

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE

Corso di Laurea Magistrale
in Scienze e Tecnologie Alimentari

Studio della flora microbica e della *shelf life* della carne di Broiler con miopatie

Relatore

Dott. Luca Fasolato

Correlatore

Prof.ssa Angela Trocino

Laureanda

Chiara Salomoni

Matricola

1132626

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Sommario

Riassunto.....	i
Abstract.....	iii
1.INTRODUZIONE	1
1.1.Miopatie	1
1.1.1.Wooden Breast	1
1.1.2.White Striping	4
1.2. Effetti sulla qualità.....	5
1.2.1.Valore nutrizionale	6
1.2.2.Qualità tecnologiche e sensoriali	9
1.2.3.Qualità microbiologica.....	10
1.3.Microflora petti di pollo.....	11
1.4. <i>Shelf life</i>	13
1.4.1. <i>Shelf life</i> microbica	13
1.4.2. <i>Sensory Shelf life</i>	16
1.4.3.Calcolo SSL.....	17
2.SCOPO DELLA TESI.....	19
3.MATERIALI E METODI.....	21
3.1.Campionamento e preparazione campioni	21
3.2.Disegno sperimentale.....	21
3.3.Analisi sensoriali	22
3.4.Analisi microbiologiche	23
3.4.1.Processazione campioni	23
3.4.2.Terreni e incubazione.....	23
3.4.3.Lettura e raccolta dati.....	24
3.4.4.Selezione morfologie	24
3.4.5.Stoccaggio delle colonie	24
3.5.Analisi biochimiche	25
3.6.Analisi molecolare	27
3.6.1.Modalità di estrazione.....	27
3.6.2.PCR (Polymerase Chain Reaction).....	28
3.6.3.Elettroforesi su gel di agarosio	31
3.6.4.Sequenziamento.....	31
3.7.Analisi statistica.....	32
4.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	35
4.1.Analisi microbiologica.....	35
4.1.1.Variazioni della flora batterica	36

4.1.2. <i>Shelf life</i> microbica	42
4.2. <i>Shelf life</i> sensoriale	46
4.3.Analisi biochimiche	49
4.4.Analisi molecolare rRNA 16S.....	50
4.5.Ambiente e variabili fisico-chimiche.....	52
5.CONCLUSIONE.....	57
APPENDICE A.....	59
APPENDICE B	61
Bibliografia	65
Sitografia	71

Riassunto

Le miopatie del broiler risultano un problema emergente, che ha subito un incremento sostanziale negli ultimi anni. Queste alterazioni, che interessano in particolare il muscolo *Pectoralis major*, sono il White Striping e il Wooden Breast. A livello macroscopico presentano striature biancastre o zone leggermente rigonfie, pallide con consistenza legnosa, che creano un deprezzamento del prodotto; invece, a livello istologico si manifestano con lipidiosi, fibrosi con accumulo di tessuto connettivo e collagene, necrosi e rigenerazione delle fibre muscolari.

Come riportato da diversi studi, tali miopatie comportano cambiamenti più o meno marcati a livello qualitativo con modificazioni del colore, del pH, della composizione chimica, in particolare una diminuzione del contenuto di proteine e un aumento del contenuto di lipidi, e della crescita microbica. Per tale motivo, in questo lavoro di tesi è stato valutato l'effetto delle miopatie sulla flora microbica e sulla *shelf life* di petti di pollo conservati in refrigerazione. Le osservazioni, divise in tre gruppi, sono state svolte su un totale di 144 *Pectoralis major*: un terzo privi di miopatie, un terzo con Wooden Breast e un terzo con White Striping. Tutti i petti sono stati conservati per 10 giorni in film plastico e senza modificazioni compositive dell'atmosfera, esposti alla luce artificiale e alla temperatura di 4°C. I campioni sono stati analizzati in tempi diversi: a zero giorni di conservazione (T0), a due giorni (T2), a quattro giorni (T4), a sei giorni (T6), a otto giorni (T8) e a dieci giorni (T10) dalla macellazione.

Per valutare il tempo di scadimento e quindi poter stimare la *shelf life*, i petti di broiler sono stati sottoposti ad analisi sensoriali e microbiologiche. A tale scopo, per definire la freschezza dei prodotti sono stati utilizzati differenti indicatori. In ambito microbiologico, l'andamento della carica mesofila totale e la crescita di batteri alteranti specifici, come *Pseudomonas* spp., responsabili del deterioramento dei prodotti, sono stati applicati per valutare il tempo di superamento delle soglie critiche definite dalla letteratura.

Considerando l'approccio organolettico, l'Indice Sensoriale relativo alla variazione di odore, colore e consistenza è stato valutato seguendo una scala di demerito semplificata.

Per una comprensione dei generi e delle specie delle comunità microbiche, residenti sulla superficie dei petti analizzati, è stata effettuata l'identificazione molecolare di ceppi microbici isolati dai differenti terreni selettivi utilizzati.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che le flore microbiche (microbiota) studiate risultano influenzate dalla presenza delle miopatie. Differenze statistiche sono state rilevate per i

principali target microbici: conta mesofila totale, *Pseudomonas* spp., enterobatteri e batteri lattici; invece per i batteri H₂S produttori non sono state riscontrate differenze.

La *shelf life* dei petti di broiler stimata è maggiore per quelli con Wooden Breast, con un aumento di 2.9 giorni, rispetto ai petti privi di anomalie, utilizzando il limite di accettabilità di 7 log₁₀ UFC/g per la conta mesofila totale; oppure una differenza di 1.1 giorni a favore dei campioni con Wooden Breast, usando il limite di accettabilità di 7.3 log₁₀ UFC/g.

L'analisi molecolare ha confermato la flora microbica superficiale, riportata in altri studi condotti nelle medesime condizioni di conservazione di questo elaborato.

Dal punto di vista sensoriale, non sono state riscontrate differenze tra i tre gruppi, solo la *texture* dei petti con Wooden Breast ha mantenuto valori superiori al limite soglia, per tutta la durata della conservazione.

Abstract

In recent years, broiler's myopathies are an emerging problem, which has undergone substantial increases. These alterations, particularly in *Pectoralis major* muscle, are White Striping and Wooden Breast. The muscles were macroscopically pale, hard, with bulging areas or with white striping, that create a depreciation of the product. On the other hand, breast meat histologically manifest themselves with lipidosis, fibrosis with connective tissue and collagen accumulation, necrosis and regeneration of muscle fibres.

As reported by several studies, these myopathies lead to changes on qualitative attributes as color, pH, chemical composition, in particular a decrease in protein content and an increase in lipid content, and microbial growth. For this reason, the effect of myopathies on microbial flora and shelf life of chicken breasts, stored in refrigeration, was evaluated in this work.

The observations, divided into three groups, were carried out on a total of 144 *Pectoralis major*: one third without myopathy, one third with Wooden Breast and one third with White Striping. All breasts were stored for 10 days in plastic film and without compositional modifications of the air, samples were kept at 4°C and exposed to artificial light. Samples were analysed at different times: zero days of conservation (T0), two days (T2), four days (T4), six days (T6), eight days (T8) and ten days (T10) from slaughter.

To evaluate the time of shelf life, broilers' breasts were subjected to sensory and microbiological analyses. For this purpose, various indicators were used to define the freshness of the products. In the microbiological field, the progression of total viable count and the growth of specific spoilage organisms, such as *Pseudomonas* spp., have been applied to assess the time to exceed the critical thresholds defined in the literature.

P. major muscles were submitted to organoleptic approach, the Sensory Index, related to the variation of odor, color and texture, has assessed following a simplified demerit scale.

The molecular identification of strains isolated from the different selective media was applied to understand the genera and species of the microbial communities on the surface of breasts.

The results obtained show that the microbial flora (microbiota) studied is influenced by the presence of myopathies. Statistical differences are found for the main microbial targets: total viable count, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and lactic bacteria; but for H₂S producing bacteria there are no differences.

The estimated shelf life of broilers breasts meat has increased for samples with Wooden Breast. The end of shelf life was defined at the of 7 log₁₀ CFU/g threshold for total viable

count, with a 2.9-day increase in WB and WS compared to breasts without abnormalities. Considering the acceptable limit of 7.3 log₁₀ CFU/g for *Pseudomonas*, WB breasts showed 1.1 day difference with respect normal samples.

Molecular analysis confirmed superficial microbial flora reported in other studies, conducted under the same conditions of conservation.

From the sensory point of view, there were no differences between the three groups, only the texture of breasts with Wooden Breast maintained values above the threshold value all the time of the conservation.

1. INTRODUZIONE

1.1.Miopatie

Nell'ultimo decennio le esigenze dei consumatori, in merito al consumo della carne, sono sostanzialmente cambiate. In particolare, i consumi di carne di pollo sono aumentati, sia per motivi economici, che salutari, culturali e religiosi. Le richieste del consumatore sono orientate ad un prezzo basso, alla riduzione dei grassi, alla valorizzazione del profilo nutrizionale e a una buona qualità organolettica, come la tenerezza e il sapore delicato. La carne di pollo si adatta bene a queste esigenze e anche alle abitudini alimentari moderne, poiché è facile e veloce da cucinare (Petracci *et al.*, 2015). Per ovviare a tali richieste anche il mercato avicolo è variato: maggiore grandezza dei petti di broiler, maggior attenzione nella selezione genetica e maggior resa in carne.

I criteri di selezione genetica dei polli sono passati, a partire dagli anni '40 ad oggi, dalla esclusiva valutazione delle performance di crescita del pollo vivo all'importanza di ottenere buone rese del broiler sia per quanto riguarda le carcasse, che nei porzionati e nel prodotto finito, con un aumento della resa del 5%. Anche le tempistiche di crescita sono state modificate, con un dimezzamento dei tempi di accrescimento degli ibridi commerciali.

Ma tali cambiamenti condizionati dalla selezione genetica sono correlati alla comparsa e all'aumentato dell'incidenza di anomalie a livello dei muscoli del petto (*Pectoralis major*): miopatia dell'Oregon (petti di colore verde e legnosi), PSE (Pale Soft Exudative, colore pallido, aspetto molle ed essudativo), Wooden Breast (WB) e White Striping (WS). Queste miopatie si manifestano specialmente negli ibridi genetici, selezionati per ottenere un tasso di crescita elevato (Petracci *et al.*, 2015).

Le miopatie analizzate in questo studio sono il Wooden Breast (WB) e il White Striping (WS).

La presenza delle miopatie WS e WB va ad alterare la qualità della carne di pollo e a compromettere l'aspetto del prodotto, portando a una diminuzione dell'accettabilità da parte del consumatore o al declassamento dei petti a lavorazioni, che riescono a nascondere i difetti, comportando quindi una diminuzione della resa e un aumento dello scarto (Petracci *et al.*, 2013 e Kuttappan *et al.*, 2012).

1.1.1. Wooden Breast

Il WB è un'anomalia muscolare recentemente osservata nei muscoli pettorali del pollo (*P. major*), spesso accompagnata dalla presenza di un'altra alterazione: il WS. (Sihvo *et al.*, 2014 e Tijare *et al.*, 2016).

Nei petti con WB, a livello macroscopico, sono presenti zone leggermente rigonfie, pallide e dure al tatto, diffuse su tutta la superficie o solo in alcune aree. La superficie è spesso coperta da un sottile strato viscoso, limpido o lievemente torbido; inoltre, ci possono essere petecchie o piccole emorragie, visibili in Figura 1.1.1.1 La consistenza legnosa e rigida è provocata da modifiche dal punto di vista istologico: necrosi e rigenerazione delle fibre muscolari, ispessimento dell'interstizio, accumulo di tessuto connettivo e di granulazione (Sihvo et al., 2014). Soglia et al. (2016) hanno osservato a livello istologico, attraverso una sezione trasversale del muscolo, oltre alle miodegenerazioni descritte sopra, anche un ispessimento del tessuto perimisiale (fibrosi), che crea una separazione tra le fibre muscolari (Figura 1.1.1.2) e un accumulo di grasso intramuscolare. In alcuni casi i ricercatori hanno notato un'infiltrazione di cellule infiammatorie.



Figura 1.1.1.1 Campione 72 (WB) con petecchie e piccole emorragie



Figura 1.1.1.2 Campione 111 (WS), con visibile separazione delle fibre muscolari

Tijare et al. (2016) hanno suddiviso i petti con WB in diverse classi, in base al livello di durezza da 0 a 3:

- 0: petto completamente flessibile (normale)
- 1: petto rigido nella parte craniale e la parte restante flessibile (leggero)
- 2: petto molto rigido, moderato nella parte caudale (moderato)
- 3: petto completamente rigido e duro (severo)

Nei petti con un elevato grado di WB (*score* 3), le lesioni a livello macroscopico sono molto più visibili a causa della riorganizzazione della struttura muscolare scheletrica; inoltre, tali modificazioni istopatologiche si presentano soprattutto sulla superficie e diminuiscono gradualmente verso l'interno del muscolo (Soglia et al., 2016). Kuttappan et al. (2013) hanno individuato lesioni sia nella coscia che nel dorso delle carcasse di broiler.

Dagli ultimi cinquant'anni, il peso dei polli è duplicato e il tempo di crescita è dimezzato (Barbut et al., 2008); questo aumento di biomassa crea: una diminuzione dello spazio tra la fibre, un minor apporto di sangue e di ossigeno, causando la necrosi di alcune cellule e l'indurimento della carne del petto.

Le principali cause di comparsa di WB possono essere ricondotte al rapido aumento del tasso di crescita del muscolo e all'elevato peso totale dei broiler, provocando un aumento del numero di cellule muscolari. Anche altre cause, alcune riconducibili a livello nutrizionale, sono state riportate: la carenza di selenio o vitamina E, che compromettono la capacità antiossidante, l'ipossia oppure la predisposizione genetica dell'animale (Sihvo et al., 2014).

1.1.2. White Striping

Nei petti di broiler più pesanti, oltre al WB, vi è la presenza di un'altra miopatia: White Striping (WS). Il WS è caratterizzata da striature bianche parallele alle fibre muscolari, in particolare sulla faccia ventrale del muscolo *Pectoralis major*, come in Figura 1.1.2.3.

Attraverso l'analisi di tali striature, Kuttappan et al. (2012) hanno identificato nei muscoli del petto tre diversi gradi della miopatia: normale, moderato e severo. Il *P. major* che non mostra distintamente fibre bianche è considerato di grado "normale", per la classe "moderato" presenta fibre bianche parallele inferiori a un millimetro di spessore e facilmente visibili sulla superficie del filetto. Invece per il grado "severo" i petti presentano striature ben visibili sulla superficie e spessore maggiore di un millimetro.

A livello istologico, il WS presenta sia degenerazioni che rigenerazioni muscolari, le quali portano ad una alterazione dell'integrità strutturale, muscolare e delle membrane cellulari. Le principali variazioni sono: modificazione nelle dimensioni delle fibre con diametri e forme diversi, perdita di striature crociate, alterazione vacuolare, lisi delle fibre, degenerazione flocculare, lieve mineralizzazione, lipidosi, infiammazione interstiziale e fibrosi (Kuttappan et al., 2013 e Petracci et al., 2013).

Oltre a ciò, i profili ematologici e sierologici hanno mostrato come sia rilevabile un aumento dei livelli dell'enzima creatina chinasi, indicatore di danneggiamento del tessuto muscolare, benché non vi sia la presenza di un'infezione o un'infiammazione sistemica (Kuttappan et al., 2013).

I filetti con elevato grado di WS sono caratterizzati da un notevole contenuto di grassi, soprattutto monoinsaturi e un basso contenuto di proteine (Kuttappan et al., 2012a)

Petracci et al. (2015) e Kuttappan et al. (2012) hanno raccolto le principali cause che influenzano la comparsa del WS nei broiler:

- Il genotipo, si manifestano specialmente negli ibridi genetici selezionati con un'elevata resa di petto rispetto agli standard
- Il sesso, maggior incidenza dei maschi (con età compresa tra le sei e le otto settimane) che nelle femmine
- La dieta, influenzata maggiormente dall'elevato contenuto energetico
- Il tasso di crescita, il WS è presente soprattutto negli ibridi di broiler con un maggior tasso di crescita

- Il peso di macellazione, la comparsa di WS si riscontra principalmente nei petti più pesanti

Perciò, hanno ipotizzato che una crescita rapida del muscolo pettorale generi uno stress metabolico, che favorisce la comparsa delle caratteristiche degenerative (simili alle distrofie muscolari).



Figura 1.1.2.3 Campione 68 (WS) con striature bianche, a sinistra. Campione 64 (N), a destra

Le modifiche istopatologiche nei muscoli affetti da anomalie WS e WB presentano caratteristiche simili, pertanto è possibile ricondurle ad un'eziologia comune (Sihvo et al., 2014 e Petracci et al., 2015).

1.2. Effetti sulla qualità

La comparsa di anomalie muscolari nelle carni di broiler, a livello del *P. major*, che è il taglio anatomico maggiormente consumato e di interesse per l'industria di trasformazione della carne, determina un declassamento nel mercato.

Le anomalie muscolari nel broiler portano a diverse implicazioni nella qualità dei prodotti freschi e trasformati.

Le carni colpite da WS e WB possono essere destinate al consumo umano in quanto considerate sicure, ma necessitano di una adatta gestione e lavorazione, durante la trasformazione, poiché presentano diverse modificazioni a livello nutrizionale, microbiologico, chimico e tecnologico.

I principali attributi della qualità delle carni di broiler sono stati raccolti da Northcutt (2009), e riportati in Tabella 1.2.1. In seguito verranno definiti i parametri qualitativi che, a causa della presenza delle anomalie studiate nella presente tesi, subiscono modifiche più o meno accentuate.

QUALITÀ	ATTRIBUTI
Qualità sensoriale	Aspetto
	Consistenza
	Sapore
Stabilità del prodotto	<i>Shelf life</i>
	Mantenimento della qualità
Valore nutrizionale	Contenuto nutritivo
	Disponibilità di nutrienti
	Apporto calorico
Salubrità	Sicurezza
Convenienza	Disponibilità sul mercato
	Facilità di preparazione

Tabella 1.2.1 Attributi della qualità delle carni di broiler

La qualità dei petti di pollo varia dal punto di vista nutrizionale, tecnologico, sensoriale e microbiologico, soprattutto nei petti con gravi o moderati livelli di anomalie.

1.2.1. Valore nutrizionale

La carne del petto di pollo è considerata un alimento di alta qualità dal punto di vista nutrizionale, con basso contenuto di colesterolo e alto contenuto di acidi grassi insaturi, ma la presenza di WS e WB ne altera i parametri nutrizionali.

Nel WS si ha un elevato quantitativo di grassi e basso di proteine, in confronto ai petti privi di miopatie (N). Inoltre il rapporto collagene e proteine totali aumenta, abbassando il valore nutrizionale e causando una riduzione della digeribilità e la carenza di amminoacidi essenziali (Petracci et al., 2015).

Secondo Kuttappan et al. (2012) la riduzione del contenuto proteico (indice della degenerazione della fibra muscolare o della atrofia) potrebbe aver portato a creare più spazio per l'espansione degli adipociti, consentendo così una maggiore deposizione di grasso nel muscolo. Il cambiamento del contenuto degli adipociti non è alterato da variazioni della dieta, ma potrebbe essere causato da un aumento della quantità di substrato lipidico che raggiunge gli adipociti o un aumento della circolazione dei lipidi plasmatici, che portano ad un maggior assorbimento e stoccaggio nel tessuto adiposo; il tutto può essere correlato ad una elevata lipogenesi nel fegato (Petracci et al., 2015). La composizione del contenuto lipidico dei petti di pollo N e grado severo di WS è stata confrontata da Kuttappan et al. (2012); hanno riscontrato che i petti N avevano maggiori percentuali di acidi grassi saturi, ma minori acidi grassi monoinsaturi rispetto ai filetti con grado severo. Tra i singoli acidi grassi saturi misurati, le proporzioni dell'acido miristico, del pentadecanoico e dell'arachidico, erano maggiori nei petti di livello WS severo, mentre gli acidi palmitici e stearici erano maggiori nei filetti N. Analogamente per gli acidi grassi monoinsaturi, gli acidi oleici ed elaidici erano maggiori nei filetti con WS severo.

PARAMETRO	NORMALE	WB	WB/WS
Umidità (%)	74,1	75,3	75,1
Proteine (%)	22,8	21,4	20,4
Grassi (%)	0,87	1,25	1,98
Cenere (%)	1,37	1,26	1,21
Collagene (%)	1,09	1,18	1,26
Mg (mg/100g)	36,4	35,0	32,0
K (mg/100g)	375,4	379,4	361,1
P (mg/100g)	220,2	205,9	207,9
Na (mg/100g)	39,3	63,7	74,1
Ca (mg/100g)	8,40	20,8	13,6

Tabella 1.2.1.2 Composizione chimica carne cruda di pollo (Soglia et al., 2016)

La presenza di WB, o WB con WS contemporaneamente, influenza la composizione chimica e minerale dei petti di broiler, caratterizzati da un aumento dell'umidità e un basso contenuto di ceneri, rispetto ai petti N. La variazione dell'umidità è stata ricondotta alla formazione di edemi e accumuli di liquido nei petti con WB moderato o grave, a seguito di infiammazioni (Soglia et al., 2016). Tutte le variazioni della composizione della carne sono visibili in Tabella 1.2.1.2.

Nei petti affetti da WB il valore del contenuto proteico è diminuito e il livello di grasso invece è aumentato, quest'ultimo è riconducibile alla lipidosi, ovvero la sostituzione delle fibre muscolari degenerate con grasso.

Per quando riguarda il contenuto minerale non ci sono significative differenze per il fosforo, il magnesio e il potassio, contrariamente al calcio e al sodio, dove le quantità sono aumentate maggiormente nei filetti con WB e WB/WS contemporaneamente. L'aumento di sodio, nei petti con WB, può portare un maggior assorbimento di calcio, che si accumula nel reticolo sarcoplasmatico, durante la necrosi delle cellule o delle miofibre, con lo sviluppo di un danno muscolare. Inoltre, l'aumento di tali minerali, sodio e calcio, provoca conseguenze a livello enzimatico: l'attivazione dell'enzima fosfolipasi, con rischio di danni alla membrana e alterazione delle funzioni mitocondriali, oppure con perdite e fuoriuscite di vari enzimi, come la cheratina chinasi (Soglia et al., 2016).

La composizione chimica nei petti con WS è riportata da Petracci et al. (2014a), evidenziando una netta distinzione nel contenuto proteico e lipidico tra i petti senza miopatie e quelli con WS severo, visibile in Tabella 1.2.1.3. Il contenuto lipidico e del collagene aumentano con l'aumentare del grado di WS, con un andamento opposto alle proteine totali (in particolare quelle sarcoplasmatiche e fibrillari). Il rapporto grassi/proteine cresce nei petti con WS moderato e severo, rispetto ai petti N (0,067 e 0,118 vs 0,027), favorito dall'ingente selezione genetica negli ibridi commerciali. Invece per l'umidità non ci sono variazioni significative.

COMPOSIZIONE	N	WS MODERATO	WS SEVERO
Umidità (%)	75,10±0,13	75,16±0,15	74,90±0,16
Proteine totali (%)	22,90±0,25	22,20±0,29	20,90±0,23
Grasso intramuscolare (%)	0,78±0,09	1,46±0,11	2,53±0,30
Collagene	1,30±0,01	1,37±0,01	1,43±0,02

Tabella 1.2.1.3 Composizione chimica della carne di petto di pollo affetta da diversi gradi di WS (Petracci et al., 2014a)

Solitamente le carni con WS e WB gravi vengono utilizzati per prodotti trasformati, dove sono modificate le loro caratteristiche chimico-fisiche. I filetti con moderato WS sono commercializzati al dettaglio porzionati, nonostante le caratteristiche nutrizionali siano leggermente diverse dai petti N (Petracci et al., 2014).

1.2.2. Qualità tecnologiche e sensoriali

Le anomalie del petto hanno conseguenze anche sulle proprietà tecnologiche come la variazione di *texture*, più morbida con WS o con aspetto legnoso con WB, o la minor capacità di trattenere i liquidi di cottura o marinatura.

La presenza del WS nei muscoli del petto può causare la comparsa di alcune problematiche durante la trasformazione e lo stoccaggio: la ridotta capacità di mantenere l'acqua (WHC, *Water Holding Capacity*) e la scarsa adesione delle fibre muscolari, dovuta alla ridotta modificazione del tessuto connettivo intramuscolare (Petracci et al., 2009 e 2013).

Il WHC, ovvero la capacità delle proteine di trattenere l'acqua aggiunta, oltre a quella di costituzione, è un parametro qualitativo e tecnologico importante, poiché è in grado di influenzare l'aspetto della carne cruda e la succosità durante la masticazione nel prodotto cotto.

Nei petti con WS, il basso valore di WHC causa nel muscolo un'essudazione notevole, inoltre provoca sofficietà e pallore (Cattaneo et al., 2003). Tale effetto è dovuto all'indebolimento e alla riduzione delle proteine nel muscolo, alla degradazione muscolare oppure all'aumento del contenuto di grassi, che riduce la capacità della carne di legare l'acqua, così come il calo del numero di fibre. In più, i petti con WS hanno una bassa capacità di trattenere la marinatura, soluzione usata per ridurre l'ispessimento del muscolo, sia durante la refrigerazione che la cottura (Petracci et al., 2013 e 2015).

Nei petti con WS grave le conseguenze si hanno anche nel prodotto cotto con l'aumento della durezza, coesione e gommosità della carne (Sanchez Brambila et al., 2016).

Anche nei petti con WB si riscontrano cambiamenti della consistenza, presentando un aumento della durezza del muscolo crudo, che si ripercuote sul prodotto cotto; il muscolo diventa più duro, gommoso, meno elastico e richiede molta più energia per macinarlo (Soglia et al., 2016).

Un altro parametro qualitativo che può variare con la presenza delle miopatie è il colore. Il colore delle carni di broiler, crude o cotte, è un fattore decisionale per l'acquisto di tali prodotti, poiché viene considerato dai consumatori come indice di freschezza. La carne del

petto cruda dovrebbe avere un colore rosa pallido, mentre la carne della coscia e della gamba dovrebbe essere rosso scuro. Il colore della carne è influenzato da diversi fattori, quali: l'età del pollo, il sesso, il ceppo genetico, la dieta, il grasso intramuscolare, il contenuto di umidità della carne, le condizioni di pre-macellazione e le modalità di trasformazione (Northcutt, 2009). Mudalal et al. (2014) hanno dimostrato che la presenza delle anomalie ha anche effetti sul colore della carne cruda: la luminosità ha valori elevati nei gruppi con WB rispetto ai gruppi con WS o WB e WS contemporaneamente, invece i *P. major* N hanno valori intermedi. Inoltre, nei petti con WB i valori di giallo sono più elevati, mentre non ci sono variazioni significative per l'arrossamento. Nel prodotto cotto non sono stati riscontrati effetti sul colore della carne, ad eccezione dell'ingiallimento nei WB.

Il sapore è un altro attributo della qualità, che i consumatori utilizzano per determinare l'accettabilità della carne di pollame, sia il gusto che l'odore contribuiscono al sapore della carne. La presenza delle miopatie ha effetti soprattutto sull'odore nel prodotto crudo, ma non si hanno conseguenze rilevabili sul prodotto cotto. Effetti minori sul sapore della carne sono correlati al ceppo genetico (ibrido commerciale), alla dieta, alle condizioni ambientali di allevamento (stalle, ventilazione, ecc.), alle temperature di scottatura, al raffreddamento, all'imballaggio e all'immagazzinamento (Northcutt, 2009).

1.2.3. Qualità microbiologica

La variabilità e la crescita microbiologica sono influenzate da diversi fattori, come la temperatura, l'umidità, l'attività dell'acqua ed il pH. È possibile ipotizzare che il cambiamento nelle caratteristiche chimico-fisiche dei petti di pollo, porti alle modifiche dell'ambiente di vita dei microorganismi residenti e delle flore microbiche implicate nel deterioramento.

La presenza di WB, così come di WS, ha effetti principalmente sul pH. I petti di broiler affetti da entrambe le anomalie presentano pH superiori che nei petti N, con conseguenze sulla WHC (Barbut et al., 2008). I muscoli *P. major* affetti da anomalie, con gradi elevati, presentano valori di pH, che aumentano a partire dal WS con valori prossimi a 6, fino ai petti con WS e WB contemporaneamente che presentano un pH maggiore di 6. Tali valori possono avere conseguenze sulla qualità del prodotto: riducendo la *shelf life* o influenzando negativamente sul gusto, sapore, e aspetto della carne, a causa della crescita microbica e dello sviluppo della flora microbica alterante superficiale, analizzata in seguito (Pettracci et al., 2013 e Mudalal et al., 2014).

Purtroppo, come viene fatto notare da Petracci et al. (2015), non esistono studi pubblicati sulla *shelf life* microbica legata alla presenza delle miopatie WS e WB.

1.3. Microflora petti di pollo

I muscoli negli uccelli viventi sani sono sterili, invece diverse microflora sono ospitate nel tratto digestivo, nei polmoni, sulla pelle e sulle piume. Ma nonostante ciò, un elevato numero di microrganismi si può trovare nella carne di pollo cruda, dovuto ad un'ampia varietà di cause che comprendono (Rouger et al., 2017):

- le pratiche di gestione degli allevamenti
- le superfici, i liquidi e l'aria con cui vengono a contatto
- le operazioni di trasformazione come la spiumatura, la scottatura, il disossamento, la macinazione e la porzionatura
- il microbiota degli animali stessi

Come nella maggior parte delle lavorazioni di carne, la macellazione del pollame comporta un passaggio da un ambiente mesofilo (con temperature comprese tra i 20 e 45° C), all'inizio dell'elaborazione, a un ambiente psicrofilo (con range di temperature tra 0 e 20°C) alla fine del ciclo produttivo. Il deterioramento del pollame è quindi più spesso associato ai microrganismi psicrotrofi¹.

Nel corso degli anni è stata isolata nella carne di broiler una flora batterica psicrotrofa molto eterogenea, in letteratura sono state riportate diverse specie della famiglia delle *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* e alcune specie di batteri lattici (Rouger et al., 2017).

Per il genere *Pseudomonas*, responsabile di infezioni respiratorie, sinusiti e setticemie negli avicoli giovani o durante la crescita oppure causa di lesioni con edemi cutanei e fibrina, con emorragie e infiammazioni delle membrane sierose; le specie commensali saprofitiche o deterioranti ritrovate nelle carni sono principalmente: *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* biovar A, B, C e F, *P. aeruginosa* (spesso producono pigmenti verdi-bianchi composti da fluoresceina e piocianina), *P. putida* biovar A, *P. alcaligenes* e *P. pseudoalcaligenes* (Arnaut-Rollier et al., 1999).

¹ Microrganismi che crescono a temperature uguali o inferiori a 7°C, producendo colonie visibili nell'arco di 7-10 giorni (Jay et al., 2009).

P. putida e *P. fluorescens* rappresentano la proporzione maggiore su carni fresche di pollame in condizioni aerobiche (circa il 90% di *Pseudomonas* spp.), anche durante i periodi più lunghi di stoccaggio, finché *P. fragi* non diventa dominante, svolgendo un ruolo significativo nel deterioramento della carne.

Appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee sono stati ritrovati ceppi di *Hafnia*, alcune volte identificati come la causa di setticemia in polli e galline ovaiole, come le specie *H. alvei*, *H. paralvei*. Per il genere *Serratia*: in particolare *S. liquefaciens*, *S. grimesii*, *S. proteamaculans*, *S. fonticola*, e *S. quinivorans*. Sono stati identificati anche ceppi di *Corynebacteria* spp., *Acinetobacter* spp. e *Moraxella* spp. (Kameník, 2013).

Un altro genere molto presente nella carne è *Shewanella*, specialmente *Shewanella putrefaciens*, inizialmente identificato come un'unica specie con *Alteromonas putrefaciens* e *P. putrefaciens*.

S. putrefaciens causa il deterioramento della carne, soprattutto in carne confezionata sotto vuoto e/o conservata a temperature refrigerate, in particolare a valori di pH più elevati, producendo idrogeno solforato e odori sgradevoli; questo composto, in combinazione con i pigmenti del muscolo, provoca l'inverdimento della carne (Russell, 2001 e Kameník, 2013).

L'identificazione molecolare delle colonie isolate dalla carne di pollo ha mostrato il coinvolgimento di diverse specie di batteri lattici, in particolare *Enterococcus* o *Lactobacillus*, come *Enterococcus viikkiensis*, *Enterococcus saigonensis*, *Lactobacillus oligofermentans* e *Leuconostoc gelidum* (Rouger et al., 2017 e Kameník, 2013).

Dopo che i batteri contaminano la carne e costituiscono il microbiota iniziale, le condizioni di stoccaggio e i diversi trattamenti applicati determinano l'andamento della loro crescita. La temperatura di stoccaggio, così come la natura e la concentrazione del gas utilizzato nelle miscele per l'imballaggio sono selettivi per alcune popolazioni batteriche, come ad esempio lo stoccaggio a bassa temperatura favorisce la crescita batterica di psicrotrofi e psicrofilo, mentre la CO₂ ha un effetto inibitorio sulle *Pseudomonas* spp., in particolare sulla crescita di *P. fluorescens* e *P. fragi*. Alcune specie possono sopravvivere durante tutto il processo, come *S. putrefaciens*.

Sulla superficie del petto si può riscontrare anche la crescita di lieviti, soprattutto durante la conservazione a basse temperature, sia proteolitici che lipolitici; le specie più isolate sono *Candida zeylanoides* e *Yarrowia lipolytica* (McKee, 2012).

Le comunità batteriche presenti nella carne di broiler possono includere specie patogene come *Salmonella* e *Campylobacter*, i due principali agenti patogeni responsabili della

gastroenterite umana a causa del consumo di carne di pollo. Inoltre sono stati individuati patogeni come *Listeria*, *Escherichia coli* e *Cryptosporidium* (McKee, 2012).

In questo studio è stata analizzata la crescita della seguente flora microbica:

- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* spp.
- Batteri produttori di H₂S
- Batteri lattici

1.4. Shelf life

La *shelf life* è definita come il tempo durante il quale un prodotto alimentare è sicuro per il consumo, rispetta la dichiarazione nutrizionale in etichetta e conserva le caratteristiche sensoriali, chimiche, fisiche e microbiologiche desiderate, se conservato nelle condizioni raccomandate (Giménez et al., 2012). Pertanto, per valutare e misurare la variazione di tali caratteristiche nel corso della *shelf life* devono essere utilizzati degli indici obiettivi (Imm B.-Y. et al., 2011).

Molti fattori influenzano la durata della *shelf life* e il processo di deterioramento dei prodotti deperibili, come la carne di pollo. Si dividono in fattori intrinseci (pH, attività dell'acqua a_w , concentrazione di sale) oppure estrinseci (umidità, composizione dei gas dell'ambiente di conservazione, pressione e soprattutto la temperatura), a questi si aggiungono i fattori di trasformazione e fattori impliciti (Kamenik, 2013).

Una modalità per lo studio della *shelf life* è quella di seguire i cambiamenti nel tempo di alcune caratteristiche qualitative; in questo elaborato sono stati analizzati i processi degradativi microbici, chimico-fisici e sensoriali, utilizzando l'indice di deterioramento microbico (Specific Spoilage Organisms, SSO) e l'indice di deterioramento sensoriale.

1.4.1. Shelf life microbica

La contaminazione microbiologica è uno dei fattori più importanti che contribuiscono alla perdita di qualità, con conseguente formazione di *slime* (strato viscoso), crescita di colonie, variazione del tessuto muscolare e generazione di sapori e odori.

L'alterazione di un alimento è il risultato dell'attività microbica ad opera di un'ampia varietà di microrganismi, che variano in numero e specie in base alle caratteristiche del prodotto e alle condizioni ambientali in cui il prodotto è trasformato e conservato.

La carica batterica iniziale è in grado di influenzare la durata della *shelf life*. Quando i batteri hanno una concentrazione iniziale alta, si ha una durata inferiore di conservazione, poiché è richiesto molto meno tempo alle popolazioni batteriche per raggiungere una soglia critica dove il metabolismo batterico produce difetti di deterioramento e raggiungere il limite di inaccettabilità.

La crescita della flora batterica negli alimenti viene associata alla trasformazione di alcuni componenti alimentari come: amminoacidi, peptidi, proteine, composti azotati non proteici, lipidi e carboidrati. Tali componenti vengono metabolizzati in diverse modalità dai microrganismi, come ad esempio la produzione di acido lattico da parte dei batteri lattici in condizioni anaerobiche o la produzione di CO₂ e H₂O, a partire dal glucosio, dagli organismi aerobi (Russell, 2001).

Il deterioramento della carne è causato dall'accumulo di sottoprodotti metabolici o dall'azione di enzimi extracellulari prodotti da batteri psicotrofi, quando si moltiplicano sulle superfici della carne di pollo, a temperature di refrigerazione. Alcuni di questi sottoprodotti sono rilevabili come odori e slime (muco, essudati e patine viscosi) sulla superficie delle carni, che variano in base alle fonti di energia disponibili utilizzate dai batteri.

La produzione di slime è vantaggiosa per i batteri, perché costituisce uno strato protettivo che mantiene l'ambiente umido e permette ai microrganismi di crescere ad una temperatura più bassa e di competere con altri batteri della carne (Wang G.-y. et al., 2017).

Quando le popolazioni batteriche sono presenti in basse quantità, viene utilizzato il glucosio come fonte primaria di energia; ma i sottoprodotti del metabolismo del glucosio solitamente non producono odori e non contribuiscono al deterioramento del prodotto. La concentrazione di glucosio nella carne a valori normali di pH è di circa 100-1000 µg/g; quando il pH è alto il livello di glucosio è basso e i processi di danneggiamento (*off-odor* e slime) si raggiungono a cariche microbiche superficiali minori (Kameník, 2013).

All'aumentare della biomassa batterica, la disponibilità di glucosio inizia a diminuire, e i microrganismi psicotrofi iniziano ad utilizzare altri substrati, che producono molti più odori e sottoprodotti; tali odori sono la conseguenza dell'utilizzo diretto, da parte della flora microbica superficiale, di composti azotati a basso peso molecolare come amminoacidi, ammoniaci, ammine e solfuri, presenti nella pelle e nel muscolo (Russell, 2001).

Sulla superficie della carne di broiler, le degradazioni muscolari maggiormente rilevate sono causate da enzimi extracellulari (proteasi e aminopeptidasi), con la scissione della miosina in meromiosina pesante e leggera e un aumento degli amminoacidi liberi e di peptidi a basso peso molecolare. L'attività proteolitica dei batteri causa la formazione dello strato viscoso

sulla superficie, oltre che alle fusione delle colonie batteriche, verso la fine del periodo di conservazione (Russell, 2001).

I microrganismi che causano il deterioramento della carne, appartengono a diversi gruppi microbici: batteri Gram negativi (*Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*), batteri Gram positivi sporigeni (*Clostridium* spp., *Bacillus* spp.), batteri Gram positivi non sporigeni (batteri lattici, *Brochetrix thermosphacta*), muffe e lieviti. Invece *Aeromonas hydrophila* e *A. sobria* sono stati classificati come batteri psicrotrofi che possono causare deterioramento e possono essere potenzialmente patogeni per l'uomo (Rouger et al., 2017). Ulteriori indagini basate sulle analisi sensoriali e sulla caratterizzazione genomica o attività metabolica di batteri lattici (*Leuconostoc*), hanno confermato il loro ruolo nel deterioramento, con la formazione di viscosità superficiale (Wang G.-y. et al., 2017).

Negli ultimi anni, sono stati definiti dei modelli di crescita microbiologici predittivi combinati con strumenti per misurare le condizioni di temperatura, per misurare la *shelf life* dei prodotti dopo la lavorazione del prodotto o per definire la durata residua durante la catena del freddo. Lo sviluppo di un modello di crescita microbiologica predittivo per descrivere il deterioramento del cibo richiede una conoscenza della perdita di freschezza e del comportamento del microrganismo responsabile principale del deterioramento (Giménez et al., 2012 e Raab et al., 2008).

1.4.1.1. SSO

I microrganismi alteranti causano modificazioni negli alimenti tali da renderli inaccettabili per il consumo umano; ma solo una parte della carica microbica totale partecipa, ed è definita: Organismi Alterativi Specifici (Specific Spoilage Organisms, SSO).

Gli SSO della carne di pollame sono tipicamente presenti a bassi livelli immediatamente dopo la macellazione, ma si sviluppano rapidamente durante lo stoccaggio a freddo, provocando cambiamenti dell'aroma, dell'apparenza e della consistenza della carne (McKee, 2012).

La concentrazione di SSO al rifiuto del prodotto è definita come "livello minimo di deterioramento" e la concentrazione dei metaboliti può essere utilizzata come indice chimico di deterioramento.

Gran parte delle ricerche pubblicate ha esaminato *Pseudomonas* spp. come SSO dominanti sulla carne di pollo refrigerata in condizioni aerobiche, poiché cresce più facilmente e velocemente in tali condizioni di stoccaggio. *P. fragi* è la specie più frequentemente identificata, seguita da *P. lundensis* e *P. fluorescens* (Wang G.-y. et al., 2017).

Anche *Shewanella putrefaciens*, può essere considerato un SSO, si trova spesso sulla carne di pollo, ed è causa di alterazioni come la produzione di H₂S.

Le Pseudomonadaceae sono i microrganismi associati alla produzione degli *off-odors*; con l'aumento dell'aroma, il prodotto diviene inaccettabile, provocando odori simili a zolfo, ammoniaci, "pesce rancido", causati dalla produzione di etilato e metilestere o, per i produttori di composti di zolfo, dimetilsolfo, dimetildisolfuro, solfo e propilene (McKee, 2012 e Rukchon et al., 2014).

Altri SSO potenziali sono stati individuati recentemente con *challenge test* e valutazioni sensoriali, come ad esempio *Aeromonas salmonicida* e *S. liquefaciens* (Rouger et al., 2017).

Il limite microbiologico di deterioramento accettabile per le carni di pollo, conservate a temperatura di refrigerazione a 4°C, per la crescita batterica di *Pseudomonas* spp. è di 10^{7,3} UFC/g (Raab et al., 2008).

1.4.2. Sensory Shelf life

La *shelf life* varia in funzione del tempo, dei fattori ambientali e della suscettibilità del prodotto ai cambiamenti qualitativi; il deterioramento di tali prodotti è percepito principalmente con il cambiamento delle caratteristiche organolettiche.

Giménez et al. (2012) riportano che, negli ultimi decenni, la stima della SSL (*Sensory Shelf life, shelf life* sensoriale) degli alimenti è diventata una questione di ricerca continua, sia sui meccanismi di deterioramento dei prodotti alimentari, sia per lo sviluppo e l'applicazione di metodologie per la stima della loro scadenza.

Il deterioramento sensoriale dipendente dalla valutazione di un prodotto alimentare accettabile o meno dal consumatore, è essenziale che i risultati di un'analisi strumentale o chimica siano strettamente correlati con i risultati della valutazione sensoriale, pertanto per la stima e il calcolo della *shelf life* del prodotto si utilizzano sia metodi analitici che metodi sensoriali, completandosi a vicenda.

La SSL è definita come la durata del tempo durante il quale il prodotto non modifica significativamente le sue caratteristiche sensoriali.

Il metodo base utilizzato per analizzare l'andamento del SSL consiste nel conservare un singolo lotto di prodotto in condizioni normali e testarlo in diversi tempi di stoccaggio; per ogni tempo alle prove organolettiche sono affiancate anche le analisi chimico-fisiche o microbiologiche. Tale metodo però ha lo svantaggio di poter perdere l'oggettività dell'analisi, ovvero i valutatori esperti o i consumatori durante l'intervallo di tempo potrebbero modificare i loro criteri di valutazione.

Per ovviare lo svantaggio del metodo appena riportato, si può progettare la valutazione della SSL misurando un insieme di campioni con diversi tempi di conservazione, tutti insieme in un'unica valutazione. Il principale vantaggio è che tutti i campioni siano valutati contemporaneamente, minimizzando il tempo e le risorse necessarie per eseguire l'esperimento.

1.4.3. Calcolo SSL

Dopo aver selezionato la metodologia, la stima della SSL richiede la selezione dei criteri di deterioramento o dei *cut-off point*, che corrispondono al livello massimo di deterioramento accettabile, al di sopra del quale il prodotto non è vendibile.

Criteri di deterioramento

Uno degli approcci più comuni per la stima della SSL è la misurazione della qualità durante lo stoccaggio utilizzando un *panel* di assaggiatori qualificati o un gruppo di esperti. I quali definiscono quando la qualità complessiva o l'intensità di un attributo sensoriale specifico raggiunge un valore predeterminato o “criterio di fallimento”, quindi un criterio di inaccettabilità.

La SSL è stimata, appunto, come il periodo in cui il prodotto raggiunge una differenza predeterminata rispetto al prodotto di controllo fresco. Il grado di differenza tra i campioni conservati e il controllo fresco potrebbe essere stimato utilizzando due approcci metodologici principali: test discriminativi o scale di intensità. Per i test discriminativi il *panel* di esperti effettua confronti accoppiati, a triangolo o duo-trio per determinare se il campione conservato e un campione fresco di controllo sono percepibili in modo diverso. Oppure utilizzando una scala strutturata a punti per misurare il grado di differenza tra i campioni e un controllo. Il vantaggio di questo metodo è che fornisce una stima precisa del tempo in cui si verificano le variazioni delle caratteristiche sensoriali dei campioni.

Un altro approccio impiegato per la stima della SSL, utilizzato in questo studio, avviene misurando l'intensità delle proprietà sensoriali durante lo stoccaggio e la stima della durata di conservazione, analizzando quanto tempo è necessario affinché l'intensità di un attributo critico, raggiunga un valore predeterminato. Gli assaggiatori addestrati sono invitati a provare il prodotto e generare successivamente una risposta numerica, utilizzando una scala che rifletta come hanno percepito l'intensità delle caratteristiche organolettiche di quel prodotto.

L'approccio più diffuso per la stima della SSL è relativo all'indice di qualità sensoriale (SQI), che è il rapporto dell'accettabilità complessiva di un prodotto alla fine della sua durata di vita

e quella all'inizio del suo tempo di conservazione, mostrando una forte correlazione positiva con le preferenze dei consumatori in un'ampia gamma di prodotti. L'*optimum* del SQI del prodotto viene identificato all'inizio della sua *shelf life*. L'utilizzo di questo tipo di metodo richiede la definizione di standard di qualità e la selezione dei criteri per valutare, se i prodotti soddisfano, i requisiti di tali standard. Un panel di valutatori qualificati analizza la qualità dei prodotti, utilizzando una scala in cui i punti sono definiti in termini di caratteristiche sensoriali, che contraddistinguono la qualità di ciascun grado, identificando i difetti sensoriali comuni che si presentano come risultato di uno stoccaggio prolungato (Giménez et al., 2012 e Imm B.- Y., 2011).

Cut-off point

Questa metodologia può essere considerata come una combinazione della misurazione di intensità e limite di accettabilità; dove vengono correlati i dati provenienti da un panel di consumatori con quelli ottenuti da un panel addestrato (Imm B.- Y., 2011).

Il livello di intensità del descrittore critico stabilito, ovvero il difetto sensoriale che si presenta come risultato di un prolungata conservazione e che è responsabile del rifiuto del prodotto, viene valutato attraverso il confronto di un panel addestrato o strumentalmente e il livello di accettabilità ottenuto da un panel di consumatori (Giménez et al., 2012).

2. SCOPO DELLA TESI

La presenza delle miopatie White Striping e Wooden Breast, nel *Pectoralis major* dei broiler, è diventata un criterio di rifiuto nelle scelte del consumatore. Nel caso del WS si manifesta con striature biancastre, percepite come un aumento del tessuto adiposo; invece i petti con WB sono caratterizzati da una consistenza legnosa e un'alterazione della tenerezza e del colore.

Gli studi dedicati alla caratterizzazione del microbiota residente in carni con miopatie sono scarsi, e quindi, attraverso analisi microbiologiche, sensoriali, biochimiche e molecolari, questa tesi ha l'obiettivo di fornire dati utili sull'effetto della presenza di tali miopatie sulla crescita della flora microbica e sulla *shelf life* della carne di broiler, conservati a temperatura di refrigerazione di circa 4°C. Sono stati impiegati tre gruppi di campioni con tesi diverse: un gruppo privo di miopatie, uno con *P. major* affetti da WS e uno con *P. major* affetti da WB.

Il monitoraggio è stato eseguito in sei tempi differenti: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 giorni dalla macellazione, ovvero fino al raggiungimento della *shelf life* stimata di 10 giorni a temperatura di refrigerazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento e preparazione campioni

Lo studio è stato condotto su un totale di 144 *Pectoralis major*, di cui 48 privi di miopatie (N), 48 con White Striping (WS) e altri 48 con Wooden Breast (WB).

I 144 polli maschi analizzati derivano da un'unica partita di un solo lotto, appartenenti al genotipo Ross 308; gli animali sono stati macellati nel medesimo giorno, a 49 giorni d'età, con un peso medio di 2.797 kg.

Le carcasse sono state selezionate dal personale del macello commerciale e trasferite al laboratorio di sezionamento. Dopo aver pesato e sezionato le carcasse, sono stati separati i muscoli *P. major*, necessari per le analisi per questo studio. I petti sono stati identificati e confezionati in vassoi rigidi e con film di PVC e portati nei laboratori, entro 24 ore dalla macellazione.

Durante il trasporto e durante il periodo di analisi dei campioni sono stati conservati a temperatura di refrigerazione a 4°C .

All'arrivo in laboratorio, ogni petto è stato esaminato per comprovare la presenza delle miopatie: per il WS sono stati considerati i petti con grado moderato e severo (Kuttappan *et al.*, 2012); per il WB è stata riconfermata la presenza o assenza.

I petti di broiler sono stati divisi in base alle analisi effettuate:

- Il *P. major* destro per le analisi della qualità della carne
- Il *P. major* sinistro per le analisi di *shelf life*

3.2. Disegno sperimentale

I campioni sono stati suddivisi in 6 gruppi *random* e analizzati in tempi diversi: a zero giorni di conservazione (T0), due giorni (T2), quattro giorni (T4), sei giorni (T6), otto giorni (T8) e dieci giorni (T10) dalla macellazione. Il punto zero delle analisi del laboratorio corrisponde a 24 ore dalla macellazione.

Per ogni tempo di conservazione sono stati sottoposti ad analisi 24 *P. major*: 24 *P. major* destri per le analisi reologiche e chimiche, mentre gli altri 24 *P. major* sinistri per quelle microbiologiche e sensoriali. Le analisi reologiche e chimiche, svolte da un altro gruppo di lavoro, consistevano in: misura del pH, del colore, dello sforzo di taglio, delle perdite di scongelamento e di cottura, del contenuto della sostanza secca, delle ceneri e delle proteine grezze. Inoltre è stata calcolata la composizione degli acidi grassi presenti nel muscolo.

Per tutte le analisi i campioni sono stati analizzati con un'alternanza della presenza/assenza delle miopatie (8 petti di broiler per ogni tesi testata, per ogni tempo di analisi): N, con WS e con WB, questo al fine di garantire risultati omogenei e più rappresentativi.

Durante il periodo di analisi di *shelf life* i petti (muscolari pettorali superficiali e profondi) sono stati confezionati in vaschette rigide e avvolte con pellicola in PVC permeabile ai gas (n. 2 petti per ciascuna vaschetta). I petti sono stati confezionati al termine delle operazioni di sezionamento delle carcasse dopo la macellazione. Le vaschette sono state collocate in un armadio frigorifero (temperatura di esercizio 2-4 °C) disposte su tre ripiani. A 40 cm al di sopra di ogni ripiano era collocata una lampada a tubo modello OSRAM NATURA® T8, tubular, G13 base, 18W e 750 lumen che veniva accesa dalle 8:00 alle 20:00 di ogni giornata di conservazione.

La durata dello studio (10 giorni) è stata definita in base a quanto osservato da Raab et al., (2008) e Russell (2001) in petti di pollo conservati a 4 °C; la durata della *shelf life* è stata definita utilizzando come indicatori, nel modello di crescita microbiologica predittivo, la carica microbica mesofila totale e la crescita di *Pseudomonas* spp. impiegando come limiti soglia 10^7 e $10^{7.3}$ UFC/g, rispettivamente. Alle analisi microbiologiche sono state affiancate quelle sensoriali, per calcolare la soglia di rifiuto mediante Sensory Index (SI).

Il disegno sperimentale delle analisi condotte è riportato in Appendice A.

3.3. Analisi sensoriali

L'analisi sensoriale consisteva in un *panel test*, basato su tre parametri: colore, odore e texture. Il test era effettuato da tre membri del laboratorio che osservavano, annusavano e valutavano la consistenza di ciascun petto singolarmente, senza confrontarsi. Al termine dell'analisi assegnavano a ogni campione un punteggio da 1 a 3, dove 3 corrispondeva alla buona qualità e 1 era di qualità non accettabile. Attraverso i dati raccolti per ogni singolo campione è stato calcolato, con la seguente formula, l'Indice Sensoriale (SI):

$$\frac{[(2 \times C) + (2 \times O) + T]}{5}$$

C:colore, O:odore, T: texture.

Tale indice, se uguale o inferiore a 1,8, porta allo scarto del campione (Raab *et al.*, 2008).

3.4. Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state utilizzate per monitorare la crescita della flora microbica sulla superficie della carne di broiler durante il periodo di conservazione.

3.4.1. Processazione campioni

Per ogni tempo di conservazione, 15 *P. major* sinistri sono stati sottoposti ad analisi microbiologica. In ogni muscolo sono stati prelevati 25g con pinze e forbici sterili in più punti della superficie muscolare, per garantire la rappresentatività della flora batterica superficiale. Ciascun campione è stato raccolto in un sacchetto sterile, sono stati quindi aggiunti 225 ml di Maximun Recovery Diluent (MRD), e quindi è stato omogenato per un minuto utilizzando uno omogenizzatore a battuta (Star-Blender™ Digital, VWR International Srl, Milano). Gli omogenati sono stati preparati all'inizio di ciascuna giornata, per ogni tempo stabilito dal protocollo, e conservati a una temperatura di 4° C fino all'occorrenza per le analisi (entro un'ora).

Creata così la prima diluizione (1:10), dal sacchetto dell'omogenato è stato prelevato 1 ml e mescolato con ulteriore MRD (9 ml) in tubi sterili con tappo, fino ad ottenere il numero di diluizioni seriali desiderate.

Da ciascuna diluizione è stata prelevata una quantità di 1 ml o 0,1 ml in base alla metodica di semina: per *pouring*, si inoculano 1 ml di campione diluito in piastre Petri vuote, miscelandolo con terreno nutritivo liquido agarizzato di PCA (Plate Count Agar) e VRBG (Cristal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar), dopo averlo fatto solidificare viene versato un secondo strato; oppure per *spreading*, dove viene seminata un'aliquota di 0,1 ml delle diluizioni del campione e distribuito con una spatola monouso su terreni agarizzati solidificati di MRSA (De Man, Rogosa e Sharpe Agar), CFC (Pseudomonas Agar Base addizionato con Cetrimmide, Fucidina, Cefaloridina) e LYNGBY (Lingby Iron Agar).

3.4.2. Terreni e incubazione

I terreni utilizzati in questo studio sono:

- Plate Count Agar (PCA “Biokar Diagnostic”, Solabia Group, Francia) per la conta mesofila totale, incubato a 30°C per 72 ore;
- Cristal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG “Conda”, Laboratorios Conda, Italia) per l'isolamento e il conteggio degli enterobatteri, incubato a 37°C per 24 ore;
- Lingby Iron Agar (“Conda”) per la numerazione di batteri H₂S produttori, incubato a 25°C per 48 ore;

- Pseudomonas Agar Base addizionato con Cetrimmide, Fucidina, Cefaloridina (PAB e CFC “Conda”) per la valutazione della presenza di *Pseudomonas* spp., incubato a 25°C per 48 ore.
- De Man, Rogosa e Sharpe Agar (MRSA “Conda”) addizionato con Verde di Bromocresolo (C₂₁H₁₄Br₄O₅₅) per la conta di batteri lattici, incubato in anaerobiosi a 30°C per 24 ore.

3.4.3. Lettura e raccolta dati

Trascorse le ore di crescita definite dal protocollo, nei relativi incubatori termostatici, i risultati sono stati raccolti contando le colonie presenti per ogni diluizione; sono state considerate due piastre consecutive con un numero inferiore alle 300 colonie ciascuna.

Per ottenere il numero totale dei microrganismi cresciuti viene applicata la formula:

$$\frac{\Sigma C}{V(n1 + 0.1 \times n2)d}$$

ΣC : somma delle colonie contate delle due piastre consecutive; V: volume per l’inoculo; $n1$ e $n2$: numero di piastre impiegate; d: prima diluizione considerata nella conta.

I risultati ottenuti sono in UFC/g; per analizzare l’andamento di crescita della flora in funzione del tempo sono stati calcolati in \log_{10} UFC/g.

3.4.4. Selezione morfologie

Per ogni terreno ai tempi T0, T6 e T10 sono state selezionate delle colonie in base alle principali morfologie osservate nei rispettivi terreni selettivi/differenziali.

Le caratteristiche morfologiche delle colonie sono state registrate come: colore, dimensione, morfologia e margini e le variazioni indotte al terreno, ad esempio gli aloni.

Le colonie del terreno CFC sono state analizzate inoltre con la lampada ad UV (UVGL-58 Handhel UV Lamp, UVP, Cambridge, UK), con lunghezze d’onda di 254 e 365 nm, distinguendo le colonie che presentavano fluorescenza da quelle che non la presentavano.

3.4.5. Stoccaggio delle colonie

Le colonie selezionate per ogni gruppo di miopatie sono state stoccate a -80°C, per le conferme mediante i test biochimici e le successive analisi molecolari, o per studi futuri.

Le colonie isolate in purezza sono state fatte crescere su terreno Tryptic Soy Agar (TSA Biolife Italiana Srl, Milano), quindi stemperate in 750 µl di Tryptic Soy Broth (TSB “Biolife”) e circa 500 µl di glicerolo, come crioprotettore. Per i batteri lattici, che hanno maggiori esigenze nutritive, le colonie sono state fatte crescere in De Man, Rogosa e Sharpe Broth (MRSB “Conda”), successivamente su terreno solido MRSA e poi stoccati in 750 µl di MRSB, ed infine aggiunti circa 500 µl di glicerolo.

3.5. Analisi biochimiche

Le colonie selezionate sono state inoltre confermate con le analisi biochimiche: test dell’ossidasi, della catalasi, con l’idrossido di potassio, dell’O/F e colorazione di Gram.

Test dell’ossidasi

Per questo test si utilizzano delle strisce di carta, dopo averle inumidite con acqua distillata, con un’ansa vengono strisciate con la colonia di interesse. Le strisce sono dotate di un substrato (diidicloruro di tetrametil-p-fenilendiamina) che se ossidato dai batteri aerobi, aventi l’enzima citocromo C, da incolore passano ad una colorazione blu in circa 30 secondi (Figura 3.5.1).



Figura 3.5.1 Test dell’ossidasi con risultato positivo e negativo

Test della catalasi

Per il test della catalasi è necessario un supporto (ad esempio una piastra Petri vuota), dove viene versata una goccia di H₂O₂ al 3% e stemperata al suo intero la colonia. La catalasi è un enzima ossidoreduttasi, che catalizza la reazione $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

Il test risulta positivo se vi è la presenza di bolle di gas (Figura 3.5.2).

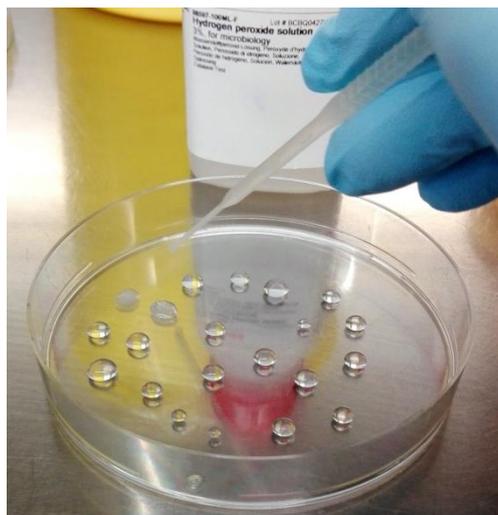


Figura 3.5.2 Test della catalasi con due risultati positivi

Test con il KOH

Per il test con il idrossido di potassio è necessario un supporto dove mettere alcune gocce di una soluzione di KOH al 10%, all'interno stemperare con un'ansa la colonia del microrganismo di interesse, quindi miscelare e sollevare l'ansa per osservare l'eventuale formazione di un filamento viscoso.

Attraverso il test del KOH si possono distinguere i batteri Gram positivi e Gram negativi. Il KOH, a contatto con i batteri Gram negativi, lisa la loro parete e i lipidi presenti su di essa sono disciolti, creando un filamento viscoso; invece, i Gram positivi non sono lisati e non hanno alcun cambiamento chimico-fisico. Tale test può essere utilizzato per confermare o sostituire la colorazione di Gram.

Colorazione di Gram

Procedura per definire se la flora batterica sia Gram positiva o negativa, in base alla capacità di tali microrganismi di trattenere il complesso iodio-cristalvioletto. I batteri, che dopo la decolorazione, sono in grado di trattenere il complesso sono identificati come Gram-positivi, poiché la parete cellulare disidratata con alcol perde permeabilità e trattiene la colorazione primaria. Invece i batteri, sempre dopo la decolorazione, che assorbono la colorazione di contrasto sono classificati come Gram-negativi; la parete cellulare, grazie all'elevata quantità di lipidi, dopo la disidratazione diventa più permeabile, perdendo la colorazione primaria.

Per la colorazione è stata stemperata una colonia in alcune gocce di acqua, su un vetrino e lasciato asciugare. Successivamente sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- Cristalvioletto per 1 minuto
- Soluzione di Lugol per 1 minuto
- Decolorante per circa 30 secondi
- Safranina per altri 30 secondi

Dopo ogni passaggio con i reagenti il vetrino è stato lavato con acqua.

L'identificazione di Gram e la morfologia dei batteri è avvenuta attraverso l'osservazione al microscopio ottico.

Test O/F

Il test O/F è utilizzato per valutare la capacità ossidativa e fermentativa dei batteri. Il terreno utilizzato è Hugh Leifson Base. Il terreno viene fatto solidificare dentro le provette, con una concentrazione di glucosio dell'1%, inoculato per infissione prelevando le singole colonie dal terreno Lyngby Iron Agar, per la conferma delle colonie di colore nero dei batteri idrogeno solforanti (*Shewanella* spp.). Incubate a 25°C per 48 ore.

Il test è stato condotto in doppio, sia in aerobiosi che in anaerobiosi con olio di vaselina.

I batteri con metabolismo fermentativo produrranno un'acidificazione del terreno con un viraggio da verde a giallo, sia in aerobiosi che anaerobiosi. I batteri con metabolismo ossidativo produrranno un'acidificazione nella provetta in aerobiosi.

3.6. Analisi molecolare

Una parte dei ceppi selezionati, in base ai risultati dei test biochimici e alle morfologie delle colonie, è stata rivitalizzata su terreni TSA e MRSA (per i batteri lattici) per poter effettuare l'identificazione molecolare del genere o della specie mediante l'analisi di sequenziamento del gene dell'RNA ribosomiale 16S.

Si è quindi proseguito all'estrazione del DNA secondo modalità differenti, riportate qui di seguito, per i Gram negativi con la tecnica per bollitura, invece per i Gram positivi con un *buffer* di lisi.

3.6.1. Modalità di estrazione

Estrazione DNA Gram negativi

L'estrazione dei batteri Gram negativi selezionati è avvenuta con la tecnica di bollitura, che consiste nelle seguenti fasi:

- in 100 µl di acqua *DNAse free* (H₂O BDH) stemperare la colonia

- riscaldare in un termoblocco a secco a 96°C per 10 minuti
- centrifugare a 14000 rpm (*revolutions per minute*, giri al minuto) per 2 minuti
- prelevare il surnatante

Estrazione DNA Gram positivi

Per l'estrazione del DNA dei batteri lattici Gram positivi è stata stemperata la colonia in 100 µl di H₂O BDH, prelevato 1 µl di tale soluzione e addizionato a 19 µl di buffer MicroLYSIS®-Plus DNA (Labogen, Milano), soluzione di lisi, in ciascun pozzetto della piastra. Per concludere l'estrazione la piastra è stata posta nel termociclatore AB (Applied Biosystem 2700 Thermal Cycler) con il seguente protocollo termico:

- 65°C per 15 minuti
- 96°C per 2 minuti
- 65°C per 4 minuti
- 96°C per 1 minuto
- 65°C per 1 minuto
- 96°C per 30 secondi
- 20° *hold*

3.6.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

La metodica di PCR è una tecnica che permette di ottenere un numero elevato di copie di DNA partendo da uno specifico frammento.

Per l'amplificazione genica delle porzioni di rRNA 16S di ciascun cappo rivitalizzato, è stata preparata una miscela di reazione con un volume totale di 15 µl da aggiungere ai 5 µl di DNA estratto, quest'ultimo diluito in H₂O BDH con un rapporto 1:10 per i Gram negativi e rapporto 1:5 per i Gram positivi².

Per la miscela di reazione per l'amplificazione sono stati aggiunti:

- Buffer di reazione, tampone che garantisce le condizioni di pH ottimali per la reazione.

² È stata scelta tale diluizione per i Gram positivi, poiché a diluizioni inferiori le bande di amplificato non erano visibili.

- Il magnesio, fornito come $MgCl_2$, è fondamentale per l'attivazione della *Taq Polimerasi*. La concentrazione del magnesio varia da 0.5 a 5 mM in base al *primer* usato; la concentrazione di $MgCl_2$ non deve essere eccessiva, poiché potrebbe crescere il livello di amplificazione aspecifica.
- dNTPs, i deossiribonucleotidi trifosfati dATP, dTTP, dGTP, dCTP, necessari per la sintesi dei nuovo frammenti. Possono essere in concentrazioni da 50 a 250 μM .
- *Primer forward* (senso) e *primer reverse* (antisenso), frammenti di singoli filamenti di acidi nucleici, sono complementari all'estremità 5' del frammento da amplificare. I *primer reverse* sono assemblati in direzione 5'→3', invece si lega al filamento *primer forward* 3'→5'. È stato impiegato come *primer forward* 8FLP con sequenza 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG -3', invece come *primer reverse* 806R di sequenza 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3', i quali permettono di ottenere un prodotto di amplificazione di circa 800pb. L'enzima adoperato è la *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega, Promega Italia S.r.l, Milano).
- *Taq Polimerasi*, l'enzima DNA polimerasi, a partire dai *primer*, lega le basi nucleotidiche complementari alla sequenza del DNA stampo.

La miscela di reazione (con kit Promega) per i Gram negativi era composta secondo quanto riportato in Tabella 3.6.2.1.

REAGENTI	CONCENTRAZIONI	QUANTITÀ 1X
Buffer di reazione 5X	1X	4 μl
MgCl₂ 25mM	2.5 mM	1,5 μl
dNTPs 25mM	250 μM	0,2 μl
<i>Primer forward</i> 10 μM	0.125 μM	0,5 μl
<i>Primer reverse</i> 10 μM	0.125 μM	0,5 μl
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	1 U	0,2 μl
H₂O BDH		8,1 μl

Tabella 3.6.2.1 Miscela di reazione per Gram negativi

La miscela di reazione (con kit Kapa Biosystems, Inc., US) per i Gram positivi era composta secondo quanto riportato in Tabella 3.6.2.2.

REAGENTI	CONCENTRAZIONI	QUANTITÀ 1X
Buffer di reazione 5X	1X	2 µl
dNTPs 25mM	2.5 mM	0,2 µl
Primer forward 10 µM	0.125 µM	0,5 µl
Primer reverse 10 µM	0.125 µM	0,5 µl
Taq Polimerasi con MgCl₂	1 U	0,2 µl
H₂O BDH		11,6 µl

Tabella 3.6.2.2 Miscela di reazione per Gram positivi

L'amplificazione del gene 16S è stata eseguita utilizzando il termociclatore AB secondo un profilo termico che prevede tre passaggi:

1. Denaturazione della doppia elica di DNA, con la separazione dei filamenti; avviene a temperature fino ai 94-99°C.
2. *Annealing*, fase nella quale i *primer* si legano al filamento stampo corrispondente; la temperatura viene abbassata.
3. Estensione, formazione dei nuovi frammenti di filamenti di DNA; la temperatura si rialza per garantire le condizioni ottimali di azione dell'enzima *Taq Polimerasi*.

Questi passaggi vengono ripetuti ciclicamente per un numero di volte variabile da 25 a 35.

In questo studio per i batteri Gram negativi si è utilizzato il seguente protocollo termico:

- 94°C per 2 min
 - 94°C per 30 sec
 - 51°C per 30 sec
 - 72°C per 1 min
 - 72°C per 7 min
- } 33 cicli

Invece per la flora batterica dei Gram positivi:

- 94°C per 2 min
 - 94°C per 30 sec
 - 51°C per 30 sec
 - 72°C per 1 min
- } 35 cicli

- 72°C per 7 min

3.6.3. Elettroforesi su gel di agarosio

Per controllare l'avvenuta amplificazione genica dei ceppi batterici, gli amplificati della PCR vengono sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio. Il gel di agarosio all'1,8% è stato preparato sciogliendo l'agarosio in polvere nel buffer TAE, tampone a bassa forza ionica, utilizzato inoltre durante la corsa elettroforetica, quindi portati ad ebollizione. Per rendere visibile l'amplificato è stato addizionato il colorante fluorescente SYBR®Safe DNA Gel Stain (1 µl ogni 10 ml di gel). La soluzione è stata versata nella cameretta dotata di *pettinini*, necessari per la formazione dei pozzetti, e lasciata solidificare.

In ogni pozzetto sono stati caricati 5 µl di amplificato e 5 µl di Loading Buffer 2X (Green GoTaq Flexi Buffer, Promega); inoltre sono stati caricati nei pozzetti un controllo negativo, un controllo positivo e un marcatore di pesi molecolari di 100 paia di basi (DNA Ladder, BioLabs).

La corsa elettroforetica è avvenuta orizzontalmente a 100 V per 30 minuti, al termine il gel è stato analizzato con Gel Doc XRTM (Biorad), per controllare la presenza/assenza delle bande.

3.6.4. Sequenziamento

Gli amplificati sono stati inviati alla ditta MacroGen Inc. (Amsterdam, Olanda) per la purificazione e il sequenziamento; le sequenze ottenute sono state lette attraverso il programma informatico Chromas versione³ 2.6.4 come cromatogrammi, con colori diversi per ciascuna base azotata.

Inoltre le sequenze delle basi azotate vengono fornite in formato FASTA (modalità di scrittura delle sequenze nucleotidiche), usato per analizzare la similarità di quelle ottenute durante questo studio e confrontate con una banca dati, con i seguenti software online:

- BLAST⁴ (Basic Local Alignment Search Tool) dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information)
- RDP⁵ (Ribosomal Database Project) considerando i soli ceppi tipo.

³ <https://technelysium.com.au/>

⁴ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁵ <https://rdp.cme.msu.edu/>

3.7. Analisi statistica

L'effetto della presenza delle anomalie WB e WS sulla flora microbica dei petti di broiler è stato valutato attraverso differenti analisi statistiche multivariate, in particolare l'analisi della varianza multivariata permutazionale PERMANOVA, affiancata dal test di combinazione non parametrica (*NPC test – free software*⁶). Questa ultima analisi è stata effettuata per comprendere il contributo di ogni singola variabile. Per il test NPC, i valori del *p-value* totali e globali sono stati determinati per i profili di conteggio microbico (\log_{10} UFC/g), considerando due effetti principali: il tempo di conservazione (T0, T2, T4, T6, T8, T10) e la categoria di miopatia considerata (N; WS; WB). Inoltre il fattore tempo è stato utilizzato come variabile indipendente di stratificazione per confrontare le diverse categorie di lesioni in base ai tempi sperimentali studiati (Fasolato et al., 2016).

L'analisi PERMANOVA a due vie (*two-way Permanova*) è stata eseguita per evidenziare gli effetti dei fattori fissi, come il tempo e la tipologia di miopatie nonché le loro interazioni; quando l'interazione è risultata significativa sono stati confrontati a coppie (*a posteriori pairwise comparison*) (Fasolato et al., 2016). La distanza di Gower è stata applicata per creare la matrice di dissimilarità come proposto da Anderson et al., (2009).

Il *clustering* gerarchico (*Hierarchical clustering*) è stato effettuato sugli stessi dati utilizzando la distanza di Gower mediante un approccio di tipo agglomerativo utilizzando il metodo *Complete linkage*. I dati sono anche stati visualizzati mediante *Non-metric multidimensional scaling* (NMDS) *plots*. Questo metodo permette di rappresentare la dissomiglianza tra le coppie di oggetti allo studio in uno spazio a due o tre dimensioni. A partire da una matrice di similarità, ad ogni elemento studiato (campione) viene assegnato una posizione in uno spazio bidimensionale. I metodi basati sul rango sono generalmente più affidabili per i dati che non hanno una distribuzione identificabile.

Infine è stato utilizzato il metodo DistLM (*Distance – based multivariate analysis*) per i dati microbiologici. Il software permette di effettuare la *forward selection* (selezione in avanti) delle variabili ambientali sia singole (*individual variables*) che comprese in un set di variabili attinenti (*sets of variables*). Il programma restituisce la percentuale di variabilità cumulativa della matrice di dissimilarità dei dati microbiologici spiegata dal set di variabili ambientali prese in esame.

I profili di conteggio microbico, utilizzati nelle analisi statistiche multivariate, sono stati stimati con l'applicazione on-line *DMfit* del programma *Combase*⁷; con i parametri ottenuti

⁶ <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/pesarin/material.html>

⁷ <http://www.combase.cc/>

in relazione alle ore di conservazione è stato studiato l'accrescimento microbico, attraverso alcuni modelli primari: il modello dinamico (*D-model*) di Baranyi e Roberts e il modello trilineare di Buchanan e colleghi (Gardini et al., 2013).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per lo studio della flora microbica e della *shelf life* dei petti di broiler affetti da miopatie sono stati considerati alcuni attributi qualitativi: qualità microbiologica attraverso l'analisi coltura-dipendente e qualità sensoriale attraverso la valutazione del colore, odore e *texture*. Queste analisi sono state affiancate da un approccio di tipizzazione molecolare, per identificare le specie e i *taxa* che formano la microflora dei petti di pollo conservati, attraverso il gene codificante dell'RNA ribosomiale 16S.

Come descritto nel disegno sperimentale, nel capitolo precedente, i petti di pollo esaminati appartenevano a tre diverse categorie: un gruppo privo di miopatie (N), un gruppo con WS e un terzo gruppo con WB. I campioni sono stati suddivisi in 6 tempi diversi di conservazione, a partire dall'arrivo in laboratorio: a 0 giorni di conservazione fino a 10 giorni, a giorni alterni.

4.1. Analisi microbiologica

In questo studio, con l'applicazione dei metodi tradizionali per determinare la natura e la composizione della flora microbica del petto di pollo, sono state definite le conte delle colonie per i seguenti target: carica mesofila totale, batteri idrogeno-solfurato produttori, enterobatteri, LAB e *Pseudomonas* spp..

Le colonie individuate, e successivamente selezionate per la conferma e l'archiviazione, per ciascun terreno, sono riportate nella tabella seguente (Tabella 4.1.1):

TERRENO	MICROORGANISMI	MORFOLOGIA TIPICA
VRBG	<i>Enterobacteriaceae</i>	<ul style="list-style-type: none">• viola con alone chiaro• viola con alone rosso (precipitazione dei sali biliari)• viola senza alone• viola con doppio alone
LYNGBY IRON AGAR	H ₂ S produttori	<ul style="list-style-type: none">• tonde nere con alone bianco• tonde nere senza alone• tonde arancioni
CFC	<i>Pseudomonas</i> spp.	<ul style="list-style-type: none">• tonde bianche

		fluorescenti
		• tonde arancioni fluorescenti
		• tonde viola/rosa fluorescenti
		• tonde bianche non fluorescenti
		• tonde arancioni non fluorescenti
		• tonde viola/rosa non fluorescenti
MRSA	Batteri lattici	• tonde verde scuro
		• tonde verde chiaro
		• tonde verde chiaro con centro più scuro
		• irregolari verde chiaro con centro più scuro

Tabella 4.1.1 Morfologie colonie selezionate

4.1.1. Variazioni della flora batterica

Durante il periodo di studio, la flora batterica dei petti di pollo è stata sottoposta ad analisi microbiologiche quantitative. In Tabella 4.1.1.2 sono riportati i dati delle conte microbiche della flora microbica tipica del pollo, elaborati attraverso il test NPC, test di combinazione non parametrica, dove sono confrontate le tesi (N, WB e WS) stratificate per tempo oppure tra i livelli dei fattori tempo e miopatie.

La concentrazione della carica batterica mesofila totale (CMT) a T0 sulla carne dei petti di pollo, così come per gli altri microrganismi presenti, per quanto riguarda i campioni N, è in accordo con quanto riportato nei lavori di Rouger et al. (2017), Vasconcelos et al. (2014) e Raab et al. (2008). L'andamento della crescita batterica della CMT mostra un incremento continuo, così accade anche per la crescita di *Pseudomonas* spp., entrambi utilizzati appunto come indici microbici per la determinazione della *shelf life* della carne di pollo in ambiente aerobico e refrigerato.

Come si può notare dalla Tabella 4.1.1.2, le conte microbiche sono state maggiormente influenzate dalla presenza delle miopatie a partire dal tempo T2, per poi uniformarsi verso gli

ultimi tempi sperimentali (T10), con una differenza durante la conservazione tra i campioni N e quelli con miopatie di 1 o 2 \log_{10} UFC/g. Differenze significative ($P \leq 0.001$) si riscontrano principalmente nelle *Enterobacteriaceae* (in tutti i tempi, eccetto il T10) e nei batteri lattici. Al contrario nei batteri H_2S produttori, non è stata riscontrata alcuna significatività, pertanto questo target microbico è simile in tutte le tesi allo studio.

L'effetto complessivo sul profilo microbico è stato definito con un *p-value* globale inferiore a 0.001. Questi dati indicano che le flore microbiche sono differenti tra le tesi studiate.

Per l'analisi degli effetti separati tra le lesioni date dalle patologie e il tempo, la presenza delle miopatie ha influenzato in modo significativo solo le conte degli enterobatteri ($P \leq 0.01$).

Nei Grafici 4.1.1.1 sono riportati gli andamenti significativi della Tabella 4.1.1.2.

Tempo	Trattament i	CMT	<i>Pseudomonas</i>	H ₂ S produttori	Enterobatteriacee	LAB	Global P
Test tra i trattamenti stratificati per tempo							***
T0	N	3.719± 0.30	3.01±0.58	2.58± 0.14	2.45±0.32	3.22±0.44	
	WS	3.669±0.34	2.36±0.32	2.44± 0.18	2.32 ±0.30	3.63±0.29	
	WB	3.339±0.09	2.68±0.57	2.12± 0.72	1.84±0.29	2.85±0.27	
	<i>P</i>				***	**	
T2	N	4.04±0.31	4.16±1.09	2.90±0.36	2.96±0.06	3.61±0.16	
	WS	3.10±0.16	2.71±0.56	2.60±0.42	2.19±0.22	3.47±0.22	
	WB	3.21±0.14	2.70±0.51	2.59±0.35	2.17±0.42	3.22±0.40	
	<i>P</i>	***	***		***		
T4	N	5.85±0.28	6.08±0.78	3.69±0.17	4.26±0.45	4.74±0.37	
	WS	4.26±0.13	4.71±0.28	3.78±0.46	3.44±0.43	3.95±0.11	
	WB	3.90±0.31	4.02±0.45	3.48±0.47	3.01±0.24	3.43±0.55	
	<i>P</i>	***	***		***	***	
T6	N	7.51±0.48	8.07±0.51	5.62±0.70	6.32±0.22	5.69±0.60	
	WS	6.92±0.51	7.51±0.51	5.99±0.94	4.93±0.55	5.11±0.43	
	WB	5.83±0.25	6.91±0.48	5.44±0.46	4.56±0.66	4.48±0.79	
	<i>P</i>	***	**		***	*	
T8	N	8.10±0.64	8.03±0.24	6.22±0.44	6.40±1.02	6.52±0.36	
	WS	7.07±0.51	7.11±0.58	5.23±0.98	5.23±1.00	5.48±0.95	
	WB	6.90±0.48	7.01±0.57	5.48±0.27	4.11±1.00	5.40±0.56	
	<i>P</i>	*	**		**	*	
T10	N	8.11±0.59	8.31±0.41	6.83±0.28	7.48±0.46	6.97±0.80	
	WS	7.98±0.59	8.29±0.51	6.82±0.21	7.09±0.60	7.07±0.39	
	WB	8.09±0.54	8.03±0.47	6.77±0.20	6.71±0.58	6.80±0.43	
Test tra livelli dei fattori Tempo e Trattamenti							
Trattament i	<i>P</i>				**		*
Tempo	<i>P</i>	**	***	**	***	***	***

Tabella 4.1.1.2 Target microbici analizzati durante la conservazione dei petti di pollo (p= valori riferiti al NPC test). Dati espressi in log₁₀ UFC/g; * = P ≤ 0.05; ** = P ≤ 0 .01; *** = P ≤ 0.001

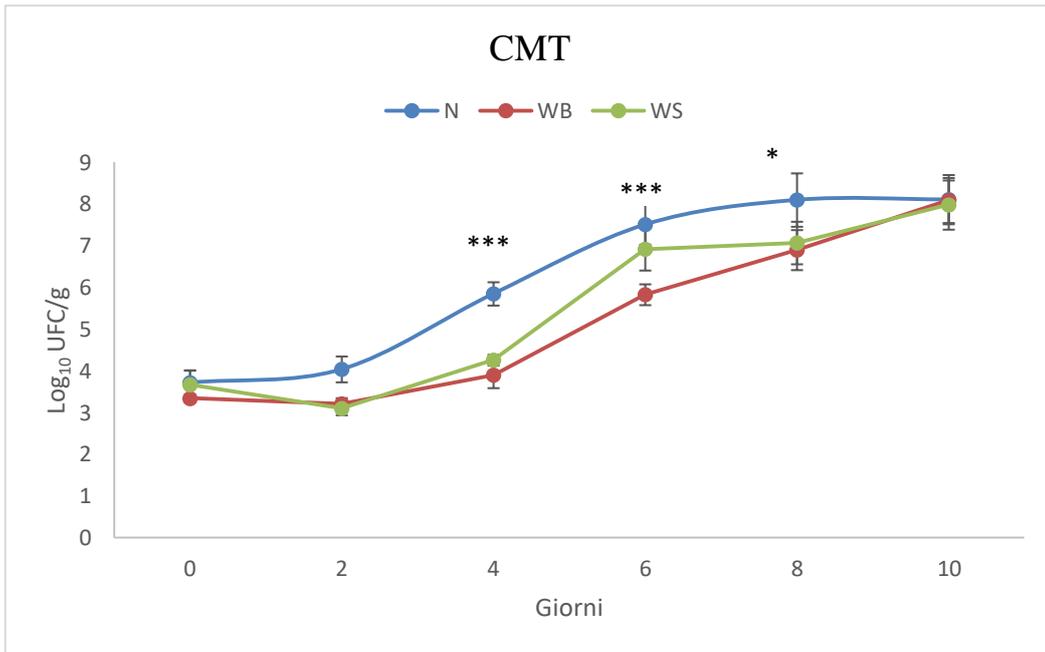


Figura 4.1.1.1a Andamento CMT in funzione del tempo

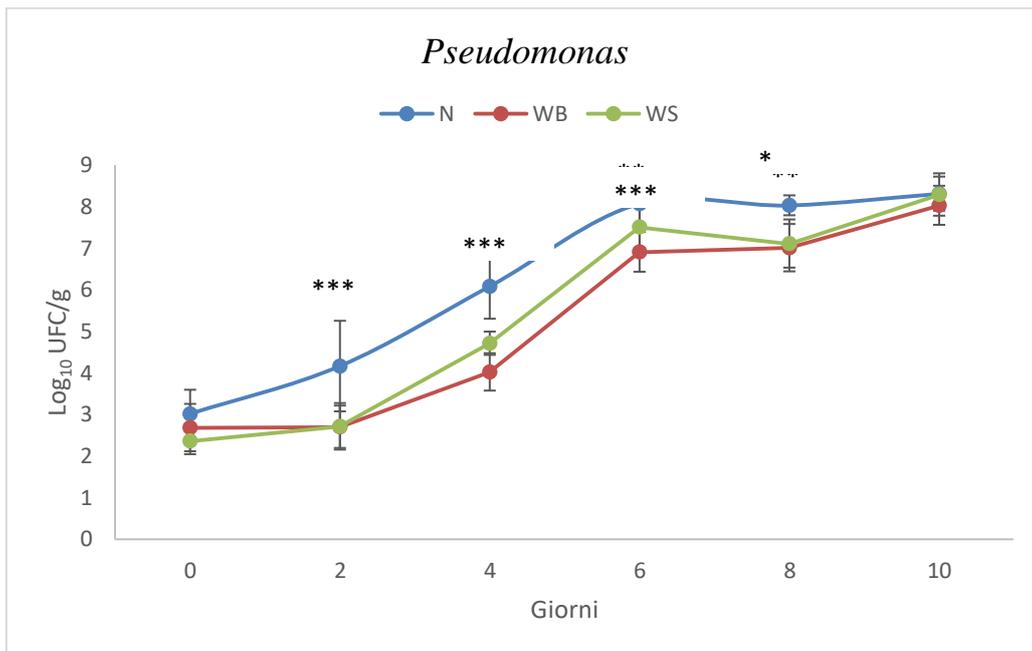


Figura 4.1.1.1b Andamento *Pseudomonas* in funzione del tempo

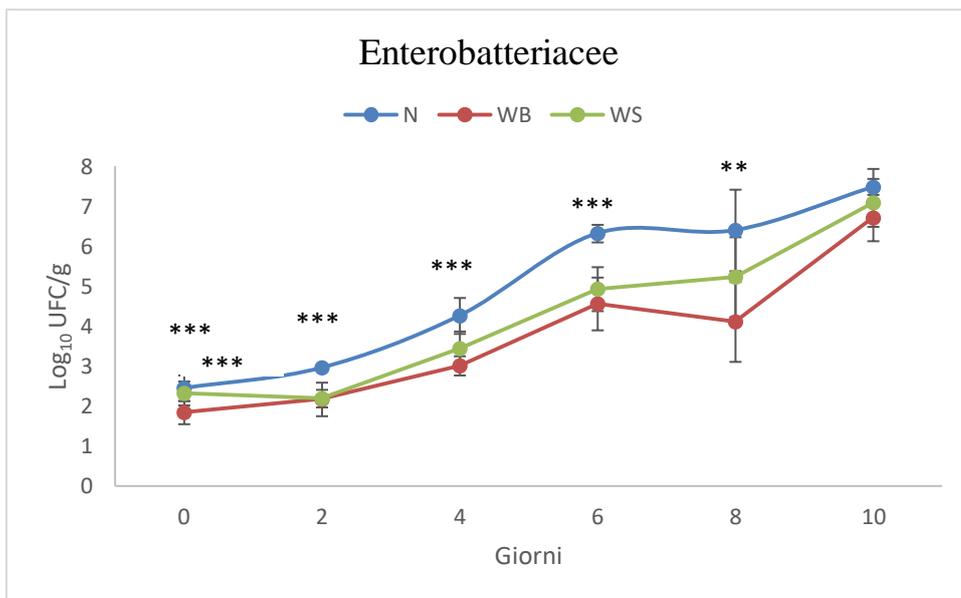


Figura 4.1.1.1c Andamento Enterobatteriaceae in funzione del tempo

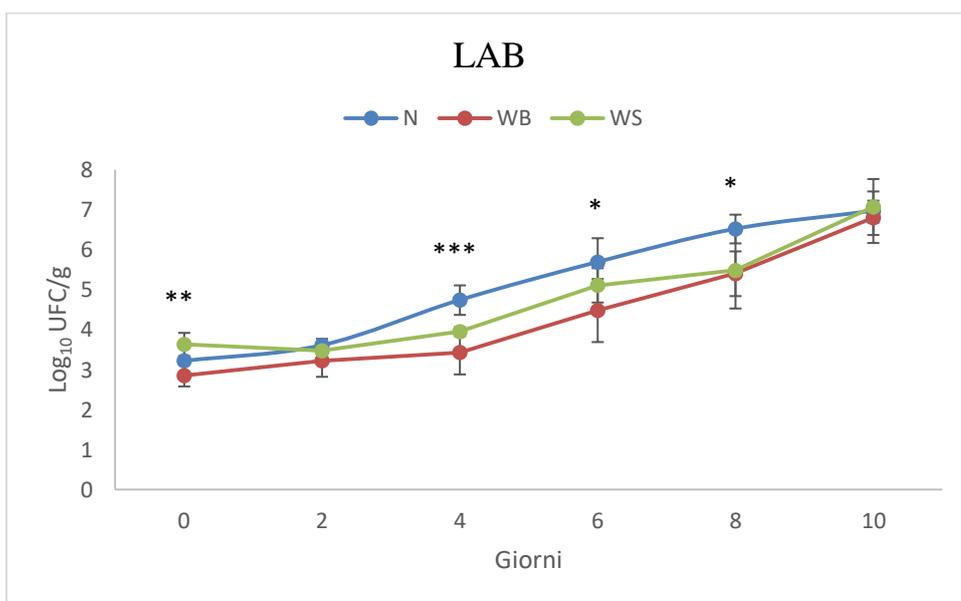


Figura 4.1.1.1d Andamento LAB in funzione del tempo

Dopo aver analizzato i profili microbiologici ottenuti da ciascun campione, per evidenziare dove si originano le dissomiglianze più significative tra le diverse tesi (N, WS e WB), con l'analisi PERMANOVA sono stati considerati i due principali effetti dei fattori fissi: il fattore tempo di conservazione ed il fattore "tipo di miopatia", e quindi la loro interazione (Tabella 4.1.1.3).

	Tempo		Trattamenti		Tempi x Trattamenti		Test a coppie Tempo X Trattamenti (P values)						
	F	P	F	P	F	P	Trattamenti						
							Tempo	N vs WS	vs N	WB	vs N	WS vs WB	
Profili microbica	conta	327.1	0.001	38.6	0.001	2.4	0.022	0	0.409		0.037		0.009
								2	0.001		0.002		0.772
								4	0.001		0.001		0.053
								6	0.028		0.003		0.019
								8	0.004		0.001		0.699
								10	0.724		0.372		0.578

Tabella 4.1.1.3 Modello PERMANOVA dei profili della conta microbica. F= pseudo -f Fisher.

L'analisi della varianza multivariata permutazionale (PERMANOVA) è un metodo di permutazione che consente di valutare i cambiamenti statistici nella struttura dei gruppi, PERMANOVA non ha richiesto alcuna assunzione di distribuzione normale delle variabili. Nel caso di effetti significativi, vengono effettuati confronti a posteriori a coppie (Fasolato et al., 2016).

Come si può notare dalla Tabella 4.1.1.3, l'analisi PERMANOVA ha evidenziato un significativo effetto del tempo, delle tesi e dell'interazione tra i due. Il confronto a coppie dell'interazione tempo X tipologie di tesi ha dimostrato differenze statistiche tra N e WS durante il periodo di conservazione, in particolare dal T2 al T8 e tra N e WB durante tutto il periodo di conservazione, ad eccezione del tempo T10; tali differenze significative verranno ritrovate successivamente nella predizione della durata della *shelf life*. Invece, il confronto tra WS e WB ha dimostrato una certa similarità tra le crescite batteriche dei petti affetti dalle due anomalie, portando una differenza solo iniziale e al T6. Tale similarità potrebbe essere ricondotta alle similarità istopatologica ed eziologica, evidenziate da Petracci et al. (2015), Sihvo et al. (2014) e Kuttappan et al. (2013).

Due ulteriori analisi esplorative sono state condotte per studiare la variabilità dei campioni ed evidenziare il grado di similarità. Il grado di similarità è stato determinato mediante: *Hyerarchical Cluster Analysis*, dove i gruppi sono stati rappresentati in base al 20, 40, 60, 80 % di similarità tra i campioni oppure la similarità tra i campioni, divisi per gruppo e per tempo, è stata analizzata graficamente con il diagramma MDS (*MultiDimensional Scaling*)

non metrico, attraverso la rappresentazione di una dispersione di punti, riportato nel Grafico 4.1.1.2.

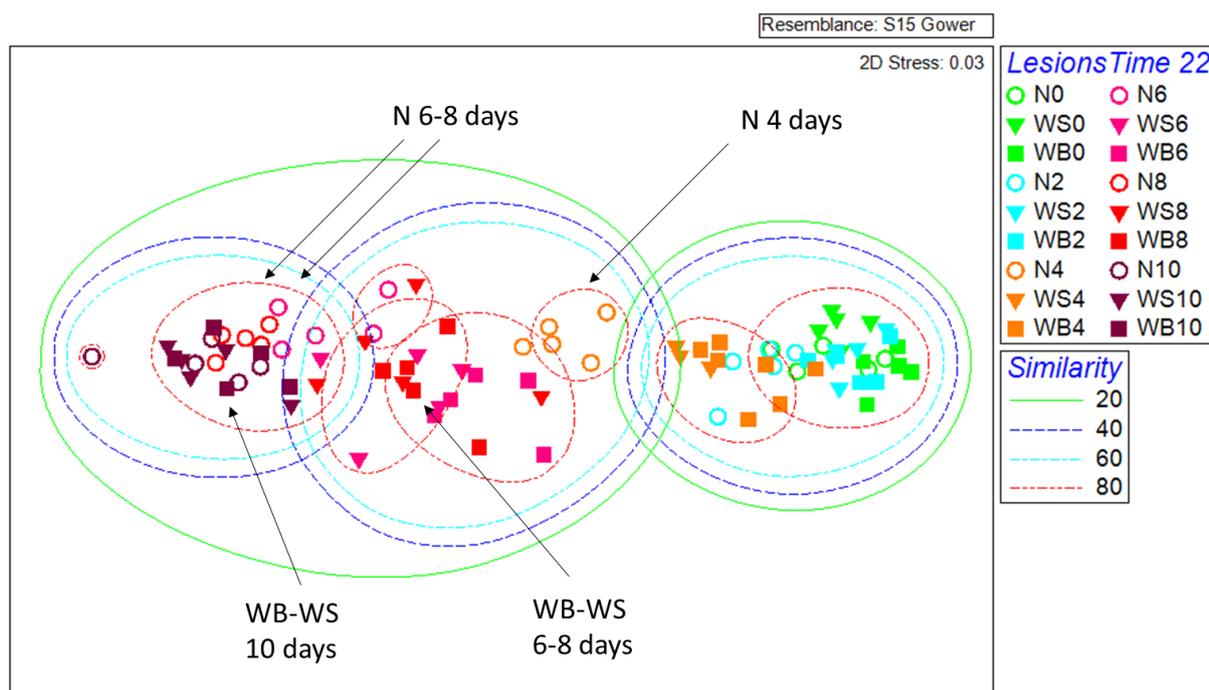


Grafico 4.1.1.2 MDS *plot*, Triangoli = WS, Quadrato = WB, Cerchi = N.

Nel Grafico 4.1.1.2, i dati sono stati etichettati in base al tempo di conservazione, con diversi colori. Alcuni *cluster* sono stati evidenziati con le frecce, per sottolineare un particolare spostamento dei campioni controllo, soprattutto dei gruppi dei campioni N a partire dal T4, che risultano differenti rispetto la variabilità osservata nelle altre tesi. Nel tempo T4, fino a T8, la flora microbica dei gruppi N è più simile ai gruppi con miopatie dei tempi successivi, ciò potrebbe descrivere un deterioramento più veloce ed ad una *shelf life* più breve. Al T10 i gruppi delle tre tesi tendono ad uniformarsi nuovamente, raggiungendo una similarità dell'80%, ad eccezione di un solo gruppo di campioni N, riducendo la similarità al 60%.

Come sottolineato precedentemente, non vi sono studi relativi alla crescita microbica in petti di pollo con le miopatie, quindi non risulta possibile confortare i dati ottenuti in questo studio con la bibliografia.

4.1.2. *Shelf life* microbica

Per poter facilitare il confronto dell'andamento delle curve di crescita dei principali indicatori utilizzati in questo studio per il calcolo e la predizione della *shelf life*, ovvero la carica mesofila totale e *Pseudomonas* spp. (Tabella 4.1.1.2), sono stati rappresentati graficamente (Grafico 4.1.2.3 e 4.1.2.4).

In Tabella 4.1.2.4 sono riportati i principali parametri di crescita della CMT, come il valore iniziale per ogni tesi, in questo studio è un valore di circa $3 \log_{10}$ UFC/g, la fase *lag*, il μ_{max} e il valore finale. La fase di adattamento (fase lag) all'ambiente di crescita varia in base alla tipologia di lesioni, in particolare per i campioni affetti da miopatie è molto più lunga rispetto ai campioni N (85.20, 77.8 vs 46.3 ore); anche la velocità di crescita massima (μ_{max} , *maximum rate*) cambia tra i diversi gruppi, ed è maggiore per i campioni WS. Il valore finale raggiunto al termine del tempo di conservazione (10 giorni), si uniforma per tutti i gruppi a circa $7.5-8 \log_{10}$ UFC/g.

L'andamento della proliferazione batterica descritto dalla CMT per i campioni privi di miopatie è in accordo con quanto descritto nel lavoro di Vasconcelos et al. (2014), dove riportano la CMT iniziale per petti di pollo refrigerati di $4.2 \pm 0.5 \log_{10}$ UFC/g fino a raggiungere valori prossimi a $8 \log_{10}$ UFC/g in un totale di 14 giorni.

Le curve di sviluppo microbico della CMT indicano un accrescimento continuo, per questo la CMT viene considerata insieme alla crescita di *Pseudomonas* spp. indici opportuni per la determinazione della *shelf life* nel petto di pollo refrigerato.

Predicted Parameters	Unit	N	WS	WB
Initial value	\log_{10} cfu/g	3.7±0.17	3.39±0.17	3.20±0.15
Lag/shoulder	h	46.3±9.36	85.20±9.44	77.8±8.8
Maximum Rate	\log_{10} cfu/g/h	0.04±0.004	0.062±0.001	0.035±0.003
Final Value	\log_{10} cfu/g	8.24±0.13	7.53±.17	8.21±0.26
Shelf life	H (days)	126.74 (5.3)	143.40 (5.9)	197.56 (8.2)
Goodness of fit				
R²		0.96	0.93	0.961
SE fit		0.387	0.542	0.373

Tabella 4.1.2.4 Parametri di crescita CMT stimati con il modello di Baranyi and Roberts.

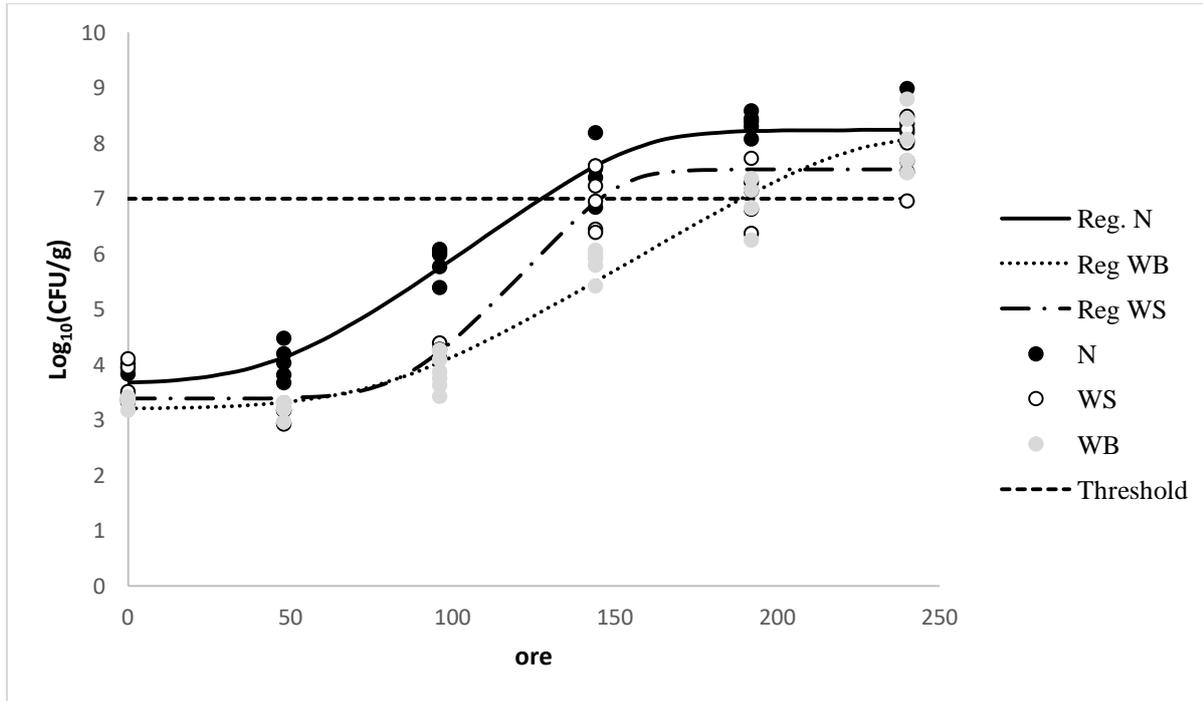


Grafico 4.1.2.3 Andamento CMT dei petti di pollo. La fine della *shelf life* è definita al valore soglia di 7 log₁₀ UFC/g.

I parametri della Tabella 4.1.2.4, sono rappresentati nel Grafico 4.1.2.3; i valori riportati sono le singole osservazioni utilizzate per il *fitting* del modello predittivo costruito con il software DMfit. Come riportato sopra, la curva delle regressioni dei campioni N presenta visibilmente una fase lag ridotta, rispetto alle altre due regressioni. La curva di WB è caratterizzata da una crescita continua nel corso del monitoraggio, con una distinzione meno percepibile tra le fasi di crescita e una ridotta fase stazionaria.

Attraverso i parametri raccolti in Tabella 4.1.2.4 è stato possibile stimare la *shelf life* dei petti di pollo, attraverso il modello trilineare di Buchanan e colleghi, con la seguente formula:

$$Shelf\ life = t_{lag} + t_m \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right)}{\ln(2)}$$

Con,

$$\frac{1}{\mu_{max}} = \frac{t_m}{\ln(2)}$$

Dove: N_0 è il numero di cellule iniziale, N_f è il numero di cellule finale, t_{lag} è la durata della fase lag, μ_{max} è la velocità specifica di crescita massima e t_m è il tempo medio di generazione.

La *shelf life* per la CMT è stata definita con il limite finale di accettabilità di 7 log₁₀ UFC/g (Rukchon et al., 2014). La *shelf life* ottenuta varia completamente da circa 5 giorni per i campioni senza miopatie ad 8.2 giorni per i campioni con WB, quest'ultimi caratterizzati da una lag fase lunga e una velocità di crescita minore, rispetto agli altri gruppi, favorendo così l'allungamento del tempo di conservazione. Il valore della *shelf life* nei petti di pollo N, l'unico gruppo confrontabile con la bibliografia, è di poco superiore ai valori riportati da Rukchon et al. (2014) per i petti di pollo conservati a 4°C.

Per i parametri della crescita di *Pseudomonas* spp. nei petti di broiler si può far riferimento alla Tabella 4.1.2.5.

Predicted Parameters	Unit	N	WS	WB
Initial value	log ₁₀ cfu/g	3.0±0.297	2.43±0.23	2.69±0.19
Lag/shoulder	h	27.4±13.3	60.9 ± 12.4	77.4 ± 6.9
Maximum Rate	log ₁₀ cfu/g/h	0.046 ± 0.008	0.067 ± 0.015	0.066 ± 0.009
Final Value	log ₁₀ cfu/g	8.25 ± 0.2	7.72 ± 0.19	7.59 ± 0.18
Shelf life	H (days)	120.28 (5.0)	134.92 (5.6)	147.72 (6.1)
Goodness of fit				
R²		0.92	0.94	0.94
SE fit		0.64	0.61	0.55

Tabella 4.1.2.5 Parametri di crescita di *Pseudomonas* stimati con il modello di Baranyi and Roberts.

La carica iniziale dei tre gruppi di tesi varia di circa 0.5 log₁₀ UFC/g, con una carica maggiore per i campioni privi di miopatie, causando uno scadimento del prodotto più veloce. Un andamento simile lo si trova per le fasi di latenza e il Maximum Rate, caratterizzati da valori più bassi per i campioni N, medio alti per i campioni con WS e alti per quelli con WB; tale andamento è visibile nel Grafico 4.1.2.4.

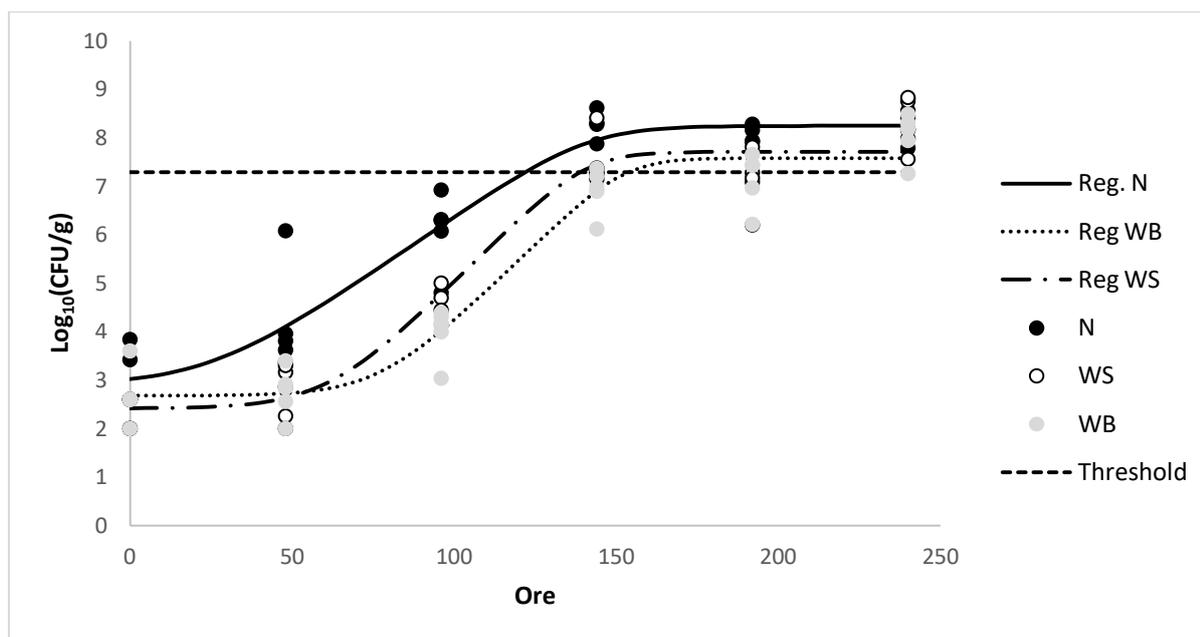


Grafico 4.1.2.4 Comportamento crescita *Pseudomonas* nei petti di pollo

La *shelf life* calcolata, corrispondente al tempo per raggiungere il limite di accettabilità di 7.3 log₁₀ UFC/g (Raab et al., 2008), è di 5 giorni per il campioni N, 5,6 per WS e infine 6 giorni per i petti con WB.

La *shelf life* calcolata dei campioni N è confrontata con quanto riportato da Raab et al. (2008), utilizzando appunto la crescita di *Pseudomonas* come indicatore, con un valore di 94.55 ore, riportando una differenza di un giorno rispetto ai dati ottenuti da questo lavoro (120.28 ore).

La crescita di *Pseudomonas* continua durante il periodo di conservazione, confermando che il genere *Pseudomonas* è in grado di accrescersi e competere contro gli altri microrganismi, grazie a diversi fattori: ambientali (basse temperature e disponibilità di ossigeno), il pH ottimale alla crescita del petto (6-6.5), la composizione chimica della carne come aminoacidi e prodotti a basso contenuto di zuccheri semplici (Vasconcelos et al., 2014).

4.2. Shelf life sensoriale

Per calcolare lo scadimento sensoriale del prodotto, è stato utilizzato un metodo semplificato di analisi sensoriale, con un range di valutazione dei tre parametri (colore, odore e texture) compreso tra 1 e 3. La soglia limite di accettabilità, che definisce la fine della *shelf life* sensoriale, è di 1.8 punti (Raab et al., 2008).

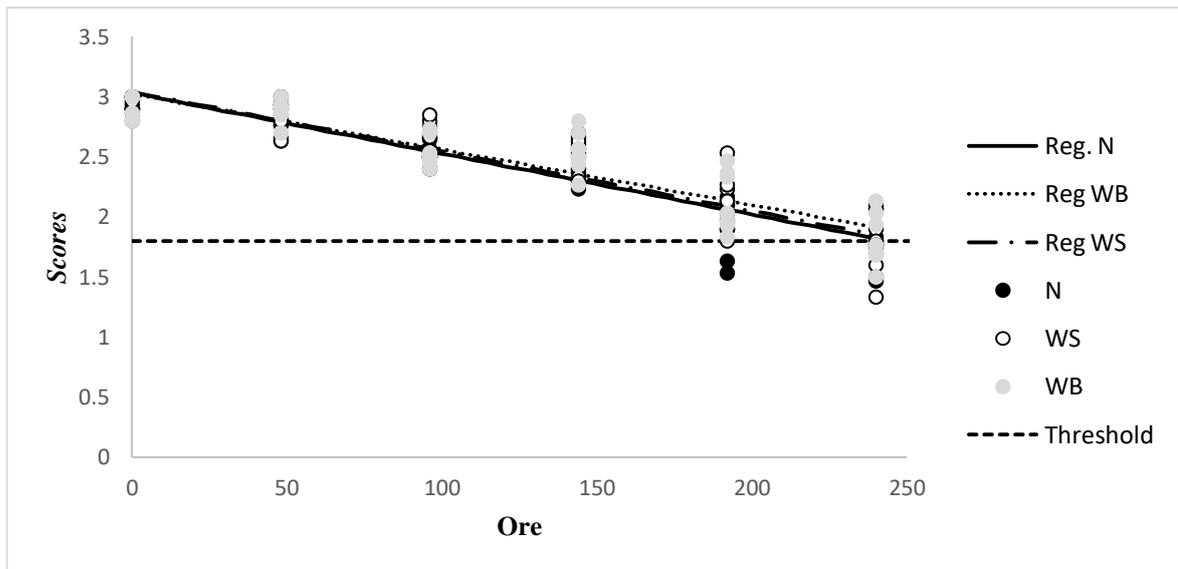


Grafico 4.2.5 Andamenti del Sensory Index nel petto di pollo

L'andamento dell'Indice Sensoriale (SI) per i tre gruppi (N, WS e WB) è molto simile, come è possibile vedere in Figura 4.2.1, 4.2.2 e nel Grafico 4.2.5.

Nel Grafico 4.2.5 sono state riportate le regressioni lineari degli indici sensoriali delle tre tesi, in funzione del tempo, necessari per calcolare il Sensory Index (SI). In questo studio, la *shelf life* è stata valutata con l'SI, definito in ore, risultando per i campioni N e WS di 240 ore e per i petti affetti da WB superiore, in quanto al termine dell'osservazione il valore dell'SI era di 1.9.

I dati di SI ottenuti in questo studio sono superiori a quelli descritti da Raab et al. (2008), calcolati con lo stessa scala di valutazione, per i campioni senza miopatie conservati a 4°C (240 vs 119,49 ore).

Dai dati ottenuti si nota una riduzione dell'accettabilità, quindi sotto il valore soglia, soprattutto negli ultimi tempi dell'analisi (T8 e T10). I punteggi più bassi sono stati assegnati all'indice dell'odore dei petti, causato probabilmente dalle elevate cariche microbiche del genere *Pseudomonas*, che dopo aver consumato il glucosio disponibile, inizia il catabolismo dei composti azotati e degli amminoacidi liberi, creando odori sgradevoli (Vasconcelos et al., 2014). Alcune valutazioni inaccettabili sono state attribuite al colore del petto e in quantità minore alla texture.

Nella Figura 4.2.3 e 4.2.4, sono rappresentati i profili finali dell'analisi sensoriale attraverso uno schema a "tela di ragno", che permette di comprendere l'andamento di tale analisi, riportando i valori medi dell'intensità dei tre descrittori su tanti assi quanti sono i descrittori presi in esame, con origine comune (Stone et al., 1974). Confrontando i tre schemi, come anticipato, le differenze sono minime, al contrario di quanto riportato da Tasoniero et al.

(2016) che hanno riscontrato una variazione significativa nell'intensità generale degli odori tra i vari gradi di lesioni da miopatie. L'unica variazione percepibile è evidenziata nella Figura 4.2.4, dove i campioni con WB mantengono valori di texture superiori a 2 punti per tutta la durata della *shelf life*, fattore riconducibile alle variazioni istopatologiche caratteristiche della miopatia, come miodegenerazioni a livello di fibre muscolari, accumulo di tessuto connettivo e di granulazione, ispessimento dell'interstizio e del tessuto perimisiale (fibrosi), oltre che ad un accumulo di grasso intramuscolare (Sihvo et al., 2014 e Soglia et al. 2016).

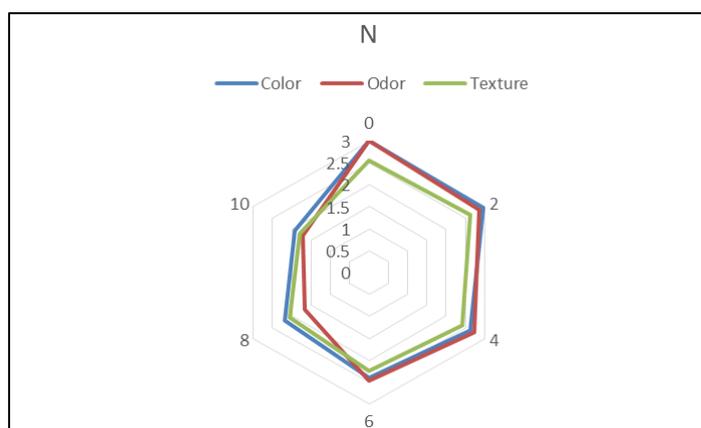


Figura 4.2.2 Comportamento del colore, dell'odore e della consistenza durante il tempo di conservazione del petto di pollo senza miopatie



Figura 4.2.3 Comportamento del colore, dell'odore e della consistenza durante il tempo di conservazione del petto di pollo con WB e WS

A conferma della riduzione dell'accettabilità del prodotto per gli ultimi due tempi (T8 e T10), dal punto di vista macroscopico, l'attribuzione dei punteggi è stata influenzata dalla presenza di *slime* e fluorescenza, visibile nei campioni analizzati anche con lampada ad UV, (Figura 4.2.3 e 4.2.4). Tali alterazioni sono causate dalla produzione di pigmenti fluorescenti, quali le

pioverdine (in particolare *Pseudomonas* spp.), oltre che alle fusione delle colonie batteriche sulla superficie del muscolo (Russell, 2001).



Figura 4.2.3 Crescita colonie fluorescenti su campione N 133 (T10)

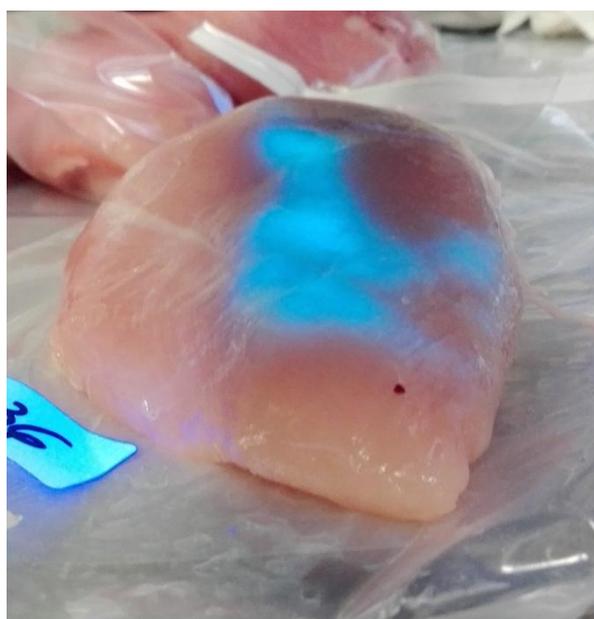


Figura 4.2.4 Crescita colonie fluorescenti su campione N 136 (T10)

4.3. Analisi biochimiche

Per ogni terreno ai tempi T0, T6 e T10 sono state selezionate ed isolate un totale di 539 colonie in base alle principali morfologie, ed una parte di queste, per la conferma fenotipica, è stata sottoposta ad analisi biochimiche: test del KOH, test dell'ossidasi, test della catalasi, test O/F (per i batteri H₂S produttori al T10) e colorazione di Gram (per i LAB al T10).

Per il tempo T0 sono stati isolati 143 ceppi, di cui 20 ceppi Gram negativi (da terreno VRBG, CFC, LYNGBY) e 16 Gram positivi (da terreno MRSA) e successivamente analizzati con i

test biochimici. Per il T6 i ceppi isolati sono 196, di cui 19 Gram negativi e 9 Gram positivi; invece per il T10 i ceppi sono 200, di cui 21 Gram negativi e 30 Gram positivi.

Le colonie tipiche dovevano possedere le seguenti caratteristiche (Tabella 4.3.6):

Microrganismo	Test KOH	Test Ossidasi	Test Catalasi	Test O/F
Enterobatteri	+	+	-	O/F
<i>Pseudomonas</i> spp.	+	+	+	O
H₂S produttori	+	+	+	O
LAB	-	-	-	

Tabella 4.3.6 Risultati test biochimici. O: metabolismo ossidativo, F: metabolismo fermentativo

Per il primo tempo e il T6, le colonie con morfologie tipiche analizzate con i test biochimici hanno riportato i risultati come in Tabella 4.3.6, eccetto gli H₂S produttori nel T0. Per il tempo T10 gli Enterobatteri e *Pseudomonas* hanno avuto i profili fenotipici richiesti, invece per degli H₂S produttori solo alcuni ceppi hanno dato i risultati biochimici tipici, confermati ulteriormente con il test dell'O/F; tra i LAB, analizzati anche con la colorazione di Gram, è stata evidenziata la presenza di alcuni lieviti con morfologia simile alle colonie batteriche tipiche.

I ceppi sottoposti ad estrazione ed amplificazione del DNA sono 101, dei quali 54 inviati per il sequenziamento; nella Tabella 4.3.6 verranno elencati i ceppi sequenziati, per i quali è stato possibile confrontare le sequenze nucleotidiche ottenute con una banca dati software online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information).

4.4. Analisi molecolare rRNA 16S

In Tabella 4.4.7 sono riportate le colonie tipiche isolate, delle quali è stata effettuata l'identificazione mediante analisi di sequenza del gene 16S. I microrganismi isolati sono stati contrassegnati mediante: numero di campione di provenienza, terreno di crescita e numero identificativo di archiviazione. Per l'analisi molecolare sono state analizzate delle colonie rappresentative per ciascun terreno, per tre tempi T0, T6 e T10.

Per il terreno VRBG sono state identificate alcune colonie di *Hafnia* e *Serratia*, in accordo a quanto riportato da Kamenik (2013); inoltre per il genere *Hafnia* è stato possibile riportare anche la specie *H. alvei*, per alcune colonie, ed invece per altre è stata riconosciuta solo l'appartenenza alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Invece per il terreno LYNGBY IRON AGAR le colonie isolate, con colorazione nera, sono ascrivibili a *Shewanella putrefaciens*, uno dei maggiori responsabili del deterioramento della carne di pollo.

Per il terreno CFC le colonie identificate appartengono tutte al genere *Pseudomonas*, e le principali specie ritrovate sono *P. fragi*, *P. psychrophila*, *P. fluorescens*, *P. constantinii* e *P. ludensis*; la maggior parte delle quali è stata riscontrata anche in altri studi come Rouger et al. (2017) e Arnaut-Rollier et al. (1999).

I batteri lattici sequenziati solo per il tempo T10, cresciuti su terreno MRSA, appartengono al genere *Lactobacillus*, con la possibilità dell'identificazione di specie come *L. fuchuensis*, *L. curvatus* e *L. sakei*, quest'ultimo contribuisce nelle carni fermentate alle proprietà sensoriali e alla creazione di aromi (Gory et al., 2001). In bibliografia (Rouger et al., 2017 e Kameník, 2013) è stato riportato solo il genere *Lactobacillus*, o la specie trovata con maggior frequenza *L. oligofermentans*.

Dalle sequenze ottenute non sempre si è potuto identificare i batteri a livello di specie, ma l'attribuzione certa è riservata al genere.

MRSA

ISOLATO			IDENTIFICAZIONE
131	MRSA	387	<i>Lactobacillus curvatus</i>
128	MRSA	393	<i>L. fuchuensis/L. curvatus</i>
133	MRSA	408	<i>L. sakei</i>
135	MRSA	415	<i>L. curvatus</i>
124	MRSA	424	<i>L. sakei</i>

VRBG

ISOLATO			IDENTIFICAZIONE
1	VRBG	2	<i>Enterobacteriaceae</i>
2	VRBG	3	<i>Serratia</i> spp.
7	VRBG	13	<i>Hafnia alvei</i>
73	VRBG	147	<i>H. alvei</i>
80	VRBG	171	<i>Hafnia</i> spp.
83	VRBG	180	<i>Enterobacteriaceae</i>
126	VRBG	355	<i>Serratia</i> spp.
129	VRBG	364	<i>Hafnia</i> spp.
131	VRBG	367	<i>Hafnia</i> spp.

IRON AGAR

ISOLATO			IDENTIFICAZIONE
123	LYNGBY	494	<i>Shewanella putrefaciens</i>
73	LYNGBY	223	<i>Shewanella</i> spp.

CFC

ISOLATO			IDENTIFICAZIONE
1	CFC	70	<i>Pseudomonas</i> spp.
1	CFC	71	<i>P. psychrophila</i>
1	CFC	72	<i>Pseudomonas</i> spp.
3	CFC	73	<i>Pseudomonas</i> spp.
4	CFC	74	<i>P. fragi/P. lundensis</i>
73	CFC	191	<i>P. fluorescens</i>
73	CFC	192	<i>P. ludensis/P. fragi</i>
74	CFC	193	<i>Pseudomonas</i> spp.
121	CFC	438	<i>P. fragi/P. psychrophila</i>
122	CFC	451	<i>P. fluorescens/P. costantinii</i>
125	CFC	458	<i>P. fragi/P. ludensis</i>

Tabella 4.4.7 Identificazione dei batteri isolati mediante analisi di sequenza del gene 16S

4.5. Ambiente e variabili fisico-chimiche

Come riportato da Raab et al. (2008) diversi sono i parametri che influenzano la crescita microbica, creando deterioramento del prodotto durante la *shelf life*, sia intrinseci che estrinseci; individuando la temperatura come il più importante.

Alcuni dati chimico-fisici, come la composizione chimica, i profili di acidi grassi e altri indici derivati adattati sequenzialmente, sono stati analizzati statisticamente attraverso il test DistLM (*Distance – based multivariate analysis for a linear model*), metodo che fornisce per ogni variabile ambientale il contributo in percentuale alla varianza e la percentuale cumulativa, osservata insieme al livello di significatività ad esso associato, rispetto ai conteggi microbici (variabilità del microbiota).

La selezione diretta dei dati è stata eseguita prima per ciascun gruppo di variabili, e successivamente rispetto alle singole caratteristiche, come è stato riportato in Tabella 4.5.8 e 4.5.9.

I dati chimico-fisici necessari per questo confronto sono stati ottenuti da un altro gruppo di lavoro del Dipartimento, in quanto partecipante ad un progetto più ampio, al quale fa parte anche questo studio, relativo all'effetto della presenza di miopatie sulla qualità e sulla *shelf life* della carne di pollo. I dati completi sono consultabili in Appendice B.

Come riportato in Tabella 4.5.8, per i gruppi di variabili, i parametri significativi ($P \leq 0,05$) sono i profili degli acidi grassi, i tratti reologici e la composizione chimica. Per le variabili individuali sono state definite significative per la crescita microbica: la forza di taglio, la percentuale di acqua, la presenza di acido miristico (C14) e il contenuto totale di proteine (CP). Altri fattori concorrono a definire la variabile microbica, ma risultano meno influenti (Tabella 4.5.9).

Nella *review* di Kamenik (2013), sono indicati come fattori intrinseci che influenzano maggiormente la crescita di batteri deterioranti: pH, attività dell'acqua, contenuto di sostanze nutritive e struttura del prodotto alimentare; i dati significativi ottenuti in questo studio convergono in parte con la *review*.

Il pH non ha un valore significativo nella conta microbica, in quanto il p-value è di 0.8311, inoltre il contributo alla variabilità microbica è pari a 0.006%.

Invece la percentuale di acqua sembra influenzare la variabilità microbica osservata ($P=0.0001$; % var = 18%). L'acqua comprende le sue diverse forme a livello muscolare: quella di "costituzione", localizzata tra le molecole proteiche e facente parte della struttura stessa delle proteine; "l'acqua di interfaccia", localizzata sulle proteine, in più strati e "l'acqua libera", legata da forze capillari, situata principalmente tra i filamenti muscolari, libera di muoversi tra le fibre (Cattaneo et al., 2003). Attraverso la percentuale di acqua non è possibile distinguere quale forma sia variata, né avere informazioni sull'attività dell'acqua a_w o sulla WHC, quest'ultima ridotta nei petti con miopatie; sono necessari ulteriori studi, correlati dalla misurazione dell' a_w , per poter definire la sua influenza sulla crescita microbica sulla superficie del petto di pollo.

Anche il contenuto di nutrienti aiuta lo sviluppo e la crescita della flora microbica, le proteine, insieme agli amminoacidi e ai peptidi, svolgono questa funzione (Jay et al.2009); la presenza delle miopatie ne abbassa il contenuto, come riportato da Kuttappan et al. (2012 a), il CP rimane un fattore significativo per la flora microbica, probabilmente sostenuta anche dagli altri componenti del muscolo, come lipidi e carboidrati.

Pure la struttura del muscolo ha effetti significativi sulla conta microbica, è stata calcolata con lo *Shear force* (sforzo di taglio) in kg/g. I petti con minor sforzo di taglio sono i campioni con WB, in quanto caratterizzati a livello istologico da miodegenerazioni delle fibre

muscolari e accumulo di tessuto connettivo e collagene (Soglia et al., 2016); tale cambiamento strutturale implica una marcata riduzione del contenuto di actina e di miosina, che sono responsabili della capacità di ritenzione idrica della carne, a favore del collagene che non lega l'acqua (Tasoniero et al., 2016). Questi fattori, così come il tipo di muscolo, le proteine fibrillari come alcuni collagene (I e III) e l'attività proteolitica, la composizione della matrice extracellulare, il comportamento e la fisiologia batterica, le condizioni ambientali come la temperatura, influiscono sull'adesione batterica al muscolo (Chagnot et al., 2017 e Maxcy, 1980). Questo potrebbe quindi spiegare le diverse dinamiche di accrescimento microbico osservate in questi differenti muscoli con o senza miopatie.

A conferma di quanto riportato da Kuttappan et al. (2012), la composizione degli acidi grassi nei petti con miopatie è variata: con una riduzione degli acidi grassi saturi (SFA) e un aumento significativo per gli acidi grassi insaturi (UFA) nei petti con WB e WS (Tabella 1 B, Appendice). Come riportato da più autori, Zheng C. J. et al. (2005) e Chang et al. (2005), la presenza di UFA a catena lunga (acido oleico, palmitoleico, arachidonico e linolenico) ha effetti significativi sulla crescita microbica, in quanto sono in grado di esercitare un'attività antibatterica contro Gram positivi e Gram negativi e un'attività battericida per importanti microrganismi patogeni, come *E. coli*; meno attivi sono invece gli SFA. Sono state condotte, inoltre, alcune prove *in vitro* a conferma dell'attività batteriostatica dell'acido linoleico, in campioni di latte conservati a 4°C, che riportavano una fase *lag* più lunga (Desbois A. P. et al., 2009), l'attività batteriostatica degli acidi grassi insaturi potrebbe in parte spiegare la *shelf life* più lunga nei petti con miopatie.

Variable	P	% Var	Cumulative %
<i>Sets of variables</i>			
Fatty acid profiles	0.0034	0.5394	0.5394
Rheological traits	0.0014	0.2023	0.7417
Proximate composition	0.0128	0.0937	0.8353
FA Indexes	0.2188	0.0411	0.8764

Tabella 4.5.4 Risultati analisi DISTLM per set di variabili

Variables	P	% Var	Cumulative %
<i>Individual variables</i>			
Shear force, kg/g	0.0001	0.5278	0.5278
Water, %	0.0001	0.1822	0.71
C14:0	0.043	0.0274	0.7374
Cooking losses, %	0.0719	0.0199	0.7573
C16:0	0.2051	0.0097	0.7671
C18:3n6	0.0589	0.0206	0.7877
C16:1n9	0.1833	0.0098	0.7975
Weight	0.1654	0.0105	0.808
C22:6n3	0.1862	0.0093	0.8173
C18:1n7	0.2449	0.0071	0.8244
EE	0.6562	0.0014	0.8258
CP	0.0155	0.0282	0.854
Ash	0.3678	0.0039	0.8579
C18:0	0.3493	0.0042	0.8621
C16:1n7	0.6307	0.0015	0.8635
C18:1n9	0.7133	0.001	0.8646
C18:2n6	0.5889	0.0018	0.8663
C20:4n6	0.4456	0.0032	0.8695
C20:5n3	0.8747	0.0004	0.8699
pH	0.8311	0.0006	0.8705

Tabella 4.5.5 Risultati analisi DISTLM per variabili singole

5. CONCLUSIONE

Il presente studio di tesi ha contribuito a fornire nuove informazioni e alcune osservazioni relativamente alla presenza di miopatie Wooden Breast e White Striping nei petti di broiler, con conseguenze significative sulle caratteristiche qualitative della carne. Gli aspetti considerati in questo lavoro sono stati la qualità microbiologica e sensoriale e la loro influenza sulla *shelf life* del prodotto.

Con l'analisi microbiologica sono state riscontrate differenze tra i petti con e senza miopatie, con risultati significativi per gli indicatori di deterioramento (CMT e *Pseudomonas*), così come per le *Enterobacteriaceae*, minori per i batteri lattici e assenti per gli H₂S produttori.

Per l'analisi sensoriale non sono state individuate differenze rilevanti tra le tre tesi (N, WS e WB), ma l'andamento dei singoli descrittori valutata con il SI ha mostrato una variazione tra i campioni con N e WS rispetto a quelli con WB (in particolare per la texture).

La valutazione della *shelf life* microbica, utilizzando come indicatori gli SSO, ha dimostrato un allungamento del tempo di conservazione in particolare per i petti con WB e WS, rispetto ai petti privi di anomalie; probabilmente riconducibile alle modificazioni istologiche e chimiche che avvengono nei campioni affetti, come l'accumulo di grasso intramuscolare (Sihvo et al., 2014; Soglia et al., 2016), l'aumento della deposizione di tessuto connettivo interstiziale (fibrosi) (Sihvo et al., 2014), l'aumento degli acidi grassi insaturi (Zheng C. J. et al., 2005) e l'elevata percentuale di umidità associata alle zone edematose, conseguenza del processo infiammatorio.

Ulteriori studi futuri, potrebbero essere condotti con prove sulla *shelf life* microbica: considerando la crescita delle singole specie per le differenti tesi, sottoponendo i campioni a temperature diverse sia fisse che dinamiche, oppure mantenendo i campioni affetti da miopatie in vari ambienti di conservazione; il tutto per creare maggior somiglianza alle condizioni di conservazione e di vendita dei petti di broiler.

APPENDICE A

Data	4 aprile 2017 (martedì)	6 aprile 2017 (giovedì)	8 aprile 2017 (sabato)	10 aprile 2017 (lunedì)	12 aprile 2017 (mercoledì)	14 aprile 2017 (venerdì)
Giorni conservazioni e	0	2	4	6	8	10
Dissezione carcasse	144 carcasse Separazione P.major dx e sx. Impacchettament o P major dx e sx nella stessa vaschetta.					
Analisi reologiche (DAFNAE, Padova) <i>P. major</i> destro	24 campioni (8 per gruppo) pH, colore, conservazione per scongellamento, cottura, tenerezza 24 campioni Acqua libera (macinato)					
Analisi chimiche (DAFNAE, Padova) <i>P.major</i> destro	24 campioni (8 per gruppo) (analisi tipo, acidogramma)			24 campioni (8 per gruppo) (analisi tipo, acidogramma)		24 campioni (8 per gruppo) (analisi tipo, acidogramma)
Shelf life (BCA, Padova) <i>P.major</i> sinistro	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB	15 campioni (5 per gruppo) Conta mesofila totale, Entorobacteriace e, <i>Pseudomonas</i> , H2S produttori, LAB
Analisi sensoriale <i>P.major</i> sinistro	24 campioni (8 per gruppo)					
Comunità microbiche <i>P.major</i> sinistro	15 campioni (5 per gruppo) Prelievo dei campioni			15 campioni (5 per gruppo) Prelievo dei campioni		15 campioni (5 per gruppo) Prelievo dei campioni

Tabella 1 A. Disegno sperimentale delle analisi condotte

APPENDICE B

Questo studio fa parte di un progetto più ampio che intende valutare l'effetto della presenza di miopatie sulla qualità della carne di pollo e sulla sua conservazione, mediante indicatori reologici, chimici, batteriologici e sensoriali. Il lavoro fino a qui considerato si basa su risultati preliminari ottenuti dal gruppo di lavoro del settore di Ispezione degli Alimenti del Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, nelle Tabelle (1B, 2B e 3B) descritte in seguito verranno riportati i risultati ottenuti da un altro gruppo di lavoro, che ha svolto le analisi chimiche e reologiche.

In Tabella 1B è stato riportato l'effetto della miopatia sulla composizione degli acidi grassi nei petti di broiler, in funzione del gruppo di lesioni e del tempo di conservazione; inoltre è stato indicato il *p-value* per ciascun parametro e la loro interazione. Effetti significativi per la presenza delle miopatie sono stati riscontrati per gli acidi grassi: C14:0, C16:0 e C18:0, con una riduzione del contenuto per i petti WB e WS; l'andamento contrario è avvenuto invece per gli acidi polinsaturi C18:2n6 e C18:3n6.

In Tabella 2B è evidenziato l'effetto della miopatia sulle caratteristiche reologiche del *Pectoralis major* nel broiler, con un significativo aumento del peso per i petti con WB, così come le perdite di cottura; inoltre i campioni con WB presentano una *Shear force* molto più bassa rispetto alle altre lesioni. Il valore del pH invece non cambia tra i gruppi.

Nella Tabella 3B, sono riportati gli effetti della miopatia sulla composizione chimica dei petti di broiler, utilizzando le stesse modalità di confronto della Tabella 1B e 2B. Tutti i gruppi sperimentali presentano un *p-value* significativo ($P < 0.001$).

	Experimental group (G)			Storage time (hours)			P-value			RSD
	Normal	Wooden breast	White striping	(H)			G	H	G x H	
				24	168	264				
Breasts,	24	24	24	24	24	24				
C14:0	0.45	0.43	0.43	0.43	0.42	0.45	0.41	<0.05	0.43	0.04
C16:0	22.8 ^b	20.4 ^a	20.4 ^a	20.9	20.9	21.7	<0.001	0.10	<0.05	1.5
C16:1n9	0.38 ^a	0.43 ^b	0.42 ^b	0.43 ^b	0.40 ^a	0.40 ^a	<0.001	<0.05	0.82	0.03
C16:1n7	3.58 ^b	3.14 ^a	3.19 ^a	3.32	3.52	3.08	<0.05	0.06	0.60	0.6
C18:0	7.48 ^b	6.59 ^a	6.63 ^a	6.72 ^a	6.38 ^a	7.60 ^b	<0.001	<0.001	0.35	0,6
C18:1n9	31.8 ^b	30.8 ^a	30.7 ^a	30.8	31.7	30.8	<0.05	0.11	0.10	1.6
C18:1n7c	1.78	1.71	1.73	1.73	1.69	1.80	0.13	<0.05	0.34	0.1
C18:2n6	25.6 ^a	29.7 ^b	29.9 ^b	29.0	28.8	27.4	<0.001	0.12	<0.05	2.8
C18:3n6	2.58 ^a	3.08 ^b	3.06 ^b	2.91	3.00	2.75	<0.001	<0.05	0.15	0.3
C20:4n6	0.69	0.79	0.72	0.77	0.61	0.83	0.34	<0.01	0.27	0.3
C20:5n3	0.07	0.08	0.06	0.07	0.07	0.08	0.27	0.20	0.99	0.03
C22:6n3	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.21	0.89	0.84	0.03
SFA	31.3 ^b	28.0 ^a	28.0 ^a	28.6 ^a	28.2 ^a	30.4 ^b	<0.001	<0.001	<0.05	1.8
UFA	68.7 ^a	72.0 ^b	72.0 ^b	71.4 ^a	71.8 ^b	69.6 ^a	<0.001	<0.001	<0.05	1.8
MUFA	38.2 ^b	36.7 ^a	36.7 ^a	36.9	37.8	36.8	<0.05	0.17	0.14	2.1
PUFA	30.5 ^a	35.4 ^b	35.3 ^b	34.4	34.0	32.8	<0.001	0.26	<0.05	3.4
SFA/UFA	0.46 ^b	0.39 ^a	0.39 ^a	0.40 ^a	0.39 ^a	0.44 ^b	<0.001	<0.001	<0.05	0.04
n3	2.89 ^a	3.39 ^b	3.34 ^b	3.26	3.28	3.08	<0.001	0.14	0.23	0.4
n6	27.4 ^a	31.7 ^b	31.7 ^b	30.9	30.4	29.5	<0.001	0.28	<0.05	3
n3/n6	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.67	0.12	0.85	0.006

Tabella 1 B. Effetti della miopatia sulla composizione degli acidi grassi nel *Pectoralis major* nei petti di broiler

	Experimental group (G)			Storage time (hours)						P-value			RSD
				(H)						G	H	G x H	
	N	WB	WS	24	72	120	168	216	264				
Breasts,	48	48	48	24	24	24	24	24	24				
Weight, g	237 ^a	312 ^c	280 ^b	277	284	272	272	270	282	<0.001	0.80	0.17	42.4
pH	6.00	6.05	6.02	6.03	6.00	6.03	6.02	6.00	6.05	0.14	0.56	0.80	0.11
Shear force, kg/g	3.74	3.39	3.80	5.08 ^c	4.15 ^b	2.83 ^a	3.39 ^a	3.50 ^a	2.94 ^a	0.12	<0.001	0.77	1.04
Cooking losses, %	22.0 ^a	26.9 ^c	23.8 ^b	24.4 ^b	23.9 ^b	22.5 ^a	21.5 ^a	26.9 ^c	26.3 ^{bc}	<0.001	<0.001	0.05	2.35
L*	46.3	46.8	46.4	48.1 ^b	45.1 ^a	46.6 ^{ab}	45.9 ^a	47.1 ^b	46.2 ^a	0.29	<0.001	0.54	1.84
a*	-0.88	-0.43	-0.41	-0.64	-0.64	-0.55	-0.57	-0.58	-0.47	<0.001	0.92	0.10	0.59
b*	7.28 ^a	7.79	7.77	8.28 ^b	7.64 ^{ab}	7.41 ^{ab}	6.98 ^a	7.41 ^{ab}	7.95 ^{ab}	0.11	0.02	0.89	1.83
C	7.38	7.86	7.85	8.40 ^b	7.72 ^{ab}	7.46 ^{ab}	7.04 ^a	7.54 ^{ab}	8.01 ^{ab}	0.13	0.01	0.89	1.32
H	97.9 ^b	94.2 ^a	94.3 ^a	96.5	95.6	94.6	95.3	96.4	94.4	<0.001	0.58	0.25	4.95

Tabella 2 B. Effetti della miopatia sulle caratteristiche reologiche nel *Pectoralis major* nei petti di broiler

	Experimental group (G)			Storage time (hours)			P-value			RSD
				(H)			G	H	G x H	
	Normal	Wooden breast	White striping	24	168	264				
Breasts,	24	24	24	24	24	24				
Water, %	73.4 ^a	75.0 ^b	73.6 ^a	74.8 ^b	73.8 ^b	73.4 ^a	<0.001	<0.001	<0.05	1.12
Crude protein, %	23.9 ^b	21.4 ^a	23.2 ^b	22.2 ^a	22.6 ^a	23.6 ^b	<0.001	<0.001	0.22	1.12
Ether extract, %	1.09 ^a	1.88 ^b	1.48 ^{ab}	1.22 ^a	1.94 ^b	1.29 ^a	<0.001	<0.001	0.49	0.63
Ash, %	1.20 ^b	1.14 ^a	1.20 ^b	1.17 ^a	1.16 ^a	1.21 ^b	<0.001	<0.001	0.18	0.05

Tabella 3 B. Effetti della miopatia sulla composizione chimica nel *Pectoralis major* nei petti di broiler

Bibliografia

- Allen C. D., Fletcher D. L., Northcutt J. K. e Russell S. M., 1998. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. *Poultry Science* 77: 361-366
- Allen, C. D., Russell, S. M., and Fletcher, D. L., 1997. The relationship of broiler breast meat color and pH to shelf-life and odor development, *Poultry Science* 76: 10-42
- Anderson, M. J., Ellingsen, K. E., McArdle, B. H., 2006. Multivariate dispersion as measure of beta diversity. *Ecology letters* 9: 683-693
- Arnaut-Rollier I., De Zutter L. and Van Hoof J., 1999. Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal Of Food Microbiology*. 48(2): 87-96
- Barbut S., Sosnicki A. A., Lonergan S. M., Knapp T., Ciobanu D. C., Gatcliffe L. J. e Huff-Lonergan E., 2008. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, ed. Elsevier, 79 (1): 46-63
- Cattaneo, P., Stella, S. and Cozzi, M., 2003. Variations in water holding capacity of bullock meat in relation to provenance. *Large Animals* 9 (6): 7-13
- Chagnot C., Venien A., Renier1 S., Caccia N., Talon R., Astruc T. e Desvaux1 M., 2017. Colonisation of Meat by *Escherichia coli* O157:H7: Investigating Bacterial Tropism with Respect to the Different Types of Skeletal Muscles, Subtypes of Myofibres, and Postmortem Time. *Front. Microbiol.* 8 (1366): 1-9
- Dehaut A., Midelet-Bourdin G., Brisabois A. e Duflos G., 2014. Phenotypic and genotypic characterization of H₂S-positive and H₂S-negative strains of *Shewanella baltica* isolated from spoiled whiting. *Letters in Applied Microbiology* 59: 542-548
- Del Zotto Elisa (2016). “Indagine morfologica sulle miopatie del pollo da carne”. Università degli Studi di Padova, Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

- Desbois A. P. e Smith V. J., 2009. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1629–1642
- Erdtsieck, B. 1989. Quality requirements in the modern poultry industry. *Processing of Poultry* (G. C. Mead, ed.): 1-30
- Fasolato L., Carraro L., Facco P., Cardazzo B., Balzan B., Taticchi A., Andreani N. A., Montemurro F., Martino M. E., Di Lecce G., Toschi T. G. e Novelli E., 2016. Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh pork sausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water. *International Journal of Food Microbiology* 228: 34–43
- Ferro Carlos Villavicencio (2015). “Caratteristiche qualitative delle carni di petto di pollo anomale”. Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Campus di Cesena, Laurea magistrale in scienze e tecnologie alimentari
- Gamón Ubeda Paola Angélica (2016). “Caratterizzazione qualitativa di petti di pollo con anomalie White Striping e di destrutturazione”. Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Campus di Cesena, Laurea magistrale in scienze e tecnologie alimentari
- Gardini F. e Parente E., 2013. *Manuale di microbiologia predittiva. Concetti e strumenti per l'ecologia microbica quantitativa*. Ed. Springer-Verlag Italia
- Giménez A., Ares F. e Ares G., 2012. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Review. Food Research International*, ed. Elsevier, 49:311-325
- Gory L., Montel M. C. e Zagorec M, 2001. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiology Letters*, 194 (2): 127–133

- Imm B.- Y., Lee J. H. e Lee H. S., 2011. Sensory quality index (SQI) for commercial food products. *Food Quality and Preference*, ed. Elsevier, 22 (8): 748–752
- Jay J. M., Loessner M. J. e Golden D. A., 2009. *Microbiologia degli alimenti*, a cura di Pulvirenti A. Milano: Springer-Verlag Italia S.r.l.
- Kameník J., 2013. The microbiology of meat spoilage: a review.
- Kuttappan V. A., Brewer V. B., Apple J. K., Waldroup P. W. and Owens C. M., 2012. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science* 91: 2677–2685
- Kuttappan V. A., Lee Y.S., Erf G. F., Meullenet J. F. C., McKee S. R. e Owens C. M., 2012a. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degree of white striping. *Poultry Science* 91 (5): 1240-1247
- Kuttappan V. A., Brewer V. B., Mauromoustakos A., McKee S. R., Emmert J. L., 2013. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science* 92 (3): 811-819
- Lando Luca (2015). “Utilizzo di composti fenolici derivati dalla molitura delle olive nell'alimentazione del broiler”. Università degli Studi di Padova, Laurea magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione
- Lee J.-Y., Kim Y.-S. e Shin D.-H., 2002. Antimicrobial Synergistic Effect of Linolenic Acid and Monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2193-2199
- Lovrekovich L., Lovrekovich H. e Jenkins D.C., 1972. Use of ultraviolet light in the typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains by pyocin production. *Journal of Clinical Pathology* 25 (1): 94-95
- Maxcy R.B., 1980. Surface Microenvironment and Penetration of Bacteria into Meat. *Journal of Food Protection*, 44 (7): 550-5521

- Mazzoni M., Petracci M., Meluzzi A., Cavani C., Clavenzani P. e Sirri F., 2015. Relationship between *Pectoralis major* muscle histology and quality traits of chicken meat. *Poultry Science* 94 (1): 123–130
- McKee L., 2012. Microbiological and Sensory Properties of Fresh and Frozen Poultry. In *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, second edition, ed. L. M. L. Nollet, 737-389. Iowa (USA): Blackwell Publishing
- McKee L., Cobb E. e Padilla S., 2012. Quality Indicators in Poultry Products. In *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, second edition, ed. L. M. L. Nollet, 390-409. Iowa (USA): Blackwell Publishing
- *Microbiology Manual*, 5th Edition, 2011. Spagna: ed. Laboratorios Conda, S. A.
- Pérez-Chabela M. de L., 2012. *Shelf life* of Fresh and Frozen Poultry. In *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*, second edition, ed. L. M. L. Nollet, 410-422. Iowa (USA): Blackwell Publishing
- Petracci M., Bianchi M. e Cavani C., 2009. The European perspective on pale, soft, exudative conditions in poultry. *Poultry Science* 88 (7): 1518–1523
- Petracci M., Mudalal S., Bonfiglio A. e Cavani C., 2013. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poultry Science* 92(6): 1670–1675
- Petracci M., Mudalal S., e C. Cavani. 2014. Meat quality in fastgrowing broiler chickens. *Proc. XIVth European Poultry Conference*, Stavanger, Norway, 221–233.
- Petracci M., Mudalal S., Babini E. e Cavani C., 2014a. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Ital. J. Anim. Sci.* 13:179–182

- Petracchi M., Mudalal S., Soglia F., e Cavani C., 2015. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *World's Poultry Science Journal* 71: 363-371
- Piccoli Stefania (2012). Polifenoli estratti dalle acque di vegetazione dei frantoi: effetti sulla shelf-life di salsicce e studi in vitro. Università degli Studi di Padova, Laurea magistrale interfacoltà in Biotecnologie per l'Alimentazione
- Pirola Santos Mantilla S., Barbosa Santos E., Queiroz de Freitas M., Carvalho Vital H., Borges Mano S. e Maia Franco R., 2012. Refrigerated poultry breast fillets packed in modified atmosphere and irradiated: bacteriological evaluation, *shelf life* and sensory acceptance. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1385-1392
- Raab V., Bruckner S., Beierle E., Kampmann Y., Petersen B. and Kreyenschmidt J., 2008. Generic model for the prediction of remaining *shelf life* in support of cold chain management in pork and poultry supply chains. *Journal on Chain and Network Science* 8: 59-73
- Rouger A., Tresse O. e Zagorec M., 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. Review. *Microorganisms*, MDPI Journal, 50 (5): 1-16
- Rukchon C., Nopwinyuwong A., Trevanich S., Jinkarn T. e Suppakul P., 2014. Development of a food spoilage indicator for monitoring freshness of skinless chicken breast. *Talanta*, ed. Elsevier, 130: 547-554
- Russell S. M., 2001. Spoilage bacteria associated with poultry. In *Poultry Meat Processing*, ed. A. R. Sams, 10: 159-175. Florida: CRC Press LLC
- Saif Y.M., 2008. *Disease of poultry*, 12th edition. USA: Blackwell Publishing Professional
- Sanchez Brambila G., Bowker B. C. e Zhuang H., 2016. Comparison of sensory texture attributes of broiler breast fillets with different degrees of white striping. *Poultry Science* 95 (10): 2472–2476

- Schmitt, R. E. e Schmidt-Lorenz W., 1992. Degradation of amino acids and protein changes during microbial spoilage of chilled unpacked and packed chicken carcasses, *Lebensmittel, Wissenschaft e Technologie A.*, 25 (1): 11-20
- Sihvo H. K., Immonen K. e Puolanne E., 2014. Myodegeneration With Fibrosis and Regeneration in the Pectoralis Major Muscle of broilers. *Veterinary Pathology* 51(3): 619-623
- Soglia F., Mudalal S., Babini E., Di Nunzio M., Mazzoni M., Sirri F., Cavani C. e Petracci M., 2016. Histology, composition, and quality traits of chicken *Pectoralis major* muscle affected by wooden breast abnormality. *Poultry Science* 95 (3): 651–659
- Stone H., Sidel J. L., Oliver S., Woolsey A., Singleton R.C., 1974. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, 28: 24-34
- Tasoniero G., Cullere M., Cecchinato M., Puolanne E. e Dalle Zotte A., 2016. Technological quality, mineral profile, and sensory attributes of broiler chicken breasts affected by White Striping and Wooden Breast myopathies. *Poultry Science*, 95 (11): 2707–2714
- Tijare V. V., Yang F. L., Kuttappan V. A., Alvarado C. Z., Coon C. N., Owens C. M., 2016. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. *Poultry Science* 95 (9): 2167–2173
- Tuncer B. e Sireli U. T., 2008. Microbial Growth on broiler Carcasses Stored at Different Temperatures After Air- or Water-Chilling. *Poultry Science*, 87 (4): 793–799
- Vasconcelos H., Saraiva C., e Almeida J. M. M. M. (2014). Evaluation of the Spoilage of Raw Chicken Breast Fillets Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Tandem with Chemometrics. *Food Bioprocess Technol* 7: 2330-2341
- Wang G.-y., Wang H.-h., Han Y.-w., Xing T., Ye K.-p., Xu X.-l. e Zhou G.-h., 2016. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken *in vitro* and *in situ*. *Food Microbiology*, ed. Elsevier, 63: 139-146

- Wang L.-L. e. Johnson E. A., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, 624-629
- Zheng C. J., Yoo J.-S., Lee T.-G., Cho H.-Y., Kim Y.-H. e Kim W.-G., 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids, *FEBS Letters*, 579: 5157–5162

Sitografia

- Consiglio Nazionale delle Ricerche. <http://www.gustosalutequalita.it/>
- Northcutt J. K., 2009. Factors Affecting Poultry Meat Quality. <https://athenaeum.libs.uga.edu/>
- The Poultry Site. <http://www.thepoultrysite.com/>

