metodo dello standard interno tramite il software Multiquant (Sciex).

3.6 Analisi dei composti reattivi all'Acido Tiobarbiturico (TBARS)

La determinazione delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) è stata effettuata seguendo la metodica riportata da Soyer et al., (2010), con opportune modifiche.

La carne macinata (25 g) è stata omogeneizzata in 125 mL di acqua bidistillata per circa 2 minuti. 5 mL sono stati prelevati e trasferiti in tubi Falcon da 15 mL, dopo filtrazione con carta da filtro.

1.5 mL di filtrato è stato aggiunto a 3 mL di soluzione contenente acido tricloroacetico (15%, w/v) e acido tiobarbiturico (80 mM) in HCl 0.25 N. A seguito di centrifugazione (2000 rpm per 5 minuti), per precipitare le proteine, 3 mL sono stati trasferiti in tubi di vetro e mantenuti ad una temperatura di 40°C per 90 minuti in bagnetto termostato. Infine, dopo filtrazione con filtri da 0,45 µm, l'assorbanza è stata determinata ad una lunghezza d'onda di 532 nm tramite spettrofotometro UV-vis (Lambda Bio 20, Perkin-Elmer). Sono state effettuate due misurazioni per ogni campione (dati espressi come media ± deviazione standard).

La curva di calibrazione è stata costruita utilizzando una soluzione di 1,1,3,3-tetraetossipropano (Sigma-Aldrich, ≥ 96%) in metanolo, in un intervallo di concentrazione tra 0,625 e 20 µM.

3.7 Analisi statistica

Tutte le determinazioni sono state fatte in triplo e le medie e le relative deviazioni standards sono state calcolate. L'analisi di varianza (ANOVA) è stata svolta per valutare l'effetto significativo delle variabili (tagli, imballaggi, tempo); le differenze significative ($p < 0.05$) sono state valutate con il test delle minime differenze significative (LSD test). L'analisi statistica è stata effettuata usando il software XLSTAT versione 2019-1 per Microsoft ex-cell (Addinsoft, New York, NY, USA). Per la discriminazione dei campioni è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali PCA (*Principal Component*

Analysis) utilizzando la macro di *Excel* XLSTAT.

4. Risultati e Discussioni

Secondo quanto previsto dal progetto, sono state condotte prove preliminari su campioni ad inizio e fine conservazione, al fine di individuare i migliori indici non convenzionali, per valutare la qualità della carne di pollo diversamente confezionata e refrigerata.

Tale sperimentazione ha dimostrato che nel corso della conservazione a +4° dopo 15 giorni (shelf life indicata, a livello commerciale, dall'azienda), per tutti i tagli considerati e per le tre tipologie di imballaggio oggetto dello studio, gli indici più significativi, correlabili alla shelf life, erano:

- amine biogene e poliamine
- anserina e carnosina
- Vitamina B3

Le prove sugli ossisteroli sono state abbandonate. Comunque, in linea con gli obiettivi del progetto, la sperimentazione eseguita e riportata al paragrafo 3.5 del presente report, ha permesso la messa a punto e ottimizzazione di un metodo per la ricerca di tali analiti in carne di pollo e matrici alimentari simili.

Dunque, la sperimentazione è proseguita solo sull'osservazione di di-peptidi (anserina e carnosina) Vitamina B3 e amine biogene, di cui erranno di seguito riportati i dati ottenuti, in confronto alla valutazione del decadimento della qualità correlata all'ossidazione mediante gli indici convenzionali (analisi TBARs).

Inoltre, al fine di poter correlare i risultati ottenuti con le condizioni ambientali dei campioni, sono stati considerati utili i risultati relativi alla composizione dei gas all'interno delle confezioni di tipo *Stretch* e *MAP* (vedi tabella sotto).

tempo	FUSO STRETCH		FUSO ATM		COSCIA STRETCH		COSCIA ATM		PETTO STRETCH		PETTO ATM	
	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
0	20,1	0,9	79,1	19,1	20,0	0,7	79,8	18,9	18,0	1,1	70,3	19,6
0	19,3	1,1	77,9	18,5	19,7	0,9	77,6	18,1	18,4	0,7	69,9	20,1
0	19,8	1,1	78,3	19,7	19,2	0,9	79,6	19,3	18,1	0,6	70,0	20,0
1	19,4	1,3	78,0	20,1	19,1	1,4	78,2	20,2	18,9	1,2	70,1	19,6
1	19,4	1,4	77,8	19,6	18,9	2,0	78,9	19,0	19,0	1,9	69,9	21,3
1	19,0	1,9	78,5	19,1	19,3	1,6	77,0	19,3	18,6	1,7	69,5	21,1
4	18,8	1,8	77,5	18,3	16,7	3,3	77,0	18,7	18,9	2,1	69,5	27,1
4	18,6	1,7	72,8	18,4	17,2	3,2	71,3	17,9	17,1	2,0	69,4	26,5
4	18,8	1,8	70,0	16,7	17,8	2,7	72,6	17,0	18,1	2,3	69,0	27,3
5	18,0	2,5	75,9	20,4	16,7	2,8	74,3	20,2	17,6	2,4	69,3	26,2
5	17,5	2,7	76,4	19,2	16,5	2,5	70,1	19,5	17,5	2,2	69,2	27,0
5	17,8	3,1	75,4	20,1	17,1	2,8	74,9	20,3	17,0	2,7	69,6	27,3
6	19,1	2,3	71,8	19,0	16,8	2,9	73,6	19,0	16,8	3,0	68,6	25,9
6	17,6	3,0	72,6	19,9	16,2	2,3	72,0	19,4	15,9	2,5	68,0	25,4
6	18,7	2,6	72,2	20,6	18,4	2,6	72,6	20,3	16,6	2,6	69,1	28,2
8	17,3	3,1	71,2	21,6	17,0	2,5	72,0	20,9	14,7	2,5	66,5	28,8
8	17,2	2,5	71,9	21,8	17,3	2,4	71,7	21,8	14,5	2,7	67,9	26,1
8	17,8	2,3	73,6	22,5	16,2	3,0	71,7	22,2	15,2	2,9	68,6	27,3
11	12,6	4,4	70,0	24,0	14,6	2,8	68,5	24,6	11,0	3,5	68,8	27,0
11	13,3	4,1	69,2	24,3	15,4	3,0	68,2	23,7	12,6	3,9	70,9	26,6
11	13,7	4,4	68,2	24,6	11,9	4,1	68,4	25,0	11,8	3,8	69,3	27,4
12	6,9	4,8	65,0	26,0	7,0	5,3	65,3	26,2	11,3	4,5	68,4	27,0
12	3,5	5,4	64,1	26,8	9,9	4,2	65,7	26,3	11,8	4,9	67,4	28,2
12	3,4	5,6	63,2	25,3	12,1	4,0	63,1	25,9	10,9	4,8	67,4	26,6
13	3,0	5,9	63,3	24,9	10,9	4,1	62,9	25,9	8,8	5,0	69,9	26,9
13	2,4	6,1	64,5	24,1	6,2	5,4	64,1	23,9	7,9	5,1	70,2	25,2
13	4,2	6,3	58,2	21,2	5,4	5,1	59,0	21,7	8,2	4,9	66,2	26,3
14	0,9	4,2	51,3	21,3	11,5	3,7	58,1	21,9	4,9	6,9	65,7	27,6
14	2,4	6,8	57,1	20,1	15,8	3,0	55,5	19,9	5,0	6,5	68,7	25,9
14	2,2	6,8	65,7	26,3	1,6	5,4	56,6	26,0	4,4	6,5	67,2	28,1
15	1,9	7,2	64,2	26,7	2,7	6,1	57,8	26,2	3,8	7,2	69,1	26,7
15	2,2	6,5	65,4	27,1	2,2	6,8	58,9	26,6	3,0	7,5	69,9	26,3
15	2,1	6,4	65,1	26,7	1,9	7,0	54,1	26,4	4,0	6,0	67,4	26,1

Tabella 2. Composizione dei gas (CO₂ e O₂) nelle confezioni dei campioni esaminati, durante la fase di conservazione refrigerata.

1. 1 Andamento della Anserina e Carnosina

Nella tabella 3 vengono riportati i valori di anserina e carnosina all'inizio della shelf-life (t0) ottenuti dai campioni considerati.

Tabella 3. Valori di anserina e carnosina a t0

t0	Anserina			Carnosina		
	Conc (mg/100 g)	Dev st	CV %	Conc (mg/100 g)	Dev st	CV %
Dru_SK	332.97	44.33	13.31	81.05	17.37	21.43
Dru_MA	344.49	40.47	11.75	76.73	11.49	14.97
Dru_ST	310.28	1.33	0.43	73.70	5.51	7.47
Bre_SK	1073.34	142.69	13.29	193.07	54.78	28.37
Bre_MA	1001.67	139.00	13.88	144.96	25.29	17.45
Bre_ST	922.70	131.85	14.29	157.03	27.43	17.47
Leg_SK	296.07	12.55	4.24	54.02	4.92	9.11
Leg_MA	284.01	23.81	8.38	53.58	5.72	10.68
Leg_ST	298.43	26.09	8.74	57.49	4.45	7.74

In tutte le tipologie di carne di pollo, la concentrazione di anserina è risultata maggiore rispetto alla carnosina, confermando l'anserina come il dipeptide CRCs più rappresentativo, con una concentrazione fino a 10 volte maggiore, come già ampiamente riportato in precedenti studi. I valori ottenuti differiscono sensibilmente per i diversi tagli anatomici analizzati: in particolare è stato riscontrato un contenuto maggiore nel petto (BRE) per entrambi i dipeptidi rispetto alla sovracoscia (DRU) e alla coscia (LEG), in accordo con gli studi presenti in letteratura. Una possibile spiegazione potrebbe essere dovuta alla diversa composizione dei muscoli, nonché al diverso metabolismo: i muscoli pettorali (fibra bianca) contengono principalmente fibre glicolitiche a contrazione rapida (tipo IIB), mentre la coscia contiene fibre ossidative a contrazione lenta (fibra rossa, tipo I). Le fibre di tipo IIB generano ATP mediante fermentazione anaerobica del glucosio in acido lattico a causa della limitazione dell'apporto capillare per fornire ossigeno, quindi, ha una contrazione rapida ed è facilmente affaticabile a causa dell'accumulo di acido lattico. Le fibre di tipo I hanno un buon apporto capillare per un efficiente scambio di gas e un'elevata mioglobina. Pertanto, sono costruiti per il metabolismo aerobico hanno una contrazione lenta e sono altamente resistenti alla fatica. Poiché uno dei ruoli biologici dei CRCs è fungere da tampone regolando il pH che diminuisce a causa dell'accumulo di acido lattico, questa loro attività può spiegare perché è stata riscontrata una maggiore concentrazione nel muscolo pettorale in cui si verificano comunemente alti livelli di metabolismo anaerobico.

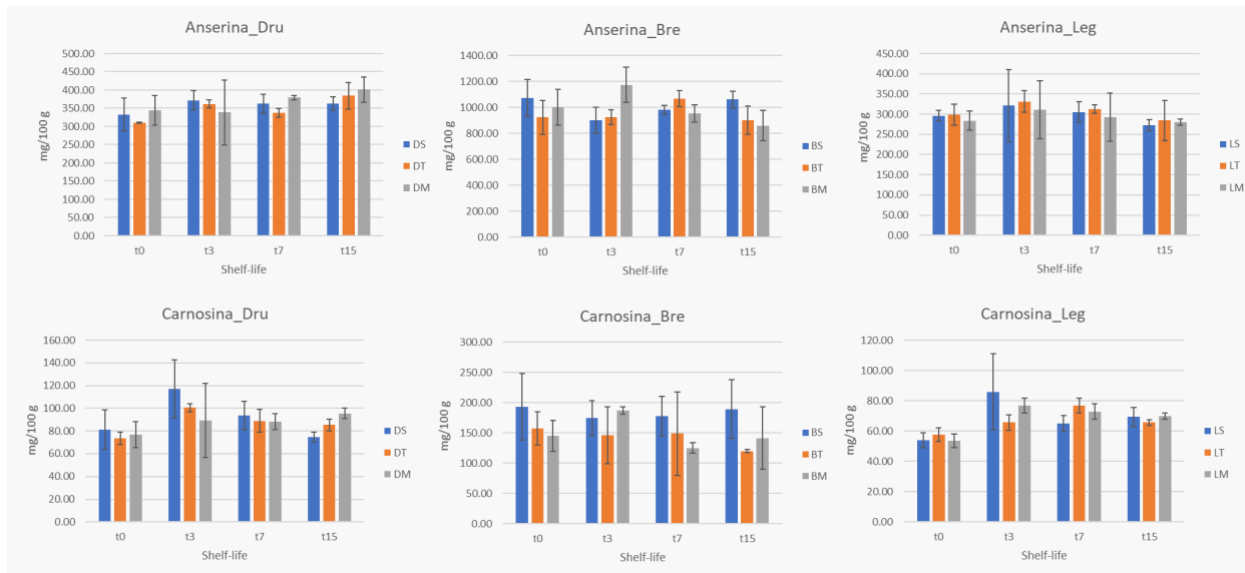


Figura 3. Andamento di Anserina e Carnosina durante la *shelf-life* dei campioni.

L'andamento dei dipeptidi durante la *shelf-life* viene riportato nella figura 2, per i tagli BRE, DRU e LEG. Le tre tipologie di carne considerate hanno mostrato una risposta simile da parte dei due analiti di interesse: rispetto ai valori iniziali (t0), è stato registrato un aumento della concentrazione di anserina e carnosina a tempi intermedi (t3 e t7) con un successivo decremento alla fine della *shelf-life* (t15), raggiungendo valori simili rispetto a quelli iniziali. Nonostante il differente *range* di concentrazione riscontrato nei diversi tagli anatomici, è stato ottenuto lo stesso andamento per l'evoluzione di anserina e carnosina, come confermato dal rapporto C/A che rimane pressoché costante durante tutta la *shelf-life*. L'unica eccezione in questo senso è rappresentata dai campioni LEG, per i quali è stata riscontrata un maggiore decremento di anserina rispetto alla carnosina, con un conseguente incremento del rapporto C/A. Tuttavia, alla luce dei risultati ottenuti, il contenuto dei CRCs all'interno dei campioni considerati, pur subendo delle variazioni durante lo stoccaggio refrigerato, non presenta delle variazioni significative alla fine della *shelf-life*.

4.2 Andamento della Vitamina B3

Nella figura 4 viene riportato l'andamento della vitamina B3, considerando l'inizio della *shelf-life* (t0), tre (t3), sette (t7) e quindici (t15) giorni di stoccaggio a temperatura refrigerata; anche in questo caso sono state considerate le stesse tipologie di campioni, ovvero tre diversi tagli di carne in tre differenti tipologie di packaging. Per l'analisi della vitamina B3 è stata considerata soltanto la nicotinammide, essendo la forma più significativa e maggiormente presente all'interno dei prodotti carnei.

In accordo con gli studi presenti nella letteratura, i valori di nicotinammide rilevati differiscono in maniera significativa per i diversi tagli anatomici considerati: nello specifico la quantità maggiore di vitamina B3 è stata riscontrata nel petto (BRE) seguita dalla coscia (LEG) e sovracoscia (DRU), con un quantitativo due volte maggiore nei campioni di petto. Questi risultati sono in accordo con precedenti studi presenti in

letteratura, secondo i quali la maggior quantità di vitamina B3 sia presente nei tagli di carne chiara (tra cui il petto) piuttosto che in tagli di carne scura, tra cui coscia e sovracoscia.

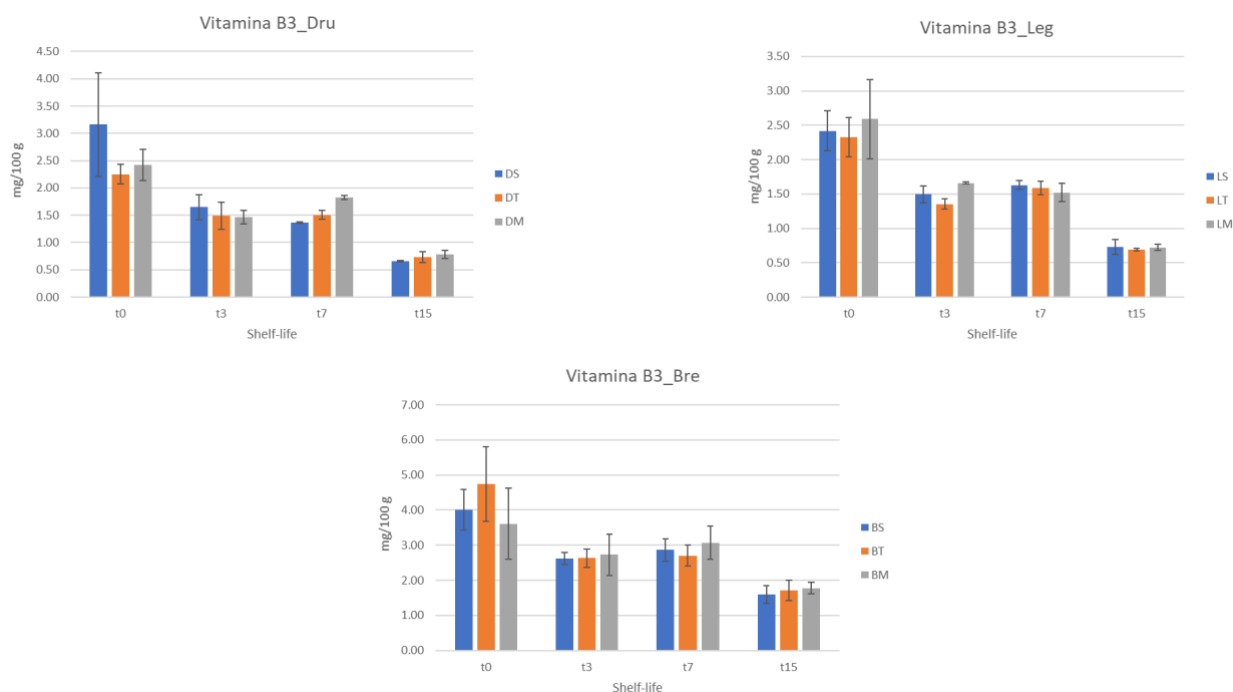


Figura 4. Andamento Vitamina B3 durante la *shelf-life* dei campioni.

Nonostante le differenze in termini di concentrazione iniziale riscontrate nei diversi campioni, il livello della nicotinammide durante lo stoccaggio ha seguito un andamento simile, non mostrando variazioni significative dopo sette giorni, mentre un decremento considerevole è stato riscontrato alla fine della *shelf-life* per tutti i tagli considerati. Nei campioni di petto è stato riscontrato un decremento maggiore per il packaging classico con O₂ rispetto ai packaging senza ossigeno (MAP e s/v); tuttavia, questo comportamento non è stato confermato dai campioni LEG e DRU non confermando la Vitamina B3 come *marker* di ossidazione della carne di pollo.

4.3 Andamento delle amine biogene

Come precedentemente illustrato, le amine biogene (AB) sono bio-composti che durante la vita commerciale di una materia prima e/o prodotto trasformato, vanno incontro a meccanismi di ossidazione, o transaminazione o altre reazioni.

Le analisi condotte hanno mostrato risultati incoraggianti rispetto alla possibilità di utilizzare un indice complessivo di AB per controllare lo stato qualitativo di diversi tagli di carne avicola in differenti packaging. Generalmente, i risultati denotano l'alta qualità della materia prima; i campioni di tutti gli imballi e tagli ai tempi T₀ e T₃, o non contengono quantitativi preoccupanti di AB o ne hanno tracce

comunque imputabili al metabolismo endogeno. Seguendo l'evoluzione di queste molecole, si possono notare differenze già a partire dai campioni T₃ nella capacità dei diversi imballi di conservare i diversi tagli. Per seguire al meglio l'evoluzione di questi composti, in seguito all'analisi delle singole AB nei diversi campioni, è stato costruito un indice che mettesse insieme quelle che più aumentavano nel tempo e che avessero una potenziale incidenza sulla salute dei consumatori. L'indice BAI INDEX (BI) contempla

$$\text{BAI INDEX (BI)} = \text{putrescina} + \text{cadaverina} + \text{istamina} + \text{tiramina}$$

Amine come spermina e spermidina non sono state inserite in questo indice essendo distribuite in tutti i campioni anche al T₀ vista la natura (carne di pollo) caratterizzata dalla presenza di queste amine a prescindere dallo stato di conservazione/ossidativo (Bogusławska-Tryk et al., 2020). Grazie a questo indice siamo stati in grado di discriminare che l'imballaggio più protettivo per tutti i tagli risulti essere il MAP. Si può anche notare come i tagli coscia e sovracoscia (LEG, DRU) siano nettamente più ricchi in AB probabilmente per la presenza della pelle. L'imballaggio più sfavorevole per l'evoluzione di AB è lo *stretch* per il quale l'accumulo di AB inizia ad essere visibile già nei campioni T₃. Bisogna sottolineare che comunque in tutti i campioni analizzati entro i 7 giorni la quantità in ppm di AB è minore o compresa ro 50 ppm, che potenzialmente non rappresentano un rischio conclamato per il consumatore. In figura 4 sono riportati i grafici relativi al contenuto di AB in ppm riferiti al (BI) per i diversi imballi e tempi.

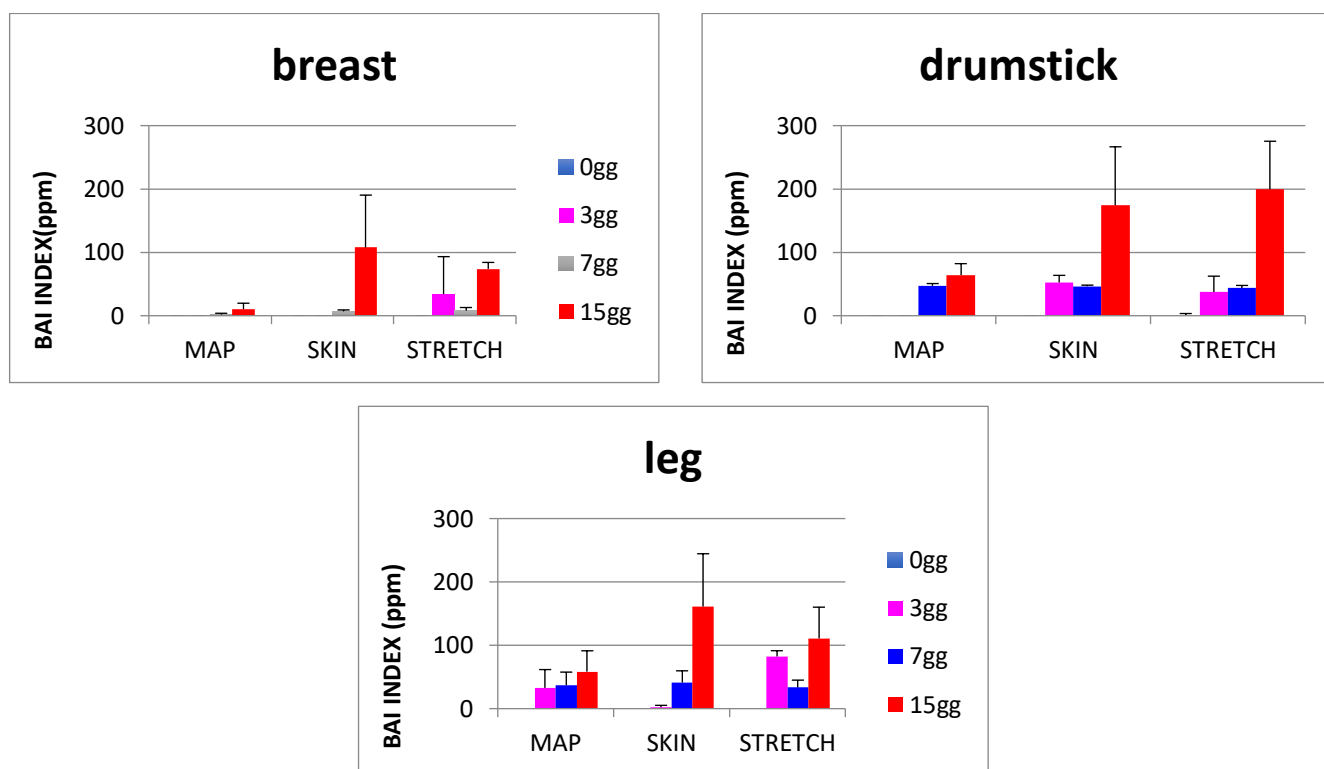


Figura 5 Livelli di amine biogene, (BI index, ppm) per tempo e taglio

4.4 Andamento dei processi di ossidazione secondo gli indici convenzionali (analisi TBARs) e

confronto con indici innovativi

Il saggio TBARs, come atteso, permette una correlazione diretta rispetto al tempo di conservazione. Per tutti gli imballi la malondealdeide (ppm) è aumentata nel tempo. Si può notare che l'imballo più protettivo rispetto a questa analisi è risultato essere lo skin (sottovuoto), come atteso, essendo l'ossidazione un fenomeno strettamente dipendente dalla presenza di O₂. Allo stesso modo si spiega un avanzamento più spinto della reazione per quei tagli la cui presenza di grassi è maggiore (LEG, DRU). Considerando come soglia di accettabilità il contenuto minore o uguale a 1 ppm di malondealdeide (Rahman et al., 2015), i contenuti nei campioni di LEG e DRU conservati in MAP risultano essere inaccettabili già dopo 7 giorni (range: 1.20-1.25 ppm) e lo stesso si verifica per i campioni in STRETCH. I campioni di petto in tutti gli imballi risultano più protetti essendo questo taglio molto meno ricco di lipidi. Da questa breve descrizione si può capire quanto il saggio TBARs non permetta di discriminare bene l'evoluzione di specifici composti. La malondealdeide reagisce infatti con diversi prodotti di ossidazione che possono anche derivare da altri fenomeni ossidativi. A dimostrazione di quanto affermato, il fatto che in campioni simili per composizione (LEG, DRU) i valori TBARs siano paragonabili per imballaggio e tempo.

L'analisi statistica multivariata dei dati ha dimostrato un'alta correlazione fra ossidazione e contenuto di amine biogene in tutti i campioni esaminati (vedi figura 5)

Tuttavia, lo studio effettuato nel corso della sperimentazione prevista dal progetto, ha dimostrato che il solo indice convenzionale TBARs potrebbe essere insufficiente a descrivere i fenomeni di alterazione della qualità, in particolare per le confezioni in MAP.

Infatti, *l'indice non convenzionale BI* che si propone alla luce di tale sperimentazione, sembra in grado di definire con più precisione le criticità che si possono presentare nell'andamento della qualità di un prodotto come la carne di pollo di diversi tagli e diversamente confezionata. In particolare, i risultati ottenuti evidenziano come nel corso della conservazione refrigerata dei prodotti in MAP, le condizioni dell'ambiente-confezione vengono leggermente modificate (vedi tabella 2) per O₂ e CO₂. In ogni caso, i prodotti imballati in MAP sono in presenza di alte concentrazioni di CO₂.

Ciò potrebbe inibire le reazioni biochimiche di decarbossilazione catalizzate da enzimi aminobiogenici, enzimi esogeni (appartenenti al microbiota presente nella carne al momento del confezionamento, che possono essere attivi anche dopo la lisi cellulare dei microrganismi).

Il confezionamento in MAP, pertanto, sembrerebbe inibire la presenza di amine biogene, che sono:
a) un indice indiretto di decadimento della qualità (correlato a fenomeni microbiologici); b) un indice

diretto di qualità, dal momento che le amine biogene potrebbero causare fenomeni di tossicità, soprattutto se associati ad altri alimenti (e/o bevande) durante il consumo dei pasti, considerando anche la loro elevata stabilità alla cottura, le osservazioni rilevate dimostrano una maggiore stabilità del sistema MAP durante la conservazione di tutti i tagli considerati.

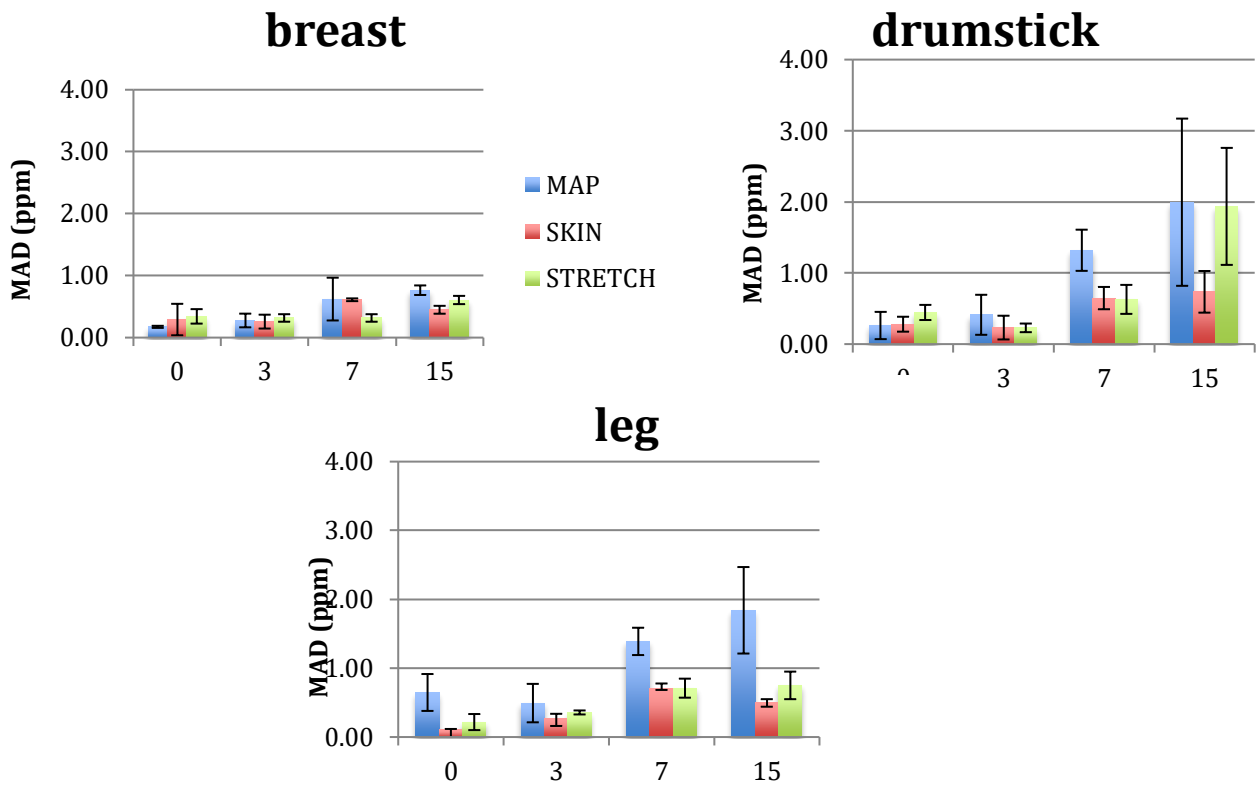


Figura 6 Livelli di malondialdeide (MAD, ppm) per tempo e taglio

5. Conclusioni

In conclusione si può affermare che la sperimentazione condotta, in linea con quanto previsto dal progetto, ha evidenziato che lo stato di ossidazione aumenta con il tempo di conservazione in tutti i campioni osservati, anche se il petto è il taglio in cui tale processo sembra avvenire più lentamente. Fra i nuovi indici su cui lo studio è stato focalizzato, si può anche asserire che il contenuto di di-peptidi (anserina, carnosina) e vit B3 rimane elevato fino al 3° giorno di conservazione, poi si riduce nel tempo, senza effetto significativo né del taglio, né del tipo di confezionamento.

Al contrario, i due indici che sono risultati avere maggiore correlazione con la shelf life dei campioni esaminati risultano TBARS (indice convenzionale) e BI (indice proposto, come previsto dal progetto). Nella fattispecie, dopo 7gg di conservazione refrigerata, l'aumento dell'ossidazione è osservato con gli indici convenzionali (TBARS) e con l'indice BAI, soprattutto in coscia e sovracoscia.

Tuttavia, lo studio effettuato nel corso della sperimentazione prevista dal progetto, ha dimostrato che il solo indice convenzionale TBARS potrebbe essere insufficiente a descrivere i fenomeni di alterazione della qualità, in particolare per le confezioni in MAP, mentre *l'indice non convenzionale BI*, sembra in grado di definire con più attendibilità la stabilità dei prodotti carnei confezionati.

Infatti, utilizzando tale indice BI, il confezionamento in MAP risulta avere un maggior effetto positivo sulla stabilità ossidativa e sulla qualità di tutti i tagli, dimostrando livelli bassi di amine biogene anche alla fine del periodo di osservazione (15gg); tale risultato contrasta con quanto evidenzia l'indice convenzionale relativo ai composti reattivi all'acido tiobarbiturico (TBARS), secondo il quale il confezionamento in skin mostra il maggior effetto protettivo verso la formazione di tali composti.

Pertanto, a conclusione di tale ricerca, l'indice BI può essere proposto alle aziende del settore come marcatore innovativo da usare in aggiunta a quelli convenzionali o comunque in confronto ad essi, per meglio definire la shelf life di carne di pollo confezionata e refrigerata, e di altri matrici similari in analoghe condizioni di conservazione.

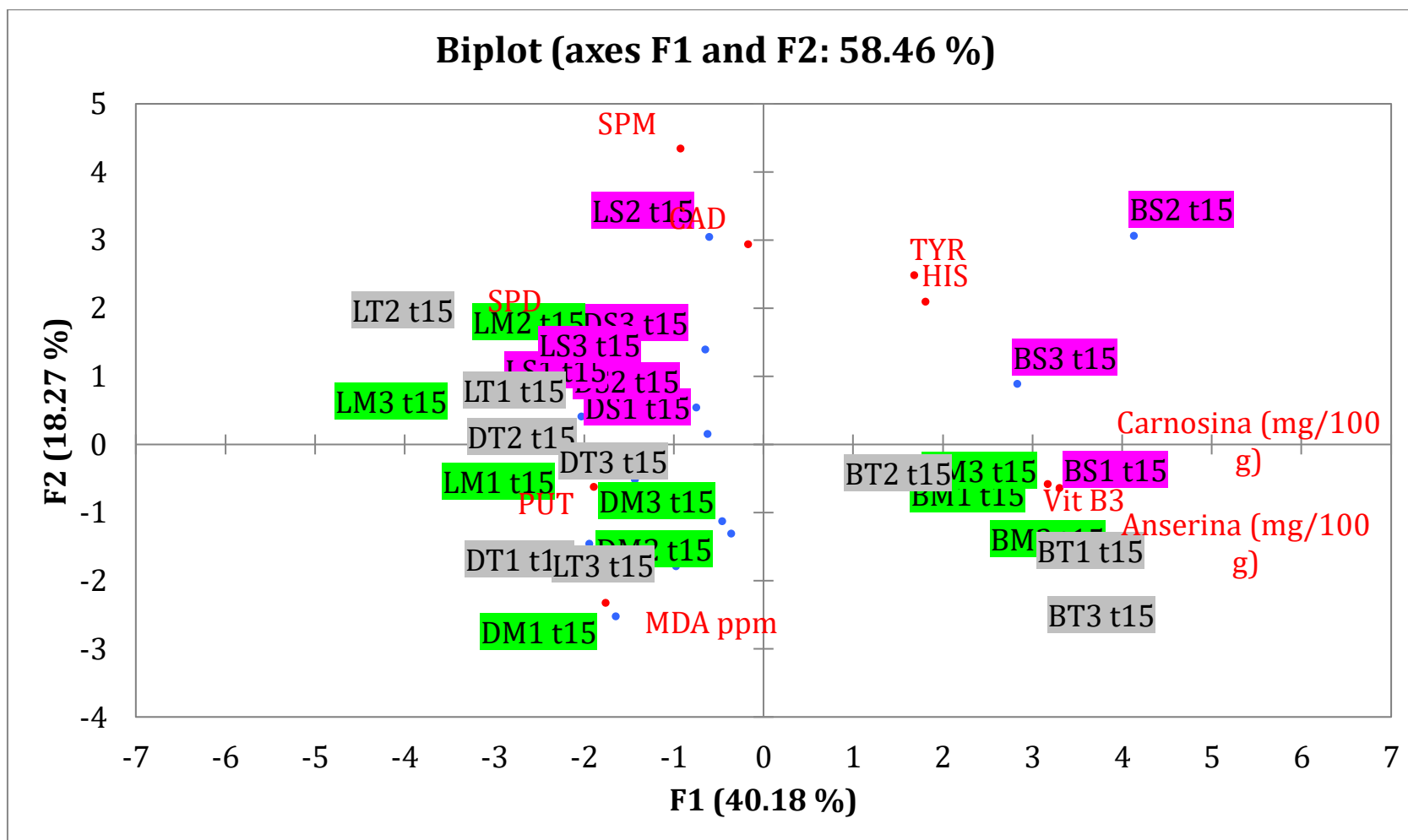


Figura 7. Analisi multivariata su tutti i dati osservati nel corso della sperimentazione del progetto (tutti itagli, tutti gli imballi, tutti i tempi).

Legenda: fucsia, SKIN; grigio, STRETCH; verde, MAP.

6. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO:

- Brown AJ, Jessup W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142(1):1–28.
- Chaves-Lopez C., Serio A., Montalvo C., Ramirez C., Pérez Alvares, J.A., Paparella A., Mastrocola D., Martuscelli M (2017). Effect of nisin on biogenic amines and shelf life of vacuum packaged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets". *Journal of Food Science and Technology*, 54(10), 3268-3277.
- Derewiaka D, Obiedzinski M. 2009a. Oxysterol content in selected meats and meat products. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 8(3):5–13.
- Derewiaka D, Obiedzinski M. 2009b. Determination of sterols and oxysterols in selected fruity yoghurts. *Bromat Chem Toksykol* 42(3):564–8
- Hur SJ, Park GB, Joo ST. 2007. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. *Food Control* 18(8):939–47
- Johnson CB. 1996. Isolation of cholesterol oxidation products from animal fat using aminopropyl solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 736(1–2):205–10
- Martuscelli M., Pittia P., Casamassima L.M., Manetta A.C., Lupieri L., Neri L. (2009). Effect of intensity of smoking treatment on the free amino acids and biogenic amines occurrence in dry cured ham. *Food Chemistry*, 116, 955-962.
- Soriano-Maldonado A, Cuenca-García M, Moreno LA, Gonzalez-Gross M, Leclercq C, Androutsos O, Guerra-Hernandez EJ, Castillo MJ, Ruiz JR. 2013. Egg intake and cardiovascular risk factors in adolescents: role of physical activity; the HELENA study. *Nutr Hosp* 28(3):868– 77.
- Bogusławska-Tryk M, Bogucka J, Dankowiakowska A, Walasik K, 2020 Small intestine morphology and ileal biogenic amines content in broiler chickens fed diets supplemented with lignocellulose; *Livestock Science* 241,104189
- Martuscelli M, Esposito L, Mastrocola D, 2021 Biogenic Amines' Content in Safe and Quality Food; *Foods* 10(1), 100
- Loret S, Deloyer P, Dandrifosse G, 2005 Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples *Food Chemistry* 89 (4) 519:525
- Ma J K, Raslan A A, Elbadry S, Rizk El-Ghareeb W, Mulla Z S, Bin-Jumah M, Abdel-Daim M M, Darwish W S. 2020 Levels of biogenic amines in cheese: correlation to microbial status, dietary intakes, and their health risk assessment, *Environmental Science and Pollution Research* 27, 44452–44459
- Muñoz-Esparza N C, Latorre-Moratalla M L, Comas-Basté O, Toro Funes N, Veciana-Nogués M T, Vidal-Carou M C, 2019 Polyamines in Food Food. *Frontiers in Nutrition* 6:108. doi: 10.3389/fnut.2019.00108
- Doeun D, Davaatseren M, Chung M S, 2017 *Food Science and Biotechnology*; 26(6): 1463–1474

Teramo, 25 giugno 2021

Firma del responsabile tecnico

Prof.ssa Maria Martuscelli

A handwritten signature in blue ink that reads "Maria Martuscelli". The signature is written in a cursive style with a large initial 'M' and a long, sweeping underline.