

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II

Tesi di Dottorato di ricerca in

Scienze e Tecnologie delle produzioni Agro-alimentari

XVIII ciclo

STUDIO DELLE POPOLAZIONI BATTERICHE DURANTE

LA CONSERVAZIONE REFRIGERATA DELLA CARNE

Relatore

Prof. Francesco Villani

Candidata

Federica Russo

Coordinatore

Prof. Salvatore Spagna Musso

INDICE

CAPITOLO 1	5
<i>INTRODUZIONE</i>	5
1.1 Composizione e valore nutritivo della carne cruda bovina	5
1.2 Modificazione della carne dopo la macellazione	8
1.3 Maturazione della carne	9
1.4 La qualità organolettica della carne cruda	11
1.5 Contaminazione batterica della carne cruda	13
1.6 Le alterazioni della carne cruda	15
1.7 La conservazione refrigerata della carne cruda	18
1.8 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata aerobicamente	23
1.9 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata sottovuoto	25
1.10 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata in atmosfera protettiva	26
Tabella 1	28
CAPITOLO 2	29
<i>2.1 INTRODUZIONE</i>	29
<i>2.2 MATERIALI e METODI</i>	31
2.2.1 Campioni di carne	31
2.2.2 Numerazione e isolamento delle microflore alterative	31
2.2.3 Isolamento e identificazione di <i>Brochothrix thermosphacta</i> e raccolta di bulk cellulari dalle microflore alterative	32
2.2.4 Estrazione del DNA	32
2.2.5 Analisi PCR-DGGE	33
2.2.6 Sequenziamento delle bande DGGE	34

2.2.7 Comportamento “in vitro” di <i>Brochothrix thermosphacta</i> in presenza di microflora alterative della carne	34
2.3 RISULTATI	35
2.3.1 Numerazione e isolamento dei microrganismi ricercati	35
2.3.2 Identificazione delle specie tramite PCR-DGGE	35
2.3.3 Comportamento di <i>Brochothrix thermosphacta</i> in presenza di <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> e LAB durante la conservazione aerobica a 5°C	36
2.4 DISCUSSIONE	37
Tabella 2	40
Tabella 2.1	41
Tabella 2.2	42
Figura 1	44
Figura 1.1	45
CAPITOLO 3	46
3.1 INTRODUZIONE	46
3.2 MATERIALI e METODI	48
3.2.1 Selezione di additivi food grade antimicrobici attivi contro le popolazioni alterative della carne cruda	48
3.2.2 Preparazione di film in polietilene (PE) ad azione antimicrobica contro le popolazioni alterative della carne cruda	49
3.2.3 Valutazione dell’attività antimicrobica del confezionamento attivo durante la conservazione di carne cruda confezionata sottovuoto	49
3.3 RISULTATI E DISCUSSIONI	50
3.3.1 Selezione di additivi food grade antimicrobici attivi contro i microrganismi alterativi della carne cruda	50

3.3.2 Attività antimicrobica di film PE attivati con soluzione di nisina contro le popolazioni alterative della carne cruda	51
3.3.3 Attività antimicrobica del confezionamento attivo durante la conservazione di carne cruda confezionata sottovuoto	52
Tabella 3	54
Tabella 3.1:	54
Tabella 3.2:	55
Figura 3	56
Figura 3.1	57
CAPITOLO 4	58
<i>4.1 INTRODUZIONE</i>	58
<i>4.2 MATERIALI E METODI</i>	59
4.2.1 Campioni di carne	59
4.2.2 Confezionamento in atmosfera protettiva di campioni di carne cruda bovina	59
4.2.3 Determinazione dello spazio di testa delle confezioni (O ₂ -CO ₂)	60
4.2.4 Determinazione del colore	60
4.2.5 Analisi microbiologiche	61
4.2.6 Isolamento e raccolta in bulk cellulari di popolazioni microbiche	61
4.2.7 Estrazione del DNA	61
4.2.8 Analisi PCR-DGGE	62
4.2.9 Sequenziamento delle bande DGGE	63
<i>4.3 RISULTATI E DISCUSSIONI</i>	63
4.3.1 Analisi qualitativa di campioni di carne cruda confezionata in atmosfera protettiva	63
4.3.2 Analisi microbiologica dei campioni di carne cruda bovina confezionati in atmosfera protettiva	66
4.3.3 Identificazione delle specie microbiche tramite PCR-DGGE	67

<i>4.4 CONCLUSIONI</i>	70
Tabella 4	72
Tabella 4.1	73
Figura 4	74
Figura 4.1	75
Figura 4.2	76
Figura 4.3	77
Figura 4.4	78
Figura 4.5	79
CAPITOLO 5	80
<i>CONCLUSIONI</i>	80
BIBLIOGRAFIA	83

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Composizione e valore nutritivo della carne cruda bovina

La carne è quella parte del corpo animale composta dai muscoli, dal grasso intramuscolare e intermuscolare e dal tessuto connettivo, dai vasi sanguigni e linfatici e dai nervi che vi sono compresi. Essa assume tale nome dopo la macellazione dell'animale e le susseguenti modificazioni chimico-fisiche (frollatura).

A volte con il termine carne s'intendono anche le frattaglie, che sono invece costituite da organi e tessuti (fegato, cuore, reni, ruminante-reticolo, omaso, abomaso e cervello) con caratteristiche molto diverse.

La carne costituisce una componente fondamentale dell'alimentazione umana in quanto rappresenta una delle principali fonti d'energia, soprattutto di proteine e di ferro. Meno importante il suo apporto di minerali e vitamine.

L'impiego della carne nell'alimentazione dell'uomo ha origini antichissime. La caccia, infatti, ha rappresentato un'importante fonte di cibo per le popolazioni primitive. Successivamente essa è stata integrata e quasi sostituita dall'allevamento degli animali che hanno dato origine alla moderna zootecnia.

La composizione chimica della carne, è molto variabile in funzione della specie, della razza, del singolo animale, dell'età, delle tecniche di alimentazione, allevamento, macellazione dell'animale e delle modalità di lavorazione, conservazione e distribuzione delle carni.

La carne fresca è costituita per circa tre quarti da acqua, e per un quarto circa da sostanza secca (costituita per il 70-90 % da sostanze azotate e in particolare da proteine).

Come tutte le proteine animali, anche le proteine della carne bovina hanno un'altissima digeribilità e un valore biologico superiore a quelle delle proteine di origine vegetale, anche se inferiore a quello delle proteine del latte e delle uova.

Le proteine più importanti sono certamente quelle miofibrillari (miosina, actina, tropomiosina e troponine) e quelle sarcoplasmatiche (gliceraldeide, aldolasi, creatina chinasi, mioglobina, ecc.) che costituiscono le fibre muscolari vere e proprie.

Le proteine, costituenti le fibre muscolari e il collagene, sono presenti nella carne in concentrazioni variabili (dal 16 al 22%), secondo il taglio considerato e la specie animale di provenienza. Sono definite “complete”, ossia presentano una composizione in aminoacidi essenziali e non essenziali simile a quella dell'organismo umano. Per quanto riguarda gli aminoacidi essenziali, è opportuno ricordare la presenza di aminoacidi ramificati (leucina, isoleucina, valina) in rapporto ottimale. Questi, oltre a essere un valido nutrimento per la fibra muscolare, intervengono nei processi biochimici alla base dell'equilibrio energetico (gluconeogenesi). Inoltre le proteine della carne, a differenza delle proteine provenienti da altre fonti alimentari, sono ben assorbite e utilizzate dall'organismo umano.

Rilevante è nella carne il contenuto in vitamine e, in particolare, in vitamine del gruppo B (B₁, B₂, B₆, B₁₂, PP, acido folico); non è invece presente la vitamina C, mentre le vitamine A e la D si trovano nelle interiora.

I glucidi (zuccheri) sono assenti nella carne, ad eccezione di un discreto contenuto di glicogeno (2%) nella carne di cavallo e nel fegato. Il glicogeno, che risulta fisiologicamente presente nei muscoli degli animali viventi, dopo la macellazione e durante la maturazione o frollatura, viene prevalentemente trasformato in acido lattico.

I lipidi (grassi), contenuti nella cosiddetta venatura e nello strato sottocutaneo (grasso di copertura) sono variabilmente contenuti in funzione dell'età dell'animale e delle modalità di

allevamento. In relazione al diverso tenore in grassi, il valore calorico della carne può variare da 110 a 300 Kcal per 100 g di parte edibile.

Il grasso è presente nella carne in tre forme distinte: come *grasso invisibile*, posto all'interno delle fibre muscolari, come *grasso di marezzatura*, costituito da piccoli depositi adiposi visibili all'interno del muscolo, e come *grasso intermuscolare*, disposto tra un muscolo e un'altro.

Tra i minerali sono soprattutto rappresentati il ferro, lo zinco, il rame, il fosforo, l'alluminio e il manganese, mentre tra i macrominerali le carni hanno un buon contenuto di fosforo, sodio e potassio e un discreto tenore di calcio, che sono particolarmente abbondanti nelle frattaglie, in particolare nel fegato e nel rene.

Dal punto di vista nutrizionale è ormai documentato che tutte le carni si equivalgono, anche se possono esistere differenze tra specie animali diverse e, nell'ambito della stessa specie, tra tagli diversi.

La carne bovina è caratterizzata da elevato contenuto proteico (circa il 20 % della parte edibile) e contenuto variabile in lipidi (2-8%) e acqua, in relazione all'età dell'animale da cui viene ricavata e al taglio considerato. La parte più pregiata, dal punto di vista commerciale, è il quarto posteriore (filetto, lombo, girello), ma dal punto di vista nutrizionale i vari tagli si equivalgono, purché sia confrontabile il contenuto lipidico. Sul prodotto finito e pronto per uso alimentare possono esserci sensibili differenze determinate dalle diverse cotture o dal tipo di condimenti utilizzati nella preparazione.

Nella tabella 1 viene riportata la composizione in nutrienti per le carni bovine (vitello e bovino adulto).

Grazie alle sue caratteristiche nutrizionali, la carne è consigliabile in qualunque periodo della vita e in particolare durante l'accrescimento. E' opportuno comunque ricordare che, a

somiglianza di quasi tutti gli alimenti di origine animale, anche nella carne sono presenti acidi grassi saturi, colesterolo e purine.

1.2 Modificazione della carne dopo la macellazione

Dopo l'abbattimento dell'animale, i muscoli vanno incontro ad una serie di cambiamenti biochimici e fisici.

L'irrigidimento cadaverico, o *rigor mortis*, compare dopo alcune ore dalla morte dell'animale, e consiste nell'esaurimento della disponibilità di ATP con conseguente irrigidimento del muscolo (formazione dell'actomiosina). In un primo momento l'ATP si può riformare a partire dalla fosfocreatina (PC) e attraverso la glicolisi anaerobia, ma con il passare del tempo la velocità di sintesi dell'ATP diminuisce per esaurimento delle riserve di glicogeno. La glicogenolisi si arresta infatti prima del consumo totale del glicogeno per inibizione delle fosforilasi in seguito all'abbassamento del pH. Questo da 7,3-7,5 passa, nel giro di qualche ora, a 5,3-5,5, sia per l'accumulo di acido lattico, che deriva dalla catabolizzazione del glucosio e glicogeno, sia per l'effetto acidificante dell'idrolisi dell'ATP da cui si liberano ioni fosfato e ioni idrogeno.

L'abbassamento del pH fino a tali livelli è temporaneo, perché successivamente aumenta fino a stabilizzarsi su valori di 5,6-5,8, grazie alla disponibilità di ioni calcio e sodio che si liberano per effetto della denaturazione delle proteine determinando la parziale neutralizzazione dell'acido lattico (Cappelli e Vanucchi, 1998).

La velocità della comparsa della rigidità cadaverica dipende, oltre che dalla temperatura ambientale, dallo stato di nutrizione dell'animale e dal grado di affaticamento al momento della morte, comparando più rapidamente in animali malnutriti e stressati.

Nel corso delle normali situazioni di manipolazione e trasporto al macello, nonché di attesa della macellazione, i bovini possono essere soggetti a fattori in grado di causare una

condizione di stress, concomitante ad una scarica di adrenalina che conduce ad una mobilitazione delle loro riserve energetiche e ad un depauperamento del glicogeno muscolare. La mancanza di quest'ultimo, immediatamente dopo la macellazione, condiziona negativamente l'inizio del *rigor mortis* ed impedisce il raggiungimento di un normale pH acido. A parte gli inconvenienti legati alla proliferazione microbica e quindi alla conservabilità del prodotto, la carne risulta di colore eccessivamente scuro e di aspetto nel complesso sgradevole (carni a taglio scuro).

In condizioni normali, vale a dire in assenza di stress, dopo la morte dell'animale, nel muscolo si verificano reazioni idrolitiche a carico dell'ATP con formazione di ADP, liberazione di un protone e conseguente abbassamento del pH (Valin, 1986). Per azione della fosfocreatina e del glicogeno muscolare avviene un processo di rifosforilazione e successiva defosforilazione con ulteriore acidificazione del substrato. Queste reazioni proseguono fintantoché le riserve di fosfocreatina e di glicogeno lo consentono e la diminuzione del pH non inibisce la via glicolitica. Pertanto, l'acidificazione e la velocità della stessa dipendono dalle reazioni idrolitiche a carico dell'ATP e l'intensità dell'abbassamento del pH è in funzione delle riserve di fosfocreatina e di glicogeno.

1.3 Maturazione della carne

Finché permane la rigidità cadaverica la carne non è adatta per l'alimentazione essendo dura e tigliosa. Questa si risolve, in un periodo più o meno lungo a seconda della temperatura ambiente, attraverso la cosiddetta maturazione o *frollatura*. Solo dopo tale processo, infatti, il muscolo diventa vera e propria carne alimentare.

L'animale, una volta ucciso e dissanguato, viene scuoiato, privato della testa e delle zampe, quindi suddiviso in mezzane poste in celle frigorifere a temperatura di 0-4°C, u. r. 75-88, per 10-14 giorni. In questo lasso di tempo le mezzane raggiungono la rigidità necessaria per

essere suddivise in quarti. Durante la maturazione, oltre ad un aumento graduale della tenerezza, si osservano altri cambiamenti che conferiscono alla carne un colorito più pallido, un sapore più gustoso e delicato, e una maggiore succosità.

La maturazione della carne durante la conservazione *post mortem* è stata e rimane uno dei mezzi fondamentali per migliorare la tenerezza, vale a dire la caratteristica organolettica più importante nel determinare l'accettabilità del prodotto da parte del consumatore.

Attualmente, per esigenze di commercializzazione, si adottano, a volte, tempi di maturazione eccessivamente brevi che non consentono alla carne di raggiungere la sua piena potenzialità qualitativa. D'altra parte non si può trascurare il fatto che, accanto agli aspetti positivi della frollatura, ci sono anche riscontri negativi, nel senso che l'allungamento dei tempi di conservazione può comportare modificazioni che riguardano il colore della carne. Ne deriva, quindi, l'interesse di individuare tecniche idonee al controllo del colore in relazione alla velocità di intenerimento.

Il meccanismo responsabile della maturazione della carne non è ancora completamente conosciuto, tuttavia si ritiene che la risoluzione dello stato di *rigor*, con proteolisi enzimatica delle proteine miofibrillari, fornisca il maggior contributo al processo di intenerimento della carne (Dutson, 1983; Goll *et al.*, 1983).

Tra le proteasi presenti nelle fibre muscolari, quelle Ca-dipendenti (CAF: Calcium activated factor) e le catepsine lisosomali sembrano le più interessate.

Le prime, o proteasi neutre, hanno un pH ottimale vicino a 7, tuttavia sono ancora attive a pH 5,5-5,8 (Greaser, 1986). Le catepsine lisosomali hanno un pH ottimale acido e quindi, se chiamate in causa nel processo di intenerimento, esplicano la massima attività quando il pH raggiunge il suo valore terminale (Grouse, 1988).

Le proteasi neutre sono state oggetto di recenti indagini. Mellgren (1980) riferisce l'esistenza di due forme di proteasi Ca-dipendenti: CDP-I, che richiede concentrazioni molto basse di Ca

per un'attivazione pari al 50%, e CDP-II che necessita di concentrazioni di Ca molto più elevate.

La velocità dei processi enzimatici è in funzione della temperatura (Valin, 1986) e la riduzione dell'intensità di raffreddamento migliora l'attività delle proteasi chiamate in causa nelle modificazioni *post mortem* (Moeller *et al.*, 1976; Dutson *et al.*, 1977).

L'età dell'animale influisce sulla maturazione, dal momento che essa è più veloce e più intensa nel giovane (Valin, 1986). Tale effetto è probabilmente legato all'evoluzione qualitativa a carico del collagene, il quale è implicato nei processi di frollatura.

1.4 La qualità organolettica della carne cruda

La qualità organolettica della carne viene generalmente valutata attraverso l'aspetto, la tessitura, la succosità e l'aroma.

I metodi, per valutare questi aspetti sono riconducibili sostanzialmente a due categorie: strumentali (o chimico- fisici) e sensoriali. Entrambi servono a misurare determinati parametri, che sono in relazione alle caratteristiche della carne. Li differenzia il mezzo impiegato per raggiungere lo scopo: nel primo caso si utilizzano strumenti più o meno complessi; nel secondo si impiega un piccolo gruppo di persone, selezionate e addestrate, che nell'insieme costituiscono lo strumento per misurare «oggettivamente» quei parametri che non possono essere compiutamente valutati con sistemi chimico-fisici.

Per definire l'aspetto della carne, il colore è un componente della massima importanza. Contribuiscono poi alla valutazione dell'aspetto la dimensione, la forma, la presenza e la disposizione del grasso, la finezza della «grana». Quest'ultimo attributo si situa nella zona di confine tra aspetto e tessitura, nel senso che la persona cerca, visivamente, di immaginare la tessitura del prodotto, che sperimenterà nel piatto, ad esempio già nel momento di tagliare la carne con il coltello (Hutchings, 1977). In realtà, integrando le impressioni su «grana» e

«colore», l'acquirente cerca di prevedere il principale attributo della carne cotta, cioè la tenerezza.

La tenerezza è una caratteristica qualitativa di importanza strategica che condiziona il giudizio globale sul prodotto. Essa dipende principalmente dalle variazioni a carico delle proteine miofibrillari, di quelle del tessuto connettivo, dell'acqua, nonché dalle loro interazioni con le modalità di cottura (Dransfield, 1981). Da un punto di vista percettivo, è una caratteristica legata essenzialmente alla «tessitura» della carne. I fattori che contribuiscono alla tessitura possono essere raggruppati in due categorie: quelli attribuibili al complesso actomiosina e quelli riferibili al tessuto connettivo. I primi sono in relazione soprattutto con le modificazioni successive alla macellazione e possono essere controllati con una opportuna gestione del trattamento termico della carcassa e del processo di maturazione,

La succosità è un aspetto qualitativo valutabile mediante l'analisi sensoriale, nella quale si può richiedere al panel un giudizio relativo alla sensazione di umidità percepita durante i primi atti masticatori (succosità iniziale) e alla persistenza di tale sensazione, dovuta alla quantità di fluido che si libera nel corso della masticazione (succosità prolungata). Essa dipende: dal contenuto in acqua della carne e dalla sua capacità di trattenerla; dal tenore in grasso che può agire come mezzo di lubrificazione e sulla succosità prolungata. Questa caratteristica organolettica è inoltre influenzata dall'aroma, in quanto la presenza di certi composti nella carne stimola un rapido rilascio di saliva che contribuisce all'impressione di succosità, nonché dalla tessitura. Quest'ultima condiziona la facilità con cui l'acqua viene rilasciata dalla carne nel corso della masticazione, fornendo pertanto un ulteriore contributo al determinismo della caratteristica in oggetto.

L'ultimo aspetto qualitativo che va considerato è l'aroma, cioè la complessa combinazione di attributi olfattivi e gustativi percepiti durante l'assaggio. Esso può essere influenzato da fattori come la tessitura, la temperatura, il pH, il metodo di cottura. Varie sensazioni si sviluppano

nella carne sottoposta all'azione del calore ed alla successiva masticazione per la liberazione di succhi aromatici e di sostanze volatili.

1.5 Contaminazione batterica della carne cruda

La carne costituisce un sistema alimentare molto complesso, con caratteristiche chimiche e chimico-fisiche tali da permettere la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero e varietà di microrganismi, soprattutto batteri, alcuni dei quali utili o indifferenti, altri indesiderati, sia patogeni che alterativi. Tipo e numero di microrganismi presenti sulla carne dipendono dall'azione combinata di numerosi fattori.

Naturalmente la carne possiede una microflora che è strettamente dipendente:

- dalla composizione chimica (75% acqua, 19% di proteine, 2,5% di lipidi e diverse altre sostanze come aminoacidi, peptici, nucleotidi e zuccheri);
- dall'ambiente in cui viene prodotta (condizioni di allevamento e macellazione);
- dalle condizioni di trasformazione, distribuzione, conservazione e consumo.

Dopo la macellazione, la contaminazione delle carcasse con microrganismi provenienti dalla pelle, dalle feci e dall'intestino dell'animale, così come dall'aria, dall'acqua, dal suolo, dagli operatori e dalle strutture di lavorazione, raggiunge livelli compresi fra 10^2 e 10^4 batteri/cm².

Le popolazioni microbiche che in genere contaminano la carne cruda consistono in una grande varietà di specie come *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacteriaceae*, batteri lattici, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus*, lieviti e muffe.

In seguito, il tipo di conservazione della carne determina una sorta di selezione della microflora che inizialmente contamina la carne stessa. Infatti, solo il 10% dei microrganismi che sono presenti sulla carne è in grado di crescere durante la fase di conservazione refrigerata e di questi solo una parte è capace di causare alterazione (Borch *et al.*, 1996).

La carne rappresenta anche un vettore di microrganismi patogeni, ossia dannosi per la salute umana, anche se la loro presenza deve considerarsi eccezionale in quanto gli animali subiscono visite ante e post mortem che permettono di escludere la commercializzazione di carni provenienti da animali malati. Tuttavia, è possibile che alcuni animali siano portatori sani a livello intestinale di batteri patogeni, i quali attraverso diversi meccanismi possono contaminare le carni.

Tra i patogeni più frequentemente coinvolti ricordiamo, i generi *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Yersinia* e altri batteri enterici. Questi microrganismi non sempre provocano alterazione della carne, ma risultano essere un pericolo per il consumatore, causando intossicazioni e tossinfezioni alimentari.

Le vie di contaminazione più comuni sono da ricercare durante le fasi di allevamento (animali infetti, mangimi ed acqua contaminati, inadeguate modalità di smaltimento di rifiuti e reflui), di macellazione (operazioni di rimozione delle piume o tegumenti) e di eviscerazione. Anche lo stress dell'animale durante un soggiorno prolungato e in condizioni di sovraffollamento nei recinti e nei macelli prima della macellazione, può determinare l'insorgenza di microrganismi patogeni.

Inoltre, in seguito alla macellazione, le carcasse calde e umide rappresentano un substrato ideale per la proliferazione dei patogeni. Queste, infatti, devono essere rapidamente raffreddate ad una temperatura di almeno 7°C. Dopo il raffreddamento le carcasse devono essere eventualmente trasportate ad altri stabilimenti per ulteriori trattamenti, o ai mercati, per la vendita (Grasso e Riparelli, 1995).

1.6 Le alterazioni della carne cruda

La carne, come un qualsiasi altro alimento, risulta alterata quando in essa avvengono trasformazioni sensibili a carico del colore, del sapore, dell'odore e del valore nutritivo. Le alterazioni sono essenzialmente di due tipi:

1. alterazioni chimico-fisiche
2. alterazioni biologiche

Le alterazioni della carne dovute a cause chimiche comportano modificazioni profonde a carico della sua composizione.

Ad esempio, il colore rosso della carne è legato alla presenza di un pigmento muscolare, la mioglobina, costituita da una parte proteica vera e propria, la globina, e da un anello porfirinico con al centro un atomo di ferro in forma bivalente. La mioglobina ha una grande affinità per l'ossigeno e si trasforma facilmente in ossimioglobina che conferisce alla carne fresca il tipico colore rosso vivo nelle parti esposte all'aria. In seguito a prolungata esposizione all'aria, il ferro bivalente della mioglobina si ossida a ferro trivalente e si ha la formazione di un nuovo pigmento, la metamioglobina, che conferisce alla carne una colorazione bruna o marrone. La presenza nel tessuto muscolare di sostanze riducenti (cisteina, metionina, glutatione) opera una riduzione della metamioglobina a mioglobina, ma persistendo le condizioni di ossidazione, i processi ossidativi aumentano e trasformano irreversibilmente l'anello porfirinico dando luogo a pigmenti giallo-verdi (Cappelli e Vanucchi, 1998).

La carne poco colorita, molle e sierosa (PSE, Pale-Soft-Exsudative) e la carne scura soda e dura (DFD, Dark-Firm-Dry) sono, invece, alterazioni della qualità dei muscoli.

La carne PSE si forma soprattutto in razze suine, in seguito a condizioni di strapazzo dell'animale durante il trasporto, prima della macellazione.

La carne DFD si forma invece quando, prima della macellazione la riserva di glicogeno del muscolo è scarsa a causa di una condizione di stress dell'animale. Pertanto, "post mortem", si può formare solo una piccola quantità di acido lattico. Il pH relativamente alto della carne DFD, scura, di non bell'aspetto, comporta una maggior capacità di legare l'acqua, ma anche una maggiore predisposizione al deterioramento.

Per quanto riguarda le alterazioni di natura microbiologica, queste sono le più frequenti, le più insidiose e le più difficili da controllare. Esse sono causate dall'attività di diverse specie di microrganismi presenti nella carne e nell'ambiente. Si tratta di batteri che esplicano la loro attività vitale utilizzando come fonte di energia tutte le sostanze nutritive (carboidrati, grassi, proteine, sali minerali, ecc) contenute nella carne trasformandole in composti più o meno sgradevoli e/o dannosi.

I fattori che influenzano la crescita microbica sono la temperatura, l'aw, il potenziale di ossido-riduzione, il pH, concentrazioni saline, la presenza di eventuali additivi, ecc (Zambonelli *et al.*, 1992).

Molta importanza ha la carica microbica iniziale presente nella carne cruda. Una contaminazione troppo spinta porta a rapide alterazioni della carne, contrastabili con le dovute attenzioni alle condizioni di igienicità e all'abbassamento della temperatura durante tutte le fasi di produzione e conservazione.

I microrganismi coinvolti appartengono al gruppo degli enterobatteri, *Lactobacillus*, *Alteromonas*, *Acinetobacter/Moraxella*, *Brochotrix* (Borch, *et al.*, 1996).

In seguito ad un deterioramento superficiale, la carne diventa untuosa e mucillaginosa, e si manifestano alterazioni dell'odore e del colore.

In aria la crescita di questi microrganismi dipende da componenti a basso peso molecolare presenti nella carne fresca (glucosio, glucosio-6-fosfato, ribosio, glicerolo, aminoacidi e

lattato) e l'alterazione della carne è il risultato del cambiamento di tali composti in altri che conferiscono odori e aromi sgradevoli.

Inizialmente la crescita dei batteri avviene sulla superficie della carne tramite la metabolizzazione del glucosio. Quando il glucosio viene esaurito avviene una diffusione all'interno del tessuto dove vengono degradati gli aminoacidi presenti.

Da questo tipo di metabolismo sono state rinvenute, nelle carni conservate all'aria, una serie di complesse miscele contenenti esteri, alcoli, composti solforati, amine, idrocarburi e chetoni.

In particolare, il genere *Pseudomonas* è responsabile della produzione di composti contenenti zolfo e putrescine da arginina e ornitina; *Brochothrix thermosphacta* ed *Enterobacteriaceae* formano catene ramificate di acidi e alcoli da aminoacidi e 2,3-butandiolo solo nella carne con pH normale. Inoltre, gli enterobatteri sono capaci di produrre la cadaverina dalla lisina (Stanley *et al*, 1981; Jay *et al*, 2003).

Studi scientifici dimostrano che *Brochothrix thermosphacta* cresce bene (10^7 UFC/cm²) in condizioni di anaerobiosi sulla carne fresca con pH > 5,8. A questo pH e in presenza di basse concentrazioni di glucosio, tale batterio produce iso-butanolo e acido iso-valerico causando odori putridi e fecali.

Al contrario in condizioni di pH basso e alta concentrazione di glucosio, si ha la produzione di acetoino, acido acetico, 2,3-butandiolo, 3-metilbutanolo, 3-metilpropanolo (Gardner, 1981). L'aggiunta del 2% di glucosio nella carne bovina cruda ha causato un decremento del pH e l'arresto dello sviluppo di melma e della microflora alterativa.

Le alterazioni dovute a temperature elevate (25°-40°C) provocano una putrefazione profonda nelle masse muscolari delle carcasse non tempestivamente refrigerate dopo l'abbattimento. Essa è dovuta allo sviluppo molto rapido di batteri anaerobi, essenzialmente di *Clostridium*, che provengono dal tratto intestinale degli animali. La moltiplicazione di tali batteri è dovuta

a una progressiva instaurazione di anaerobiosi in seguito ad un consumo dell'ossigeno residuo nelle prime 8-10 ore dalla morte dell'animale. Le carni scure o DFD provenienti da animali malandati, con un potenziale redox basso e un pH elevato facilmente si putrefanno in profondità (Ingram e Dainty, 1971).

In un secondo momento, la carne diviene maleodorante a causa della moltiplicazione di specie batteriche più anaerobiche come *Clostridium histolyticum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium oedemanties*. Tali microrganismi presentano infatti, una forte attività proteolitica determinando la liberazione di composti con odore ammoniacale o solfidrico decisamente sgradevole e la formazione di ammine da decarbossilazione che rendono pericoloso il consumo di queste carni, il cui aspetto e odore le porta ad essere rifiutate.

Un'altra alterazione della carne è l'inverdimento che deriva dall'azione di microrganismi produttori di perossido d'idrogeno o di idrogeno solforato, i quali formano pigmenti verdi a partire dalla mioglobina.

1.7 La conservazione refrigerata della carne cruda

Una corretta refrigerazione della carne migliora le sue qualità organolettiche, in quanto completa la fase di frollatura, ma soprattutto ostacola la moltiplicazione della microflora contaminante.

La direttiva CEE 64/433 e 69/349 oltre a richiedere che i macelli abbiano celle di refrigerazione sufficientemente grandi, stabiliscono che:

- La carne deve essere refrigerata immediatamente dopo l'ispezione post-mortem e tenuta ad una temperatura costante di non più di +7°C per le carcasse e i tagli, e non più di +3°C per le frattaglie;

- Gli impianti di sezionamento devono avere un'attrezzatura di raffreddamento nelle sale stesse di sezionamento per tenere la carne a una temperatura interna costante di non più di +7°C;
- Gli impianti di sezionamento devono avere al loro interno un termometro o teletermometro;
- Durante il sezionamento la temperatura della sala non deve superare i 10°C.

Dopo le fasi di macellazione dell'animale, le carcasse vengono dissosate, tagliate e confezionate con le seguenti tecnologie:

- in aria
- sottovuoto
- in atmosfera modificata o protettiva
- in active packaging

Il confezionamento in aria è il tipico confezionamento casalingo che consiste nel conservare in condizioni aerobiche in frigorifero la carne cruda appena acquistata. La shelf life della carne in questo caso è solo di alcuni giorni (2-5) e dipende fortemente da come le condizioni di allevamento, macellazione, trasporto ecc. abbiano influenzato il grado di contaminazione microbica della carne stessa.

Nel Confezionamento sottovuoto vengono utilizzati materiali d'imballaggio ad alta barriera, con l'effetto di ridurre la pressione atmosferica residua da 1 bar a 0,3-0,4 bar.

Nelle carni così confezionate si assiste ad un aumento della CO₂ dovuto alla respirazione del tessuto e alla fermentazione microbica. Infatti, circa il 10-20% di CO₂ può svilupparsi nelle prime 4 ore di confezionamento e raggiungere il 30% con la respirazione di batteri aerobi presenti nella carne.

Il confezionamento in atmosfera modificata o dall'inglese MAP (Modified Atmosphere Packaging) corrisponde ad una tecnologia per la conservazione di prodotti alimentari, nella

quale la naturale composizione dell'aria (0,03% di CO₂, 0,93% di argon, 20,95% di O₂, 78,09% di N₂ e altri gas in tracce) è sostituita da una miscela di gas in differenti proporzioni, allo scopo di prolungare la shelf life degli alimenti. La MAP esiste da circa 20-30 anni e in Italia solo il 5% del mercato è rappresentato da prodotti così confezionati, contro il 70-80% del nord Europa; questo perchè il consumatore mostra un po' di diffidenza nel riconoscere come "fresco" un prodotto confezionato in atmosfera modificata.

Gli alimenti che possono essere confezionati con questa tecnologia sono la pasta fresca, i formaggi, la carne e i prodotti carnei, i prodotti da forno, il pesce e la frutta e le verdure fresche.

Questa tecnologia di confezionamento dipende esclusivamente dalle:

- Caratteristiche del prodotto alimentare
- Caratteristiche del materiale di confezionamento
- Miscela gassosa

L'interazione di questi parametri è studiata al fine di prolungare quanto più possibile la shelf life degli alimenti, in modo da non alterarne la qualità organolettica, preservando da possibili alterazioni chimiche e/o microbiologiche.

Il Confezionamento high-O₂ è un tipo di MAP favorita in Europa occidentale che consente un mantenimento del colore rosso vivo delle carni fresche (conserva lo stato di ossiemoglobina), ma che facilita l'ossidazione dei grassi. In questo tipo di confezionamento sono adoperati materiali ad alta barriera e miscele di gas con O₂ al 40-60%, CO₂ al 20-40% e bilancio con N₂. Il rapporto del volume di carne e volume di atmosfera modificata da raggiungere è di circa 1:1,2. Con questo tipo di atmosfera modificata però non si riscontrano lunghi aumenti di shelf life delle carni (Faber, 1999).

Il Confezionamento high-CO₂ si utilizza, invece, se il colore della carne non è il parametro principale da considerare e può essere utilizzata una concentrazione di CO₂ > 40% in assenza di ossigeno, ottenendo una lunga shelf life (Faber, 1999).

L'Active-packaging corrisponde ad una sostituzione volontaria e controllata della composizione dell'aria con una miscela di gas specifica a cui vengono aggiunte sostanze capaci di interagire con la superficie alimentare, al fine di migliorarne la conservabilità.

Generalmente si tratta di sostanze che hanno lo scopo di rimuovere l'ossigeno, rimuovere o rilasciare la CO₂, eliminare l'acqua e l'umidità, assorbire etilene, avere attività antimicrobica, rilasciare preservanti e aromi.

Gli assorbitori di O₂ sono composti ferrosi, sali metallici, organometalli, ect., commercializzati in piccole buste da inserire direttamente nella confezione. Essi esplicano la loro funzione o rimuovendo l'O₂ presente nel volume non occupato dall'alimento, o assorbendo l'O₂ che può entrare nella confezione durante la conservazione. Tutto ciò ha lo scopo di rallentare i fenomeni di ossidazione, inibire la crescita di microrganismi aerobi e di insetti, e di bloccare eventuali alterazioni del colore.

Gli assorbitori/generatori di CO₂ consistono generalmente di CaCl₂ + NaOH/acido ascorbico ed hanno lo scopo di limitare la crescita microbica superficiale, specie di prodotti come carne, pollame, formaggi, pesce, etc.

Gli assorbitori di umidità hanno la funzione di rimuovere attivamente l'acqua che può accumularsi nelle confezioni per l'effetto della traspirazione dei prodotti vegetali, degli sbalzi di temperatura durante la conservazione, della elevata umidità relativa dell'ambiente di conservazione, etc. I regolatori di umidità invece, sono in grado di modulare l'attività dell'acqua nell'ambiente determinando condizioni sfavorevoli alla crescita di muffe e batteri. I dispositivi più utilizzati sono generalmente due strati di polimero plastico microporoso tra i quali c'è un terzo strato di polimero granulare superassorbente.

Gli assorbitori di etilene sono permanganato di potassio, cristobalite, carboni attivi zeolite, etc, che hanno la funzione di arrestare il processo di maturazione dei vegetali e della frutta fresca rimuovendo l'ormone maggiormente responsabile. Ciò avviene con l'utilizzo di materiali plastici addizionati di composti assorbenti ed attivi nei confronti dell'etilene o tramite l'inserimento di bustine contenenti i principi attivi.

Gli emettitori di etanolo si basano sul fatto che l'etanolo è utilizzato soprattutto nella conservazione dei prodotti da forno sottoforma di liquido sprayzzato o di vapore, favorendo l'inibizione di muffe e funghi.

Infine esistono sostanze ad azione antimicrobica (acido ascorbico, acido propionico, acido lattico, acido acetico, nisina, chitosani, silicati di alluminio, argento, rame, zeoliti sintetiche, ossido di zinco, ossido di magnesio, etc.), antiossidante (BHT e BHA), ed enzimatica (colesterolo redattasi, glucosio ossidasi) capaci di aumentare la shelf life degli alimenti conservati con le MAP. Futuri studi prevedono infatti, trattamenti combinati di confezionamento in atmosfera modificata e sostanze specifiche individuali per alimento.

L'applicazione di film antimicrobici ottenuti con l'incorporazione di acidi organici e loro sali in film plastici ed edibili, ne sono un esempio.

L'incorporazione delle sostanze antimicrobiche nel film può avvenire tramite aggiunta diretta durante la fase di estrusione del film stesso, o tramite aggiunta nel materiale d'imballaggio in multistrato.

Questa tipologia di confezionamento deve però tener conto di diversi fattori, come una possibile diffusione della sostanza attiva dal film all'alimento, e considerare che la composizione chimica-fisica dell'alimento stesso può interagire con il rilascio e alterare l'efficacia della sostanza antimicrobica.

Infine, l'intelligent-packaging o imballaggi intelligenti prevedono la presenza di sistemi indicatori capaci di definire e monitorare la qualità dell'alimento (Rooney, 1995). Si tratta di :

- Indicatori tempo/temperatura (TTI), capaci di segnalare il superamento della soglia limite dei parametri tempo e temperatura.
- Indicatori di CO₂ e di O₂, capaci di rilevare la presenza di CO₂ e di O₂ al di sopra dei valori limite.
- Indicatori di integrità, capaci di rilevare la presenza/assenza di CO₂ e di O₂.
- Indicatori di crescita microbica, capaci di rilevare i composti metabolici gassosi dei microrganismi.

1.8 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata aerobicamente

Le popolazioni batteriche che dominano durante la conservazione aerobica della carne sono rappresentate da specie del genere *Pseudomonas*, da *Brochothrix thermosphacta*, da membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* e da alcuni generi di batteri lattici.

Tra le specie batteriche più importanti che crescono sulla carne, alcune risultano essere particolarmente adattate e specifiche di questo prodotto, essendo isolate solo dalla carne e dagli ambienti di processo (macello, utensili ecc.). *Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens* e *P. lundensis* sono le tre specie di psicrotrifi gram-negativi che dominano il sistema grazie al loro alto tasso di crescita (Davies, 2002).

Specie appartenenti ai generi *Moraxella*, *Psychrobacter* e *Acinetobacter*, pur rappresentando una parte non trascurabile della microflora della carne refrigerata aerobicamente, rivestono scarsa importanza nell'alterazione della carne. Questi batteri gram-negativi sono metabolicamente differenti da *Pseudomonas*, non essendo in grado di utilizzare il glucosio, sebbene occasionalmente possono competere con successo con la microflora psicrotrofica della carne (Gill e Newton, 1977). Altro componente maggiore della microflora della carne refrigerata aerobicamente è rappresentato da *Brochothrix thermosphacta*, per il quale la carne rappresenta una nicchia ecologica, essendo questa specie isolata solamente dalla carne e da

ambienti ad essa correlati. *B. thermosphacta* degrada il glucosio e il glutammato della carne; in aerobiosi il glucosio è degradato principalmente ad acido lattico, mentre in anaerobiosi acido lattico ed etanolo costituiscono circa il 90% dei prodotti del metabolismo del glucosio. Anche se rappresentano una proporzione non elevata della microflora totale della carne, alcune *Enterobacteriaceae* psicrotrofiche (*Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*) così come specie di alcuni generi di batteri lattici (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*) possono essere presenti sulla carne conservata all'aria. Quando i livelli di *Pseudomonas* giungono a circa $10^7/\text{cm}^2$ incominciano ad essere evidenti i primi sintomi dell'alterazione della carne che si manifesta con la comparsa di odori anomali riconducibili a debole aroma di caseario (Dainty e Mckey, 1992).

La crescita di questi microrganismi nella carne dipende, quindi, da componenti a basso peso molecolare presenti nella carne fresca (glucosio, glucosio-6-fosfato, ribosio, glicerolo, aminoacidi e lattato) e l'alterazione della carne è il risultato del cambiamento di tali composti in altri che conferiscono odori e aromi specifici (Dainty, 1996).

Inizialmente la crescita dei batteri avviene sulla superficie della carne tramite la metabolizzazione del glucosio. Quando il glucosio viene esaurito avviene una diffusione all'interno del tessuto dove vengono degradati gli aminoacidi presenti.

Da questo tipo di metabolismo sono state rinvenute, nelle carni conservate all'aria, una serie di complesse miscele contenenti esteri, alcol, composti solforati, amine, idrocarburi e chetoni.

In particolare il genere *Pseudomonas* è responsabile della produzione di composti contenenti solfuri e putrescine da arginina e ornitina; *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacteriaceae* formano catene ramificate di acidi e alcol da aminoacidi e 2,3-butandiolo solo nella carne con pH normale. Inoltre gli enterobatteri sono capaci di produrre la cadaverina dalla lisina (Gill e Newton, 1977).

1.9 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata sottovuoto

Una tipologia di conservazione molto utilizzata che garantisce un aumento della shelf life della carne cruda è il sottovuoto (Bell e Garout, 1994). Negli USA, il 97% di tutta la carne bovina deve essere prodotta e trasportata come prodotto sottovuoto (Humphreys, 1996).

Questo confezionamento infatti, elimina la presenza di ossigeno all'interno della confezione e quindi il potenziale contatto con la superficie della carne, in modo da rallentare e condizionare in maniera selettiva la crescita microbica.

Sulla carne conservata sotto vuoto, la microflora batterica è dominata da batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus*, *Carnobacterium* e *Leuconostoc* (Dainty e Mckey, 1992).

La permeabilità del film di confezionamento 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, anche se in minor misura, di *B. thermosphacta*. La carne SV può essere conservata per tempi di 10-12 settimane a temperature di 0°C, fino a che le caratteristiche organolettiche diventano inaccettabili. L'odore anomalo di acido è essenzialmente impartito dalla produzione di acido lattico ed acetico da parte dei batteri lattici. Quando i carboidrati sono esauriti, sono utilizzati gli aminoacidi con conseguente produzione di acidi grassi volatili che impartiscono tipico odore di caseario alla carne. In alcuni casi anche la produzione di composti solforati e l'inverdimento possono contribuire all'alterazione.

Nella carne conservata sottovuoto non è raro assistere alla crescita di *Brochothrix thermosphacta*, che causa "odore di formaggio" ed *Enterobacteriaceae* che causano odore di solfito (Egan *et al.*, 1980).

Durante la conservazione sottovuoto, l'attività respiratoria dei tessuti della carne determina una variazione della composizione della fase gassosa; la concentrazione di O₂ diminuisce fino a livelli inferiori all'1% mentre quella della CO₂ aumenta fino a valori di circa il 20%. *B. thermosphacta* presenta una buona tolleranza alla CO₂, ma la sua crescita sottovuoto è inibita

quando il pH della carne è inferiore a 5,8, a dispetto di quanto avviene in condizioni aerobiche in cui il pH non esercita nessuna influenza sul suo sviluppo. Allo stesso modo l'acido lattico e la CO₂ inibiscono lo sviluppo delle *Enterobacteriaceae* in condizioni anaerobiche, anche se aumenti di temperatura, di pH o permeabilità all'ossigeno della confezione riducono fortemente tale effetto inibente.

Un altro batterio alterativo è stato isolato dalla carne conservata in condizioni refrigerate sottovuoto. Esso produce H₂ e CO₂, butandiolo e acido butanoico, molti esteri e composti volatili contenenti solfuri. L'isolato è uno psicrofilo che cresce bene tra 1 e 15°C, non a 22°C, ed è stato classificato come *Clostridium estertheticum* (Collins *et al.*, 1992).

1.10 Le popolazioni batteriche della carne refrigerata in atmosfera protettiva

Oltre che dalla temperatura, le popolazioni microbiche presenti sulla superficie della carne sono influenzate dalla composizione dell'atmosfera gassosa dell'ambiente di confezionamento. L'atmosfera di una confezione, realizzata con film che presentano una bassa permeabilità ai gas atmosferici, può essere modificata sostituendola con miscele a concentrazione nota di CO₂, O₂ e N₂ (atmosfera modificata o protettiva). Il tipo di atmosfera gassosa esercita una forte selezione sulla microflora della carne. In generale, l'aumento della concentrazione di CO₂ con limitazione di quella di O₂ seleziona una microflora che è dominata da batteri Gram-positivi, piuttosto che da Gram-negativi come è tipico della carne conservata all'aria. Il minor tasso di crescita e i differenti attributi metabolici dei batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi, determina un allungamento della shelf-life della carne in atmosfera protettiva.

Una carne conservata con un'atmosfera contenente il 100% di CO₂ può essere conservata fino a 3 mesi o più se la temperatura è mantenuta a 0-1°C. In queste condizioni i batteri lattici rappresentano normalmente la microflora dominante, sebbene *B. thermosphacta* ed enterobatteri, se presenti inizialmente in alto numero, possono essere causa di alterazione (Pin

et al., 2002). La composizione della microflora della carne conservata in atmosfera protettiva 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, ma altri microrganismi come *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* ed *Enterobacteriaceae* possono crescere fino a numeri finali alti, soprattutto a temperature di 5-6°C. L'alterazione sensoriale si manifesta con la comparsa di odore di rancido e caseario.

In high-O₂ MAP (CO₂: O₂: N₂ 25%:60%: 15%), l'ossigeno mantiene il pigmento muscolare allo stato desiderato di ossimioglobina, e le concentrazioni di CO₂ > 20% dimezzano approssimativamente la crescita di batteri alterativi.

In low-O₂ MAP (CO₂: O₂: N₂ 50-90%: 1-10%: 10-40%), livelli di high-CO₂ e low-O₂ inibiscono la microflora alterativa.

Un confezionamento in atmosfera modificata usando il 100% di CO₂ sopprime la crescita dei microrganismi alterativi a temperature < 0°C, mentre per temperature > 0°C *Brochothrix thermosphacta* ritorna un problema (Brody, 1989; Pin *et al.*, 2002).

Tabella 1 - Composizione in nutrienti e valore energetico delle carni bovine (per 100 g di parte edibile)

Tabelle di Composizione degli alimenti – Istituto Nazionale della Nutrizione, 1994

Alimenti	Acqua g	Proteine g	Lipidi g	Glucidi g	Energia Kcal	Sodio mg	Potassio mg	Ferro mg	Calcio mg	Fosforo mg	Tiamina mg	Niacina mg	Vit. A µg	Vit. C mg
Vitello	76.9	20.7	1.0	0	92	89	360	2.3	14	214	0.15	6.30	tracce	0
Vitellone														
- filetto	73.3	19.7	5.6	0	129	51	340	1.8	4	-	-	-	-	0
- girello, fesa, sottofesa, noce, scamone	74.9	21.3	2.8	0	108	51	340	1.8	4	-	-	-	-	0
- lombata, costata	71.4	21.5	6.1	0	140	51	340	1.8	4	-	-	-	-	0
- pancia, bianco- stato, punta di petto	70.4	20.2	8.3	0	155	55	315	1.7	6	-	-	-	-	0
- geretto anteriore e posteriore	75.6	20.9	2.6	0	107	53	328	1.7	5	-	-	-	-	0

CAPITOLO 2

COMPORAMENTO DI *BROCHOTHRIX THERMOSPACTA* IN PRESENZA DELLE POPOLAZIONI ALTERATIVE DELLA CARNE CRUDA REFRIGERATA

2.1 INTRODUZIONE

La carne cruda rappresenta un ecosistema alimentare molto complesso che con le sue proprietà chimico-fisiche può determinare la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero e varietà di microrganismi (Holzapfel, 1998; García-López, Prieto e Otero, 1998), pertanto è ritenuto un alimento altamente deteriorabile.

Tipo e numero di microrganismi presenti sulla carne dipendono dall'azione combinata di numerosi fattori. Naturalmente la carne possiede una microflora che è strettamente dipendente dalla sua composizione chimica (75% di acqua, 19% di proteine, 2,5% di lipidi e diverse altre sostanze come aminoacidi, peptidi, nucleotidi e zuccheri), dall'ambiente in cui viene prodotta (condizioni di allevamento) e dalle condizioni in cui è trasformata, conservata, distribuita e consumata (Gill, 1998).

La carne è considerata alterata quando intervengono dei cambiamenti organolettici che la rendono inaccettabile per il consumo umano. A volte queste modificazioni indesiderate possono essere ovvie, come lo sviluppo superficiale di muffe o la produzione di mucillagini batteriche; altre volte l'alterazione riguarda modificazioni strutturali della carne o la comparsa di odori anomali, che sono il risultato di complesse interazioni tra la microflora che si sviluppa sulla carne e le modificazioni chimiche che avvengono nella stessa. L'alterazione organolettica evidente della carne è dunque il risultato della decomposizione e della

produzione di metaboliti conseguente la crescita dei microrganismi. La shelf-life della carne, pertanto, è strettamente dipendente dal numero e tipi di batteri inizialmente presenti e dalla loro successiva crescita nelle condizioni ecologiche applicate durante la conservazione, in particolare temperatura e atmosfera gassosa.

L'alterazione della carne fresca e dei prodotti carnei conservati a temperature di refrigerazione è causata soprattutto da batteri psicrotrofici (*Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Carnobacterium* spp.). Essa si manifesta comunemente con cattivi odori causati dalla presenza di composti volatili prodotti durante il metabolismo microbico (Borch, *et al.*, 1996).

Tra le specie batteriche più importanti che crescono sulla carne, alcune risultano essere particolarmente adattate e specifiche di questo prodotto, essendo isolate solo dalla carne e dagli ambienti di processo (macello, utensili ecc.). *Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens* e *P. lundensis* sono le tre specie di psicrotrifi gram-negativi che dominano il sistema grazie al loro alto tasso di crescita.

Altro componente principale della microflora della carne refrigerata aerobicamente è rappresentato da *Brochothrix thermosphacta*, per il quale la carne rappresenta una nicchia ecologica, essendo questa specie isolata solamente dalla carne e da ambienti ad essa correlati. Tuttavia, esso è probabilmente il responsabile di alcuni "off odors", che sono il primo segnale di alterazione (Dainty *et al.*, 1979).

B. thermosphacta degrada il glucosio e il glutammato della carne. Infatti, in aerobiosi il glucosio è degradato principalmente ad acido lattico, mentre in anaerobiosi acido lattico ed etanolo costituiscono circa il 90% dei prodotti del metabolismo del glucosio.

Anche se rappresentano una proporzione non elevata della microflora totale della carne, alcune *Enterobacteriaceae* psicrotrofiche (*Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*) così come specie di alcuni generi di batteri lattici (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Carnobacterium) possono essere presenti sulla carne conservata all'aria (Gill e Newton, 1977).

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare "in vitro" il comportamento di *Brochothrix thermosphacta* in presenza delle varie microflora alterative della carne conservata aerobicamente a 5°C e valutarne le loro possibili interazioni.

2.2 MATERIALI e METODI

2.2.1 Campioni di carne

Quattro campioni di carne cruda sono stati acquistati in differenti macellerie della regione Campania, trasportati in laboratorio e conservati a 5°C in condizioni aerobiche fino a completa alterazione.

2.2.2 Numerazione e isolamento delle microflora alterative

Per ogni campione di carne cruda sono stati prelevati 25 g al tempo zero (giorno dell'acquisto) e dopo 7 giorni, diluiti con 225 ml di soluzione fisiologica (0,85% NaCl – 0,1% peptone) ed omogeneizzati con Stomacher per 2 minuti. Ogni campione poi è stato diluito con sospensioni seriali decimali di soluzione fisiologica ed inoculato in piastre petri per il conteggio di LAB (incubazione a 30°C per 48 h su MRS agar (Oxoid)), *Enterobacteriaceae* (incubazione a 30°C per 24-48 h su Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid)), *Pseudomonas* spp. (incubazione a 30°C per 48 h su Pseudomonas Agar con CFC selective supplement (Oxoid)), *Brochothrix thermosphacta*. (incubazione a 25°C per 48 h su STA Agar con STA selective supplement (Oxoid)).

2.2.3 Isolamento e identificazione di *Brochothrix thermosphacta* e raccolta di bulk cellulari dalle microflore alterative

Le colonie tipiche isolate dalle piastre di STA Agar sono state purificate e identificate biochimicamente a livello di specie con le gallerie API 50 CH (Bio-Merieux, Italia, Milano.). Sono stati raccolti bulk cellulari usando l'intero contenuto delle piastre (substrato e colonie cresciute) alle diluizioni più concentrate. Queste sono state trasferite in buste da Stomacher e diluite 10 volte con soluzione Ringer (Oxoid). Ogni sospensione è stata filtrata su garza sterile e centrifugata a 8000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in 5 ml of TSB (Oxoid), aggiunto del 20% di glicerolo e conservato a -20°C .

2.2.4 Estrazione del DNA

Un millilitro di ogni bulk cellulare è stato centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a 25°C . Il pellet è stato risospeso in 100 μl di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ed è stato estratto il DNA secondo un protocollo descritto da Wizard DNA purification kit (Promega, Madison, Wiscon.): i 100 μl di sospensione sono stati miscelati con 160 μl di 0,5 M EDTA/ Nuclei Lysis Solution in rapporto 1/4,16, 5 μl di RNase (10 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich, Milano, I) e 20 μl di proteinase K (20 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich) ed incubati per 60 min a 37°C . Dopo incubazione, 1 vol. di ammonio acetato 5M è stato aggiunto al campione che è stato centrifugato a 14000 rpm per 5 min a 4°C . Il supernatante è stato precipitato con 0,7 vol. di isopropanolo e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti. Infine, il pellet è stato asciugato, risospeso in 50 μl di DNA Rehydration Solution e incubato a 55°C per 45 minuti.

2.2.5 Analisi PCR-DGGE

I primers P1 (GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC) e 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') sono stati utilizzati per l'amplificazione della regione variabile V1-V3 del 16S rDNA (Ercolini, 2004), ottenendo dei prodotti PCR di circa 500 pb. Ogni miscela di amplificato (volume finale 25 µl) conteneva 1 µl di DNA, ciascun primer a una concentrazione di 0,2 µM, ciascun deossinucleoside trifosfato a una concentrazione di 0,25 mM, 2,5 mM di MgCl₂, 2,5 µl di 10 X PCR buffer (Invitrogen) e 2,5U di *Taq* polimerasi (Invitrogen). E' stata effettuata una PCR "touchdown" in una Minicycler (MyCycler™ Bio-Rad). La temperatura iniziale di annealing è stata scelta a 65°C ed è stata diminuita di 1°C ad ogni ciclo per 10 cicli. Infine, sono stati programmati 20 cicli a 55°C. La fase di estensione per ogni ciclo è stata effettuata a 72°C per 3 minuti, mentre l'estensione finale è stata effettuata a 72°C per 10 minuti. Aliquote da 3µl dei prodotti PCR sono stati controllati su gel di agarosio all'1,5% (w/v). I prodotti PCR sono stati poi analizzati tramite un gel elettroforetico a gradiente di denaturanti (denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE) usando un apparato Dcode (Bio-Rad Labs, Hercules CA). I campioni, infatti, sono stati caricati in un gel di poliacrilamine al 7% (w/v) in 1X TAE buffer (Tris base 2M, Acidi acetico glaciale 1M e EDTA 50mM a pH 8,0). Gli esperimenti di elettroforesi parallela sono stati effettuati a 60°C usando un gel contenente un gradiente di denaturanti da 20 a 50% urea-formamide (100% corrispondente a 7 mol l⁻¹ di urea e 40% [w/v] di formamide). La corsa elettroforetica è stata effettuata per 4 h a 200V. I gel sono stati poi immersi in una soluzione di bromuro di etidio per 3 minuti e decolorati in acqua distillata per 15 minuti.

2.2.6 Sequenziamento delle bande DGGE

Con un puntale sterile sono stati picchettati piccoli pezzi di bande dal gel DGGE ed ognuno dei quali è stato trasferito in 20µl di acqua sterile ed incubati overnight a 4°C per favorire la diffusione del DNA. Un microlitro del DNA eluito è stato utilizzato per la riamplicazione seguita da DGGE. Il DNA amplificato dai bulk cellulari è stato usato come controllo. I prodotti che migravano come singole bande, posizionate all'altezza del campione controllo, sono stati purificati tramite il Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) e sequenziati con il primer 518r. Per determinare le specie relative alle sequenze trovate è stata effettuata una ricerca nella GenBank con il BLAST program.

2.2.7 Comportamento “in vitro” di *Brochothrix thermosphacta* in presenza di microflora alterative della carne

Il comportamento di *Brochothrix thermosphacta* è stato valutato su LYP Agar medium costituito da lab-lemco (1 g/L, Oxoid), estratto di lievito (2 g/L, Oxoid), peptone (0,5 g/L, Oxoid), glucosio (0,5 g/L, Oxoid) e agar (15 g/L, Oxoid), versato in piastre con griglia da 20 mm (Ø 150 mm) (Falcon). Le piastre sono state inoculate per spatolamento con 1 ml di un mix di 4 ceppi di *B. thermosphacta* (circa 10^4 UFC/g o 10^3 UFC/cm²) da solo o co-inoculato con una miscela degli altri gruppi microbici secondo le seguenti combinazioni:

1. *Brochothrix thermosphacta* e LAB
2. *Brochothrix thermosphacta* e *Enterobacteriaceae*
3. *Brochothrix thermosphacta* e *Pseudomonas* spp.
4. *Brochothrix thermosphacta* con LAB e *Enterobacteriaceae*
5. *Brochothrix thermosphacta* con LAB e *Pseudomonas* spp.
6. *Brochothrix thermosphacta* con *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.
7. *Brochothrix thermosphacta* con LAB, *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*

Dopo 0, 24, 48 e 120 h di incubazione a 5°C sono stati analizzati pezzi di substrato inoculato (2x2 cm²) le cui diluizioni sono state opportunamente spatolate sui substrati selettivi prima descritti per la numerazione di ogni gruppo microbico.

2.3 RISULTATI

2.3.1 Numerazione e isolamento dei microrganismi ricercati

I risultati dei conteggi relativi alla ricerca dei microrganismi alterativi dai campioni di carne sono mostrati in Tabella 2. Tutti i campioni di carne mostrano dopo 7 giorni di conservazione a 5°C una completa alterazione (sensorialmente inaccettabili). Tutti i gruppi microbici ricercati mostrano un aumento della crescita durante la conservazione refrigerata a 5°C. Tuttavia, *B. thermosphacta* mostra un aumento di circa 2 cicli logaritmici rispetto al conteggio iniziale in tutti i campioni analizzati; risultando la popolazione dominante nella carne alterata.

Le piastre, dopo la lettura, sono state utilizzate per la selezione di ceppi o di popolazioni di gruppi microbici per gli esperimenti successivi. Sono state isolate circa 20 colonie dalle piastre di STA Agar, poi purificate ed identificate come *B. thermosphacta* tramite galleria API 50 CH.

Tutte le piastre derivanti dai 4 campioni di carne alterata invece sono state utilizzate per la raccolta di bulk cellulari come descritto nel paragrafo dei Materiali e Metodi.

2.3.2 Identificazione delle specie tramite PCR-DGGE

E' stata applicata la tecnica PCR-DGGE ai DNA amplificati estratti dai bulk cellulari. I profili DGGE dei 4 gruppi microbici sono mostrati in Figura 1, mentre i risultati relativi ai frammenti sequenziati sono schematizzati in Tabella 2. Le specie appartenenti al gruppo dei

LAB isolati da MRS agar sono *Lactobacillus sakei/curvatus* e *Leuconostoc mesenteroides*, mentre *Enterobacter amnigenus* e *Afnia halvei* sono le specie identificate dalle bande ottenute dai profili dei bulk della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Infine, le due bande appartenenti ai bulk ottenuti da *Pseudomonas* agar sono state entrambe identificate come *Pseudomonas* spp. (Tabella 2.1).

2.3.3 Comportamento di *Brochothrix thermosphacta* in presenza di *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e LAB durante la conservazione aerobica a 5°C

Nel primo esperimento su LYP agar è stato co-inoculato un mix di 4 ceppi di *B. thermosphacta* (ognuno isolato da ogni campione di carne) con ciascuno dei seguenti gruppi microbici: LAB, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* ad una concentrazione finale di circa 10^4 UFC/cm². La conta vitale di ogni gruppo microbico è stata effettuata a vari tempi fino a 5 giorni di conservazione a 5°C come descritto in Materiali e Metodi. I risultati di conteggi di *B. thermosphacta* in presenza di ogni gruppo microbico è riportato Fig. 2 (Panel a).

Dopo 24 h di incubazione *B. thermosphacta* mostra la stessa crescita indifferentemente dal gruppo microbico associato.

Tuttavia, mentre in presenza di *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* esso mostra un andamento simile a quello che mostra quando è da solo, in presenza di LAB, *B. thermosphacta* dopo 5 giorni di incubazione mostra una crescita più bassa. In particolare, dopo 48 h il conteggio di *B. thermosphacta* in presenza di LAB è più basso di 2 cicli logaritmi rispetto a quando *B. thermosphacta* è da solo.

Sono stati effettuati anche i conteggi di ogni gruppo microbico durante l'incubazione a 5°C e risultati sono elencati in Tabella 2.2. Come è possibile notare tutti i gruppi microbici crescono durante l'incubazione. Quando *B. thermosphacta* cresce in presenza di LAB, il conteggio dei

LAB è più alto di quello di *B. thermosphacta* soprattutto dopo 48 h d'incubazione (Fig. 2 e Tab. 2.2).

Negli esperimenti successivi, i cui risultati sono mostrati in Fig. 2 (Panels b e c, rispettivamente) e nella Tabella 2.3, *B. thermosphacta* è stato co-inoculato con coppie di gruppi microbici e con tutti i gruppi microbici allo stesso tempo. E' possibile notare infatti, come *B. thermosphacta* mostra lo stesso andamento di crescita quando è da solo o in presenza di *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* insieme (Fig. 2, Panel b). In presenza di LAB e *Pseudomonas*, nelle prime 24 h, il numero di cellule di *B. thermosphacta* è di circa 1,5 log più alto che quando è da solo (Fig. 2, Panel b). Tuttavia, dopo 24 h la crescita di *B. thermosphacta* con LAB e *Enterobacteriaceae* è più bassa di quando *B. thermosphacta* è da solo (Fig. 2, Panel b). Inoltre, la crescita di *B. thermosphacta* è influenzata negativamente dalla presenza di *Enterobacteriaceae* e LAB insieme specialmente nelle prime 48 h d'incubazione (Fig. 1, panel b).

Infine, la crescita di *Brochothrix thermosphacta* mostra lo stesso andamento quando è da solo o in presenza di una miscela di tutti gli altri gruppi microbici alterativi (Fig. 2, Panel c).

2.4 DISCUSSIONE

Brochothrix thermosphacta risulta essere il batterio dominante associato all'alterazione della carne cruda refrigerata seguito da *Pseudomonas*, LAB, e *Enterobacteriaceae* (Borch *et al.*, 1996).

In questa ricerca le analisi microbiologiche dei campioni di carne confermano che *B. thermosphacta* può giocare un ruolo significativo nell'alterazione della carne refrigerata, infatti le conte vitali su STA Agar dopo 7 giorni risultano essere le più elevate.

I gruppi microbici alterativi sono stati raccolti in bulk cellulari e identificati a livello di specie tramite PCR-DGGE.

Questo approccio molecolare si è dimostrato utile per l'identificazione di miscele di microrganismi coltivabili e isolati direttamente da matrici alimentari (Ercolini *et al.*, 2001; Ercolini *et al.*, 2003; Ercolini, 2004).

Tutte le specie identificate (Tabella 2) sono state riconosciute come possibili microrganismi alterativi della carne cruda. In particolare, lattobacilli e *Leuconostoc* tra i LAB e *Enterobacter* e *Afnia halvei* tra la famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Infatti, *Afnia halvei* può dominare tra gli enterobatteri nella carne cruda confezionata sottovuoto (Borch *et al.*, 1996). *Pseudomonas* è un altro importante componente della microflora alterativa della carne cruda e in molti casi risulta essere il batterio dominante in condizioni aerobiche (Dainty and MacKey, 1992). In particolare, *Pseudomonas fragi* è comunemente considerata la specie più frequentemente isolata dalla carne cruda (Molin e Ternström, 1982). Tuttavia, in questo lavoro, l'identificazione a livello di specie per il genere *Pseudomonas* non è stata possibile. Probabilmente, la regione V1-V3 del 16S rDNA non risulta essere abbastanza discriminante. La presenza di *Pseudomonas* spp. sul substrato STA Agar e quella di *Bacillus* spp. sul substrato MRS agar confermano come alcuni substrati utilizzati come selettivi di determinati microrganismi possano fallire (Ercolini, 2004). Tuttavia, gli esperimenti di challenge non sono stati compromessi da tali contaminazioni in quanto per osservare il comportamento di *B. thermosphacta* è stata usata una miscela di ceppi isolati, purificati e identificati.

Nella maggior parte dei lavori che citano interazioni tra microrganismi sono state utilizzate singole culture pure. In questo lavoro invece, sono state esaminate interazioni tra le popolazioni responsabili dell'alterazione della carne cruda refrigerata usando una miscela di gruppi microbici isolate direttamente da campioni di carne alterata.

Dagli esperimenti di interazioni a coppie tra *B. thermosphacta* e gli altri gruppi microbici alterativi si può notare come *B. thermosphacta* viene inibito dai LAB, mentre la sua crescita non viene influenzata dagli altri 2 gruppi microbici (Fig. 2, Panel a). Tuttavia, si osserva come tutte le altre popolazioni alterative sono capaci di crescere durante la competizione con *B. thermosphacta* (Tabella 2.1). In particolare, i LAB mostrano conte vitali di 1 log UFC/g più alte degli altri gruppi microbici nelle prime 24h, il che potrebbe giustificare il loro ruolo antagonista nei confronti di *B. thermosphacta*.

Quando *B. thermosphacta* è co-inoculato con più gruppi microbici alterativi allo stesso tempo, esso in presenza di LAB e *Pseudomonas* mostra, nelle prime 24 h, una crescita di circa 1,5 log UFC/g più alta che quando è da solo (Fig. 2, Panel b). Mentre, in presenza di tutti gli altri gruppi microbici insieme non si notano effetti sulla crescita di *B. thermosphacta*.

In condizioni aerobiche durante il challenge test i LAB dimostrano essere i migliori a crescere in competizione con *Pseudomonas* aerobico e *Enterobacteriaceae* anaerobici facoltativi.

In conclusione, in questo lavoro sono stati valutati gli effetti sulla crescita di *B. thermosphacta* in presenza di popolazioni alterative della carne cruda *in vitro* e i risultati riportati si riferiscono alle competizioni batteriche cresciute sullo stesso substrato. In una prospettiva futura questi challenge tests possono essere migliorati ed eseguiti *in vivo* direttamente sulla carne, in modo da ottenere una visione più realistica delle interazioni tra le popolazioni alterative della carne cruda refrigerata, al fine di comprendere meglio l'evoluzione microbica responsabile dell'alterazione della carne per migliorarne la conservazione.

Tabella 2 – Analisi microbiologica della carne cruda conservata a 5°C.

Campione n°	Tempo (giorni)	UFC/g			
		STAA	MRS Agar	VRBGA	Pseudomonas Agar
1	0	2.0×10^6	3.0×10^5	1.2×10^4	3.0×10^4
	7	9.0×10^8	1.0×10^5	1.0×10^5	2.0×10^6
2	0	2.0×10^6	3.5×10^4	3.0×10^4	3.0×10^4
	7	4.4×10^8	1.5×10^6	5.0×10^4	1.7×10^6
3	0	5.6×10^5	1.0×10^4	3.0×10^3	1.0×10^4
	7	3.0×10^7	1.0×10^7	1.1×10^5	1.7×10^5
4	0	2.5×10^4	3.0×10^3	2.0×10^3	5.0×10^4
	7	3.4×10^6	3.4×10^6	1.1×10^5	1.0×10^5

Tabella 2.1 – Specie identificate da bande ottenute dall’analisi DGGE di bulk cellulari di conteggi in piastra di campioni di carne.

Banda ^a	Origine (substrato)	Closest relativo	% Identità	Accession no.
1	STAA	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	99	AY543029
2	STAA	<i>Pseudomonas</i> spp.	95	AY342005
3	VRBGA	<i>Enterobacter amnigenus</i>	97	AF060537
4	VRBGA	<i>Afnia halvei</i>	98	AY572428
5	VRBGA	<i>Afnia halvei</i>	99	AY572428
6	MRS Agar	<i>Lactobacillus sakei/ curvatus</i>	99	AY204895/AY204889
7	MRS Agar	<i>Bacillus</i> spp.	99	AY462209
8	MRS Agar	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	AY675249
9	<i>Pseudomonas</i> Agar	<i>Pseudomonas</i> spp.	99	AY486375
10	<i>Pseudomonas</i> Agar	<i>Pseudomonas</i> spp.	99	AF451270

a: I numeri delle bande sono indicati in Figura 1.

Tabella 2.2 – Conte vitali (UFC/cm² ± Deviazione Standard) di Lactic Acid Bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* (E) e *Pseudomonas* spp. (P) ognuno in presenza di una miscela di quattro ceppi di *B. thermosphacta* a 5°C.

Time (h)	LAB	E	P
0	5.37 x 10 ⁴ ± 0.03	1.09 x 10 ⁵ ± 0.06	3.55 x 10 ⁴ ± 0.03
24	2.29 x 10 ⁶ ± 0.05	1.00 x 10 ⁵ ± 0.16	4.86 x 10 ⁵ ± 0.05
48	1.00 x 10 ⁷ ± 0.08	1.00 x 10 ⁷ ± 0.07	6.92 x 10 ⁸ ± 0.18
120	5.24 x 10 ⁸ ± 0.15	9.55 x 10 ⁸ ± 0.10	5.49 x 10 ⁸ ± 0.02

Tabella 2.3 – Conte vitali (UFC/cm² ± Deviazione Standard) di Lactic Acid Bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* (E) e *Pseudomonas* spp. (P) co-inoculati con *B. thermosphacta* a 5°C.

Temp (h)	Nifedid		Nifedid		Nifedid		Nifedid		
	LAB	E	LAB	P	P	E	LAB	P	E
0	15x10 ⁺⁰³	78x10 ⁺⁰⁵	62x10 ⁺⁰²	44x10 ⁺⁰³	35x10 ⁺⁰⁵	12x10 ⁺⁰⁷	25x10 ⁺⁰⁵	38x10 ⁺⁰³	10x10 ⁺⁰²
24	315x10 ⁺⁰⁵	10x10 ⁺⁰⁸	19x10 ⁺⁰⁵	44x10 ⁺⁰⁸	18x10 ⁺⁰⁴	19x10 ⁺⁰⁹	39x10 ⁺⁰⁷	19x10 ⁺⁰⁹	29x10 ⁺⁰⁵
48	35x10 ⁺⁰¹	10x10 ⁺⁰³	15x10 ⁺⁰²	10x10 ⁺⁰²	62x10 ⁺⁰²	10x10 ⁺⁰³	18x10 ⁺⁰⁹	45x10 ⁺⁰⁸	45x10 ⁺⁰¹
120	10x10 ⁺⁰¹⁰	56x10 ⁺⁰²	52x10 ⁺⁰¹	38x10 ⁺⁰⁴	10x10 ⁺⁰¹¹	25x10 ⁺⁰³	89x10 ⁺⁰²	10x10 ⁺⁰⁴	35x10 ⁺⁰⁵

Figura 1 – Profili PCR-DGGE di bulk cellulari ottenuti da (A) STA Agar; (B) VRBGA; (C) MRS Agar; (D) *Pseudomonas* Agar. L'identificazione delle bande numerate è riportata in Tabella 2.1.

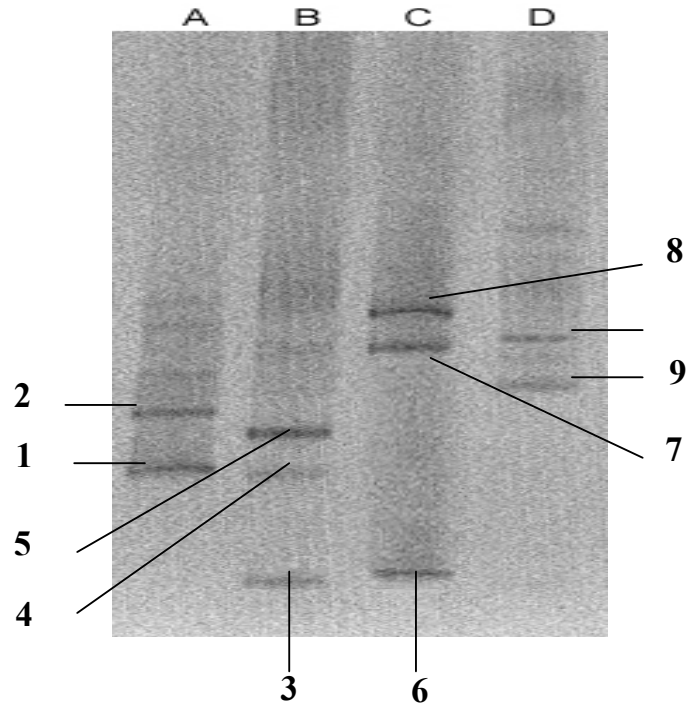
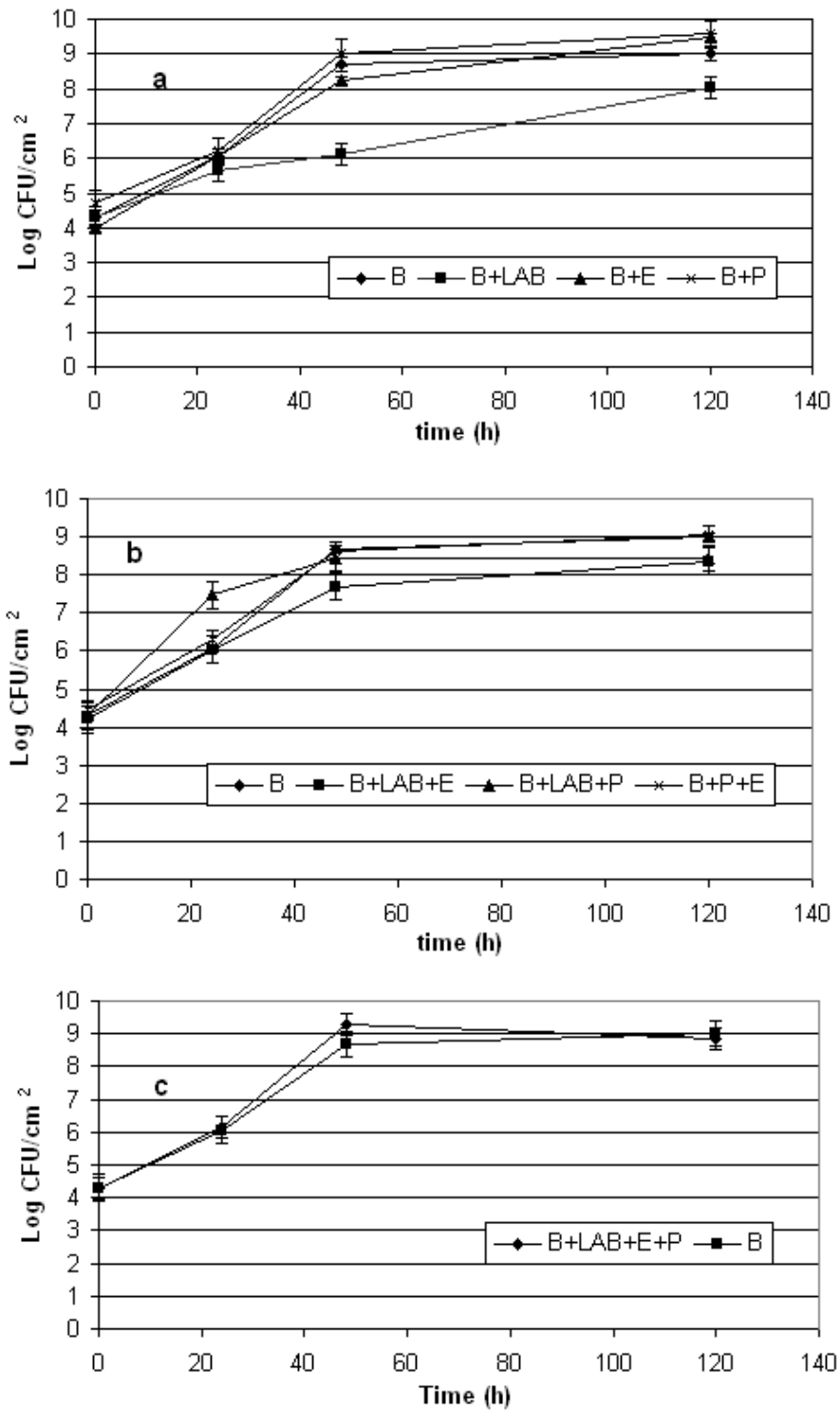


Figura 1.1 – Comportamento di *Brochothrix thermosphacta* in presenza di uno (a), due (b) e tutti (c) i gruppi microbici alterativi della carne.



(B) *Brochothrix thermosphacta*; (LAB) Acid lactic Bacteria; (E) *Enterobacteriaceae*; (P) *Pseudomonas* spp.

CAPITOLO 3

ATTIVITA' ANTIMICROBICA DI FILM PLASTICI ATTIVATI CON NISINA SU CARNE CONFEZIONATA SOTTOVUOTO

3.1 INTRODUZIONE

La qualità microbiologica delle carne cruda è influenzata dalle possibili contaminazioni che si verificano dopo la fase di macellazione. Infatti, le operazioni di scuoiamento, eviscerazione, docciatura e tolettamento della carcassa, lo stoccaggio ed il trasporto possono fornire occasioni di contaminazione microbica (Kramer, 1994). IL grado di tale contaminazione è quindi di fondamentale importanza nelle successive fasi di confezionamento e conservazione della carne cruda.

Una tipologia di conservazione molto utilizzata che garantisce un aumento della shelf life della carne cruda è il sottovuoto (Bell e Garout, 1994). Negli USA, il 97% di tutta la carne bovina deve essere prodotta e trasportata come prodotto sottovuoto (Humphreys, 1996).

Questo confezionamento infatti, elimina la presenza di ossigeno all'interno della confezione e quindi il potenziale contatto con la superficie della carne, in modo da rallentare e condizionare in maniera selettiva la crescita microbica. La popolazione predominante in questo caso è caratterizzata da batteri psicrotrifici come *Pseudomonas*, responsabile degli odori putridi, *Acinetobacter* e *Psychrobacter* spp.; ma si ritrovano frequentemente anche *Brochothrix thermosphacta*, che causa "odore di formaggio" ed *Enterobacteriaceae* che causano odore di solfito (Egan *et al.*, 1980).

Tuttavia in tema di conservazione della carne cruda negli ultimi anni si sta facendo strada un nuovo tipo di confezionamento alimentare che va sotto il nome di *active packaging*. Si tratta

di un imballaggio che non è più una semplice barriera passiva che difende il prodotto confezionato dall'ambiente esterno, ma interagisce con l'alimento e diventa *carrier* di sostanze che possono migliorarne la conservabilità. In pratica, nel confezionamento "attivo" l'attenzione ora si sposta considerevolmente sui materiali di confezionamento, sulle pellicole plastiche, che diventano parte attiva di esso.

Inoltre, studi recenti sulla conservazione degli alimenti sono sempre più diretti verso nuove tecnologie che prevedono l'utilizzo di componenti biologici *food grade*, additivi compatibili con gli alimenti quali enzimi, batteriocine e olii essenziali per un potenziale miglioramento della sicurezza microbiologica dell'alimento (Mauriello *et al.*, 2004; Mauriello *et al.*, 2005).

L'applicazione di film antimicrobici ottenuti con l'incorporazione di acidi organici e loro sali o sostanze antimicrobiche in film plastici ed edibili, ne sono un esempio. L'incorporazione di tali sostanze nel film può avvenire tramite aggiunta diretta durante la fase di estrusione del film stesso, o tramite aggiunta nel materiale d'imballaggio in multistrato. Questa tipologia di confezionamento deve però tener conto di diversi fattori, come una possibile diffusione della sostanza attiva dal film all'alimento, e considerare che la composizione chimica-fisica dell'alimento stesso può interagire con il rilascio e alterare l'efficacia della sostanza antimicrobica.

La nisina è una batteriocina, ossia un agente antimicrobico di natura peptidica prodotta da alcuni ceppi del microrganismo appartenente alla specie *Lactococcus lactis*, subspecie *lactis* abitualmente impiegato nell'industria casearia (Hurst, 1981). La nisina è attiva nei confronti di un'ampia gamma di batteri patogeni e/o alterativi, infatti la sua efficacia è stata molto studiata (Chung, Dickson e Crouse, 1989; Taylor e Somers, 1985) ed è prevalente nei confronti di batteri Gram-positivi, tra i quali le specie patogene *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Delves-Broughton, 1990; Motlagh *et al.*, 1991).

Pertanto, obiettivo di questo lavoro è stato quello di selezionare e sperimentare soluzioni antimicrobiche a base di nisina attive nei confronti di popolazioni microbiche alterative della carne, al fine di realizzare un film di polietilene (PE) per il confezionamento sottovuoto di carne cruda bovina, in modo da garantirne una migliore qualità microbiologica.

3.2 MATERIALI e METODI

3.2.1 Selezione di additivi food grade antimicrobici attivi contro le popolazioni alterative della carne cruda

In questo studio sono stati valutati gli affetti di alcuni additivi antimicrobici food grade come la nisina (Sigma-Aldrich, 2,5% di nisina), l'acido acetico (Sigma-Aldrich) e l'EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid; Sigma-Aldrich), da soli o in combinazione tra loro (Tabelle 3 e 3.1) contro le tipiche popolazioni alterative della carne cruda.

I microrganismi utilizzati sono rappresentati da bulk cellulari di popolazioni microbiche di *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e Lactic Acid Bacteria (LAB), raccolti secondo il metodo descritto nel Capitolo 1. Le soluzioni di nisina sono state preparate sciogliendo, al momento, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/ml di nisina (Sigma-Aldrich, 2,5% di nisina) in 0,02N HCl (pH 2) (Sigma-Aldrich).

Per il saggio di attività antimicrobica aliquote da 10 µl di ciascuna soluzione antimicrobica sono stati spottati su piastre di TSA (Oxoid) contenente 0,75% di agar inoculate con ciascuna popolazione microbica alterativa. Dopo incubazione delle piastre, l'attività antimicrobica è stata valutata osservando una chiara zona d'inibizione della crescita in corrispondenza dello spot.

3.2.2 Preparazione di film in polietilene (PE) ad azione antimicrobica contro le popolazioni alterative della carne cruda

Due soluzioni antimicrobiche composte da 5 mg/ml di nisina e 77 mg/ml di EDTA e 2,5 mg/ml di nisina e 6% di acido acetico, sono state utilizzate per il trattamento di *coating* del film plastico. Infatti, con l'aiuto di una barra filettata di metallo ogni soluzione è stata spalmata su un film di PE in strato sottile e poi asciugata con un getto di aria calda. In particolare, sono stati prelevati 400 µl della soluzione per effettuare un trattamento di spalmatura di circa 400 cm² di film PE a bassa densità. Inoltre, dopo la preparazione, ogni film attivato è stato saggiato per l'attività antimicrobica contro le popolazioni alterative della carne cruda, quali *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e LAB.

Allo scopo di verificare l'adesione della soluzione antimicrobica alla superficie del film, parte di esso è stato strofinato con un tampone di ovatta sterile prima di saggiare l'attività antimicrobica. Infatti, 3 porzioni (2x2 cm²) di film, di cui uno trattato con la soluzione antimicrobica, uno controllo (non trattato) e uno pulito, sono stati posti a contatto su piastre contenenti TSA (Oxoid) contenente 0,75% di agar inoculate con i bulk cellulari delle popolazioni microbiche alterative. Dopo incubazione alle rispettive temperature di crescita, l'attività antimicrobica è stata valutata osservando un chiaro alone d'inibizione della crescita in corrispondenza della zona di contatto col film.

3.2.3 Valutazione dell'attività antimicrobica del confezionamento attivo durante la conservazione di carne cruda confezionata sottovuoto

Il confezionamento antimicrobico ottenuto secondo il metodo descritto nel paragrafo precedente, è stato utilizzato per confezionare sottovuoto pezzi di carne cruda bovina di circa 1 Kg ciascuno. Le confezioni di carne sono state conservate a temperatura di refrigerazione

(circa 4°C) per 21 giorni. Pezzi di carne confezionati in film non trattati sono stati analizzati come controlli.

Al tempo zero (giorno del confezionamento) e dopo 21 giorni di conservazione a 4°C sono state effettuate le conte vitali di batteri aerobi mesofili (incubazione a 30°C per 72 h su PCA (Oxoid)), *Brochothrix thermosphacta*, (incubazione a 25°C per 48 h su STA Agar con aggiunta di STA selective supplement (Oxoid)) *Enterobacteriaceae* (incubazione a 30°C per 24-48 h su VRBGA (Oxoid)), *Pseudomonas* spp. (incubazione a 30°C per 48 h su Pseudomonas Agar con aggiunta di CFC selective supplement (Oxoid)) e LAB (incubazione a 30°C per 48 h su MRS Agar (Oxoid)).

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONI

3.3.1 Selezione di additivi food grade antimicrobici attivi contro i microrganismi alterativi della carne cruda

Nelle Tabelle 3 e 3.1 sono riportati i risultati relativi alle attività antimicrobiche nei confronti di popolazioni alterative della carne cruda delle soluzioni contenenti nisina, acido acetico ed EDTA in varie combinazioni.

Nessuna delle soluzioni contenenti una sola delle sostanze saggiate mostrava effetto contro tutti i gruppi microbici.

Dai risultati ottenuti si osserva come la nisina da sola (2,5 mg/ml) abbia effetto antimicrobico solo sui LAB e *Brochothrix thermosphacta*, in accordo con la bibliografia corrente in quanto entrambi appartenenti ai batteri Gram positivi.

L'acido acetico mostra invece un effetto inibitore nei confronti di *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* al 6% e al 5% rispettivamente.

La soluzione contenente 58 mg/ml di EDTA basta ad inibire la popolazione delle *Pseudomonas* spp., mentre occorrono 77 mg/ml per inibire la famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Le soluzioni, in cui la nisina è combinata con acido acetico o EDTA, che mostrano il massimo effetto antimicrobico su tutte le popolazioni alterative, sono quelle contenenti 2,5 mg/ml di nisina con il 6% di acido acetico e 5 mg/ml di nisina con 77 mg/ml di EDTA.

3.3.2 Attività antimicrobica di film PE attivati con soluzione di nisina contro le popolazioni alterative della carne cruda

Le due soluzioni antimicrobiche contenenti nisina (2,5 mg/ml) ed acido acetico (6%) e nisina (5 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) sono state utilizzate per la spalmatura del film PE col metodo descritto nel paragrafo dei materiali e metodi.

È stata saggiata l'attività antimicrobica dei due film PE attivati contro popolazioni microbiche alterative della carne cruda. In questo caso, il film con la soluzione contenente nisina ed acido acetico non mostrava alcun effetto di inibizione della crescita delle popolazioni microbiche, mentre il film trattato con la soluzione costituita da 5 mg/ml nisina e 77 mg/ml di EDTA risultava in grado di inibire la maggior parte delle popolazioni alterative (Fig. 3). Infatti, nonostante i risultati ottenuti negli esperimenti preliminari nella formulazione della soluzione in acido acetico, durante la preparazione del film, e in particolare durante la fase di asciugatura, l'acido acetico essendo una sostanza altamente volatile, probabilmente in parte evaporava. Inoltre, nell'esperimento relativo all'attività delle differenti soluzioni venivano spatolati 10 µl su una superficie di circa 0,2 cm², mentre la porzione di film saggiata ricopriva una superficie di 4 cm² e veicolava circa 4 µl della soluzione spalmata. Tuttavia, il rapporto adottato tra la quantità di soluzione e la superficie spalmata era quella che permetteva di

mantenere inalterate le caratteristiche tecnologiche del film plastico (colore, saldatura, trasparenza).

Questa ipotesi è confermata dai risultati riportati in Tabella 3.2 dove si può osservare che l'attività antimicrobica in piastra della soluzione nisina/EDTA contro le popolazioni microbiche alterative non trova riscontro nell'attività di film attivati con la stessa soluzione. In particolare, si osserva che la soluzione antimicrobica ha effetto su tutti i gruppi microbici, mentre il film attivato ha effetto solo contro i batteri Gram positivi.

Inoltre, dopo 24 h, 1, 2, 3 e 4 mesi di conservazione a temperatura ambiente il film attivato con la soluzione contenente nisina (5 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) risultava ancora attivo contro le popolazioni alterative della carne (dati non mostrati).

3.3.3 Attività antimicrobica del confezionamento attivo durante la conservazione di carne cruda confezionata sottovuoto

È stata valutata l'attività antimicrobica del film PE attivato con la soluzione contenente nisina (5 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) su pezzi di carne cruda confezionati sottovuoto per 21 giorni a 4°C.

I grafici della Figura 3.1 dimostrano come la carne cruda confezionata con il film attivato presenta una riduzione del numero di cellule di *Pseudomonas* spp. (Fig. 3.1 c) e *Brochothrix thermosphacta* (Fig. 3.1 e). Infatti, nella carne cruda dopo 21 giorni di conservazione sottovuoto in film attivo queste popolazioni si riducono entrambi di circa 0,5 log UFC/g e 1,5 log UFC/g rispettivamente. Mentre, con il film non trattato *Brochothrix thermosphacta* aumenta di circa 1,6 log UFC/g e *Pseudomonas* spp. aumenta di 0,5 log UFC/g.

Per quanto riguarda i batteri mesofili aerobi, LAB ed *Enterobacteriaceae*, non si osserva nessun effetto inibitore della crescita durante il confezionamento con film attivo (Fig. 3.1 a, 2 d e 2 b). Tali risultati evidenziano come utilizzando un film PE attivato con una soluzione di

nisina ed EDTA nel confezionamento sottovuoto di carne cruda bovina, il comportamento di alcune popolazioni microbiche alterative che comunemente contaminano quest'alimento cambia. In particolare, l'efficacia dell'imballaggio attivo è confermata dall'inibizione della crescita di *B. thermosphacta* e *Pseudomonas* spp., due tra le popolazioni microbiche alterative che predominano nella carne cruda specie in condizioni di sottovuoto (Delves-Broughton, 1990; Motlagh *et al.*, 1991).

Tabella 3: Attività antimicrobica di differenti soluzioni di nisina e acido acetico, contro *Enterobacteraiceae* (E), *Pseudomonas* spp.(P), LAB (L) e *Brochothrix thermosphacta* (B).

nisina mg/ml	ACIDO ACETICO														
	0%			3%			4%			5%			6%		
	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B
5	-	-	+++	-	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
2,5	-	-	+++	-	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
1,25	-	-	++	-	++	++	-	++	++	+++	++	++	+++	+++	++
0,625	-	-	++	-	++	++	-	++	++	++	++	++	+++	+++	++
0	-	-	-	-	+	-	-	++	-	+++	++	-	+++	+++	-

+++ : diametro di inibizione della crescita > 20 mm
 ++ : diametro di inibizione della crescita tra 10 e 20 mm
 + : diametro di inibizione della crescita < 10 mm
 - : nessuna inibizione della crescita

Tabella 3.1: Attività antimicrobica di differenti soluzioni di nisina e EDTA, contro *Enterobacteraiceae* (E), *Pseudomonas* spp.(P) LAB (L) e *Brochothrix thermosphacta* (B).

nisina mg/ml	EDTA mg/ml														
	0			19			39			58			77		
	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B	E	P	L/B
5	-	-	+++	-	-	+++	++	-	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
2,5	-	-	+++	-	-	+++	++	-	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
1,25	-	-	++	-	-	++	+	-	++	+++	++	++	++	+++	+++
0,625	-	-	++	-	-	++	+	-	++	++	+++	++	+++	+++	+++
0	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+++	++	+	+++	+

+++ : diametro di inibizione della crescita > 20 mm
 ++ : diametro di inibizione della crescita tra 10 e 20 mm
 + : diametro di inibizione della crescita < 10 mm
 - : nessuna inibizione della crescita

Tabella 3.2: Attività antimicrobica della soluzione di nisina (5 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) e del film PE attivato con la stessa soluzione contro le popolazioni microbiche alterative della carne cruda.

MICROORGANISMI	Soluzione di nisina e EDTA ^a	Attività del film ^b
<u><i>Brochothrix thermosphacta</i></u>	20	+
<u><i>Pseudomonas</i> spp.</u>	20	-
<u><i>Enterobacteriaceae</i></u>	20	-
<u>Lactic acid bacteria</u>	30	+
<u><i>Micrococcus flavus</i></u>	21	+

a: alone di inibizione in mm.

b: positivo (+); negativo (-).

Figura 3: Attività antimicrobica del film PE spalmato con una soluzione di nisina (0,3 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) contro *Brochothrix thermosphacta*.

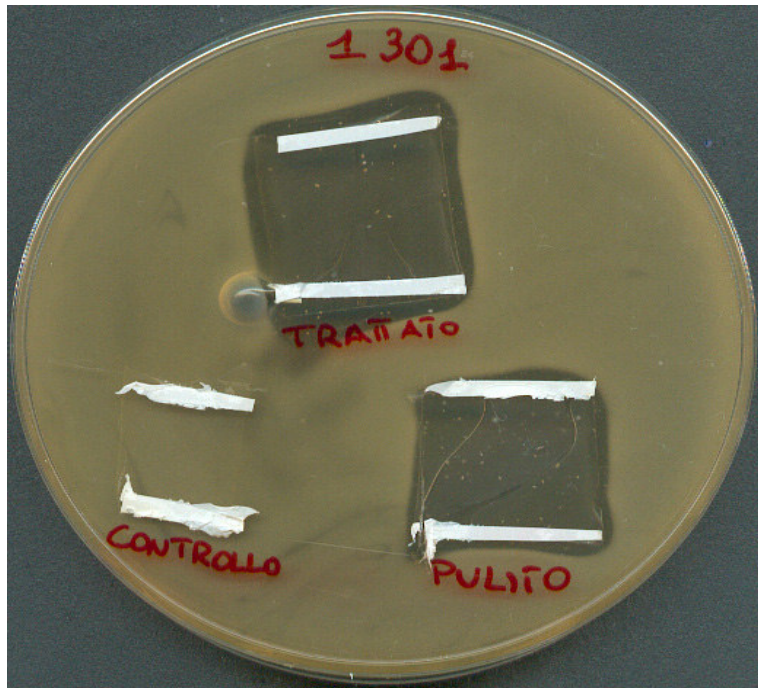
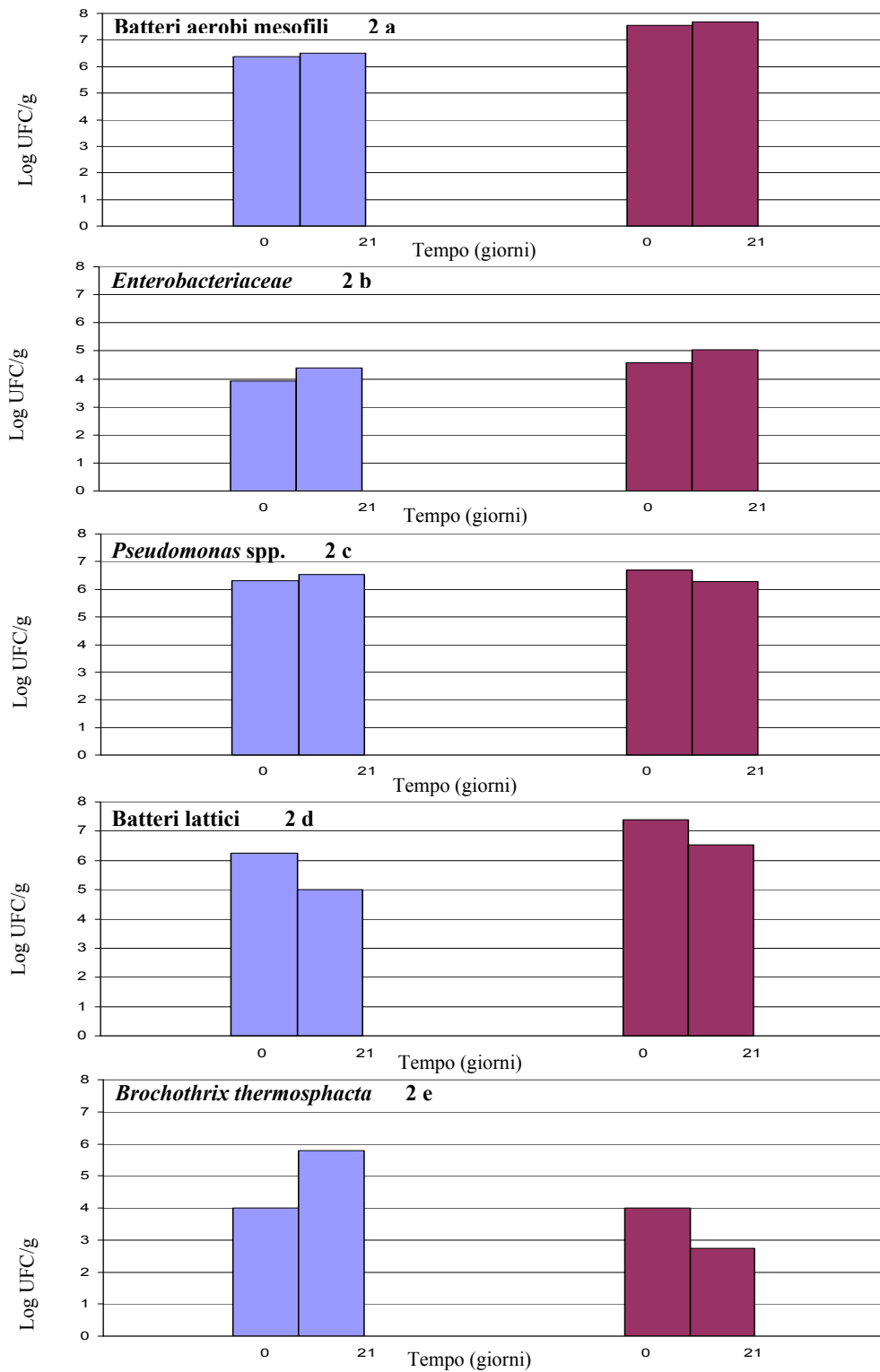


Figura 3.1: Analisi microbiologiche di carne confezionata sottovuoto con film attivo (rosso) e non (blu) per 21 giorni a 4°C.



CAPITOLO 4

CONSERVAZIONE DI CARNE CRUDA IN ATMOSFERA PROTETTIVA: EFFETTI SULLE POPOLAZIONI MICROBICHE E SUL COLORE

4.1 INTRODUZIONE

La shelf life della carne cruda dipende in larga misura dal tipo e dal numero di microrganismi presenti. Nella carne la carica microbica mesofila totale è indicativamente pari a 10^2 - 10^3 UFC/g e comprende una grande varietà di specie. Tuttavia, solo il 10% dei microrganismi inizialmente presenti è in grado di crescere alle temperature di refrigerazione (Borch *et al.*, 1996). Inoltre, durante la conservazione fattori ambientali come la temperatura, il pH, l'atmosfera gassosa e la concentrazione salina influiscono sulla selezione dei microrganismi e sulla loro velocità di crescita e attività metabolica.

La shelf life della carne cruda refrigerata può infatti variare da pochi giorni ad alcuni mesi.

Generalmente, per la carne cruda vengono utilizzati tre differenti tipologie di confezionamento: aria, sottovuoto e atmosfera protettiva. Quest'ultima è una tecnologia che consiste nel confezionamento con un'atmosfera costituita da una miscela di gas in differenti proporzioni, allo scopo di prolungare la conservazione della carne.

Nel caso del confezionamento in atmosfera protettiva, possono essere utilizzate differenti concentrazioni di ossigeno, anidride carbonica e azoto. Elevate percentuali di ossigeno (60-70%) sono adatte per la carne cruda rossa, al fine di prolungare il mantenimento del colore tipico, mentre le elevate percentuali di CO₂ (10-20%) esplicano un'efficace azione batteriostatica (Luño *et al.*, 2000; Dixon and Kell, 1989). Nella carne confezionata in

atmosfera protettiva con alte concentrazioni di O₂, un elevato numero di specie è in grado di crescere, come ad esempio, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp, *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp.. Tuttavia, molti microrganismi sono inibiti dalla CO₂ per cui la velocità di crescita diminuisce e la shelf life aumenta.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto di due differenti atmosfere gassose durante la conservazione refrigerata di fette di carne cruda bovina, osservando i cambiamenti nel colore e nella crescita di popolazioni microbiche alterative.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Campioni di carne

Sono state acquistate fette di carne cruda bovina (circa 80 g ciascuna) in differenti macellerie della regione Campania, trasportate in laboratorio, confezionate in atmosfera protettiva e conservate a 4°C.

4.2.2 Confezionamento in atmosfera protettiva di campioni di carne cruda bovina

I campioni sono stati confezionati in atmosfera protettiva mediante termosigillatrice semiautomatica a cassetto a doppio scomparto (Minipack Torre, TSM 105), del tipo “vuoto-immissione di gas”. La confezionatrice utilizzata è munita di un dispositivo di controllo elettronico delle fasi di estrazione dell'aria, immissione della miscela gassosa (impostate al 90%), tempo e temperatura di saldatura (impostate rispettivamente a 2,5 secondi e 150°C). I gas sono stati miscelati tramite il miscelatore (Brooks Microprocessor, Control & Read Out Unit, model 0152/0154) alimentato da tre bombole, munite di valvole a pressione residua. Il gas in uscita dal miscelatore veniva accumulato in un serbatoio in acciaio prima di essere

inviato alla macchina confezionatrice. Per il confezionamento del prodotto sono state utilizzate vaschette di polistirolo ricoperte con film barrierato, fornite dalla ditta Coop-box (B5-50). Le vaschette presentavano sul bordo uno strato sigillante che con la saldatura fa un corpo unico con il film di copertura, PET ($P_{O_2}=1,3\text{cm}^3/\text{m}^2\text{24h atm a } 23^\circ\text{C, } 0\%\text{UR}$). Le miscele utilizzate per confezionare la carne sono riportate in Tabella 4.

In ogni vaschetta con una fetta di carne è stato anche inserito un pannolino assorbente. Le vaschette così ottenute sono state conservate a temperatura di refrigerazione (4°C) per 2, 4, 7 e 14 giorni.

4.2.3 Determinazione dello spazio di testa delle confezioni (O_2 - CO_2)

Le concentrazioni percentuali di ossigeno ed anidride carbonica presenti nello spazio di testa delle confezioni contenenti i campioni di carne sono state misurate mediante l'utilizzo di un misuratore di gas Dansensor Check Mate 9900 O_2 - CO_2 . Lo strumento è fornito di pompa aspirante e tramite un ago preleva un campione di gas di 3 ml su cui viene eseguita la determinazione.

4.2.4 Determinazione del colore

La valutazione del colore è stata eseguita mediante un colorimetro a riflettanza MINOLTA Chroma Meter, modello CR-300, provvisto di una testa di misura con un'apertura di 8 mm di diametro, illuminante D65, geometria dell'illuminante d/0 e calibrazione standard CR-A43. I risultati, su 5 repliche di ogni campione, sono stati espressi in coordinate L^* (luminosità), a^* , indice del rosso, che varia dal verde (negativo) al rosso (positivo); b^* , indice del giallo, che va dal blu (negativo) al giallo (positivo). Inoltre è stato effettuato il test di Duncan per una analisi della varianza dei dati ottenuti.

4.2.5 Analisi microbiologiche

Per ogni vaschetta di carne sono stati prelevati 25 g al tempo zero (giorno dell'acquisto e del confezionamento) e dopo 2, 4, 7 e 14 giorni, diluiti con 225 ml di soluzione sale-peptone (0,85% NaCl – 0,1% peptone) ed omogeneizzati in Stomacher per 2 minuti. Ogni campione poi è stato diluito in sospensioni seriali decimali di diluente ed inoculato in piastre petri sterili per il conteggio di batteri mesofili aerobi (incubazione a 30°C per 72 h su PCA (Oxoid)), batteri psicotrofici aerobi (incubazione a 7°C per 10 giorni su PCA (Oxoid)), LAB (incubazione a 30°C per 48 h su MRS agar (Oxoid)), *Enterobacteriaceae* (incubazione a 30°C per 24-48 h su Violet Red Bile Glucose Agar (Oxoid)), *Pseudomonas* spp. (incubazione a 30°C per 48 h su Pseudomonas Agar con CFC selective supplement (Oxoid)) e *Brochothrix thermosphacta* (incubazione a 25°C per 48 h su STA Agar con STA selective supplement (Oxoid)).

4.2.6 Isolamento e raccolta in bulk cellulari di popolazioni microbiche

Sono stati ottenuti bulk cellulari di *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e LAB utilizzando una spatolina di vetro sterile e circa 1 ml di soluzione fisiologica (Ringer, Oxoid) per raccogliere le cellule cresciute su ogni piastra contabile ad ogni tempo di analisi.

Tutti i bulk cellulari sono stati poi conservati a –20°C per essere sottoposti ad estrazione del DNA.

4.2.7 Estrazione del DNA

Circa 100 µl di ogni bulk cellulare scongelato è stato centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a 25°C. Il pellet è stato risospeso in 100 µl di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ed è stato estratto il DNA secondo un protocollo descritto da Wizard DNA purification kit (Promega, Madison, Wiscon.): i 100 µl di sospensione sono stati miscelati con 160 µl di 0,5

M EDTA/ Nuclei Lysis Solution in rapporto 1/4,16, 5 μl di RNase (10 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich, Milano, I) e 20 μl di proteinase K (20 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich) ed incubati per 60 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione, è stato aggiunto al campione 1 vol. di ammonio acetato 5M e poi è stato centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante è stato precipitato con 0,7 vol. di isopropanolo (Sigma-Aldrich) e centrifugato a 14000 rpm per 5 min. Infine, il pellet è stato asciugato, risospeso in 50 μl di DNA Rehydration Solution (Invitrogen) e incubato a 55°C per 45 minuti.

4.2.8 Analisi PCR-DGGE

Per l'amplificazione della regione variabile V6-V8 del 16S rDNA sono stati utilizzati i primers U968-GC (AAC GCG AAG AAC CTT AC) e L1401 (GCG TGT GTA CAA GAC CC) (Randazzo *et al.*, 2002). Ogni miscela di amplificazione (volume finale 25 μl) conteneva 1 μl di DNA, i primers a una concentrazione di 0,2 μM ciascuno, ogni deossinucleoside trifosfato a una concentrazione di 0,25 mM, 2,5 mM di MgCl_2 , 2,5 μl di 10 X PCR buffer (Invitrogen) e 2,5 U di *Taq* polimerasi (Invitrogen). E' stata effettuata una PCR "touchdown" in una Minicycler (MyCycler™ Bio-Rad). La temperatura iniziale di annealing è stata scelta di 65°C e diminuiva di 1°C ad ogni ciclo per 10 cicli. Infine sono stati programmati 20 cicli a 55°C. La fase di estensione per ogni ciclo è stata effettuata a 72°C per 3 minuti mentre l'estensione finale è stata effettuata a 72°C per 10 minuti. Aliquote (3 μl) dei prodotti PCR sono stati controllati su gel di agarosio all'1,5% (w/v). I prodotti PCR sono stati poi analizzati tramite gel elettroferetico a gradiente di denaturanti (denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE) usando un apparato Dcode (Bio-Rad Labs, Hercules CA). I campioni sono stati caricati in un gel di poliacrilamine al 7% (w/v) in 1X TAE buffer (Tris base 2M, Acidi acetico glaciale 1M e EDTA 50mM a pH 8,0). Gli esperimenti di elettroforesi parallela sono stati effettuati a 60°C usando un gel contenente un gradiente di denaturanti da 30 a 60% urea-

formamide (100% corrispondente a 7 mol l^{-1} di urea e 40% [w/v] di formamide). La corsa elettroforetica è stata effettuata per 4 h a 200V. I gel sono stati poi immersi in una soluzione di bromuro di etidio per circa 10 minuti e decolorati in acqua distillata per 15 minuti.

4.2.9 Sequenziamento delle bande DGGE

Con un puntale sterile sono stati picchettati piccoli pezzi di bande dal gel DGGE ed ognuno dei quali è stato trasferito in 20 μ l di acqua sterile ed incubati overnight a 4°C per favorire la diffusione del DNA. Un microlitro del DNA eluito è stato utilizzato per la riamplicazione seguita da DGGE; mentre il DNA amplificato dai bulk cellulari è stato usato come controllo. I prodotti che migravano come singole bande, posizionate all'altezza del campione controllo, sono stati purificati tramite il Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) e sequenziati con il primer L1401. Per determinare le specie relative alle sequenze trovate è stata effettuata una ricerca nella GenBank con il BLAST program.

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.3.1 Analisi qualitativa di campioni di carne cruda confezionata in atmosfera protettiva

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalla determinazione del colore delle fette di carne al tempo zero, prima del confezionamento, 2 campioni su cinque mostravano un colore rosso vivo tipico della carne fresca, mentre gli altri campioni mostravano un leggero schiarimento della carne in alcune parti della fetta, che assumeva un colore più tendente al grigio che al rosso vivo.

Il test di Duncan mette in evidenza che proprio questi 2 campioni appartengono allo stesso sottogruppo, differendo significativamente dagli altri che a sua volta non sono statisticamente significativi. Le coordinate cromatiche L^* , a^* e b^* sono state misurate in 10 diverse posizioni su ogni fetta di carne.

La differenza tra i campioni in termini di L^* è dovuta all'ingrigimento osservato su alcune parti di ogni fetta di carne.

Poiché i campioni di carne sono stati acquistati la mattina stessa e trasportati in laboratorio in vaschette contenenti ognuna circa 1 kg di carne, è probabile che il differente colore sia dovuto ad una maggiore esposizione alla luce di alcune fette rispetto alle altre.

Poiché la variabilità al tempo zero può influenzare la variabilità nel corso della conservazione, consideriamo le 5 repliche appartenenti allo stesso gruppo per stimare l'effettiva varianza della popolazione.

Dopo 2 giorni di conservazione a 4°C (Fig. 4) la carne aveva un colore rosso vivo sia nel campione di controllo che nell'atmosfera con alte concentrazioni di ossigeno. Alcune differenze si evidenziavano nel campione di carne confezionato con l'atmosfera C (20% O₂ - 40% CO₂), dove la carne mostrava alcune parti grigie, molto probabilmente imputabili alla disposizione delle fette di carne nelle confezioni durante il trasporto.

L'analisi della varianza mette in evidenza che le fette di carne conservate per 2 giorni a 4°C differiscono per il parametro L^* . In particolare, il campione confezionato con l'atmosfera C si differenzia dagli altri due campioni.

L'atmosfera di conservazione non ha un effetto significativo sui parametri a^* e b^* . Su quest'ultimi però è significativo l'effetto tempo, che invece non è significativo su L^* . In particolare, entrambi i parametri diminuiscono in maniera significativa passando da un valore medio iniziale di 25,8 e 16,2 ad un valore dopo 2 giorni di 23,13 e 15,1, rispettivamente per a^* e b^* (Fig. 4).

Dopo 4 giorni di conservazione, i campioni differiscono per i parametri a^* e b^* , mentre sono risultate non significative le differenze in termini di L^* . I risultati del test di Duncan mettono in evidenza che i campioni confezionati in atmosfera protettiva appartengono allo stesso gruppo, differenziandosi invece dal campione di controllo, relativamente al parametro a^* , mentre il campione confezionato con l'atmosfera B si differenzia dal campione confezionato in aria e dal campione confezionato con l'atmosfera C per il parametro b^* , che risulta più alto rispetto agli altri due campioni.

Dopo 7 giorni di conservazione i campioni si differenziano per tutti i parametri (L^* , a^* e b^*). Il campione confezionato con l'atmosfera B preserva meglio il colore rosso della carne (a^* più elevato), rispetto all'atmosfera C.

Dopo 14 giorni di conservazione la situazione si inverte, ed il campione confezionato in aria mostra il valore di a^* più elevato.

In Figura 4.2 sono riportati i grafici dei risultati relativi allo spazio di testa delle vaschette di carne confezionate con le tre atmosfere.

Per i campioni confezionati in aria si assiste ad un aumento della concentrazione della CO_2 , espressa in percentuale, proporzionale all'aumento della crescita microbica, raggiungendo valori di circa 26% dopo 14 giorni di conservazione. La concentrazione dell'ossigeno, invece, diminuisce fino ad azzerarsi completamente. Tuttavia, al settimo giorno di conservazione entrambe le concentrazioni raggiungono lo stesso valore di 8%.

La composizione atmosferica dei campioni confezionati con il 60 % di O_2 e il 40 % di CO_2 , non subisce alcuna variazione durante la conservazione.

Analogamente, anche per i campioni confezionati con l'atmosfera C non si assiste a cambiamenti delle concentrazioni gassose fino al settimo giorno di conservazione. Infatti, solo al quattordicesimo giorno si osserva una diminuzione dell'ossigeno (circa 10%) e ad un sostanziale aumento della CO_2 .

4.3.2 Analisi microbiologica dei campioni di carne cruda bovina confezionati in atmosfera protettiva

In Figura 4.2 sono riportati i risultati dei conteggi relativi alla ricerca dei microrganismi target nei campioni di carne confezionati in atmosfera protettiva. Tutti i campioni di carne analizzati dopo 14 giorni di conservazione a 4°C si presentavano completamente alterati (sensorialmente inaccettabili).

I risultati al tempo zero mostrano come le fette di carne presentino una contaminazione microbica di circa 10^2 UFC/g facendo riferimento al conteggio di batteri mesofili e psicrotrofici aerobi.

Dopo 14 giorni di conservazione a 4C questi stessi microrganismi raggiungono valori di $2,5 \times 10^9$ UFC/g nel confezionamento controllo in aria, mentre raggiungono valori inferiori di circa 1 log nel confezionamento C (20% O₂ e 40% CO₂) e di circa 2 log nel confezionamento B (60% O₂ e 40% CO₂).

Tuttavia anche gli altri gruppi microbici ricercati subiscono un incremento della crescita durante la conservazione che varia in base al tipo di confezionamento.

Nel confezionamento A (aria) dopo 2 giorni di conservazione tutte le popolazioni microbiche, tranne le *Enterobacteriaceae*, raggiungono valori di circa 10^3 - 10^4 UFC/g. Al tempo 7 giorni *Pseudomonas* spp., mesofili e psicrotrofici raggiungono valori di 10^7 UFC/g, mentre *Brochothrix thermosphacta* cresce fino a 10^6 UFC/g; *Enterobacteriaceae* e LAB restano fermi a 5,3 e 5,4 log UFC/g rispettivamente. Dopo 14 giorni di conservazione tutti i gruppi microbici superano 10^8 UFC/g, tranne gli enterobatteri che raggiungono 10^7 UFC/g.

Nel confezionamento B (60% O₂ e 40% CO₂) a partire dal secondo giorno di conservazione a 4°C si differenziano due andamenti di crescita che riguardano batteri mesofili, psicrotrofici e LAB con valori superiori a 3,5 log UFC/g da un lato, e *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Brochothrix thermosphacta* con valori che non vanno oltre 10^2 UFC/g dall'altro. Dopo

14 giorni la crescita aumenta fino a 10^7 UFC/g tranne che per *Enterobacteriaceae* e *Brochothrix thermosphacta* che raggiungono 5 log UFC/g.

Nel confezionamento C (20% O₂ e 40% CO₂) i risultati sono molto simili a quelli ottenuti col confezionamento B fino al quarto giorno di conservazione. Infatti, a partire dal settimo giorno i valori di mesofili, psicrotrofici e LAB si presentano più elevati ed in particolare gli psicrotrofici arrivano a 7,4 log UFC/g, mentre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Brochothrix thermosphacta* mostrano valori di 10^4 UFC/g. Dopo 14 giorni, invece, tutte le popolazioni batteriche raggiungono valori compresi tra 10^7 a 10^8 UFC/g.

Infine, i confezionamenti in atmosfera protettiva risultano essere migliori del confezionamento controllo in aria fino al quarto giorno di conservazione a 4°C, in quanto tutte le specie microbiche mostrano valori di crescita inferiori.

Al settimo e quattordicesimo giorno solo il confezionamento B (60% O₂ e 40% CO₂) risulta essere migliore del confezionamento in aria dal punto di vista microbiologico.

Infatti, dopo 7 giorni di conservazione le conte vitali di LAB, mesofili, psicrotrofici e *Enterobacteriaceae* dei campioni confezionati con l'atmosfera B mostrano valori più bassi di quelli confezionati con le altre atmosfere.

In particolare, per gli enterobatteri ci sono 1,6 log UFC/g di differenza tra il confezionamento C e B, e ben 3 log UFC/g rispetto al confezionamento in aria.

Dopo 14 giorni di conservazione tutte le popolazioni microbiche analizzate presentano valori mediamente inferiori di circa 2 cicli logaritmici rispetto al controllo, con eccezione di *Brochothrix thermosphacta* i cui valori differiscono di ben 3 log UFC/g in meno.

4.3.3 Identificazione delle specie microbiche tramite PCR-DGGE

I bulk cellulari di *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e LAB sono stati sottoposti, dopo estrazione del DNA ed amplificazione della regione V6-V8, alla tecnica PCR-DGGE. I profili

DGGE dei 3 gruppi microbici sono mostrati in Figura 4.3, 4.4 e 4.5. I risultati relativi ai frammenti sequenziati sono riportati in Tabella 4.1.

Le bande ottenute dai bulk di *Pseudomonas* agar sono state identificate come *Pseudomonas* spp., *Serratia proteamaculans* e *Rahnella* sp.. In particolare, due bande hanno riportato le stesse percentuali di identità per tre specie appartenenti a *Pseudomonas* spp : *P. putida*, *P. fragi* e *P. syringae* (Tab. 4.1; Fig 4.3).

Le specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolate da VRBGA sono state identificate come *Pantoea ananatis*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia grimesii*, *Pseudomonas* sp., *Serratia proteamaculans*, *Hafnia alvei*, *Rahnella aquatilis* e *Rahnella* sp. (Tab. 4.1; Fig 4.4). Mentre, *Carnobacterium divergens*, *Leuconostoc inhae*, *Lactobacillus graminis*, *Weissella hellenica*, *Leuconostoc paramesenteroides* e *Rahnella* sp. sono le specie identificate dalle bande ottenute dai profili dei LAB cresciuti su MRS Agar (Tab. 4.1; Fig 4.5).

Analizzando i profili DGGE dei bulk di *Pseudomonas* spp., ci si rende conto come indipendentemente dalla tipologia di confezionamento utilizzato, il doppietto di bande (bande numero 2 e 3 in Tab. 4.1), identificato solo a livello di genere, è sempre presente in tutti i campioni di carne, così come al tempo zero. Durante la conservazione della carne confezionata in aria (Fig. 4) si assiste, dal settimo giorno di conservazione, alla comparsa di specie come *Serratia proteamaculans* e *Rahnella* sp.. In presenza di un'atmosfera contenente il 60 % di ossigeno e il 40% di CO₂, si assiste invece ad una situazione capovolta. Inizialmente si ha la presenza di più specie microbiche che nel tempo vengono sostituite dalla presenza solo di *Pseudomonas* sp. Nell'atmosfera C, la situazione è simile a quella in aria, dove a partire dalla sola presenza di *Pseudomonas* sp. si osserva al quattordicesimo giorno di conservazione addirittura solo la presenza di *Rahnella* sp..

In Figura 4.4 sono rappresentati i profili DGGE dei bulk ottenuti dai conteggi di *Enterobacteriaceae* su VRBGA ed è possibile notare che inizialmente, in tutti i campioni di carne prima del confezionamento, è presente solo *Enterobacter agglomerans*, poi le differenti tipologie di conservazione determinano la crescita di diverse popolazioni originariamente presenti a basse concentrazioni.

Nel confezionamento in aria al secondo giorno di conservazione sono presenti le specie *Pantoea ananatis* e *Rahnella*; quest'ultima diventa poi l'unica specie dominante durante l'alterazione della carne. Analogamente a quanto evidenziato dal profilo di *Pseudomonas* spp., il 60% di ossigeno inibisce lo sviluppo della specie *Rahnella* che invece risulta essere la specie dominante quando la concentrazione di CO₂ è maggiore a parità di ossigeno. Durante la conservazione con il confezionamento C si osserva che la specie *Serratia* lascia il posto dal settimo giorno di conservazione a *Rahnella aquatilis* e *Rahnella* sp., specie ancora una volta dominante durante l'alterazione.

Infine, i profili DGGE dei bulk cellulari di LAB sono mostrati in Figura 4.5. Nella carne prima del confezionamento è presente solamente la specie *Weissella hellenica* che si ritrova nei campioni di carne conservati in aria e con il confezionamento B. Dal secondo giorno di conservazione compare *Leuconostoc graminis* che è sempre presente in tutti i campioni di carne confezionati in aria. Durante tale confezionamento si osserva la comparsa, dal quarto giorno di conservazione, di *Carnobacterium divergens* e *Rahnella* sp. Nei campioni di carne confezionati con l'atmosfera B al secondo giorno di conservazione si nota la presenza di *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc kimchii*, che al settimo giorno scompare per dare il posto nuovamente a *Weissella hellenica*. Durante la conservazione con l'atmosfera C si osserva al secondo giorno la presenza di *Weissella hellenica*, *Leuconostoc paramesentarioides* e *Lactobacillus sakei*. Quest'ultima risulta essere la specie dominante in questa tipologia di

conservazione, durante la quale compaiono anche le specie *Leocnostonoc kimchii* e *Leocnostonoc inhae*.

Tuttavia, anche in questo caso, analogamente a quanto è successo per gli altri profili DGGE, ad alterazione avvenuta, al quattordicesimo giorno si nota la presenza della specie *Rahnella*.

4.4 CONCLUSIONI

Lo studio della conservazione refrigerata di carne cruda in atmosfera protettiva ha messo in evidenza diverse correlazioni tra aspetti microbiologici e qualitativi della carne stessa.

In questo studio le due atmosfere utilizzate contengono differenti concentrazioni di ossigeno ed anidride carbonica, al fine di valutare da un lato l'effetto O₂ (tra l'aria e l'atmosfera B) e dall'altro l'effetto CO₂ (tra le atmosfere B e C) sul processo di alterazione della carne cruda bovina

L'analisi dei campioni di carne confezionati in aria ha messo in evidenza la classica alterazione nel tempo sia dal punto di vista microbiologico che del cambiamento di colore. All'aumentare della crescita microbica, aumenta la concentrazione della CO₂ a scapito dell'ossigeno e il colore della carne diventa scuro. In particolare, l'alterazione dei campioni controllo confezionati in aria è stata confermata dall'aspetto del colore con un valore molto alto di a* (Fig. 4), probabilmente dovuto alla modificazione della composizione gassosa (Fig. 4.1) in seguito allo sviluppo dei microrganismi aerobi come *Pseudomonas* spp. (Fig. 4.2) e al conseguente instaurarsi di condizioni anaerobiche. Infatti, generalmente l'assenza di ossigeno determina la conversione dell'emoglobina in deossiemoglobina che conferisce alla carne un colore rosso ciliegia (Jeremiah, 2001).

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di carne confezionati con le atmosfere gassose B e C, dimostrano come i parametri microbiologici cambiano già dopo 4 giorni di conservazione, shelf life che generalmente si attribuisce alla carne conservata a temperatura di refrigerazione.

Infatti, al settimo giorno di conservazione con l'atmosfera B i valori in termini di UFC/g di alcune popolazioni come *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e *B. thermosphacta* sono i più bassi rispetto al controllo, determinando un aumento della shelf life della carne. Ipotesi confermata anche dall'analisi dello spazio di testa delle vaschette confezionate con le due atmosfere protettive, che nel tempo non subiscono variazioni significative se non al quattordicesimo giorno nel caso del confezionamento C.

Per quanto riguarda l'identificazione molecolare ottenuta tramite PCR-DGGE, essa ha dimostrato come la selettività dei substrati utilizzati per le conte vitali dei microrganismi ricercati è dubbia. In tutti i bulk cellulari analizzati sono state identificate specie batteriche non appartenenti al genere ricercato. In particolare, la specie *Rahnella* è presente in quasi tutti i profili ottenuti e per i quali è possibile sostenere che la sua presenza è generalmente associata all'alterazione nel tempo, nel caso dei campioni di carne confezionati in aria e soprattutto in quelli confezionati con l'atmosfera C.

Rahnella sp. e *Rahnella aquatilis* sono specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* che insieme a *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans* e *Hafnia alvei* sono specie batteriche spesso isolate da carne e prodotti carnei alterati e prodotti ittici come salmone conservato in atmosfera modificata (Lindberg *et al.*, 1998; Paludan-Muller *et al.*, 1998; Kaley, 2005).

Difficile è stata invece l'identificazione a livello di specie del genere *Pseudomonas*, in quanto l'amplificazione della regione variabile del 16S che per gli altri gruppi microbici è portato a risultati soddisfacenti, probabilmente non è stata ideale. Tuttavia, ad oggi la bibliografia corrente non suggerisce alcuna soluzione in merito.

Tabella 4 - Composizione delle miscele gassose adoperate per la conservazione dei campioni di carne cruda in atmosfera protettiva.

Atmosfera	% O₂	% CO₂	% N₂
A	21	0	79
B	60	40	0
C	20	40	0

Tabella 4.1 – Specie identificate da bande DGGE di bulk cellulari ottenuti da campioni di carne confezionata in atmosfera protettiva.

Banda ^a	Origine (substrato)	Closest relativo	% Identità	Accession no.
1	Pseudomonas Agar	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	AY900171
2	Pseudomonas Agar	<i>Pseudomonas putida/fragi/syringae</i>	98	AY450557
3	Pseudomonas Agar	<i>Pseudomonas putida/fragi/syringae</i>	100	AY450557
4	Pseudomonas Agar	<i>Serratia proteamaculans</i>	94	AF286867
5	Pseudomonas Agar	<i>Pseudomonas putida</i>	100	AY450557
6	Pseudomonas Agar	<i>Rahnella</i> sp.	99	RSU88439
7	VRBGA	<i>Pantoea ananatis</i>	98	DQ133546
8	VRBGA	<i>Enterobacter agglomerans</i>	99	AF130952
9	VRBGA	<i>Serratia grimesii/liquefaciens</i>	100	AY789460/AY253924
10	VRBGA	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	AY900171
11	VRBGA	<i>Serratia proteamaculans</i>	99	AY902209
12	VRBGA	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	AY900171
13	VRBGA	<i>Rahnella aquatilis</i>	99	AY572428
14	VRBGA	<i>Rahnella aquatilis</i>	99	AY253920
15	VRBGA	<i>Rahnella</i> sp.	99	RSU88439
16	MRS Agar	<i>Leuconostoc kimchii</i>	100	AF173986
17	MRS Agar	<i>Leuconostoc inhae</i>	95	AY675244
18	MRS Agar	<i>Carnobacterium divergens</i>	99	AY543037
19	MRS Agar	<i>Lactobacillus graminis</i>	99	AM113778
20	MRS Agar	<i>Lactobacillus sakei</i>	99	AM113784
21	MRS Agar	<i>Weissella hellenica</i>	100	AB023240
22	MRS Agar	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	100	S67831
23	MRS Agar	<i>Rahnella</i> sp.	99	RSU88439

a: Le bande corrispondenti ai numeri sono mostrate nelle Figure 4.3, 4.4 e 4.5.

Figura 4 – Analisi del colore di campioni di carne cruda confezionata in atmosfera protettiva: ■ aria; ◇ 60% O₂ e 40% CO₂; ▲ 20% O₂ e 40% CO₂.

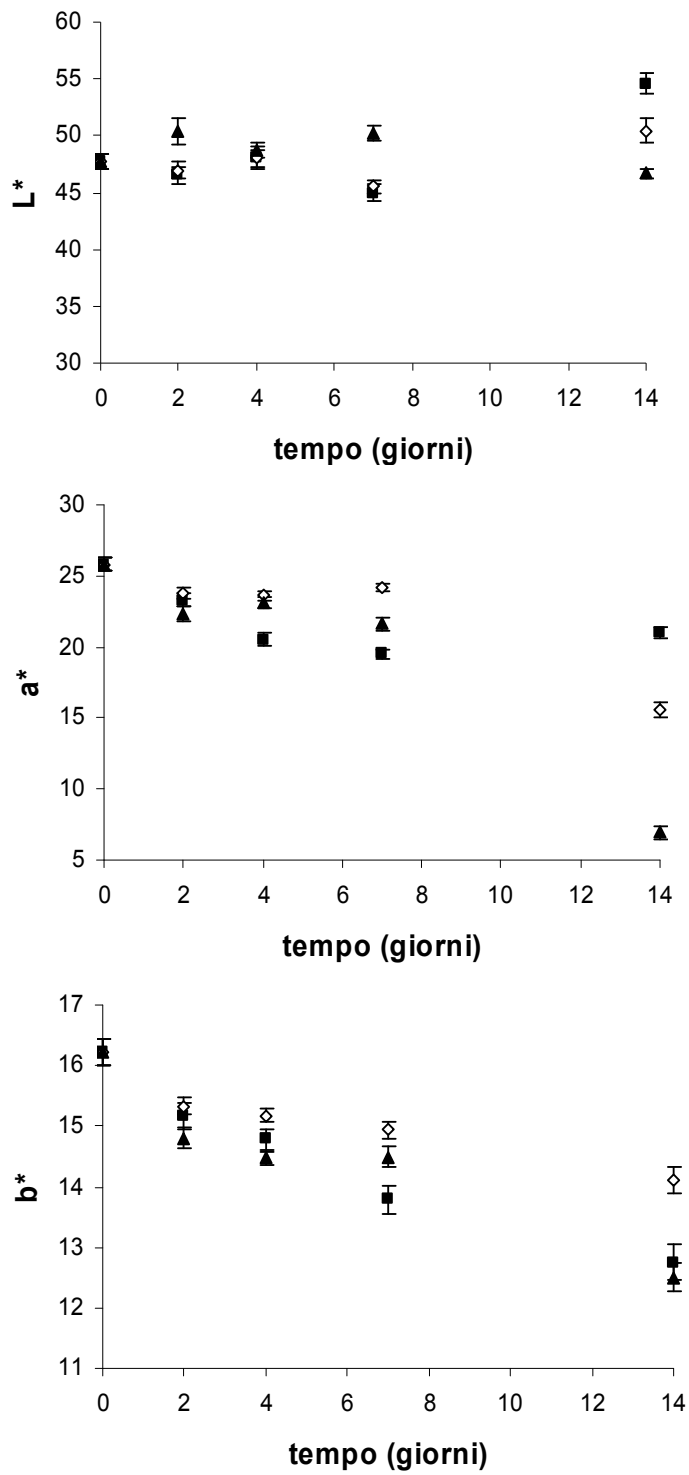


Figura 4.1 - Composizione gassosa dello spazio di testa di campioni di carne cruda confezionati in atmosfera protettiva.

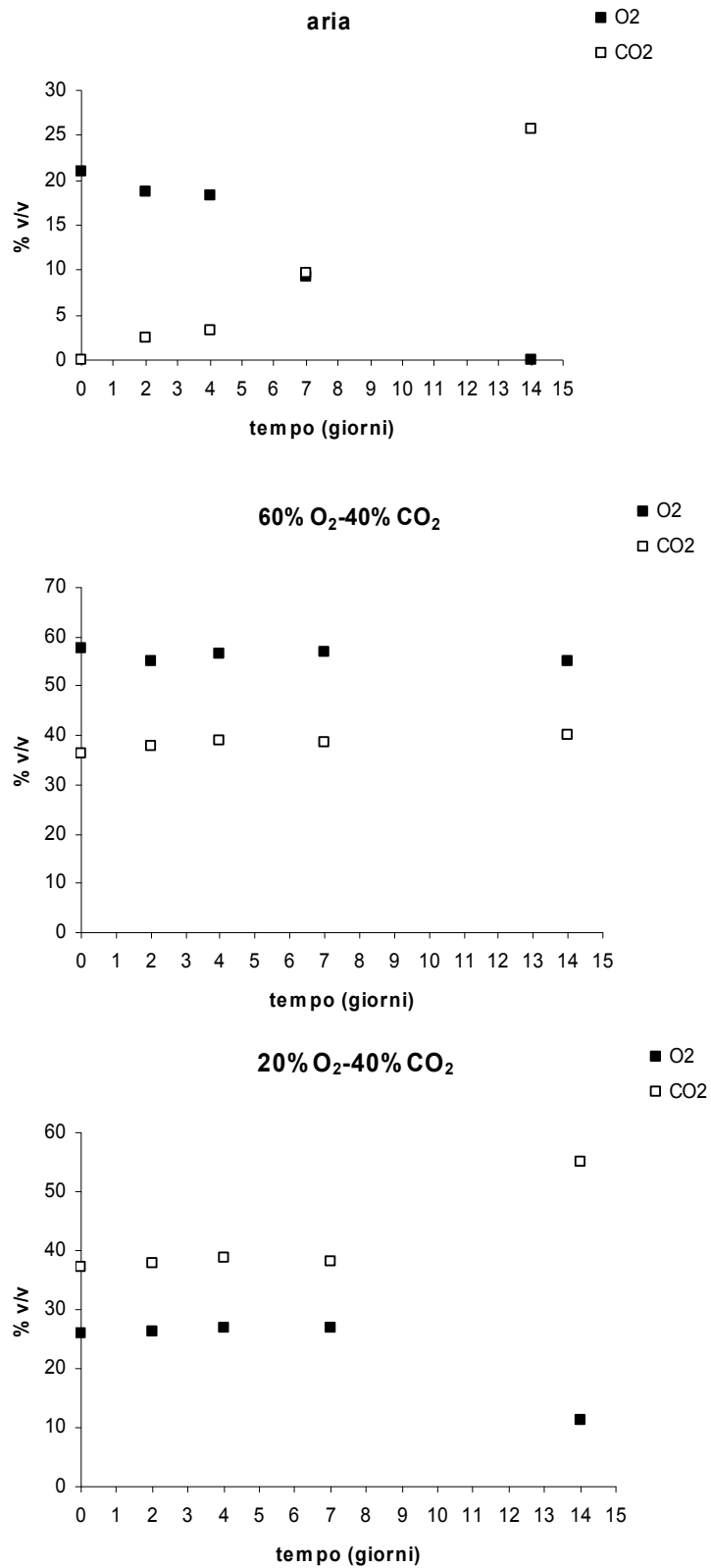
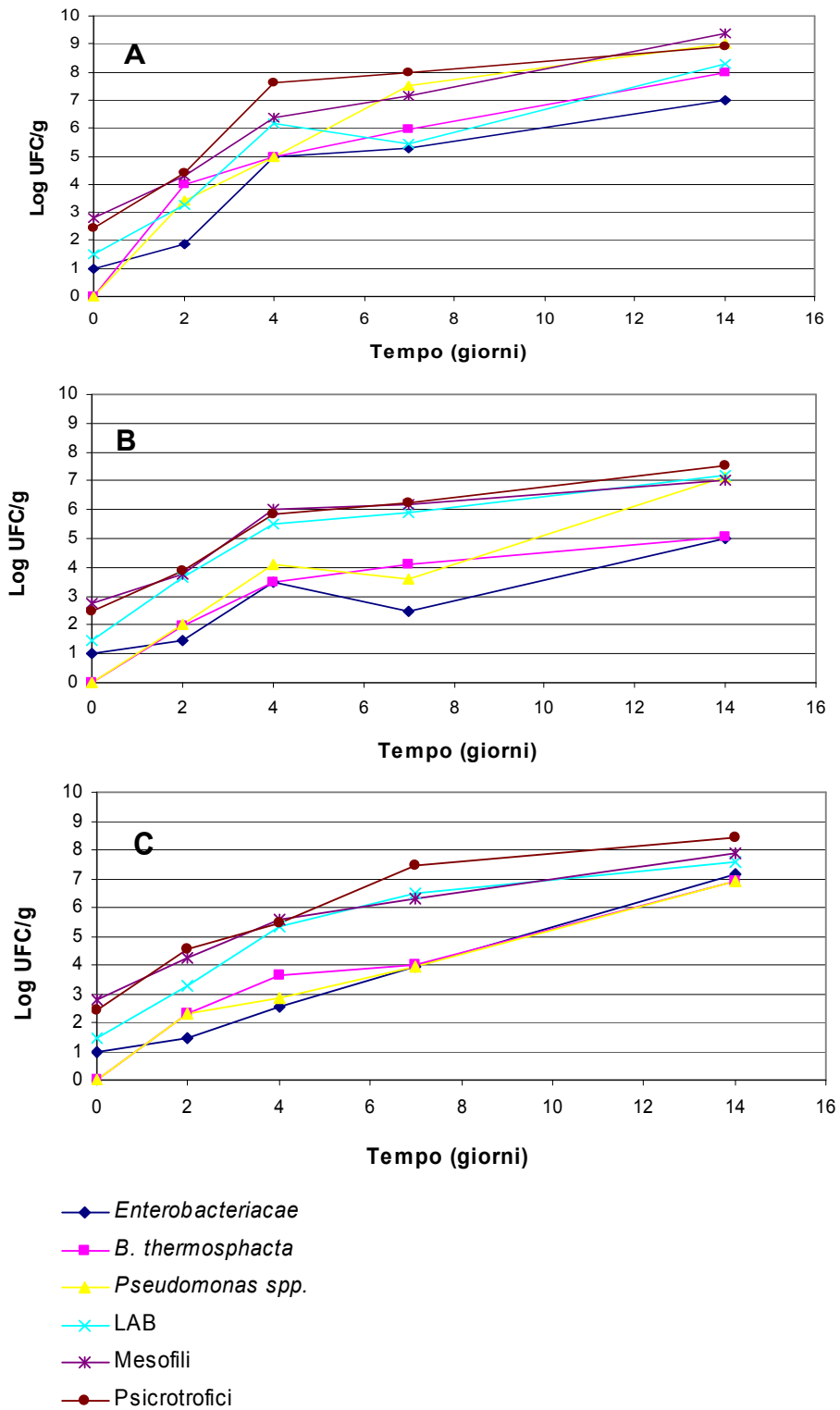


Figura 4.2 – Analisi microbiologiche di fette di carne cruda confezionata con aria (A), 60% O₂ e 40% CO₂ (B) e 20% O₂ e 40% CO₂ (C) e conservate a 4°C.



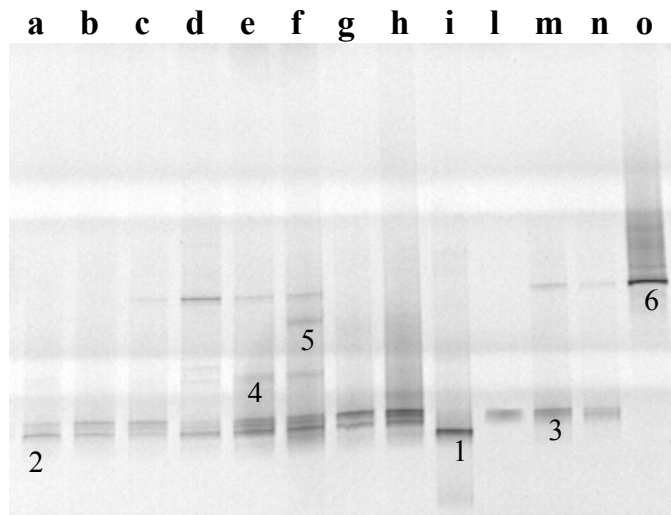


Figura 4.3 - Profili DGGE di bulk cellulari ottenuti dal conteggio su Pseudomonas Agar di campioni di carne al tempo zero (a); conservati per 2 giorni in aria (b); conservati per 4 giorni in aria (c); conservati per 7 giorni in aria (d); conservati per 14 giorni in aria (e); conservati per 2 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (f); conservati per 4 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (g); conservati per 7 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (h); conservati per 14 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (i); conservati per 2 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (l); conservati per 4 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (m); conservati per 7 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (n); conservati per 14 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (o).

L'identificazione delle bande numerate è riportata in Tabella 4.1.

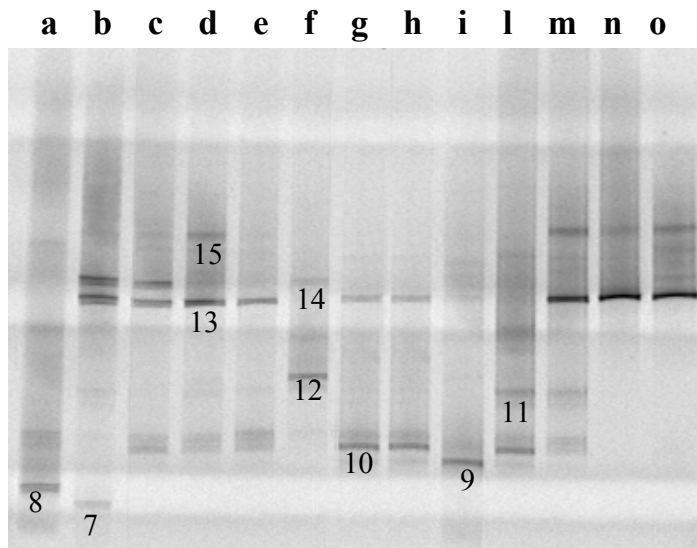


Figura 4.4 - Profili DGGE di bulk cellulari ottenuti dal conteggio su VRBGA di campioni di carne al tempo zero (a); conservati per 2 giorni in aria (b); conservati per 4 giorni in aria (c); conservati per 7 giorni in aria (d); conservati per 14 giorni in aria (e); conservati per 2 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (f); conservati per 4 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (g); conservati per 7 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (h); conservati per 14 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (i); conservati per 2 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (l); conservati per 4 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (m); conservati per 7 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (n); conservati per 14 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (o).

L'identificazione delle bande numerate è riportata in Tabella 4.1.

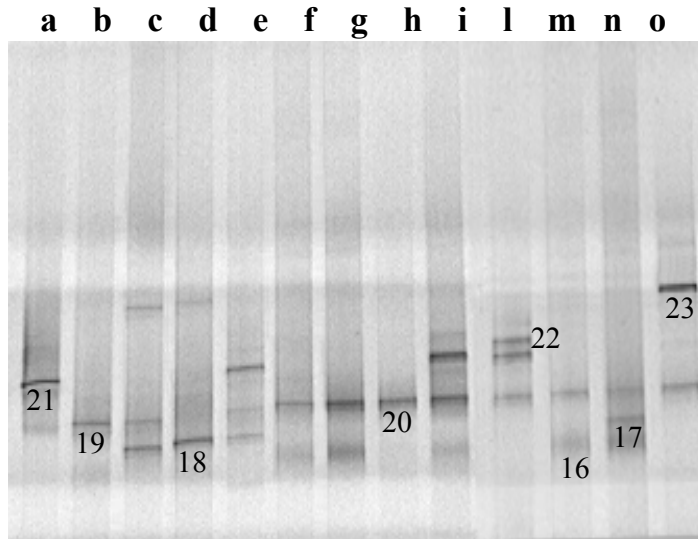


Figura 4.5 - Profili DGGE di bulk cellulari ottenuti dal conteggio su MRS Agar di campioni di carne al tempo zero (a); conservati per 2 giorni in aria (b); conservati per 4 giorni in aria (c); conservati per 7 giorni in aria (d); conservati per 14 giorni in aria (e); conservati per 2 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (f); conservati per 4 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (g); conservati per 7 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (h); conservati per 14 giorni con 60% O₂ e 40% CO₂ (i); conservati per 2 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (l); conservati per 4 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (m); conservati per 7 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (n); conservati per 14 giorni con 20% O₂ e 40% CO₂ (o).

L'identificazione delle bande numerate è riportata in Tabella 4.1.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

La carne cruda rappresenta un ecosistema alimentare molto complesso che con le sue proprietà chimico-fisiche può determinare la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero e varietà di microrganismi (Holzapfel, 1998; García-López *et al.*, 1998). Naturalmente la carne possiede una microflora che è strettamente dipendente dalla sua composizione chimica, dall'ambiente in cui viene prodotta (condizioni di allevamento e macellazione) e dalle condizioni in cui è trasformata, conservata, distribuita e consumata (Gill, 1998). La carne è considerata alterata quando intervengono dei cambiamenti organolettici che la rendono inaccettabile per il consumo umano.

L'alterazione organolettica della carne è infatti il risultato della sua decomposizione e della produzione di metaboliti dovuta alla crescita dei microrganismi. La shelf-life della carne, pertanto, è strettamente dipendente dal numero e tipi di batteri inizialmente presenti e dalla loro successiva crescita durante la conservazione. Un aspetto importante assume l'utilizzo della temperatura di refrigerazione e le condizioni di atmosfera gassosa. L'alterazione della carne fresca e dei prodotti carnei conservati a temperature di refrigerazione è causata soprattutto da batteri psicrotrofici come *Brochothrix thermosphacta*, batteri lattici (LAB), *Pseudomonas* spp. ed *Enterobacteriaceae*. Essa si manifesta comunemente con cattivi odori causati dalla presenza di composti volatili prodotti durante il metabolismo microbico (Borch, *et al.*, 1996).

In questo lavoro di tesi sono stati valutati presenza e comportamento di popolazioni batteriche alterative durante la conservazione refrigerata della carne cruda bovina. In

particolare, sono stati allestiti tre esperimenti durante i quali la conservazione della carne cruda è stata effettuata in condizioni aerobiche, sottovuoto e in atmosfera protettiva.

Nel primo esperimento è stato valutato “in vitro” il comportamento di *Brochothrix thermosphacta* in presenza delle microflora alterative della carne conservata aerobicamente a 5°C, cercando di valutare le loro possibili interazioni.

Dagli esperimenti di interazioni a coppie tra *B. thermosphacta* e gli altri gruppi microbici alterativi esso viene inibito dai LAB, mentre la sua crescita non viene influenzata né da *Pseudomonas* spp., né dalla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Quando *B. thermosphacta* è co-inoculato con più gruppi microbici alterativi allo stesso tempo, esso in presenza di LAB e *Pseudomonas* mostra, nelle prime 24 h, una crescita di circa 1,5 log UFC/g più alta che quando è da solo. Mentre, in presenza di tutti gli altri gruppi microbici insieme non si notano effetti sulla crescita di *B. thermosphacta*.

In un secondo esperimento è stata valutata l'attività antimicrobica di un film PE attivato con una soluzione contenente nisina (5 mg/ml) ed EDTA (77 mg/ml) su carne cruda bovina confezionata sottovuoto per 21 giorni a 4°C. I risultati dimostrano che popolazioni microbiche alterative come *Pseudomonas* spp e *Brochothrix thermosphacta* in tali condizioni subiscono un decremento di circa 0,5 log UFC/g e 1,5 log UFC/g rispettivamente, mentre, con il film non trattato *Brochothrix thermosphacta* aumenta di circa 1,6 log UFC/g e *Pseudomonas* spp. aumenta di 0,5 log UFC/g.

Infine, la conservazione refrigerata di carne cruda in atmosfera protettiva ha messo in evidenza diverse correlazioni tra aspetti microbiologici e qualitativi della carne stessa. Sono state confezionate fette di carne cruda bovina in vaschette contenenti aria (A), 60% O₂-40% CO₂ (B) e 20% O₂-40% CO₂ (C) e conservate per 2, 4, 7 e 14 giorni a 4°C. Gli effetti dei tre confezionamenti sono stati valutati sulla crescita di popolazioni microbiche alterative, cambiamenti del colore e dello spazio di testa dei campioni.

L'analisi dei campioni di carne confezionati in aria ha messo in evidenza la classica alterazione nel tempo. All'aumentare della crescita microbica, aumenta la concentrazione della CO₂ a scapito dell'ossigeno e il colore della carne diventa scuro.

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di carne confezionati con le atmosfere gassose B e C, dimostrano come i parametri microbiologici cambiano già dopo 4 giorni di conservazione. Infatti, al settimo giorno di conservazione con l'atmosfera B i valori in termini di UFC/g di alcune popolazioni come *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* e *B. thermosphacta* sono i più bassi rispetto al controllo, determinando un aumento della shelf life della carne. Ipotesi confermata anche dall'analisi dello spazio di testa delle vaschette confezionate con le due atmosfere protettive, che nel tempo non subiscono variazioni significative se non al quattordicesimo giorno nel caso del confezionamento C. L'analisi PCR-DGGE si è dimostrata una valida tecnica adottata per l'identificazione molecolare a livello di specie delle popolazioni microbiche isolate dai campioni di carne. La specie *Rahnella* è stata associata all'alterazione nel tempo dei campioni di carne sia confezionati in aria che con il 40% CO₂ e 20% O₂.

In conclusione, a seconda del tipo di conservazione refrigerata a cui è sottoposta, la carne cruda presenta popolazioni batteriche in grado di svilupparsi in maniera differente. Inoltre, risulta molto importante il grado di contaminazione iniziale della carne stessa che a sua volta dipende da molti fattori antecedenti al confezionamento e alla conservazione.

Futuri studi "in vivo", direttamente sulla carne, potrebbero darci una visione più realistica delle interazioni tra le popolazioni alterative della carne cruda refrigerata aerobicamente, al fine di comprendere meglio l'evoluzione microbica responsabile dell'alterazione della carne per migliorarne la conservazione.

BIBLIOGRAFIA

- Borch, E., Kant-Muermans, M-L., and Blixt Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat product. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-120.
- Brody, A.L. (1989). Modified atmosphere/vacuum packaging of meat. In *Controlled/Modified Atmosphere Packaging of Foods*. (Brody, A.L. ed.) Food & Nutrition Press, Trumbull, CT., pp. 17.
- Cappelli, P. e Vannucchi, V. (1998). *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*. Ed. Zanichelli, Bologna.
- Chung, K. T., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. (1989). Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1329-1333.
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M. and Dainty, R. H. (1992) Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium esterheticum* sp. Nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, 96, 235-240.
- Crouse, J. D. (1988). Impact of slaughtering and processing techniques on the improvement of carcass and meat valorization. 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding. Vol. 1, 437-457, INRA, Paris.
- Dainty, R. H., and Hibbard, C. M. (1979) Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 387-396.
- Dainty, R.H., and Mackey, B.M. (1992) The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol.* Symposium Supplement, 73, 103S-114S.
- Davies, A. and Board, R. (1998). *The microbiology of meat and poultry*. London: Blackie Academic & Professional.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 51, 106-112.

- Dixon, N. M., and Kell, D. B. (1989). A review. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* 67, 109-136.
- Dransfield, E., Jones, R. C. D., Mac Fie, H. J. H. (1981). Quantifying changes in tenderness during storage of beef. *Meat Sci.*, 5, 131-137.
- Dutson, T. R. (1983). Relationship of pH and temperature to distribution of specific muscle proteins and activity of lysosomal proteinases . *J. Food Biochem.*, 7, 223.
- Dutson, T. R., Yates, L. D., Smith, G. C., Carpenter, Z. L., Hostetler, R. L. (1977). Rigor mortis onset before chilling. *Proc. Recip. Meat Conf.* 30, 79.
- Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56, 297–314.
- Ercolini, D., Hill, P. J., and Dodd, C. E. R. (2003) Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3540-3548.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., and Coppola, S. (2001) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of "culture dependent" and "culture independent" approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 610-617.
- Faber, J. M. (1991). Microbiological aspect of modified atmosphere packaging technology. A review. *J. Food Protect.* 54, 58-70.
- García-López, M. L., Prieto M., and Otero, A. (1998) The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In *The Microbiology of meat and poultry* (Eds A. Davies and R. Board) pp. 118-157. London. Blackie Academic & Professional.
- Gardner, G. A. (1981) Environmental conditions and the role of *Brochothrix thermosphacta* in the spoilage of processed meat. In *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity* (Eds T. A. Roberts, G., Hobbs, J. H. B., Christian and N., Skovgaard) pp. 211-223. London. New-Work Academic Press.
- Gardner, G. A. (1981). *Brochothrix thermosphacta* (Microbacterium thermosphactum) in the spoilage of meats: a review. In: Roberts, T. A., Hobbs, G., Christian, J. H. B. e Skovgaard, H.

- (Ed.) "Psychrotrophic microorganisms in the spoilage and pathogenicity". Accademic Press, London. 139-173.
- Gill, C. O. (1998) Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In A. Davies & R. Board (Eds.), . In *The Microbiology of meat and poultry* (Eds A. Davies and R. Board) pp. 1-28. London. Blackie Academic & Professional.
- Gill, C. O., and Newton, K. G. (1977) The developmment of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 43, 189-195.
- Goll, D. E., Otsuka, Y., Nagainis, P. A., Shannan, J. D., Sathe, S. K. and Muguruma, M. (1983). Role of muscle proteinases in manteinance of muscle integrity and mass. *J. Food. Biochem.*, 7, 151.
- Greaser, M. L. (1986). Conversion of muscle to meat. In: *Muscle as food* Bechtel P. J. (Ed.): Academic Press Inc., Orlando. 37-102
- Holzapfel, W. H. (1998) The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In *The Microbiology of meat and poultry* (Eds A. Davies and R. Board) pp. 35-74. London. Blackie Academic & Professional.
- Hurst, A. (1981). Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85–103.
- Hutchings, J. B. (1977). The importance of visual appearance of foods to the food processor and the consumer. In Birch G. G., Brennan G., Parker K. J. (Ed.): *Sensory properties of food.* Applied Science Publishers Ltd., London. 45-57
- Ingram, M. e Dainty, R. H. (1971). Changes caused by microbes in spoilage of meats. *Journal applied bacteriology* 34, 21-39.
- Jay, J. M., Vilai, J. P. e Hughes, M. E. (2003). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5-7 °C. *International journal of food microbiology* 81, 105-111.
- Jeremiah, L. E. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meat using short- or long-term distribution. *Food Res. Int.* 34, 749-772.

- Kaley, T. (2005) Case reports. *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2526-2528.
- Kramer, J. (1994). Alimenti. Microbiologia e igiene. In collaborazione con Cantoni C. Ed. OEMF, Milano.
- Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat science* 52, 299-305.
- Lindberg, A. M., Ljungh, A., e, S., Lofdahl, S. And Molin, G. (1998). *Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or cream and presence of toxin encoding genes. *Int. J. Food. Microbiol.* 6, (39), 11-17.
- Luño, M., Roncales, P., Djenane, D and beltran, J. A. (2000). Beef shelf life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. *Meat Science* 55, 413-419.
- Mauriello, G., De Luca, E., La Storia, A., Villani, F. and Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated film for food packaging. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 464-469.
- Mauriello, G., Ercolini, D., La Storia, A., Casaburi, A. and Villani, F. (2004). Development of polyetene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J. Appl. Microbiol.* 97, 314-322.
- Mellgren, R. L. (1980). Canine cardiac calcium-dependent proteases Resolution of two forms with different requirement for calcium. *FEES Letters*, 109-129.
- Moeller, P. W., Fields, P. A., Dutson, T. R., Landmann, W. A., Carpenter, Z. L.(1976). Effect of high temperature conditioning on subcellular distribution and levels of lysosomal enzymes ». *J. Food Sci.*, 41, 216-217.
- Molin, G., and Ternström, A. (1982) Numerical taxonomy of the psychrotrophic *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1249-1264.
- Motlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. (1991). Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. *J. Food Prot.* 54, 873-878.

- Paludan-Muller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H. And Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum and modified atmosphere packed cold smoked salmon stored at 5 degrees C. *Int. J. Food. Microbiol.* 17, (39),155-166.
- Pin, C., Garcia de Fernando, G., and Ordonez, J. A. (2002) Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4441-4447.
- Rooney, M.L. (1995). Overview of active food packaging. In *Active Food Packaging*. (Rooney, M.L. ed.) Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 1.
- Stanley, G., Kevin, J. e Egan, A. F. S. (1981). Volatile Compounds Associated with Spoilage of Vacuum-Packaged Sliced Luncheon Meat by *Brochotrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 816-818.
- Stevens, K.A., Sheldom, B.H., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3613-3615.
- Taylor, S. L., and Somers, E. B. (1985). Evaluation of the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. *J. Food Protect.* 48, 949-952.
- Valin C. (1986). Caractéristiques qualitatives et technologiques des viandesbovines: influence des conditions d'abattage et de la technologie. In Micol D. (Ed.):Production de viande bovine. INRA, Paris. 85-98.
- Zambonelli, C., Papa, F., Romano, P., Suzzi, G. e Grazia, L. (1992). *Microbiologia dei salumi*. Ed Edagricole, Bologna.