



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**FROLLATURA DELLA CARNE:  
INNOVAZIONE DI PROCESSO CON USO DI  
PROTEASI ESOGENE VEGETALI**

*MEAT RIPENING: PROCESS INNOVATION USING  
EXOGENOUS PLANT PROTEASES*

TIPO TESI: Compilativa

Studente:  
LEONARDO MAZZARINI  
Matricola: 1100982

Relatore:  
PROF. MARINA PASQUINI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

*Ai miei genitori, alla mia ragazza  
e agli amici che hanno sempre  
creduto in me, specialmente nei  
momenti in cui ho dubitato di me  
stesso. Se sono riuscito a raggiungere  
questo importante traguardo, è solo  
grazie a voi.*

# INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 La struttura del muscolo e la sua organizzazione	pag. 1
1.2 L'innervazione muscolare e la contrazione	pag. 8
1.3 Muscolo in <i>post-mortem</i>	pag. 11
1.4 Metodi di frollatura	pag. 16
CAPITOLO 2. INNOVAZIONE DI PROCESSO: l'uso di proteasi vegetali esogene	pag. 21
2.1 Classificazione e struttura chimica delle proteasi vegetali esogene	pag. 21
2.2 Il processo di estrazione degli enzimi vegetali	pag. 27
CAPITOLO 3. SCOPO DEL LAVORO DI TESI	pag. 30
CAPITOLO 4. ANALISI DEI CONTRIBUTI SCIENTIFICI	pag. 31
4.1 Articolo n. 1: <i>Optimization of the effect of pineapple by-products enhanced in bromelain by hydrostatic pressure on the texture and overall quality of Silverside beef cut</i>	pag. 31
4.2 Articolo n. 2: <i>Improving tenderness and quality of M. biceps femoris from older cows through concentrate feeding, zingibain protease and sous vide cooking</i>	pag. 47
CAPITOLO 5. CONCLUSIONI	pag. 61
CAPITOLO 6. BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA	pag. 63
RINGRAZIAMENTI	pag. 68

# CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La struttura del muscolo e la sua organizzazione

Il muscolo è l'organo attivo della funzione motoria degli animali e compone il 40% circa della massa corporea dell'animale adulto. È costituito da tessuto muscolare specializzato nella contrazione. Il tessuto muscolare viene classificato in:

- Muscolo scheletrico
- Muscolo liscio
- Muscolo cardiaco

I muscoli scheletrici permettono il movimento e consentono di compiere un lavoro sotto il controllo nervoso volontario, mentre la muscolatura liscia costituisce principalmente la parete di organi interni ed è responsabile di movimenti involontari come la progressione dell'alimento lungo il tratto digestivo, mentre, il muscolo cardiaco è responsabile della contrazione del cuore e, conseguentemente, del flusso del sangue nei vasi sanguigni.

La muscolatura scheletrica in generale comprende un gran numero di muscoli, ognuno composto da diversi tipi di tessuto. Un muscolo scheletrico è formato principalmente da cellule muscolari, ma contiene anche tessuto connettivo, vasi sanguigni e nervi. Le cellule muscolari sono cellule giganti, derivate dalla fusione di cellule muscolari embrionali (mioblasti) e che, alla maturazione, contengono molti nuclei; il loro diametro potrà variare da 0,01 a 0,1 mm e dopo la nascita lo sviluppo di nuove fibre muscolari è solitamente limitato (Figura 1).

L'unità fondamentale del muscolo è la fibrocellula, chiamata anche fibra muscolare o miocita. Ogni fibra muscolare è avvolta da un sottile strato di tessuto connettivo (endomysio) in cui le fibre collagene si collegano al citoscheletro mediante catene proteiche. Più fibre formano gruppi di fibre muscolari anch'esse circondate da uno strato di tessuto connettivo (perimisio); più gruppi di fibre, ciascuno avvolto dal proprio tessuto connettivo, formano il muscolo a sua volta avvolto da una guaina connettivale esterna (epimisio) (Sjaastad et al., 2010).

Il tessuto connettivo è costituito da tre componenti principali: le fibre elastiche e collagene, sostanza fondamentale e cellule. Si può suddividere in: tessuto connettivo propriamente detto e tessuto connettivo specializzato.

Il tessuto connettivo propriamente detto è costituito da tessuto connettivo lasso, che comprende tessuto adiposo e reticolare, e tessuto connettivo denso, che può essere

suddiviso in regolare e irregolare. Il tessuto adiposo presente nel muscolo costituisce il 2,5% del peso totale, i cui componenti principali sono i fosfolipidi, glicolipidi e componenti insaponificabili come il colesterolo (Lawrie e Ledward, 2006). Il tessuto connettivo denso costituisce invece il 2% del peso totale del muscolo (Lawrie e Ledward, 2006); forma strutture come tendini e legamenti, essendo caratterizzato da fibre collagene disposte parallelamente tra loro ed in modo ordinato, garantendo così resistenza. Il tessuto connettivo specializzato, invece, è un tipo di connettivo che per le sue particolari funzioni assume caratteristiche istologiche tali da distinguerlo chiaramente dagli altri tessuti connettivi. Sono classificati come connettivi specializzati i seguenti tessuti: adiposo, cartilagineo, osseo, linfoide, sangue; tra questi il tessuto cartilagineo ed il tessuto osseo sono definiti tessuti connettivi di sostegno ([https://istologia.unige.it/tessuto\\_connettivo](https://istologia.unige.it/tessuto_connettivo)).

Oltre al tessuto connettivo, le fibrocellule rappresentano la componente fondamentale del muscolo. Al suo interno la fibrocellula contiene il citoplasma, detto sarcoplasma, contenente molti nuclei ed occupato prevalentemente dalle miofibrille, elementi proteici contrattili sottili, con diametro di 1-2  $\mu\text{m}$ , che si estendono per tutta la lunghezza della fibra.

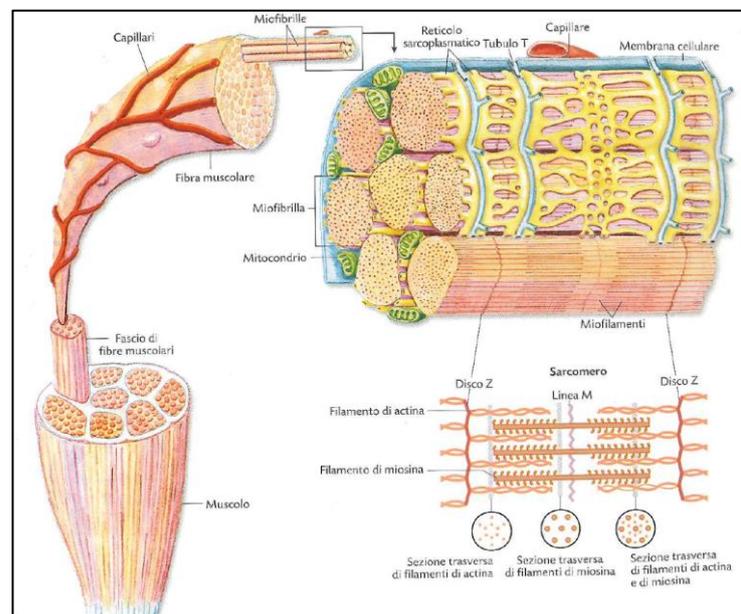


Figura 1: La struttura del muscolo scheletrico (Sjaastad et al., 2010).

La cellula muscolare (fibrocellula) è ricca di organuli sarcoplasmatici (Figura 2), tra cui voluminosi mitocondri, disposti parallelamente alle miofibrille contrattili, e deputati alla produzione di energia (ATP) necessaria per la contrazione muscolare. Sono inoltre presenti

granuli sparsi di glicogeno e gocce lipidiche (entrambi substrati energetici di riserva) e mioglobina (deputata al trasporto e immagazzinamento di ossigeno).

Un'altra struttura fondamentale delle cellule muscolari è il reticolo sarcoplasmatico, forma specializzata del reticolo endoplasmatico liscio, con una organizzazione di canalicoli a rete che avvolgono a manicotto ogni fibra muscolare, penetrando fino negli spazi interni tra una miofibrilla e l'altra. È organizzato in molti canalicoli longitudinali (in cui si accumulano ioni  $Ca^{++}$ ) che, anastomizzandosi tra loro, confluiscono nelle cisterne terminali, strutture tubulari ampie che concentrano e sequestrano  $Ca^{++}$ , per poi liberarlo al sopraggiungere di uno stimolo adeguato. Completano il reticolo sarcoplasmatico dei tubuli trasversi (o sistema dei tubuli T) che sono invaginazioni del sarcolemma (membrana cellulare), perpendicolari rispetto all'asse delle miofibrille, per portare segnali elettrochimici nelle parti più interne della cellula muscolare. Ogni tubulo trasverso e le due cisterne terminali che lo affiancano costituiscono la triade.

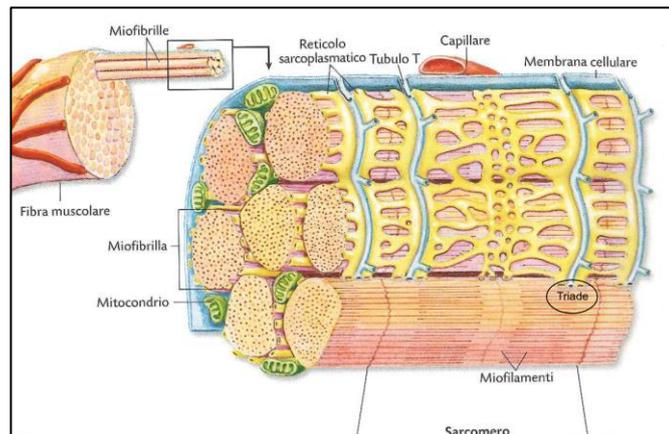


Figura 2: Sezione interna di una fibra muscolare con dettagli sugli organuli sarcoplasmatici (rielaborata da: Sjaastad et al., 2010).

Il complesso formato da reticolo sarcoplasmatico e tubuli trasversi T ha la funzione di attivare i muscoli scheletrici, quando questi sono stimolati dal motoneurone. Questo processo avviene con la massima velocità e il minimo dispendio di energia.

Le miofibrille, disposte longitudinalmente nel sarcoplasma delle cellule muscolari, sono le unità contrattili filamentose, costituite prevalentemente da due tipi di miofilamenti: spessi e sottili, composti dalle proteine miosina e actina, rispettivamente. I miofilamenti hanno un'organizzazione che si ripete in modo ordinato lungo la miofibrilla e sono costituite da unità chiamate sarcomeri, che si allineano in modo ordinato a determinare la caratteristica striatura muscolare (Sjaastad et al., 2010).

La tipica striatura della muscolatura scheletrica è dovuta alla presenza di bande o dischi e linee trasversali che si ripetono periodicamente in ogni sarcomero. Esaminando una sezione longitudinale delle miofibrille al microscopio a luce polarizzata possiamo osservare infatti l'alternarsi regolare di:

- bande chiare "I" (da isotrope), composte da filamenti sottili di actina,
- bande scure "A" (da anisotrope), composte da filamenti spessi di miosina.

Come evidenziato dalla Figura 3, il sarcomero è compreso entro 2 bande "I" che presentano al centro la linea scura "Z", la banda "A", posizionata tra 2 bande I, invece presenta al centro una banda più chiara detta "H" che è a sua volta divisa in due dalla linea "M". La porzione di fibra compresa tra due strie Z è il sarcomero, la cui lunghezza varia da 1,6  $\mu\text{m}$  nella massima contrazione a 3,6  $\mu\text{m}$  nella massima distensione.

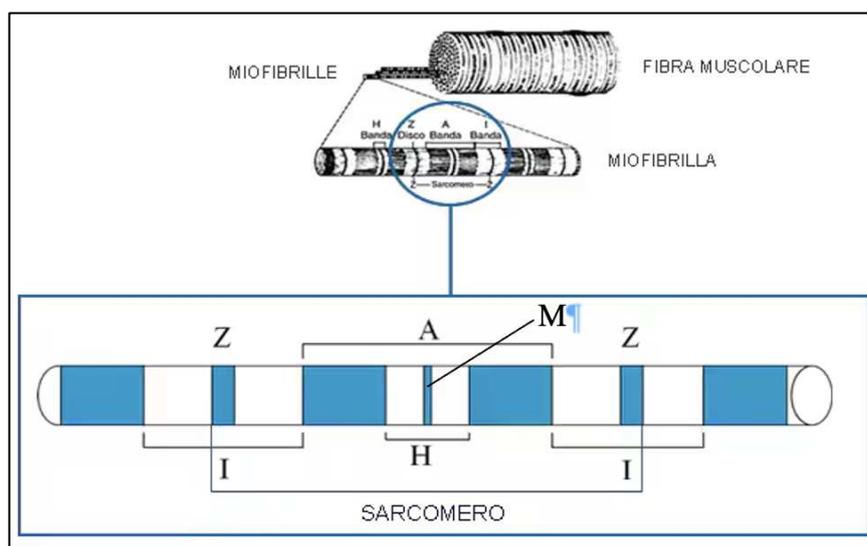


Figura 3: Organizzazione della miofibrilla in sarcomeri (modificato da: [www.my-personaltrainer.it](http://www.my-personaltrainer.it)).

Ogni fibra muscolare è composta da numerose miofibrille, che a loro volta sono formate da miofilamenti di due tipi:

- filamenti spessi di miosina (diametro di 15-50 nm = 0,015-0,05 mm),
- filamenti sottili di actina (diametro di 5-7 nm = 0,005-0,007 mm), tropomiosina e troponina.

La miosina ha la forma di bastoncino con estremità globosa, costituisce le miofibrille più spesse, è una proteina di peso molecolare di 500.000 Dalton e con una lunghezza di circa 1400-1500 Å. È composta da due catene pesanti (PM 200.000 Dalton), che si avvolgono a spirale l'una sull'altra formando una coda allungata, un collo flessibile e due

teste, e da quattro catene leggere (PM di 20.000, 16.000, 17.000 e 17.000 Dalton). Le catene pesanti sono formate da una testa globulare (meromiosina pesante o H) e una coda bastoncellare (meromiosina leggera o L), avvolte ad  $\alpha$ -elica, le quali formeranno il corpo allungato della miosina (Figura 4).

Le molecole di miosina sono orientate in modo tale che le teste siano sempre rivolte verso la banda Z del sarcomero. Grazie alla proteina titina, i filamenti di miosina sono centrati tra due bande Z, essendo ancorati ad un'estremità sulla linea M e all'altra estremità ad una banda Z (Sjaastad et al., 2010).

Come si può notare nella Figura 4 sulle protrusioni della testa della miosina sono presenti 2 siti di legame, uno con funzioni catalitiche che lega l'ATP, detto sito ATPasico miosinico, ed uno motorio che lega l'actina e che provoca il movimento di scivolamento dei filamenti.

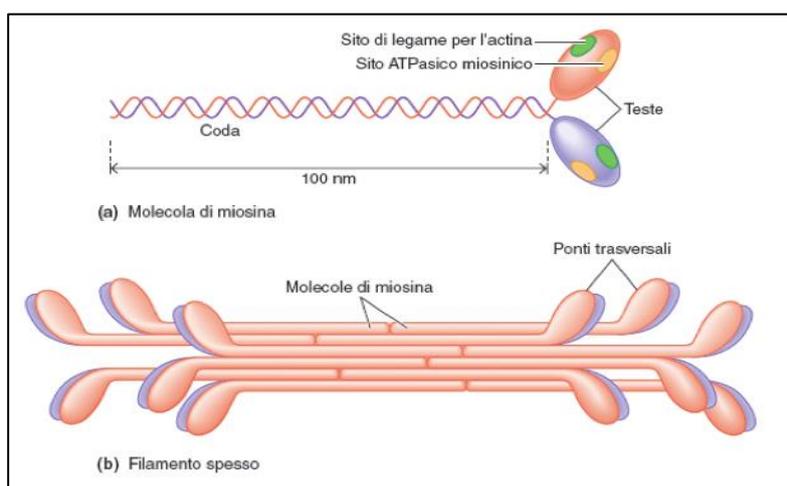


Figura 4: Struttura e organizzazione della miosina (www.chimica-online.it).

I filamenti sottili delle miofibrille sono costituiti da molecole globulari di actina, avvolte a spirale in una doppia elica, essenziali per la contrazione muscolare. Nelle fibre muscolari scheletriche, questi filamenti si formano per aggregazione delle molecole di actina attorno alla nebulina, una proteina rigida del citoscheletro, che assicura che tutti i filamenti abbiano la stessa lunghezza (1,05  $\mu\text{m}$ ).

Nella struttura dell'actina sono accolte delle proteine regolatrici, come la tropomiosina, proteina filamentosa posta intorno e negli interspazi nella doppia elica, e la troponina, proteina globulare posta lungo l'actina ad intervalli di circa 400  $\text{Å}$  (Figura 5) (Sjaastad et al., 2010).

Ogni sarcomero contiene due serie di filamenti di actina, un'estremità dei quali è ancorata al disco Z. Quando il muscolo è rilassato, i due filamenti di actina non si sovrappongono. I filamenti di miosina si dispongono con la parte centrale al centro del sarcomero, mentre le estremità si sovrappongono ai filamenti di actina. Le parti centrali dei filamenti di miosina sono connessi tra loro dalla linea trasversale M.

Nelle regioni del sarcomero in cui si ha la sovrapposizione dei filamenti di actina e miosina, ovvero alle estremità delle bande A, ogni filamento di miosina è circondato da sei filamenti di actina, ognuno dei quali è circondato da tre filamenti di miosina (Sjaastad et al., 2010).

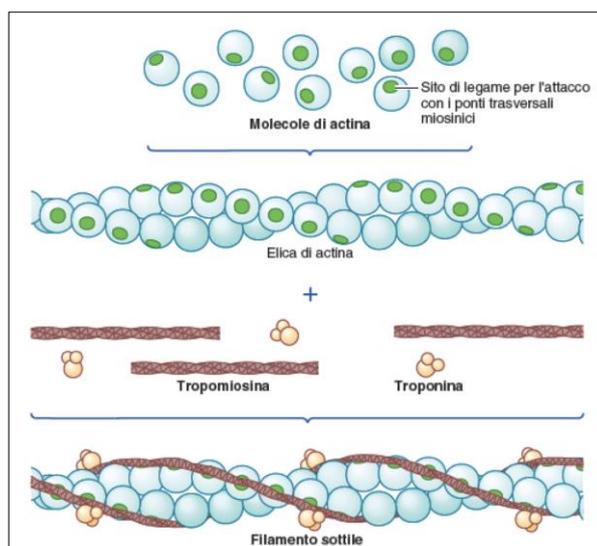


Figura 5: Struttura della molecola di actina  
(da <https://www.medicinadiprecisione.unicampania.it/attachments/category/71/Muscolo%20scheletrico%20e%20contrazione%20muscolare.pdf>).

Nella Figura 6 la molecola di actina presenta i siti di legame per i ponti trasversi con la miosina occupati dalle molecole di tropomiosina (a); quando invece si è in presenza di calcio questo si lega alla troponina e la modificazione conformazionale che questa subisce determina lo spostamento della tropomiosina e la liberazione dei siti di legame per le teste della miosina (b). La concentrazione di calcio nel sarcoplasma è quindi un fattore che condiziona fortemente il meccanismo della contrazione muscolare.

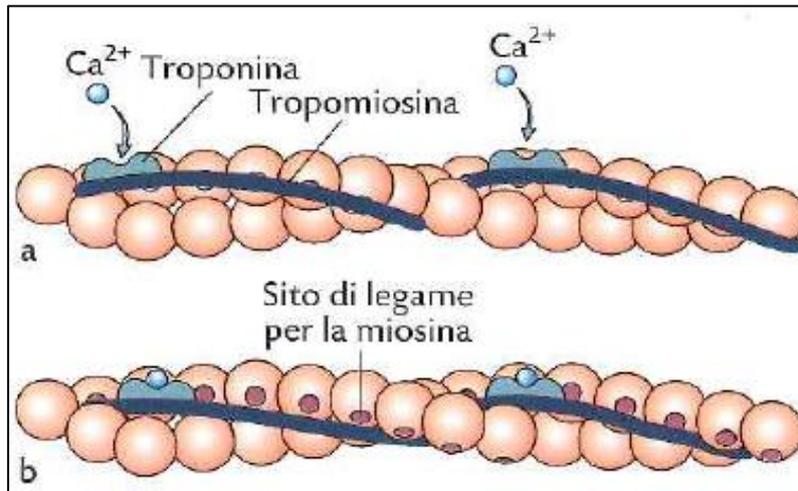


Figura 6: Ruolo del calcio nel liberare i siti dell'actina per l'aggancio della miosina (Sjaastad et al., 2010).

Quando i siti dell'actina per l'aggancio della miosina sono liberi ed il sito ATPasico della miosina, grazie all'attività adenosintrifosfatase calcio e magnesio dipendente, scinde l'ATP in ADP ed un gruppo fosfato, l'energia che si rende disponibile permette l'aggancio tra i due filamenti e, attraverso i ponti trasversi che si generano, si crea il complesso acto-miosinico nel momento della contrazione (Figura 7).

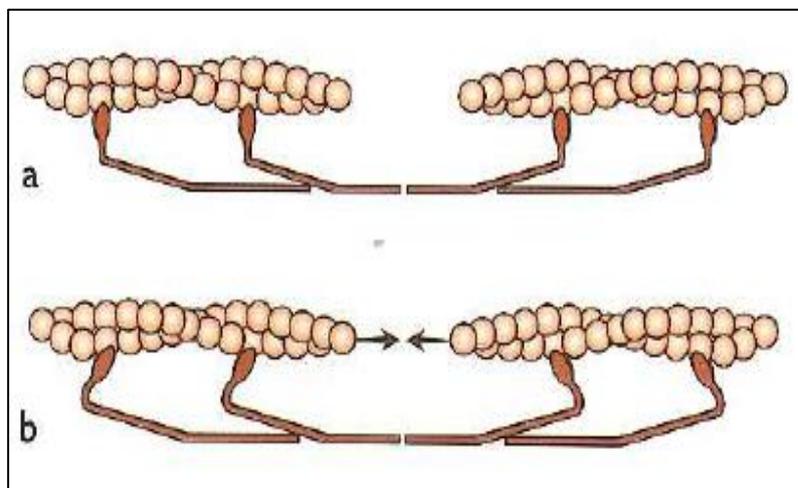


Figura 7: Complesso acto-miosinico: teste della miosina legate all'actina (a) e successiva flessione delle teste della miosina con scivolamento e avvicinamento dei filamenti di actina (b) (Sjaastad et al., 2010).

Il meccanismo di base della contrazione muscolare, in tutti i tipi di muscolo, si basa sul fatto che sui monomeri di actina (filamenti sottili delle miofibrille) sono presenti dei siti di legame per le teste della miosina, che in seguito a modificazione dell'angolo tra la coda e

le teste (flessione), causano la trazione sui filamenti di actina provocando così accorciamento del sarcomero e quindi la contrazione del muscolare.

I complessi che si formano tra i filamenti di actina e quelli di miosina vengono chiamati ponti trasversali. Tali ponti trasversali durante una rapida contrazione si formano e distaccano circa 5 volte al secondo ed ogni volta che si forma il legame le teste della miosina si flettono facendo scorrere i filamenti sottili actinici e quelli spessi miosinici gli uni sugli altri per circa 10 nm determinando l'accorciamento attivo di ogni sarcomero.

## 1.2 L'innervazione muscolare e la contrazione

Il sistema di conduzione dello stimolo per la contrazione del muscolo è dovuto alla presenza della porzione terminale dell'assone di una fibra nervosa (motoneurone) che contrae rapporti con una fibra muscolare scheletrica. Il punto di contatto in aree specifiche rappresenta la placca motrice ed è la sinapsi periferica che si stabilisce tra la terminazione di un motoneurone e una fibra muscolare originando una unità motrice (Figura 8).

Tale sede consente il passaggio dello stimolo della contrazione nel bottone sinaptico, che nelle sinapsi chimiche è costituito da una porzione pre-sinaptica (motoneurone), dalla porzione post-sinaptica (cellula muscolare) e dallo spazio che si crea tra queste sezioni (fessura sinaptica). Queste sinapsi rispondono al rilascio di neurotrasmettitori eccitatori di natura chimica come l'acetilcolina.

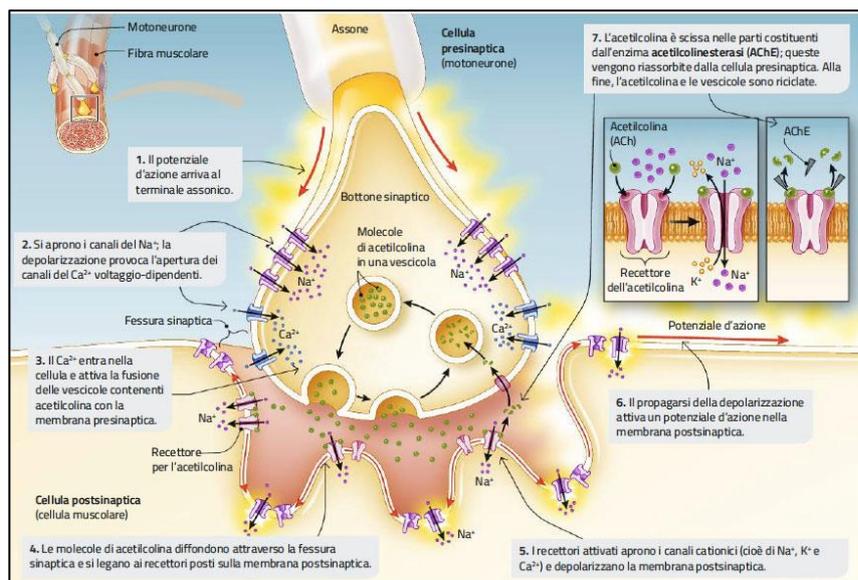


Figura 8: La placca motrice tra la terminazione di un motoneurone e una fibra muscolare (da: Sadava et al., 2020).

Il potenziale d'azione generato da un impulso nervoso, percorrendo la fibra nervosa arriva al bottone sinaptico e la depolarizzazione (eccitazione) provoca l'apertura dei canali del  $\text{Na}^+$ .

La depolarizzazione della membrana di questa porzione pre-sinaptica provoca anche l'apertura dei canali del  $\text{Ca}^{++}$  voltaggio dipendenti ed il calcio entra nella parte terminale del motoneurone. Le vescicole di acetilcolina presenti nel bottone sinaptico riversano il neurotrasmettitore nella fessura sinaptica che, raggiunto il sarcolemma, si lega ai suoi recettori posti sulla membrana post-sinaptica della cellula muscolare. I recettori attivati si trasformano in canali ionici aperti che vengono percorsi da un flusso di ioni  $\text{Na}^+$  che entrano nella fibra muscolare. L'interno della fibra, che prima era carico negativamente, si carica positivamente depolarizzando la membrana plasmatica della porzione post-sinaptica, generando il potenziale d'azione muscolare (Figura 8). Questo potenziale d'azione si propaga rapidamente lungo tutto il sarcolemma e arriva profondità nel muscolo grazie ai tubuli trasversi T che delimitano tutti i sarcomeri (Figura 9) (Sadava et al., 2020).

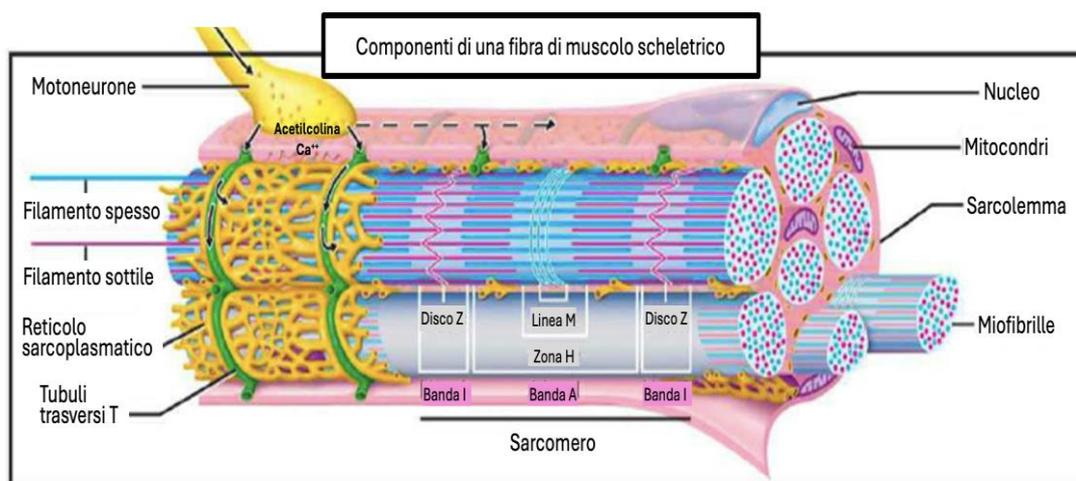


Figura 9: Elementi cellulari e ultrastrutturali della miofibrilla coinvolti nella propagazione dello stimolo alla contrazione (modificato da: <https://moodle2.units.it>).

La depolarizzazione, quindi, interessa tutte le miofibrille attraverso il sistema dei tubuli trasversi T ed i reticoli sarcoplasmatici che le avvolgono (Figura 10). Il potenziale d'azione apre i canali di rilascio del  $\text{Ca}^{++}$  dei reticoli sarcoplasmatici, pertanto, si liberano ioni calcio nel sarcoplasma che raggiungono i filamenti sottili di actina (Figura 10) dove spostano le proteine inibitrici, troponina e tropomiosina.

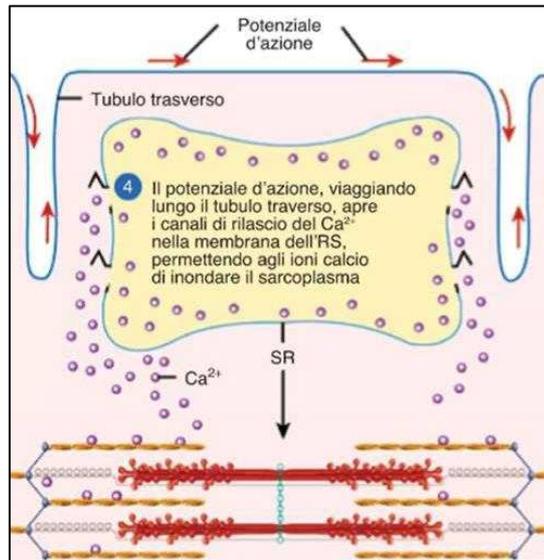


Figura 10: Ruolo dei tubuli trasversi T e dei reticoli sarcoplasmatici nella depolarizzazione delle miofibrille (modificato da: MacLaren e Morton, 2019).

A questo punto la miosina prende contatto con il filamento di actina nel suo sito specifico per l'attacco con i ponti trasversali miosinici, si carica di ATP e lo scinde. L'energia liberata consente la flessione delle teste della miosina (colpo di forza), le teste poi si staccano dallo stesso filamento di actina per legarsi ad esso un po' più avanti tirando a sé il filamento.

In questo modo i sarcomeri si accorciano, si accorciano le miofibrille e, di conseguenza, le fibre muscolari e quindi l'intero muscolo si contrae.

Nel frattempo, termina l'eccitazione ed il sarcolemma si ripolarizza; il Ca<sup>++</sup> ritorna nel reticolo sarcoplasmatico e la troponina e tropomiosina impediscono lo stabilirsi dei legami actina-miosina per cui il muscolo si rilassa ed è pronto per ricevere un nuovo stimolo nervoso per contrarsi.

L'acetilcolina coinvolta nel processo viene poi scissa nei suoi costituenti dall'enzima acetilcolinesterasi ed i suoi componenti vengono riassorbiti dalla cellula pre-sinaptica dove serviranno a produrre nuove molecole di acetilcolina che saranno raccolte in nuove vescicole ospitate nella porzione pre-sinaptica (MacLaren e Morton, 2019).

L'ATP (adenosintrifosfato) nel processo di contrazione è dunque essenziale, sia per il colpo di forza, che per staccare le teste della miosina dai filamenti di actina e per pompare il calcio dal citosol all'interno del reticolo sarcoplasmatico ponendo fine alla contrazione. Questa molecola altamente energetica nelle cellule muscolari può essere prodotta principalmente tramite due vie metaboliche: la glicolisi e, in misura minore, la

fosforilazione ossidativa e il ciclo di Krebs. I principali substrati energetici utilizzati dalle cellule muscolari per ottenere ATP sono gli acidi grassi (fosforilazione ossidativa) e il glucosio (glicolisi). Una parte dell'ATP prodotto nelle fibre muscolari viene utilizzata per produrre fosfocreatina tramite la fosforilazione della creatina mediata dall'enzima creatina-chinasi. Quando inizia la contrazione, la fosfocreatina viene utilizzata per prevenire una drastica diminuzione di ATP, durante i pochi secondi della contrazione, affinché il metabolismo energetico possa fronteggiare l'aumentato consumo energetico. Mentre la fosforilazione ossidativa dell'ADP ad ATP avviene solo nei mitocondri, la creatina può essere utilizzata per fosforilare l'ADP al di fuori dei mitocondri, dove l'ATP viene consumato. Quando i muscoli sono a riposo, accumulano glicogeno dal glucosio presente nel sangue, mentre quando il muscolo inizia a contrarsi, le scorte di glicogeno vengono immediatamente demolite ed il glucosio-1-fosfato viene liberato ed utilizzato per produrre ATP nelle cellule.

La glicolisi, rispetto alla fosforilazione ossidativa, produce solo 3 molecole di ATP da una molecola di glucosio-1-fosfato degradata a piruvato, rispetto alle 30 molecole di ATP prodotte per ogni molecola di glucosio tramite fosforilazione ossidativa, a partire dagli acidi grassi ematici. Tuttavia, la fosforilazione ossidativa richiede un costante apporto di ossigeno.

Poiché la glicolisi non necessita di ossigeno, questo processo metabolico non è influenzato dalla capacità del sistema circolatorio di trasportarlo, quindi è la situazione che si verifica dopo l'abbattimento dell'animale, quando la circolazione sanguigna si arresta e cessa il trasporto dell'ossigeno a tutti i tessuti incluso quello muscolare.

In un muscolo in condizioni anaerobiche, il piruvato prodotto attraverso la glicolisi viene convertito in acido lattico mediante fermentazione lattica, causando un rapido abbassamento del pH cellulare (Sjaastad et al., 2010).

### **1.3 Muscolo in *post-mortem***

L'arresto della circolazione sanguigna al momento della morte per abbattimento dell'animale dà inizio ad una serie di cambiamenti del tessuto muscolare. Al momento della morte i vari tessuti continuano il loro metabolismo specifico in relazione a stimoli tissutali consumando l'ATP residuo, utilizzato anche per mantenere la temperatura corporea costante e l'organizzazione delle sue cellule contro la loro spontanea tendenza a disgregarsi.

L'adenosintrifosfatasi è l'enzima della classe delle idrolasi, indicato come ATPasi, maggiormente implicato nel processo di contrazione. Il suo continuo funzionamento porta ad esaurire le scorte di ATP, producendo contemporaneamente fosfato inorganico, il quale stimola la degradazione del glicogeno ad acido lattico con conseguente abbassamento del pH cellulare da 7 a valori di 5,6-5,7 e conseguente acidificazione dei muscoli (Honikel, 2014). Il cambiamento più immediato causato dal dissanguamento è la fine dell'apporto di ossigeno a tutti i tessuti, inclusi i muscoli e la conseguente caduta del potenziale di ossidoriduzione, con arresto della sintesi di ATP (Lawrie e Ledward, 2006).

La conversione del glicogeno a glucosio è nota come glicogenolisi e avviene a partire dall'azione dell'enzima deramificante del glucosio che catalizza la rottura dei legami  $\alpha$ -1,4-glicosidici rimuovendo i monomeri di glucosio dalle ramificazioni della molecola di glicogeno ottenendo glucosio-1-fosfato; questo, tramite l'enzima glicogeno fosforilasi, catalizzatore della glicolisi, viene trasformato in acido lattico, che rappresenta il punto finale della glicolisi anaerobica (Appling et al., 2017).

Il processo di conversione del muscolo in carne può essere suddiviso in tre step:

- *pre-rigor*,
- *rigor-mortis*,
- *post-mortem*,

ed è noto anche con il termine di frollatura, che è schematizzato nella Figura 11.

Il *pre-rigor* è un periodo che può andare da pochi minuti fino a 30 minuti dopo la morte dell'animale, nel quale non si assiste a nessun calo del pH. Il costante livello del pH in questo periodo dipende dall'ossigeno ancora presente nelle cellule ed inoltre, il consumo di ATP a livello cellulare è tamponato dalla presenza della fosfocreatina, che cede un suo gruppo fosfato, diventando creatina, all'ADP per formare ATP (Honikel, 2014).

Quando il glicogeno e la creatina scarseggiano, o sono completamente esauriti, prende il sopravvento la glicolisi anaerobica, convertendo il glicogeno ad acido lattico, con conseguente abbassamento del pH del muscolo. Questo provoca cambiamenti biochimici e strutturali alle miofibrille che fanno perdere alle fibre muscolari la capacità di contrarsi ed estendersi tramite il formarsi del complesso acto-miosinico, e causano così l'avvio della fase di *rigor-mortis* (Cardenas e Olivera, 2016).

Passando dalla fase di *pre-rigor* a quella di *rigor-mortis*, si osserva un aumento della tenacità del muscolo fino al suo grado massimo di inestensione muscolare e di durezza. In

questo periodo, che può durare da 1 fino a 3 ore, a causa dell'esaurimento energetico, il pH muscolare arriva al valore di 5,6, corrispondente al punto isoelettrico delle proteine miofibrillari. Quando il pH raggiunge questo valore, le proteine miofibrillari subiscono denaturazione, spesso associata alla perdita della capacità di trattenere l'acqua (Cardenas e Olivera, 2016).

La denaturazione delle proteine sarcoplasmatiche, inoltre, rende tali proteine suscettibili ad essere attaccate dalle proteasi e dalle catepsine endogene del muscolo, enzimi mantenuti attivi all'interno dei lisosomi, organuli citoplasmatici cellulari che isolano gli enzimi dal resto della cellula durante la vita dell'organismo animale, e che vengono liberati ed attivati quando le membrane dei lisosomi vengono danneggiate a seguito dell'abbassamento del pH (Lawrie e Ledward, 2006).

Alla fase di *rigor-mortis* segue la frollatura, o *post-rigor*. Nel periodo *post-mortem*, le proteine vengono degradate da enzimi proteolitici portando ad una riduzione sostanziale della durezza/tenacità del muscolo. La proteolisi *post-mortem* è quindi il risultato dell'azione sinergica di più enzimi proteolitici, tra cui le *calpaine*, *catepsine* e *caspasi*, sebbene il ruolo predominante nel migliorare la tenerezza della carne sia attribuito alle calpaine (Warner et al., 2022).

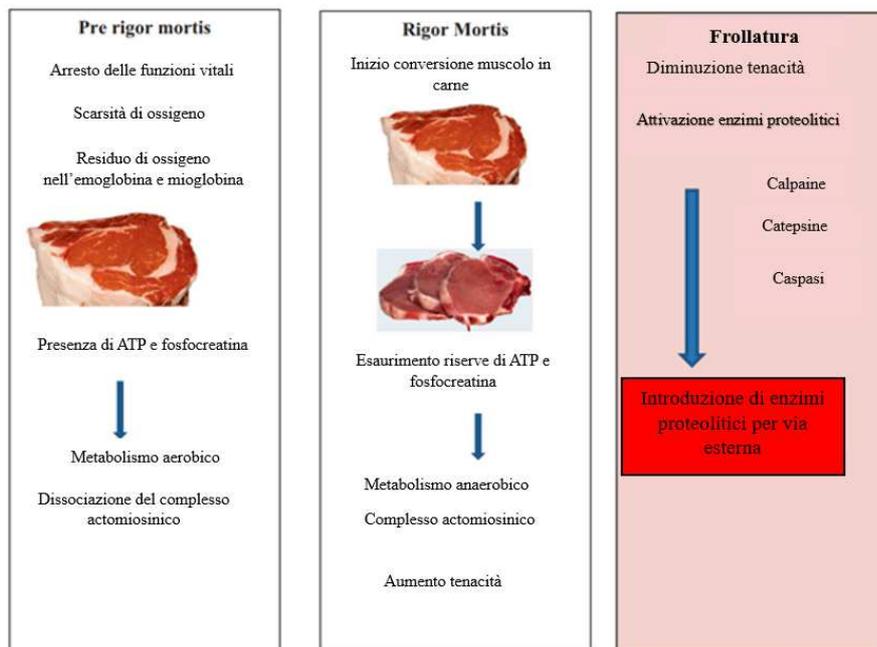


Figura 11: Fasi di conversione del muscolo in carne (modificato da: Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

Tra gli enzimi proteolitici, il principale è la Calpaina, una proteasi neutra attivata dagli ioni calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e presente sia nel citoplasma che nelle membrane cellulari delle fibrocellule (cellule muscolari). Nel muscolo, la Calpaina è presente in tre diverse forme:

- Calpaina-1,
- Calpaina-2 (o m-calpaina),
- Calpaina-3.

La Calpaina-1 è localizzata principalmente a livello delle miofibrille. Per quanto riguarda la sua distribuzione il 66% si trova sulla linea Z, il 20% sulla linea I e il restante 14% sulla banda A.

La Calpaina-2, o m-calpaina, è situata invece, prevalentemente nel citosol, ma rispetto al sarcomero si distribuisce per il 52% sulla linea Z e per il resto sulla banda A (21%) e sulla banda I (27%).

La Calpaina-3, invece, è localizzata vicino alle linee M e Z del sarcomero.

La Calpaina-1 si attiva dopo circa 6 ore dalla macellazione, quando il pH raggiunge valori tra 6,1 e 6,3 e per essere attivata, richiede una concentrazione di calcio tra 3 e 50  $\mu\text{mol/L}$ .

La Calpaina-2, invece, necessita di maggiore quantità di calcio, circa 0,4-0,8  $\text{mmol/L}$ , per raggiungere la metà della sua massima attività.

Il raggiungimento della concentrazione di calcio richiesta per l'attivazione delle calpaine non rappresenta un problema nel *post-mortem*, poiché il calcio presente nelle cellule muscolari può raggiungere livelli di circa 100  $\mu\text{mol/L}$ . L'inattivazione di tali calpaine è invece dipendente dalla Calpastatina, un inibitore endogeno (Nowak, 2011).

La Calpaina-1 è responsabile della degradazione delle strutture miofibrillari e dell'inizio del processo di intenerimento della carne nelle prime fasi *post-mortem*. Al contrario, la Calpaina-2 interviene nel processo più tardi, a partire dal quattordicesimo giorno di frollatura (Warner et al., 2022). Mentre la Calpaina-1 è attiva principalmente nelle prime due settimane, la Calpaina-2, può essere attivata successivamente e il suo effetto può essere potenziato mediante iniezioni di cloruro di calcio o tramite congelamento. Il cloruro di calcio modula l'attività sia delle Calpaine che delle Calpastatine, loro inibitori, influenzando così l'entità della frollatura (Warner et al., 2022).

Le Catepsine, sono proteasi attive a bassi pH, rappresentano una vasta famiglia di pepsidasi che degradano le proteine miofibrillari e citoscheletriche, scindendo i loro legami peptidici durante l'invecchiamento della carne, indebolendo ulteriormente la struttura del

sarcomero e contribuendo al processo di intenerimento (Warner et al., 2022). Le catepsine sono contenute nei lisosomi; quindi, per svolgere il loro ruolo nella degradazione delle miofibrille devono essere rilasciate a seguito dell'apoptosi cellulare.

Tra le catepsine ruolo specifico è svolto dalle Catepsine B, L e D. Queste catepsine agiscono sulla struttura miofibrillare del muscolo, o a livello del sarcomero, degradando principalmente i dischi Z e le bande I (Hopkins e Taylor, 2004).

Le Caspasi, infine, sono un gruppo di proteasi essenziali nel processo dell'apoptosi, che rappresenta la morte cellulare programmata. Le caspasi sono di due tipi:

- Caspasi iniziatrici, che tagliano le preforme inattive delle caspasi dette effettrici;
- Caspasi effettrici, che a loro volta tagliano precisi substrati proteici dando inizio al processo di apoptosi (<https://it.wikipedia.org/wiki/Caspasi>).

L'apoptosi consiste nella contrazione cellulare e nella suddivisione delle cellule in frammenti che vengono poi fagocitati dalle cellule limitrofe o dai macrofagi. L'apoptosi ha inizio in risposta a segnali provenienti da altre cellule o come conseguenza di danni alle stesse cellule; successivamente, si attivano enzimi come le caspasi, precursori della proteolisi (Sjaastad et al., 2010).

L'apoptosi procede secondo uno schema ben preciso, caratterizzato da una fase iniziale in cui le caspasi iniziatrici ricevono lo stimolo che può essere estrinseco, dovuto all'attivazione di recettori di morte programmata, o intrinseco, dovuto in risposta a condizioni di stress per la sopravvivenza cellulare. Successivamente le caspasi iniziatrici, una volta operative, attiveranno le caspasi effettrici, le quali eseguiranno lo stimolo, dando inizio alla disgregazione cellulare (Ouali et al., 2006).

Nel contesto del muscolo *post-mortem*, l'ipotesi è che le condizioni ipossiche, ovvero la mancanza di ossigeno, e/o ischemiche, ossia il limitato apporto di sangue, entrambe indotte dalla macellazione, attivino le caspasi e quindi l'apoptosi nel muscolo scheletrico (Kemp e Parr, 2012).

La tenerezza della carne non dipende esclusivamente dai processi *post-mortem*, ma anche da fattori *ante-mortem*, come razza, specifici geni, promotori di crescita, età, castrazione, tipo di alimentazione, condizioni di trasporto.

I cambiamenti muscolari *post-mortem* coinvolgono processi biologici influenzati da fattori intrinseci ed estrinseci.

Tra i processi maggiormente rilevanti troviamo l'ossidazione e la proteolisi *post-mortem*, nonché i processi con effetti diretti sull'integrità del tessuto muscolare.

Ad esempio, l'uso delle basse temperature -tramite congelamento- può creare nel tessuto muscolare cristalli di ghiaccio disposti più o meno ordinatamente che, quando il muscolo subirà lo scongelamento, si romperanno e porteranno alla distruzione delle strutture muscolari, con seguente rilascio degli ioni calcio, influenzando quindi la proteolisi (Warner et al., 2022).

Lo stress ossidativo, che può interessare sia la componente lipidica che quella proteica del muscolo *post-mortem*, porta all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono frammentare le proteine e influenzarne la funzionalità. L'ossidazione delle proteine miofibrillari può aumentare la loro suscettibilità alla Calpaina-1 e alle Caspasi, promuovendo la degradazione miofibrillare, ma può anche inattivare la Calpaina-1 diminuendo la proteolisi e regolando inversamente la tenerezza della carne. Tuttavia, i ROS possono essere contrastati tramite l'uso di enzimi antiossidanti come il superossido dismutasi (Warner et al., 2022).

L'ossidazione è un'importante alterazione da tenere in considerazione durante il periodo di frollatura della carne poiché induce modifiche alle caratteristiche organolettiche del prodotto. L'ossidazione proteica è il processo di grande interesse poiché è stato dimostrato che l'ossidazione delle proteine miofibrillari e sarcoplasmatiche può verificarsi entro le prime 24 ore dalla macellazione determinando la formazione di derivati carbonilici e legami crociati disolfuro, inattivando sia Calpaine che Calpastatine, e aumentando la durezza/tenacità per aggregazione delle proteine miofibrillari. Limitare l'ossidazione proteica *post-mortem* è dunque essenziale per migliorare la tenerezza della carne bovina e per farlo si può arricchire la razione alimentare con foraggi contenenti alte concentrazioni di antiossidanti, che esercitano un'azione protettiva verso le proteine miofibrillari (Warner et al., 2022).

## **1.4 Metodi di frollatura**

La frollatura è il termine attribuito al processo di stagionatura delle carni macellate, con lo scopo di renderle più tenere e saporite.

Il metodo di frollatura tradizionale consiste nel mantenere la carcassa in una camera fredda a temperature tra i 2 e i 5 °C per un periodo che varia tra i 7 e i 21 giorni.

Esistono due principali modalità di frollatura tradizionale:

- a secco, in cui la carcassa intera subisce una notevole perdita di liquidi (2-5%),

- in umido, dove i tagli primari dopo sezionamento e disossamento vengono confezionati sottovuoto.

Il principale limite della frollatura in umido è la necessità di lunghi periodi di conservazione (Bolumar, 2013).

Per aumentare la velocità del processo di frollatura e cercare di ottenere una migliore qualità del prodotto carneo, oltre alle modalità tradizionali, possono essere utilizzati altri metodi:

- frollatura con interventi fisici,
- frollatura con interventi chimici,
- frollatura con interventi enzimatici.

La frollatura delle carni con interventi fisici, rispetto agli altri metodi, è maggiormente praticabile su scala industriale ed inoltre, intervenendo solamente sulla struttura delle miofibrille, alterano in misura minima il risultato organolettico desiderato, non utilizzando, ad esempio, soluzioni che possono apportare modifiche del sapore come in caso di utilizzo di salamoie. Tuttavia, il costo di implementazione, manutenzione e utilizzo di specifici macchinari risulta particolarmente elevato a causa della necessità del loro utilizzo, come quello per le onde d'urto, celle frigorifere, etc.

Tra gli interventi fisici troviamo: la stimolazione elettrica, lo stiramento muscolare, il trattamento a pressione idrodinamica (o con onde d'urto), i cicli di congelamento e scongelamento.

La stimolazione elettrica della carcassa calda, subito dopo la macellazione, viene utilizzata dall'industria della carne principalmente per prevenire l'accorciamento da freddo dei muscoli, poiché quest'ultimo può compromettere la capacità del reticolo sarcoplasmatico e dei mitocondri di trattenere il calcio, portando ad un aumento di calcio nel sarcoplasma, promuovendo la contrazione delle miofibrille e quindi aumentando la tenacità della carne (Bolumar, 2013). Il macchinario può operare con due differenti modalità: stimolazione elettrica ad alto voltaggio, che opera ad una tensione tra 300 e 1000 Volt per 10 secondi, e stimolazione elettrica a basso voltaggio, con tensione tra 50 e 120 Volt per un tempo di 40 secondi (Ramanathan et al., 2020). Durante il processo, le carcasse bovine sono sottoposte a corrente elettrica, ad alta o bassa tensione, che induce la contrazione muscolare e accelerano notevolmente la glicolisi, portando più velocemente al passaggio alla fase del *rigor-mortis*, evitando l'accorciamento da freddo e probabilmente

innescando più rapidamente la proteolisi (Bolumar, 2013). Inoltre, la stimolazione elettrica interviene fisicamente interrompendo le fibre muscolari, determinando una maggiore tenerezza, dovuta anche alla rottura delle membrane lisosomiali e al successivo rilascio delle catepsine (Ramanathan et al., 2020). Tuttavia, un'eccessiva elettrostimolazione può provocare un calo del pH troppo rapido e ciò può influenzare negativamente la qualità della carne poiché si avrà un aumento del gocciolamento (Bolumar, 2013).

Un altro intervento fisico praticato durante la frollatura che influenza la tenerezza, è lo stiramento muscolare, anche detto *tenderstretch*. Questo metodo rappresenta un'alternativa alla procedura convenzionale che prevede di appendere le carcasse, tramite un gancio con carrucola inserito nel garretto, alla guidovia principale della linea di macellazione. Nel *tenderstretch*, la carcassa viene appesa dall'osso pelvico o dall'anca, riducendo l'accorciamento delle fibre muscolari e migliorando la tenerezza dei muscoli. Tuttavia, questa operazione deve essere eseguita nel macello prima che la carcassa raggiunga l'inizio della rigidità *post-mortem*, affinché impedisca l'accorciamento delle fibre e si riduca la contrazione del sarcomero. Questo metodo è poco utilizzato nell'industria poiché efficace solamente su muscoli di piccole dimensioni, potendo anche causare deformazioni muscolari (Bolumar, 2013). Inoltre, questa tecnica se applicata alla carcassa raffreddata troppo rapidamente può far aumentare il rischio di accorciamento da freddo. Tra gli aspetti positivi di questo intervento fisico praticato durante la frollatura è la riduzione di gocciolamento con conseguenti minori perdite di liquidi nella fase di cottura della carne (Ramanathan et al., 2020).

Negli ultimi anni, sta prendendo sempre più piede tra le lavorazioni industriali il trattamento a pressione idrodinamica (o onde d'urto) delle carcasse bovine.

Il trattamento a pressione idrodinamica (HDP), o onde d'urto, consiste nello sviluppo istantaneo di onde di pressione fino a 1 GPa (1 gigapascal) in frazioni di millisecondi. Questa pressione può essere generata da scariche elettriche sott'acqua, creando un'onda di pressione o onda d'urto. L'onda d'urto viaggia nel fluido (acqua) attraversando il campione (Bolumar, 2013). Prendendo come riferimento un campione di carne, caratterizzato nella fase di *rigor-mortis* per il 75% da acqua, (Lawrie e Ledward, 2006) l'applicazione di onde d'urto, risulta un metodo efficace per aumentare il grado di tenerezza della carne, poiché comporta la lacerazione delle miofibrille muscolari, diminuendo così la tenacità del campione (Bolumar, 2013).

Il trattamento a onde d'urto può essere praticato durante lo stato di *post-rigor* oppure dopo il confezionamento del taglio in un imballaggio per il sottovuoto. Per l'applicazione di questa tecnologia in uno stabilimento di lavorazione della carne non è necessario modificare la linea di lavorazione poiché può essere inserito o all'inizio della linea di lavorazione o alla fine del confezionamento sottovuoto (Figura 12).

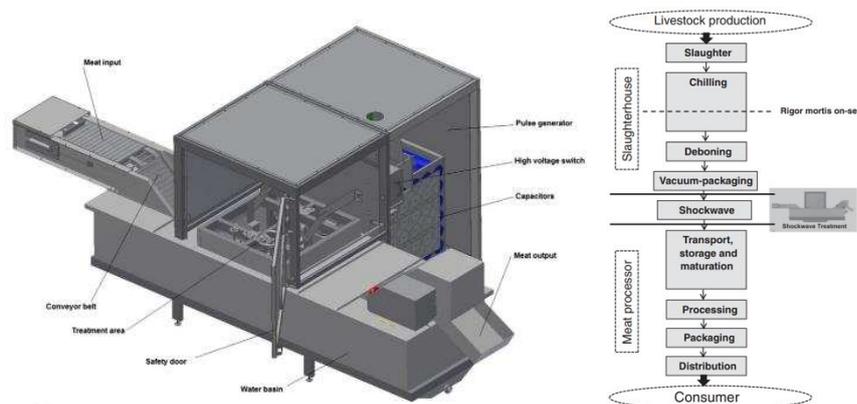


Figura 12: Impianto ad onde d'urto e suo inserimento nel flusso della linea produttiva (Bolumar, 2013).

L'impianto a onde d'urto offre vantaggi in termini di intenerimento della carne e di estensione della shelf-life in seguito ad una significativa riduzione dei tempi di lavorazione delle carcasse (Bolumar, 2013).

Infine, i cicli di congelamento e scongelamento rappresentano un ulteriore metodo per controllare e promuovere l'intenerimento della carne. Il processo prevede tre fasi operative. Nella prima fase, occorre calibrare la temperatura della camera di maturazione in modo che la temperatura rilevata dal sensore corrisponda a quella effettiva della camera. Nella seconda fase, si devono impostare due temperature, una corrispondente al punto di congelamento dell'acqua presente nella membrana cellulare del muscolo e l'altra corrispondente al suo punto di evaporazione. Nella terza fase, la carne viene lasciata in una camera di frollatura a temperatura controllata, impostata tra il punto di congelamento e il punto di evaporazione dell'acqua presente in essa. Se la mezzena da far frollare è di manzo, l'intervallo di temperatura sarà compreso tra  $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , corrispondenti rispettivamente al punto di congelamento e di evaporazione dell'acqua presente. Questo metodo, impostando la temperatura del periodo di frollatura tra il punto di congelamento e quello di evaporazione, specifico per il tipo di carne da trattare, permette di evitare che la membrana cellulare del muscolo, oramai carne, venga danneggiata dalla continua formazione e scioglimento di cristalli di ghiaccio (Patent KR101372321B1, 2012).

Il metodo di frollatura chimica consiste nell'infusione di specifiche sostanze nelle carcasse immediatamente dopo la macellazione, processo noto come "infusione vascolare post-dissanguamento". Questo metodo può favorire la proteolisi e migliorare la ritenzione idrica (Water Holding Capacity-WHC) e la stabilità del colore della carne. Tra le sostanze utilizzate, il cloruro di calcio, sodio e miscele composte da maltosio hanno portato benefici con la loro applicazione. Tuttavia, il potenziale rischio di contaminazione crociata microbica e la comparsa di aromi sgradevoli hanno fortemente limitato il loro utilizzo.

Il cloruro di sodio (o sale comune) è una sostanza chimica che ha la funzione di ammorbidire le proteine del tessuto connettivo, come il collagene, migliorando così la tenerezza della carne.

Il processo di marinatura della carne in soluzioni acide, come acido acetico o lattico, contenenti sali e fosfati, è un ulteriore metodo chimico che ha trovato crescente applicazione nell'industria della carne, migliorando le qualità e le rese produttive.

Un fattore critico può essere rappresentato dalla modalità di applicazione delle sostanze chimiche nella carne. Se l'aggiunta di tali sostanze avviene tramite marinatura, ovvero lasciando il campione immerso in una soluzione, contenente sale ed enzimi proteolitici, l'effetto sarà limitato solamente agli strati più superficiali e richiederà periodi prolungati affinché la soluzione penetri in profondità. Se l'aggiunta avviene invece per iniezione c'è il rischio di incorrere in contaminazioni crociate microbiche per l'uso di aghi contaminati o non adeguatamente puliti. Infine, va sottolineato che l'aggiunta alla carne fresca di sostanze chimiche, comprese quelle enzimatiche, comporta un inevitabile abbassamento del valore economico del prodotto poiché non potrà più essere commercializzato come "carne fresca", ma dovrà essere commercializzata come "carne preparata" (Bolumar, 2013).

La frollatura tramite trattamento enzimatico prevede l'uso di enzimi proteolitici, che possono essere di origine animale, vegetale o microbica, e che iniettati nel muscolo agiscono sui tessuti muscolari frammentando anche il collagene e permettendo il rilassamento delle fibre muscolari irrigidite dopo la morte (Ramanathan et al., 2020).

Gli enzimi proteolitici esogeni di origine vegetale -oggetto di questo lavoro di tesi- verranno discussi nel Capitolo 2.

## CAPITOLO 2. INNOVAZIONE DI PROCESSO: l'uso di proteasi vegetali esogene

### 2.1 Classificazione e struttura chimica delle proteasi vegetali esogene

La tenerezza della carne è una delle caratteristiche più apprezzate dai consumatori e rappresenta un parametro di qualità fondamentale nell'industria alimentare. Negli ultimi decenni, l'industria ha implementato diverse tecniche per ridurre la variabilità della tenerezza, come la stimolazione elettrica e l'uso di onde d'urto. Tuttavia, un aspetto innovativo e sempre più rilevante, è rappresentato dall'uso delle proteasi vegetali esogene, ossia enzimi di origine vegetale volontariamente aggiunti al tessuto muscolare dopo la macellazione.

Le proteasi esogene, come quelle endogene, sono in grado di scomporre le proteine miofibrillari, contribuendo al miglioramento significativo della tenerezza finale del prodotto. Questi enzimi possono essere classificati in base a:

- pH ottimale di attività: acide, alcaline o neutre,
- loro origine: animale, vegetale, batterica, fungina,
- tipo di azione chimica svolta: endopeptidasi ed esopeptidasi.

Tra le proteasi di origine vegetale di maggiore impatto sulla tenerezza della carne troviamo la papaina (estratta dal lattice di papaya), la bromelina (estratta dallo stelo e dal frutto dell'ananas), la ficina (dai fichi), l'actinidina (dai kiwi) e la zingibaina (dal rizoma dello zenzero) (Warner et al., 2022).

Questi enzimi esogeni possono essere utilizzati nel processo di frollatura della carne attraverso processi di marinatura, infusione o iniezione. Questi trattamenti *post-mortem* hanno lo scopo di migliorare la qualità della carne, offrendo allo stesso tempo nuove opportunità per il settore alimentare di rispondere alle crescenti esigenze dei consumatori in termini di percezione organolettica, come gusto e consistenza, del prodotto finito.

La *papaina* (EC 3.4.22.2) è un enzima cisteinico, estratto dal lattice di papaya (*Carica papaya*), tramite incisioni sulla buccia del frutto acerbo, ottenendo così il lattice che poi verrà fatto essiccare. È una proteina globulare a catena singola composta di 212 amminoacidi, con un peso molecolare di 23.406 Dalton. La sua struttura è stabilizzata da quattro ponti disolfuro, che formando legami tra le catene laterali degli amminoacidi, garantendo la stabilità e la funzionalità della proteina anche in condizioni estreme (Figura

13). I residui cataliticamente attivi presenti nella proteina, sono Gln19, Cys25, His158 e His159 (il numero indica il loro posizionamento nella catena amminoacidica). In particolare, Cys25 e His159 sono in grado di formare una diade catalitica (complesso di due amminoacidi, responsabile della catalizzazione di una reazione), situata tra due domini strutturali, responsabile dell'attività proteolitica della papaina (Amri e Mamboya, 2012).

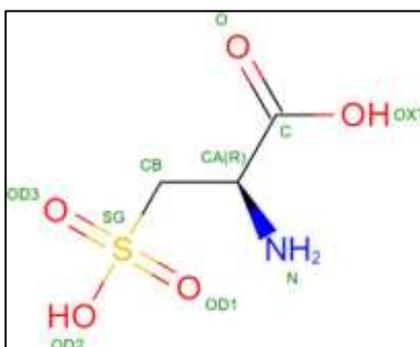


Figura 13: Struttura chimica della papaina (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

La struttura tridimensionale della papaina (Figura 14) è costituita da due domini distinti: un dominio  $\alpha$  e un dominio  $\beta$ .

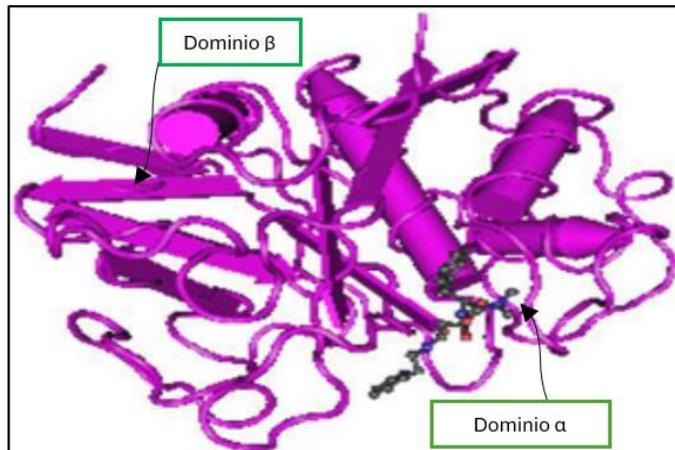


Figura 14: Struttura tridimensionale della papaina (modificato da: Amri e Mamboya, 2012).

Questa conformazione non solo conferisce stabilità alla proteina, ma la rende anche resistente a denaturanti chimici come urea 8 M e alcol etilico al 70%. La papaina risulta attiva e stabile entro un ampio intervallo di pH (3-9), sebbene in ambienti fortemente acidi (pH = 2) mantenga ancora parte della sua struttura secondaria, in particolare quella a  $\beta$  foglietto (Amri e Mamboya, 2012).

La proteina, grazie alla sua stabilità, può essere conservata a lungo ad una temperatura di 4 °C mantenendo inalterata la sua attività, e la sua riattivazione può avvenire in presenza di composti riducenti. Purtroppo, alte temperature (circa 90 °C) o la presenza di agenti ossidanti o in presenza di N-nitrosoaniline, che forma legami S-NO stabili nel sito attivo dell'enzima, determinano l'inattivazione dell'enzima (Amri e Mamboya, 2012; Bekhit et al., 2013).

Per quanto riguarda il potenziale d'azione, la papaina ha un'attività proporzionale al grado di acidità del frutto, cioè più il frutto è verde e più la papaina avrà un potenziale di azione maggiore e viceversa (Amri e Mamboya, 2012). Tuttavia, a causa della sua aspecificità, può avviare una rottura indiscriminata delle proteine miofibrillari, causando un eccessivo intenerimento, conferendo una consistenza pastosa alla carne (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021). Il meccanismo di azione della papaina è reso possibile dal residuo amminoacidico cataliticamente attivo nella Cisteina-25 (Cys25), facente parte della diade catalitica, la quale attacca il carbonio carbonilico dell'amminoacido terminale della catena peptidica, staccandolo. Quando ciò avviene in tutte le catene peptidiche delle proteine costituenti il muscolo, si assiste alla loro rottura (Amri e Mamboya, 2012).

La *bromelina* (EC 3.4.22.4) è un estratto proteolitico derivante dal gambo e dal frutto della pianta di ananas (*Ananas comosus*). È una combinazione di endopeptidasi tioliche e altri componenti come glucosidasi, glicoproteine e inibitori delle proteasi (Figura 15). La bromelina è costituita da 285 amminoacidi, con alanina e glicina in quantità maggiore mentre l'istidina e la metionina in concentrazione più bassa (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

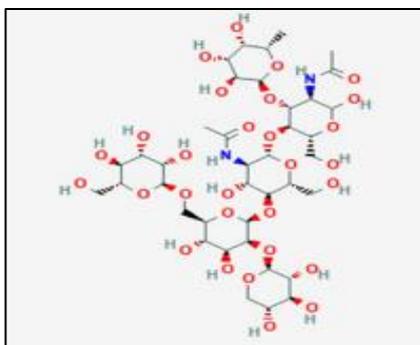


Figura 15: Struttura chimica della bromelina (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

Nella fisiologia vegetale, la bromelina svolge un ruolo difensivo, ovvero protegge il frutto durante il suo sviluppo e maturazione. In campo industriale invece, la bromelina è

ampiamente utilizzata negli alimenti. La sua elevata presenza nel gambo dell'ananas, spesso prodotto di scarto, piuttosto che nel frutto, è un dato molto importante poiché consente di recuperare sostanze preziose da un prodotto che altrimenti sarebbe inutilizzato. (Ramli et al., 2018).

I due tipi principali di bromelina sono denominati bromelina dello stelo e bromelina del frutto; con un peso molecolare rispettivamente di 23,40–35,73 kDa e 25–31,00 kDa, e con un punto isoelettrico rispettivamente di 9,55 e di 4,6 (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

L'utilizzo di soluzioni, arricchite in bromelina, per la marinatura di campioni di carne, determina in essa un calo di pH e un aumento della capacità di ritenzione idrica (WHC). La sua attività è incentrata sulle proteine miofibrillari e sul collagene, con effetto di intenerimento migliorando i parametri sensoriali. Tuttavia, la marinatura della carne con una soluzione contenente questo enzima vegetale può determinare un'eccessiva tenerezza e una consistenza della carne eccessivamente pastosa (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

Rispetto alla papaina lo spettro di attività enzimatica della bromelina risulta leggermente inferiore. L'intervallo di pH è 5-7 e la temperatura ottimale è di 50 °C.

La *ficina* (EC 3.4.22.3) è una proteasi tiolica (Figura 16), appartenente alla classe delle proteasi cisteiniche. Viene estratta principalmente dal lattice di diverse specie del genere *Ficus*, come *Ficus glabrata*, *Ficus anthelmintica* e *Ficus laurifolia*. La sua attività massima si ottiene con un pH compreso tra 5 e 8 e a una temperatura di 45-55 °C (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

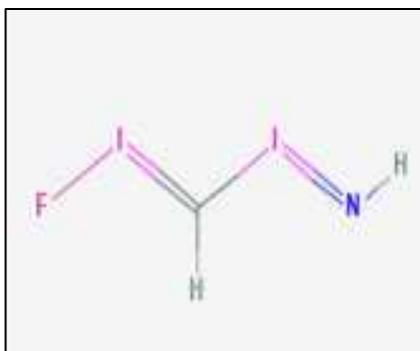


Figura 16: Struttura chimica della ficina (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

La ficina è in grado di solubilizzare proteine come l'elastina e il collagene agendo sulla prima quando viene raggiunto un pH di 5,5 e sulla seconda ad un pH pari a 7, quindi

presenta un comportamento proteolitico differenziato in base al substrato. La ficina ha dimostrato un'azione significativa come inteneritore per la carne, soprattutto per quanto riguarda le proteine miofibrillari e il complesso acto-miosinico, contribuendo ad una migliore solubilità delle stesse dopo la marinatura della carne, con soluzioni contenenti l'enzima, o iniezione di quest'ultimo nella carne. Inoltre, la sua attività migliora anche la ritenzione idrica (WHC) e la consistenza dei prodotti a base di carne, rendendola preziosa per la produzione di prodotti trasformati come la mortadella (Mandhusankha e Thilakarathna 2021).

L'enzima per essere attivato richiede agenti riducenti come la cisteina, mentre viene inibito con agenti ossidanti e metalli bivalenti (Bekhit et al., 2013).

L'*actinidina* (EC 3.4.22.14) è un enzima proteolitico tiolico presente nell'uva spina (*Ribes uva crisper*) e nel kiwi (*Actinidia chinensis*). La sua conformazione è simile alla struttura della papaina, quindi costituita da una singola catena di 220 residui amminoacidici con almeno 2 ponti disolfuro (Figura 17).

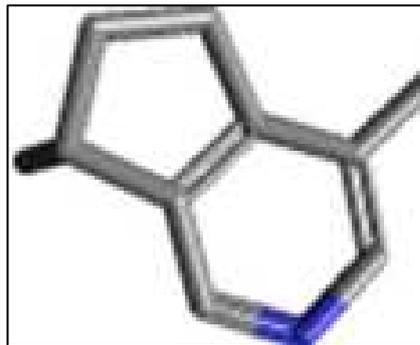


Figura 17: Struttura chimica dell'actinidina (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

L'actinidina possiede una moderata capacità di intenerire la carne, degradando sia le proteine miofibrillari che le proteine del tessuto connettivo, in particolare il collagene. Una ulteriore azione dell'actinidina è l'attivazione della Calpaina-2 (o m-calpaina) nel processo di frollatura *post-mortem* (Ha et al., 2012). Sebbene l'intensità del suo effetto sia inferiore rispetto ad altri enzimi, come la papaina, ha comunque dimostrato di migliorare la tenerezza della carne senza comprometterne il sapore o la succosità (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021). Questo rende tale enzima ideale in applicazioni dove è richiesto un effetto di intenerimento più contenuto. L'actinidina agisce con un ampio intervallo di pH, generalmente tra 5 e 7, ma è stata segnalata un'attività ottimale anche a pH più alcalini, tra

7,3 e 7,6. La sua temperatura ottimale di attività si colloca tra 58 °C e 62 °C (Bekhit et al., 2013).

Interessante è anche l'uso combinato dell'actinidina con trattamenti a ultrasuoni, che porta ad un potenziamento del suo effetto intenerente poiché le onde ultrasoniche facilitano una distribuzione più omogenea dell'enzima nelle parti più interne della carne (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021).

L'estrazione dell'enzima, per massimizzarne la resa, è praticata su frutti maturi congelati e scongelati; comunque, il contenuto di actinidina è notevolmente variabile in base alle diverse cultivar di kiwi, con livelli che vanno da non rilevabili a 10,7 mg/ml. (Bekhit et al., 2013).

Infine, lo zenzero (*Zingiber officinalae*), una spezia molto apprezzata in cucina per il suo sapore unico, è utile anche per intenerire la carne grazie alla presenza dell'enzima proteolitico *zingibaina* (EC 3.4.22.67). Questo enzima è particolarmente efficace nella degradazione del collagene rispetto al complesso acto-miosinico, contribuendo così a rendere la carne più tenera (Thompson et al., 1973). La zingibaina, rispetto alla papaina e alla ficina, svolge un'intensa attività proteolitica di degradazione del collagene. L'attività ottimale di questo enzima risulta essere ad una temperatura di circa 60 °C e ad un pH di 6 (Ha et al., 2012).

L'uso della zingibaina ha anche effetti benefici sul sapore e sulla succosità della carne (Naveena et al., 2004) e ciò la rende un agente ideale non solo per migliorare la consistenza, ma anche per esaltare le qualità organolettiche dei prodotti a base di carne.

Tuttavia, l'uso commerciale di tale enzima è limitato a causa della sua bassa stabilità, ma se trattata con ascorbato di sodio la sua durata può arrivare da 2 giorni fino a 18 mesi se conservata ad una temperatura di 5 °C (Mandhusankha e Thilakarathna, 2021). Inoltre, l'enzima ha una forte sensibilità al calore; infatti, senza l'aggiunta di stabilizzanti, la sua emivita a 60 °C è di soli 2,3 minuti; se però l'enzima si trova in presenza di stabilizzanti, come l'ascorbato di sodio, la sua emivita può aumentare fino a 24 minuti (Bekhit et al., 2013). Attualmente però la zingibaina e l'actinidina, rispetto agli altri enzimi, in USA non sono riconosciute come sostanze GRAS (Generally Recognized As Safe), pertanto il loro uso nell'industria alimentare statunitense è assai limitato (Azmi et al., 2023).

Nonostante le potenzialità delle proteasi vegetali, come agenti di intenerimento della carne bovina, la loro variabilità di purezza e la potenziale influenza negativa sulle

caratteristiche organolettiche del prodotto finale richiedono un uso regolamentato e controllato.

In particolare, enzimi come la papaina e la bromelina, se usati in dosi importanti, possono causare un intenerimento eccessivo, mentre l'actinidina e la zingibaina offrono un'azione più delicata e mirata, risultando particolarmente adatte per applicazioni che richiedono un effetto più contenuto.

## **2.2 Il processo di estrazione degli enzimi vegetali**

Un enzima è una sostanza di natura proteica dotata di proprietà catalitiche in una reazione chimica specifica, senza essere consumata né essere reperita come molecola nei prodotti finali della reazione.

Gli enzimi possono essere costituiti da proteine semplici, che determinano sia la specificità che la reazione, oppure da proteine coniugate; in questo caso, l'enzima non è composto solamente da proteine ma anche da un gruppo non proteico, chiamato gruppo prostetico quando è saldamente legato alla molecola. Quando invece la parte proteica e quella non proteica sono separate, la parte proteica prende il nome di apoenzima, mentre quella non proteica si chiama coenzima. Dall'unione di queste due parti si ottiene un enzima completo, detto oloenzima, comunemente chiamato enzima ([www.treccani.it/enciclopedia/enzima](http://www.treccani.it/enciclopedia/enzima)).

Per poter utilizzare un enzima, è necessario estrarlo e purificarlo dalla matrice di partenza. Un classico esempio è l'estrazione della papaina dal lattice di papaya, come avviene anche per le altre proteasi vegetali trattate in precedenza. L'enzima agisce formando un complesso, ad emivita molto breve, con il substrato su cui deve catalizzare, che subirà una modificazione specifica con la rottura o la formazione di legami covalenti.

Per estrarre un enzima da una matrice alimentare, è possibile operare tramite uno o più sistemi, specifici per ogni enzima.

I sistemi acquosi a due fasi (Aqueous Two-Phase Systems - ATPS) sono costituiti da due polimeri, o da un singolo polimero e un sale in acqua. Questo meccanismo consente di chiarificare, concentrare e purificare le proteine presenti nella matrice alimentare con una sola operazione. I sistemi polimero-acqua salata offrono il vantaggio di essere economici e di avere una bassa viscosità rispetto ai sistemi polimero-polimero-acqua (Nitsawang et al., 2006).

L'estrazione del lattice di papaya inizia con incisioni longitudinali sul frutto acerbo, raccogliendo il lattice essudato e conservandolo prima della purificazione a -20 °C; il lattice viene poi scongelato e miscelato con cisteina 40 mM in un rapporto 3:1 (p/v), regolato a pH di 5,6 con HCl 6 M e agitato per 15 minuti a 4 °C. La sospensione viene poi filtrata ed il pH regolato sino a raggiungere il valore di 9 con NaOH 6 M. Il materiale insolubile viene poi rimosso tramite centrifugazione per 30 minuti a 4 °C, ottenendo un surnatante. Le proteine nel surnatante vengono precipitate con una soluzione di ammonio e recuperate tramite centrifugazione. L'enzima infine viene dializzato e successivamente liofilizzato per ottenere l'enzima in polvere. La purezza della papaina verrà poi analizzata tramite cromatografia liquida a scambio ionico (Nitsawang et al., 2006).

Oltre alla papaina, anche le altre proteasi vegetali come la bromelina, la zingibaina, l'actinidina e la ficina possono essere estratte con il metodo ATPS.

Un altro metodo per ricavare enzimi vegetali è rappresentato dall'estrazione micellare inversa, metodo usato sia per estrarre la papaina che la bromelina.

La bromelina è un enzima proteolitico presente nel gambo e nel frutto dell'ananas. Un metodo efficace per la sua separazione dalla matrice di partenza e per la sua purificazione è rappresentato dall'estrazione a micelle inverse (Reverse Micellar Extraction - RME). Il processo inizia con il lavaggio del frutto di ananas, il cui torsolo verrà centrifugato per la successiva estrazione della bromelina tramite estrazione diretta e successivamente estrazione inversa.

L'estrazione diretta viene eseguita mettendo l'estratto grezzo in contatto con un volume noto (10 ml) di fase organica composta da 150 mM di bromuro dicetil-trimetilammonio (CTAB) all'80% v/v, isottano al 5% v/v, 1-esanolo al 15% v/v e 1-butanolo con lo stesso volume di fase acquosa, ottenendo la fase micellare inversa. A questa fase viene aggiunta successivamente una soluzione tampone di fosfato di sodio 0,01 M a pH 7,0 a 23-28 °C, e poi centrifugato. La miscela ottenuta viene sottoposta a RME. La soluzione finale deve essere, infine, mescolata tramite un agitatore magnetico per 60 minuti, ottenendo così la separazione delle fasi per densità, poi analizzate per testare l'attività dell'enzima in questione (Chaurasiya et al., 2015).

Un ulteriore metodo di separazione e purificazione di una proteasi vegetale, è la precipitazione.

Questo metodo viene utilizzato ad esempio, per l'estrazione della zingibaina dal rizoma dello zenzero. Il rizoma inizialmente viene centrifugato per ottenere un estratto grezzo, a questo verrà aggiunta una soluzione tampone fosfato 0,1 M a pH 7,0 contenente EDTA in concentrazione di 5 mM e 10 mM di cisteina. Il pH della soluzione ottenuta dovrà poi essere regolato al valore di 7,0. Si otterrà, a questo punto, un residuo solido che dovrà essere filtrato. La miscela filtrata dovrà poi riposare un'ora prima di essere centrifugata; quindi, il surnatante ottenuto dovrà essere filtrato attraverso farina fossile di diatomee (Celite) per rimuovere eventuali materiali in sospensione.

### **CAPITOLO 3. SCOPO DEL LAVORO DI TESI**

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di analizzare gli effetti dell'applicazione di enzimi vegetali come bromelina e zingibaina, estratti dagli scarti di produzione dell'industria alimentare, sulla carne di bovino, mediante marinatura o iniezione. L'impiego di questi enzimi nell'industria della carne mira a migliorare le caratteristiche fisiche e organolettiche di prodotti o tagli di carne di basso valore commerciale, aumentandone l'*appeal*; ad esempio, intenerendo una bistecca che altrimenti risulterebbe avere una consistenza elevata, ovvero sgradevole per il consumatore.

Nella presente indagine è stato quindi analizzato come il processo di marinatura delle carni o iniezione di quest'ultime, utilizzando soluzioni a base di acqua, sale ed enzimi, e combinazioni di trattamento come, concentrazione di un enzima nella soluzione di marinatura, tempo e temperatura di cottura e alimentazione a base di concentrati nell'ultima fase di ingrasso dei bovini, possano apportare modificazioni sul pH, colore, succosità e consistenza di campioni di carne indagati in specifiche prove sperimentali recentemente pubblicate su autorevoli riviste scientifiche del settore.

L'analisi critica delle due pubblicazioni scientifiche scelte dopo attenta valutazione della letteratura scientifica disponibile, ha avuto come fine quello di meglio comprendere innovazioni nei processi tecnologici che consentiranno la messa a punto di idonee tecnologie innovative che permetteranno di ridurre le tempistiche di frollatura delle carcasse e dei tagli di carne bovina, garantendo prodotti più standardizzati e qualitativamente costanti, oltre che più apprezzati dal consumatore finale per una maggiore tenerezza che rappresenta uno degli attributi sensoriali più importanti della carne.

## CAPITOLO 4. ANALISI DEI CONTRIBUTI SCIENTIFICI

### 4.1 Articolo n. 1:



Article

### Optimization of the Effect of Pineapple By-Products Enhanced in Bromelain by Hydrostatic Pressure on the Texture and Overall Quality of Silverside Beef Cut

Diana I. Santos <sup>1</sup>, Maria João Fraqueza <sup>2,\*</sup>, Hugo Pissarra <sup>2</sup>, Jorge A. Saraiva <sup>3</sup>, António A. Vicente <sup>4</sup> and Margarida Moldão-Martins <sup>1</sup>

<sup>1</sup> LEAF, Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food, School of Agriculture, University of Lisbon, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisbon, Portugal; dianaisasantos@isa.ulisboa.pt (D.I.S.); mmoldao@isa.ulisboa.pt (M.M.-M.)

<sup>2</sup> CIISA, Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Av. da Universidade Técnica, Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisbon, Portugal; hpissarra@fmv.ulisboa.pt

<sup>3</sup> LAQV-REQUIMTE, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; jorgesaraiva@ua.pt

<sup>4</sup> CEB, Centro de Engenharia Biológica, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade de Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; avicente@deb.uminho.pt

\* Correspondence: mjoaofraqueza@fmv.ulisboa.pt; Tel.: +351-213-652-889

Received: 28 September 2020; Accepted: 23 November 2020; Published: 26 November 2020 

### *Optimization of the Effect of Pineapple By-Products Enhanced in Bromelain by Hydrostatic Pressure on the Texture and Overall Quality of Silverside Beef Cut*

**Santos D.I., Fraqueza M.J., Pissarra H., Saraiva J.A., Vincente A.A., Moldão-Martins M. (2020a). *Foods*, 9, 1752.**

#### **Abstract**

Sottoprodotti di ananas disidratata arricchiti in bromelina tramite un trattamento a pressione idrostatica (225 Mpa per 8,5 minuti) sono stati utilizzati per la marinatura di campioni di carne bovina con l'obiettivo di migliorare le sue proprietà organolettiche. Le bistecche ottenute dai tagli di magatello (noto anche come girello) e sottofesa (*silverside*), con spessore di 2,05 cm e peso di 270,5 g, caratterizzate come le più dure ed economiche, sono state immerse in soluzioni a base di sottoprodotti d'ananas disidratati e pressurizzati, con una concentrazione di bromelina da 0 a 20 mg di tirosina/100 g di carne e per un intervallo di tempo compreso tra 0 e 24 ore. I campioni sono stati analizzati e valutata la resa di marinatura, il pH, il colore e l'istologia. Successivamente, i campioni sono stati cotti a bagnomaria a 80 °C per 15 minuti, stabilizzati a 4 °C per 24 ore e successivamente sono

stati misurati i seguenti parametri: perdita di liquidi di cottura (*cooking loss*), pH, colore, durezza e istologia. Il tempo di marinatura (12-24 ore) e la concentrazione di bromelina (10-20 mg di tirosina/100 g di carne) hanno ridotto sia il pH che la durezza, aumentata la resa di marinatura e conferito un colore più chiaro alle bistecche marinate. Sebbene la refrigerazione non sia una temperatura ottimale per l'attività della bromelina, la durezza della carne è diminuita del 41%. Pertanto, l'uso di soluzioni a base di sottoprodotti di ananas arricchiti in bromelina ha consentito la valorizzazione di tagli di bistecca di valore commerciale modesto.

## **Introduzione**

Il presente lavoro si è proposto di ottimizzare gli effetti del processo di marinatura, utilizzando soluzioni a base di sottoprodotti d'ananas, arricchiti in bromelina (proteasi cisteinica), a diverse concentrazioni e tempi di contatto, sulle caratteristiche sensoriali (in particolare la durezza) di bistecche bovine ricavate dai tagli di magatello (noto anche come girello) e sottofesa, che sono considerate di basso valore commerciale a causa delle loro caratteristiche sensoriali. Il trattamento con pressione idrostatica si sta diffondendo nell'industria alimentare in quanto è considerato un trattamento stressogeno abiotico *green*, poiché attiva e potenzia varie attività enzimatiche senza ricorrere alle classiche procedure di estrazione che hanno impatto negativo sull'ambiente poiché richiedono l'uso di potenti solventi organici volatili e infiammabili.

## **Materiali**

### **Raccolta e preparazione dei campioni di carne**

I tagli di carne bovina magatello (noto anche come girello) e sottofesa (*silverside*) provenivano da animali nati, allevati, macellati, disossati, tagliati e confezionati sottovuoto in Polonia, secondo le pratiche commerciali standard dell'UE. Il trasporto in Portogallo è avvenuto in condizioni di refrigerazione (0–4 °C), dove sono stati nuovamente etichettati. Due tagli di carne bovina indipendenti sono stati ricavati dal *M. gluteo biceps* (sottofesa) e dal *M. semitendinosus* (girello) con peso rispettivamente di 4.715 g e 4.225 g, da bovini diversi e trasportati in condizioni di refrigerazione presso la Facoltà di Medicina Veterinaria, dell'Università di Lisbona, per l'esecuzione dei test. I test sono stati eseguiti a partire dal decimo giorno dopo la macellazione degli animali. Ogni taglio di bovino è stato tagliato in 16 bistecche con uno spessore di  $2,05 \pm 0,5$  cm e un peso di  $270,5 \pm 50$  g.

### **Produzione di polvere di bromelina da sottoprodotti di ananas**

I sottoprodotti di ananas, principalmente torsoli, sono stati forniti dalla società Campotec S.A. situata a Torres Vedras, nel Portogallo centro-occidentale. I torsoli di ananas, di circa 104,5 x 30 mm, sono stati conservati refrigerati a 5 °C per circa 3 ore prima del confezionamento in PA/PE-90 (buste per il sottovuoto), poi sigillati sottovuoto ottenendo l'85% di vuoto. I sottoprodotti confezionati sono stati stressati applicando un trattamento ad alta pressione (225 MPa per 8,5 min) (Santos et al., 2020b). I torsoli dopo il trattamento ad alta pressione sono stati conservati a bassa temperatura (5±1 °C) per 24 ore. In seguito, i campioni sono stati congelati a -80 °C e liofilizzati per 7 giorni a -94 °C e con una pressione da 0,2 a 0,09 mbar. Infine, 300 g di sottoprodotti di ananas liofilizzati sono stati macinati con un robot da cucina ad una velocità di 10.200 giri/min per 25 sec ottenendo il campione in polvere. L'attività enzimatica della bromelina contenuta nella polvere disidratata di ananas è stata quantificata ed ha mostrato una concentrazione di 9,33±0,29 mg di tirosina/grammo di prodotto liofilizzato (Chakraborty et al., 2014).

### **Marinatura**

Inizialmente è stata preparata una soluzione a base d'acqua con l'1% di sale marino purificato e conservata a temperatura di 4±1 °C per 3 ore per raggiungere la sua stabilizzazione. Ogni bistecca è stata immersa in un contenitore (23×16×5.5 cm); polvere di ananas con bromelina (tra 0 e 20 mg tirosina/100 g di carne) è stata aggiunta a 400 ml di soluzione; quindi, secondo il disegno sperimentale riportato in Tabella 1 sono stati preparati campioni in duplicato per ogni trattamento del disegno sperimentale. La carne è rimasta in contatto con la soluzione per un intervallo di tempo da 0 a 24 ore, a temperatura di refrigerazione 4±1 °C. Prima della marinatura tutti i campioni sono sottoposti a misurazione del peso, del pH e del colore. Le stesse misurazioni sono state effettuate al termine della marinatura per identificare e quantificare le variazioni apportate alle bistecche dal trattamento. Le bistecche dopo la marinatura, da cui sono stati raccolti anche i campioni per le analisi istologiche, sono state successivamente sigillate e confezionate in buste per il sottovuoto.

**Table 1.** Experimental design with coded and decoded values of independent variables (bromelain concentration and time of contact) for steak samples and dependent variables: pH, marination yield, cooking yield, color, and hardness. (C) means the central point.

Run	Coded Factors		Decoded Factors		pH			Marination Yield (%)	Cooking Yield (%)	Colour									Hardness Steak (N)
	Time	Concentration	Time (h)	Concentration (mg Tyrosine. 100 g <sup>-1</sup> Meat)	Brine	Marinated Steak	Cooked Steak			Initial			Marinated Steak			Cooked Steak			
										L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
8	0.00000	1.41421	12	20	4.69 ± 0.18	5.05 ± 0.01	5.83 ± 0.03	2.38 ± 0.37	69.31 ± 0.76	38.48 ± 1.12	23.57 ± 1.08	7.23 ± 0.76	51.24 ± 1.99	11.72 ± 1.35	4.27 ± 1.43	56.67 ± 1.48	7.72 ± 0.69	8.75 ± 0.68	32.54 ± 3.91
9 (C)	0.00000	0.00000	12	10	4.81 ± 0.04	5.11 ± 0.02	5.84 ± 0.03	2.68 ± 0.29	67.70 ± 0.25	38.20 ± 1.20	24.50 ± 1.28	7.48 ± 1.15	48.89 ± 2.23	12.92 ± 1.35	3.73 ± 0.60	56.80 ± 1.53	7.33 ± 0.47	8.83 ± 0.72	35.50 ± 4.70
2	-1.00000	1.00000	3.5	17	4.31 ± 0.03	5.29 ± 0.10	5.65 ± 0.03	1.48 ± 0.08	68.08 ± 0.49	38.27 ± 1.92	25.05 ± 1.58	7.17 ± 1.10	45.08 ± 1.41	15.01 ± 0.76	3.75 ± 0.54	54.51 ± 0.90	7.85 ± 0.29	8.82 ± 0.51	38.36 ± 3.19
4	1.00000	1.00000	20.5	17	4.60 ± 0.06	4.99 ± 0.05	5.73 ± 0.01	1.97 ± 0.46	68.23 ± 1.95	38.40 ± 0.82	24.37 ± 1.19	7.34 ± 0.72	49.90 ± 3.13	11.94 ± 1.58	5.93 ± 1.12	58.53 ± 0.78	6.83 ± 0.41	8.77 ± 0.32	30.35 ± 2.50
10 (C)	0.00000	0.00000	12	10	4.93 ± 0.01	5.18 ± 0.01	5.84 ± 0.03	3.53 ± 0.87	66.27 ± 0.05	38.91 ± 1.63	24.27 ± 2.18	7.33 ± 1.59	54.11 ± 4.02	11.27 ± 0.78	4.35 ± 1.91	55.90 ± 4.86	8.20 ± 1.84	10.01 ± 0.42	35.47 ± 4.40
7	0.00000	-1.41421	12	0	5.61 ± 0.05	5.39 ± 0.07	5.99 ± 0.03	3.58 ± 0.16	69.64 ± 0.84	39.23 ± 1.28	24.88 ± 1.37	7.86 ± 1.22	51.22 ± 2.30	12.72 ± 1.29	4.26 ± 0.40	55.98 ± 1.27	8.44 ± 0.69	10.73 ± 0.44	48.14 ± 4.99
5	-1.41421	0.00000	0	10	4.14 ± 0.03	5.34 ± 0.06	5.77 ± 0.03	0.07 ± 0.09	71.18 ± 1.98	37.52 ± 1.08	23.57 ± 0.68	5.87 ± 0.96	39.24 ± 0.51	21.21 ± 1.47	5.75 ± 0.72	50.65 ± 1.68	10.32 ± 1.33	9.57 ± 0.39	41.30 ± 8.58
6	1.41421	0.00000	24	10	4.86 ± 0.05	5.07 ± 0.06	5.81 ± 0.05	4.19 ± 0.42	63.13 ± 1.92	38.54 ± 1.66	25.71 ± 2.97	8.26 ± 2.55	52.11 ± 3.80	11.47 ± 0.68	5.18 ± 1.52	59.63 ± 0.93	6.42 ± 0.37	9.18 ± 0.32	36.16 ± 6.81
11 (C)	0.00000	0.00000	12	10	4.88 ± 0.01	5.12 ± 0.09	5.80 ± 0.04	2.95 ± 0.63	64.33 ± 0.95	39.30 ± 2.40	25.42 ± 2.59	8.46 ± 1.61	49.70 ± 6.45	13.55 ± 1.72	5.31 ± 1.51	59.45 ± 0.85	6.72 ± 0.26	9.42 ± 0.46	37.14 ± 11.02
12 (C)	0.00000	0.00000	12	10	4.89 ± 0.16	5.14 ± 0.02	5.81 ± 0.06	3.54 ± 0.74	66.44 ± 0.46	39.93 ± 0.90	25.25 ± 2.88	8.75 ± 1.63	53.60 ± 0.39	11.05 ± 1.92	4.60 ± 1.10	59.45 ± 1.93	6.54 ± 0.91	8.59 ± 0.65	37.03 ± 8.04
1	-1.00000	-1.00000	3.5	3	5.16 ± 0.03	5.34 ± 0.04	5.77 ± 0.08	2.01 ± 0.12	67.21 ± 0.29	39.61 ± 1.66	24.34 ± 1.63	7.22 ± 1.72	46.45 ± 0.51	16.03 ± 0.91	4.34 ± 0.89	55.56 ± 1.00	7.72 ± 0.44	9.80 ± 0.56	43.10 ± 7.60
3	1.00000	-1.00000	20.5	3	5.34 ± 0.06	5.21 ± 0.03	5.86 ± 0.01	3.97 ± 0.51	67.47 ± 0.76	38.64 ± 1.17	25.31 ± 1.46	7.73 ± 1.33	50.34 ± 3.80	11.93 ± 1.13	4.74 ± 0.97	58.60 ± 0.73	7.41 ± 0.94	10.25 ± 0.54	38.02 ± 7.83

Tabella 1: Disegno sperimentale adottato per la prova (da: Santos et al., 2020a).

### *Effetto della soluzione enzimatica sulle bistecche marinate*

Per valutare l'effetto nel tempo dell'aggiunta della soluzione di sottoprodotti di ananas arricchiti in bromelina sulle bistecche, sono state eseguite marinature di controllo senza l'aggiunta di polvere di ananas. Nei campioni di controllo al tempo 0, la bistecca è stata posta nel contenitore senza aggiunta di soluzione all'1% (p/p), mentre i campioni trattati per i tempi prescelti (3,5 h; 12 h, 20,5 h, e 24 h) sono stati immersi in una soluzione all'1% (p/p) senza l'aggiunta di polvere di ananas disidratata.

### **Cottura**

La cottura dei campioni, in sacchetti sottovuoto, ancora refrigerati, è stata effettuata immergendoli in un bagno termostato con acqua ad una temperatura di 80±1 °C per 15 minuti, raggiungendo la temperatura di 75±1 °C al cuore del prodotto. Successivamente le bistecche sono state raffreddate tramite immersione in un bagno di acqua e ghiaccio per 30-40 minuti, fino al raggiungimento di 4±1 °C al cuore del prodotto (Honikel, 1998). Le temperature sono state monitorate tramite termometri a termocoppia, per ottenere un

rilevamento rapido e accurato. In seguito alla cottura e al raffreddamento i campioni sono stati conservati per 24 ore a 4 °C per la stabilizzazione. I campioni sono stati nuovamente oggetto delle misurazioni di peso, pH e colore. Infine, è stata misurata la durezza e sono stati raccolti i campioni per le analisi istologiche.

## **Metodi analitici**

Ogni campione di bistecca sottoposto al trattamento è stato usato per analizzare la resa di marinatura, la resa di cottura, il pH, il colore, la consistenza e l'istologia. La deviazione standard nei risultati indica la variazione tra i due campioni di carne e le repliche analitiche.

### **pH**

Il pH è stato misurato tramite un pH-metro digitale calibrato precedentemente con soluzioni tamponi a pH 7 e 4. Sulla sonda del pH-metro è stata montata una lama per una più facile penetrazione della sonda nel campione. Il pH iniziale del campione è stato misurato 2 ore dopo l'apertura del sacchetto sottovuoto, mentre quello della soluzione enzimatica è stato misurato 3 ore dopo la sua preparazione. Dopo ciascun tempo di marinatura il pH è stato nuovamente misurato sia per le bistecche che per la soluzione. Infine, dopo la cottura (a 24 ore), le misurazioni del pH sono state effettuate in triplo su ciascun campione (ISO 2917:1999).

### **Resa di marinatura**

Per il calcolo della resa della marinatura le bistecche sono state pesate immediatamente dopo il taglio su una bilancia analitica (Sartorius A200S, Gottinga, Germania). Dopo il periodo di marinatura, i campioni sono stati rimossi dalla soluzione, asciugati con carta assorbente e pesati nuovamente.

La resa di marinatura (MY, *marination yield*) è stata calcolata tramite la seguente equazione:  $MY\% = (\text{peso della bistecca marinata} - \text{peso della bistecca cruda}) / \text{peso della bistecca cruda} \times 100$  (Honikel, 1998).

### **Resa di cottura**

Per la determinazione della resa di cottura, i campioni di carne sono stati pesati appena prima la cottura, così da avere il peso del campione crudo marinato. Una volta terminata la cottura i campioni sono stati stabilizzati a 4 °C per 24 ore e solamente dopo questo tempo

sono stati rimossi dai sacchetti per il sottovuoto ed asciugati ed infine pesati nuovamente per ottenere il peso del campione cotto.

La resa di cottura (CY, *cooking yield*) è stata calcolata con la seguente equazione:  $CY\% = [(\text{peso della bistecca cotta}/\text{peso della bistecca cruda marinata}) \times 100]$  (Honikel, 1998).

### **Colore**

Il colore è stato misurato sulla superficie dei campioni tramite colorimetro Minolta CR 300, (Konica Minolta, Osaka, Giappone) secondo il sistema CIELab ed utilizzando le coordinate L\* (luminosità), a\* (componente verde-rosso, con valori negativi per il verde e positivi per il rosso), b\* (componente blu-giallo, con valori negativi per il blu e positivi per il giallo) ([www.pce-italia.it](http://www.pce-italia.it)). L'apparecchio è stato calibrato con un riferimento ceramico bianco (illuminante standard D65). Il colore iniziale del campione è stato misurato due ore dopo l'apertura del sottovuoto; è stato poi misurato dopo i vari tempi di marinatura e 24 ore dopo la cottura. Il colore è stato misurato tre volte su ciascun campione e ogni valore è il risultato della media delle tre misurazioni. I risultati sono stati presentati come variazione ( $\Delta$ ) in relazione al colore iniziale dei campioni marinati, mentre per i campioni cotti, la variazione del colore è stata misurata in relazione al campione cotto non marinato.

### **Misurazioni della texture - Durezza**

La durezza dei campioni di carne -espressa come forza necessaria per tagliare un campione di carne perpendicolarmente al senso delle fibre- è stata analizzata tramite analizzatore TA XT plus (Stable Micro Systems, Surrey, UK), dotato di lama Warner-Bratzler (a forma di V) con spessore di 0,9 mm e apertura triangolare di 60 mm. I campioni sono stati tagliati in parallelepipedi di dimensioni standard (2 x 1 x 1 cm). L'analizzatore di consistenza è stato calibrato con una cella di carico da 5 kg. I pezzi di carne sono stati tagliati perpendicolarmente alle fibre muscolari longitudinali. La lama è stata premuta sulla carne, sia nel per-test che nel test, ad una velocità costante di 5 mm/s, e di 10 mm/s nel post-test. In questo modo è stata registrata la massima forza di taglio. La misurazione della durezza è stata ripetuta 20 volte su ciascun campione (James e Yang, 2012).

### **Analisi istologica**

Per questa analisi è stata raccolta una porzione di campione (2 x 2 x 1 cm) da ciascuna bistecca di controllo (bistecche crude) e trattata (dopo la marinatura e dopo la cottura). I campioni sono stati posti singolarmente in contenitori di plastica, contenenti formalina

neutra al 10%, fino all'esecuzione dell'analisi istologica. I tagli del campione avevano uno spessore massimo di 1 cm, per facilitare il fissaggio della formalina. Dopo il fissaggio, i campioni sono stati sottoposti alla tecnica di elaborazione istologica, che prevede la fissazione con formalina, inclusione in paraffina e colorazione con ematossilina ed eosina. I campioni posizionati in dei vetrini sono stati poi osservati al microscopio ottico, e le fotografie delle sezioni istologiche sono state fatte con una macchina fotografica digitale Olympus DP21 (Barekat e Soltanizadeh, 2018).

### **Analisi statistica e modello adottato**

I dati sperimentali sono stati analizzati statisticamente tramite il software Statistica TM v.8 (StatSoft, 2007). L'analisi dei dati è stata eseguita applicando la regressione multipla con un'equazione polinomiale di secondo ordine per ciascuna variabile dipendente analizzata (pH, resa di marinatura, resa di cottura, colore e durezza delle bistecche) e considerando come variabili indipendenti la concentrazione di bromelina nella soluzione di marinatura (mg tirosina/100 g di carne) e tempo di contatto (ore); i risultati sono stati visualizzati mediante grafico tridimensionale. L'adeguatezza del modello è stata verificata mediante analisi della varianza (ANOVA) e calcolando sia il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) che il coefficiente di determinazione aggiustato ( $Adj-R^2$ ). I confronti multipli tra le medie sono stati eseguiti applicando il test HSD (Honest Significant Difference) di Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **Risultati**

### ***Ottimizzazione dell'applicazione di sottoprodotti dell'ananas arricchiti in bromelina su bistecche marinate***

#### **pH**

L'aggiunta di quantità crescenti di bromelina alla soluzione di marinatura ha portato ad una diminuzione del pH, rendendo quindi la soluzione più acida. Il pH iniziale della bistecca invece, era 5,44. La metodologia di risposta superficiale ha descritto molto bene il cambiamento del pH, nel tempo alle diverse concentrazioni di bromelina addizionata alla soluzione. Secondo questa metodologia statistica, le variabili di tempo e concentrazione della bromelina sono risultate influenzare significativamente i valori del pH delle soluzioni di marinatura. Quelle con maggiore concentrazione di enzima hanno mostrato valori di pH più bassi (4,31-4,69), mentre concentrazioni di enzima più basse hanno mostrato valori di

pH più alti (5,49-5,67) indipendentemente dal tempo di marinatura. Le soluzioni con concentrazioni di bromelina  $\geq 10$  mg di tirosina/100 g di campione, hanno presentato valori di pH  $< 5$ .

Relativamente all'andamento del pH delle bistecche, sia la concentrazione dell'enzima che il tempo del trattamento hanno mostrato un effetto lineare negativo significativo, ossia quando la concentrazione di bromelina era bassa ed il tempo di immersione era più lungo ( $\geq 12$  ore) il pH della bistecca diminuiva. Campioni trattati con concentrazione di bromelina pari a 0, o con piccole quantità (3 mg di tirosina/100 g di carne), e marinati per poco tempo (3,5 ore), oppure campioni trattati con 10 mg di tirosina per un tempo molto breve ( $< 1$  ora), hanno invece mostrato valori di pH significativamente più alti, rispetto ai campioni marinati con soluzioni contenenti elevate concentrazioni di enzima (17-20 mg di tirosina/100 g di carne).

I valori di pH delle bistecche trattate, nel corso della marinatura, sono oscillati tra il valore di 4,99 e di 5,44 (con il valore massimo rilevato nei campioni non sottoposti a marinatura). I valori più bassi di pH ottenuti per i campioni sottoposti a marinatura sono risultati quelli dei campioni marinati in soluzioni contenenti 17 mg di tirosina/100 g di carne per 3,5 ore, che hanno raggiunto un valore di pH di 4,31, oppure quelli di bistecche che dopo un trattamento di 20,5 ore, hanno raggiunto valori di pH di 4,60.

I valori del pH delle bistecche dopo la cottura hanno mostrato un'oscillazione tra 5,65 e 5,99.

### **Resa di marinatura**

La resa di marinatura (MY, *marination yield*), nelle bistecche è risultata entro un range tra 0,07-4,19%. Solo la durata dell'immersione delle bistecche nelle soluzioni di marinatura ha mostrato un effetto lineare e positivo, cioè all'aumentare del tempo di immersione dei campioni nella soluzione è aumentata la resa di marinatura. Infatti, come evidenziato dalle analisi, tempi lunghi, compresi tra 20,5 e 24 ore, e concentrazioni di bromelina basse o intermedie (tra 0 e 10 mg di tirosina/100 g di carne) hanno aumentato la resa di marinatura delle bistecche; mentre tempi brevi (tra 0 e 3,5 ore) e concentrazioni di enzima intermedie o alte (tra 10 e 17 mg di tirosina/100 g di carne) hanno diminuito la resa di marinatura.

### **Resa di cottura**

Analizzando la resa di cottura, è emerso che le variabili oggetto di studio (concentrazione di bromelina e il tempo di trattamento) inserite nel modello statistico

prescelto non hanno evidenziato un effetto significativo sulle performance di cottura dei campioni ad eccezione del pH.

## **Colore**

Dal modello statistico applicato è emerso che il colore è significativamente influenzato dal tempo di immersione della bistecca nella soluzione di marinatura (tempo di marinatura), mentre la concentrazione della bromelina, non ha mostrato alcun effetto significativo sul colore. La variazione di colore, espressa come differenza tra il colore iniziale del campione e quello finale delle bistecche marinate e cotte, è risultata quindi dipendente dal tempo di marinatura. Il colore è stato espresso tramite tre parametri  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ed i risultati ottenuti sono riportati nella Figura 18.

I valori di variazione di  $L^*$  (luminosità) più alti nei campioni marinati sono stati ottenuti per i campioni marinati tra 12 e 20,5 ore; invece, per i campioni di bistecche cotte le maggiori variazioni di  $L^*$  sono state osservate nei campioni che erano stati marinati per 15 ore, indipendentemente dalla concentrazione di bromelina. Pertanto, tempi di marinatura >12 ore, con o senza l'aggiunta dell'enzima, hanno reso le bistecche più chiare/pallide dopo la cottura. Quindi si può affermare che il valore  $L^*$  è proporzionale al tempo di marinatura del campione, indipendentemente dalla concentrazione di bromelina nella soluzione di marinatura.

La variazione per il parametro  $a^*$  (rosso) ha mostrato valori significativamente più elevati (21,21) per concentrazioni di bromelina pari a 10 mg di tirosina/100 g di campione, con tempi di marinatura pari a 0 ore (no immersione in soluzione enzimatica). I campioni marinati in una soluzione con le stesse concentrazioni di bromelina (10 mg) ma per tempi più lunghi (24 ore), hanno invece mostrato una variazione di  $a^*$  più contenuta (11,47). In contrapposizione, dopo la cottura le bistecche non marinate avevano un valore di  $a^*$  pari a 10,32, mentre in campioni con i tempi di marinatura più lunghi (24 ore) e concentrazioni di bromelina pari a 10 mg hanno presentato variazioni di  $a^*$  molto più contenute (6,42). In conclusione, sono state osservate variazioni più elevate di  $a^*$  per tempi di marinatura più brevi, indipendentemente dalla concentrazione di bromelina nella soluzione di marinatura. Il parametro  $a^*$  è l'espressione della perdita dei pigmenti rossi della carne a causa della diminuzione della mioglobina. Quindi un campione con bassa variazione nel valore di  $a^*$  risulterà avere un colore rosso meno intenso rispetto ad un campione con un delta elevato nel valore di  $a^*$ .

La variazione per il parametro  $b^*$  (giallo) non ha presentato, invece, un trend ben definito applicando il modello statistico prescelto; le variazioni per tale indicatore sono risultate comprese tra 3,26 e 6,32 (dati grezzi: 3,73 mix - 5,93 max) per le bistecche marinate e tra 8,75 e 11,99 (dati grezzi: 8,58 mix-10,73 max) per quelle cotte; senza però mostrare differenze significative dovute al tempo di marinatura e alla concentrazione di bromelina presente nella soluzione di marinatura.

Il campione di bistecca con il tempo di marinatura più breve è quello che ha presentato la più alta variazione di a\* e un delta L\* più basso, presentando quindi un colore abbastanza simile a quello della bistecca cruda non trattata.

Il campione di bistecca con il tempo di marinatura più breve è quello che ha presentato la più alta variazione di a\* e un delta L\* più basso, presentando quindi un colore abbastanza simile a quello della bistecca cruda non trattata.

Time (h)	Concentration (mg Tyrosine. 100 g <sup>-1</sup> Meat)	Initial			Marinated Steak			Cooked Steak		
		L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
12	20	38.48	23.57	7.23	51.24	11.72	4.27	56.67	7.72	8.75
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.12	1.08	0.76	1.99	1.35	1.43	1.48	0.69	0.68
12	10	38.20	24.50	7.48	48.89	12.92	3.73	56.80	7.33	8.83
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.20	1.28	1.15	2.23	1.35	0.60	1.53	0.47	0.72
3.5	17	38.27	25.05	7.17	45.08	15.01	3.75	54.51	7.85	8.82
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.92	1.58	1.10	1.41	0.76	0.54	0.90	0.29	0.51
20.5	17	38.40	24.37	7.34	49.90	11.94	5.93	58.53	6.83	8.77
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.82	1.19	0.72	3.13	1.58	1.12	0.78	0.41	0.32
12	10	38.91	24.27	7.33	54.11	11.27	4.35	55.90	8.20	10.01
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.63	2.18	1.59	4.02	0.78	1.91	4.86	1.84	0.42
12	0	39.23	24.88	7.86	51.22	12.72	4.26	55.98	8.44	10.73
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.28	1.37	1.22	2.30	1.29	0.40	1.27	0.69	0.44
0	10	37.52	23.57	5.87	39.24	21.21	5.75	50.65	10.32	9.57
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.08	0.68	0.96	0.51	1.47	0.72	1.68	1.33	0.39
24	10	38.54	25.71	8.26	52.11	11.47	5.18	59.63	6.42	9.18
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.66	2.97	2.55	3.80	0.68	1.52	0.93	0.37	0.32
12	10	39.30	25.42	8.46	49.70	13.55	5.31	59.45	6.72	9.42
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		2.40	2.59	1.61	6.45	1.72	1.51	0.85	0.26	0.46
12	10	39.93	25.25	8.75	53.60	11.05	4.60	59.45	6.54	8.59
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.90	2.88	1.63	0.39	1.92	1.10	1.93	0.91	0.65
3.5	3	39.61	24.34	7.22	46.45	16.03	4.34	55.56	7.72	9.80
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.66	1.63	1.72	0.51	0.91	0.89	1.00	0.44	0.56
20.5	3	38.64	25.31	7.73	50.34	11.93	4.74	58.60	7.41	10.25
		±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.17	1.46	1.33	3.80	1.13	0.97	0.73	0.94	0.54

Figura 18: Variazione del colore della carne (non marinata, marinata e cotta) in funzione del tempo di trattamento in soluzione contenente bromelina (modificato da: Santos et al., 2020a).

### Texture - Durezza

Nella Figura 19, si può notare come il grado di durezza (espressa come N, cioè la forza di picco osservata durante la prima compressione) dipenda, in modo inversamente

proporzionale, dal tempo della marinatura alla quale le bistecche sono state sottoposte e dalla concentrazione di bromelina presente nella soluzione di marinatura.

Infatti, i campioni non marinati hanno presentato una durezza significativamente più elevata (41,30) rispetto alle bistecche marinate con stessa concentrazione (10 mg) di bromelina (35,50). Inoltre, bistecche marinate in una soluzione contenente alte concentrazioni di bromelina (17-20 mg di tirosina/100 g di carne) hanno mostrato minor durezza, sebbene anche marinature lunghe (>12 ore) ma con concentrazioni più basse di bromelina (3-10 mg) possano portare a risultati simili (Figura 19).

Time (h)	Concentration (mg Tyrosine. 100 g <sup>-1</sup> Meat)	Hardness Steak (N)
12	20	32.54 ± 3.91
12	10	35.50 ± 4.70
3.5	17	38.36 ± 3.19
20.5	17	30.35 ± 2.50
12	10	35.47 ± 4.40
12	0	48.14 ± 4.99
0	10	41.30 ± 8.58
24	10	36.16 ± 6.81
12	10	37.14 ± 11.02
12	10	37.03 ± 8.04
3.5	3	43.10 ± 7.60
20.5	3	38.02 ± 7.83

Figura 19: Durezza delle bistecche (N) in rapporto al tempo di marinatura e alla concentrazione di bromelina (modificato da: Santos et al., 2020a).

## Valutazione istologica

Nella Figura 20, sono riportate immagini di sezioni istologiche di campioni crudi e cotti di bistecche osservate al microscopio e fotografate con fotocamera digitale. Le fibre muscolari scheletriche sembrano essere maggiormente influenzate dal tempo di marinatura piuttosto che dalla concentrazione di bromelina. Infatti, le fibre muscolari scheletriche hanno subito una leggera degradazione con tempi brevi di marinatura (3,5 ore) ed una degradazione più intensa con tempi maggiori di marinatura (>12 ore), sebbene in quest'ultimo caso la concentrazione di bromelina fosse inferiore (10 mg di tirosina/100 g di carne), rispetto alla marinatura di 3,5 ore (17 mg di tirosina/100 g di carne).

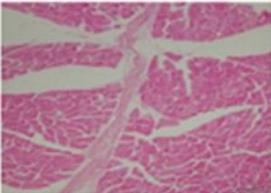
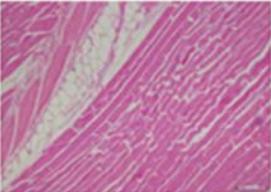
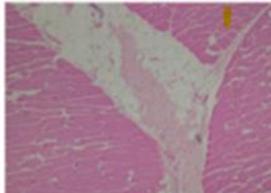
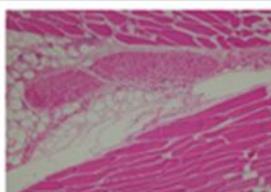
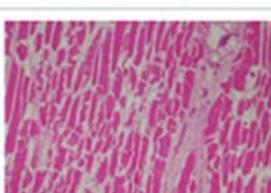
Campione	Concentrazione (mg di tirosina ogni 100 g di carne)	Tempo (ore)	Microfotografia	Descrizione qualitativa
Crudo	10	12		In questa microfotografia è visibile un moderato grado di disorganizzazione delle fibre muscolari scheletriche e un moderato grado di disorganizzazione delle fibre di collagene intermuscolari
	17	3,5		In questa microfotografia è visibile un leggero grado di disorganizzazione delle fibre muscolari scheletriche
		20,5		In questa microfotografia è visibile un moderato grado di disorganizzazione delle fibre di collagene intermuscolari e le fibre muscolari sono generalmente conservate
Cotto	20	12		In questa microfotografia è visibile un moderato grado di disorganizzazione delle fibre di collagene intermuscolari e le fibre muscolari sono gonfie
		12		In questa microfotografia è visibile un grave grado di disorganizzazione delle fibre muscolari scheletriche e una completa disorganizzazione delle fibre di collagene intermuscolari

Figura 20: Immagini delle analisi istologiche eseguite con microscopio ottico e riprese con fotocamera digitale in campioni crudi e cotti in funzione della concentrazione di bromelina (mg di tirosina/100 g di carne) e dei tempi di marinatura (ore) (modificato da: Santos et al., 2020a).

Il campione cotto, rispetto al campione crudo sia marinato che non marinato, ha mostrato una severa disorganizzazione delle fibre muscolari scheletriche causata dal trattamento termico. Per quanto riguarda invece le fibre collagene intermuscolari, hanno presentato un grado moderato di disorganizzazione, indipendentemente dal tempo di marinatura e concentrazione di bromelina. La completa disorganizzazione delle fibre collagene è stata osservata in campioni cotti, mentre non è emersa dall'osservazione dei campioni crudi, sottoposti alle stesse condizioni di marinatura. Pertanto, la disorganizzazione delle fibre muscolari scheletriche risulta maggiormente influenzata dai tempi di marinatura e in misura più contenuta dalle concentrazioni di bromelina. Infatti, dal confronto tra campioni sottoposti ad un tempo più lungo di marinatura (> 12 ore) ed una concentrazione di bromelina di 10 mg, e quelli sottoposti a tempi brevi di marinatura (3,5) con concentrazione di bromelina superiore (17 mg), il campione marinato per più tempo, anche se in una soluzione con più bassa concentrazione di bromelina, ha presentato un grado di disordine delle fibre muscolari scheletriche maggiore. Sebbene la concentrazione di bromelina incida meno rispetto al tempo di marinatura, anch'essa sortì un effetto notevole sui campioni visto che le fibre muscolari scheletriche di campioni marinati in soluzioni con alta concentrazione di bromelina sono risultate rigonfie, mentre quelle di campioni marinati con una minore concentrazione dell'enzima sono risultate pressoché simili a quelle di campioni crudi non marinati.

Per quanto riguarda invece, la disorganizzazione, cioè la degradazione, delle fibre collagene intermuscolari, questa è risultata influenzata solo dal trattamento termico e non dalla concentrazione enzimatica della soluzione di marinatura. In conclusione, più spinto sarà il trattamento termico e maggiore disorganizzazione caratterizzerà le fibre collagene intermuscolari del campione.

#### ***Effetto della soluzione senza bromelina in bistecche marinate***

La soluzione senza enzimi (soluzione di controllo), ha mostrato un valore di pH di 7,42, significativamente diverso dai valori di pH osservati nelle bistecche marinate e in quelle cotte (Figura 21). Il tempo (3,5 h, 12 h, 20,5 h, 24 h) ha mostrato invece, un effetto significativo sia sull'abbassamento del pH della bistecca marinata che sulla riduzione del pH della soluzione.

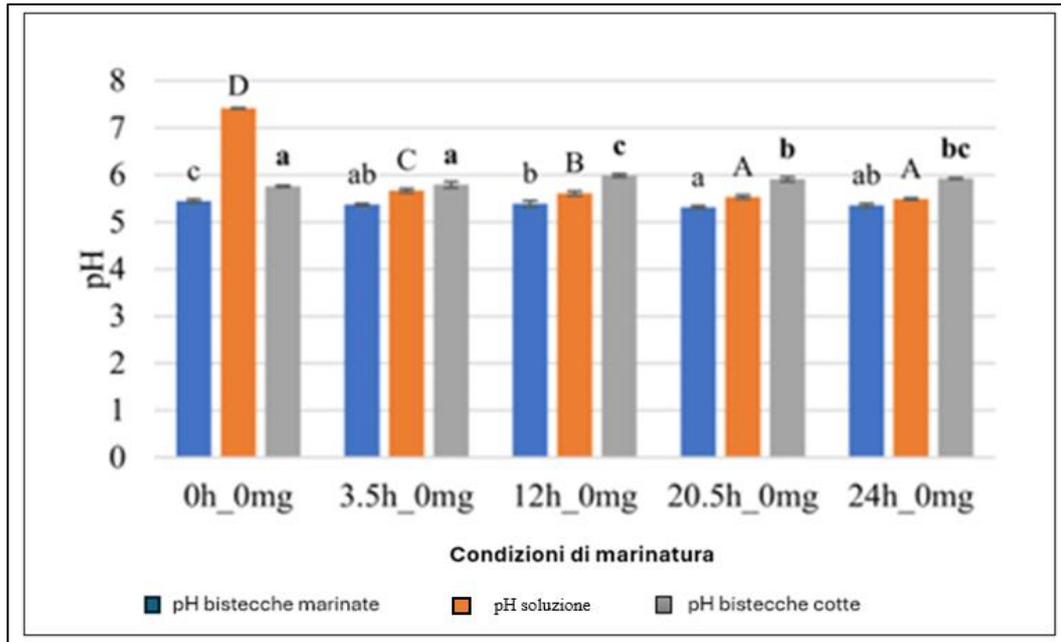


Figura 21: Effetto dell'aggiunta della soluzione senza bromelina sul pH della soluzione, bistecche marinate e bistecche cotte per tempi di contatto crescenti (modificato da: Santos et al., 2020a).

Per quanto riguarda invece l'effetto della soluzione di marinatura sulla resa di cottura, dalle analisi effettuate è emersa una resa alta per i campioni di controllo non marinati (82,04%) rispetto a quelli marinati. Il tempo di contatto tra i campioni e la soluzione senza bromelina ha comportato una diminuzione della resa di cottura, scesa a valori di 69,64-73,51%. La soluzione di marinatura ha inoltre avuto effetto sul colore, e più precisamente sui parametri  $L^*$  (luminosità) (Figura 22) e  $a^*$  (componente verde-rosso, valori negativi per il verde e positivi per il rosso) (Figura 23). Le analisi effettuate hanno evidenziato che bistecche non marinate presentavano i più bassi valori di  $L^*$  (38,14), rispetto ai campioni marinati per 20,5 ore che hanno fatto registrare i valori di luminosità più alti (52,45), entrambi senza aggiunta di enzimi. Pertanto, il parametro di luminosità  $L^*$  delle bistecche marinate è risultato significativamente influenzato dal tempo di marinatura. Dopo la cottura invece, il campione non marinato ha presentato un valore di  $L^*$  pari a 50,26, valore più basso di quello osservato nei campioni marinati per il tempo massimo di 24 ore (58,66). In conclusione, il parametro  $L^*$  è risultato più alto nei campioni cotti e precedentemente marinati per 20,5-24 ore, rispetto ai campioni con tempi di marinatura più brevi.

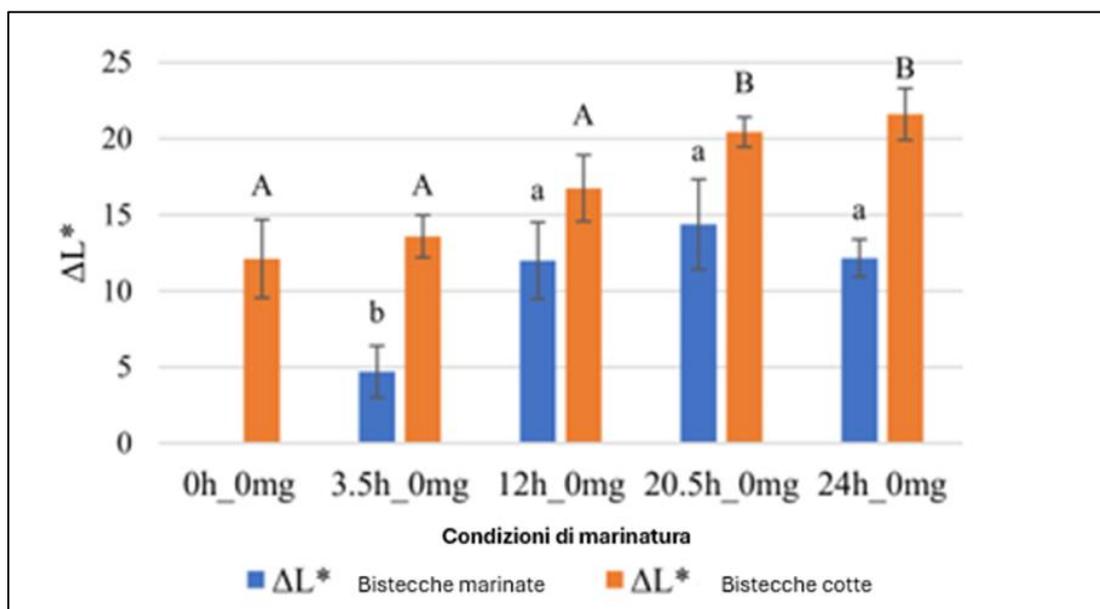


Figura 22: Effetto dell'aggiunta della soluzione di marinatura senza bromelina sul parametro L\* (luminosità) del colore di bistecche marinate e bistecche cotte per tempi di contatto crescenti (modificato da: Santos et al., 2020a).

Per quanto riguarda invece il parametro a\*, espressione del rosso, i campioni marinati hanno presentato valori significativamente più bassi per bistecche sottoposte a marinature con tempi superiori a 12 ore, mentre i campioni cotti hanno mostrato i valori più bassi di a\* per bistecche sottoposte a tempi di marinatura superiori alle 20,5 ore (Figura 23).

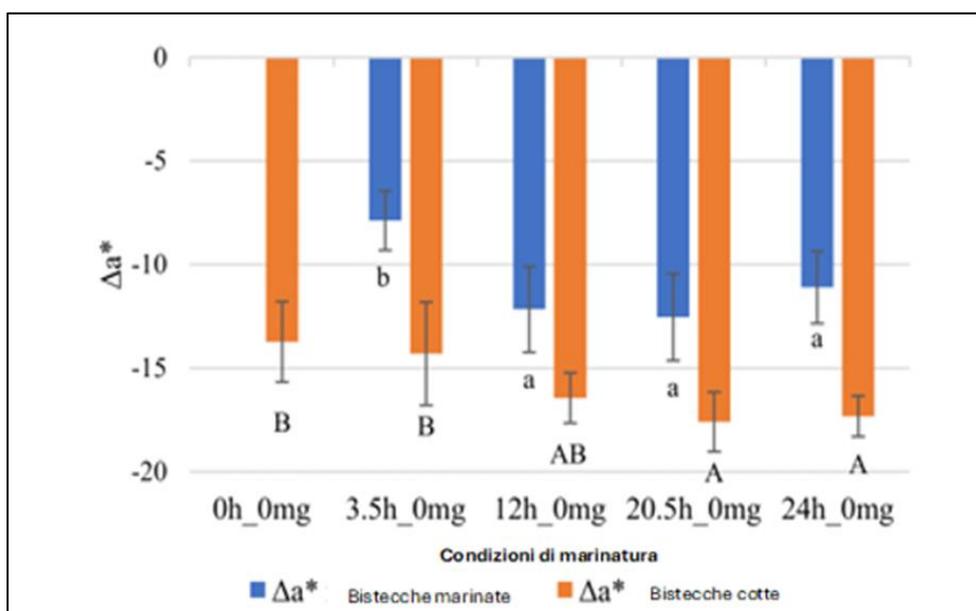


Figura 23: Effetto dell'aggiunta della soluzione di marinatura senza bromelina sul parametro a\* (rosso) del colore di bistecche marinate e bistecche cotte per tempi di contatto crescenti (modificato da: Santos et al., 2020a).

Relativamente all'effetto della durata del trattamento in soluzione di marinatura, sulla durezza (N) delle bistecche marinate in soluzione senza bromelina, le misurazioni hanno evidenziato che campioni marinati per 3,5 ore, 20,5 ore e 24 ore hanno mostrato una durezza significativamente minore, risultando quindi più teneri (Figura 24). Pertanto, l'utilizzo di soluzioni a base di acqua con l'1% di sale e con sottoprodotti di ananas disidratati con bromelina per marinare le carni risultano essere una pratica utile per ridurre la loro durezza.

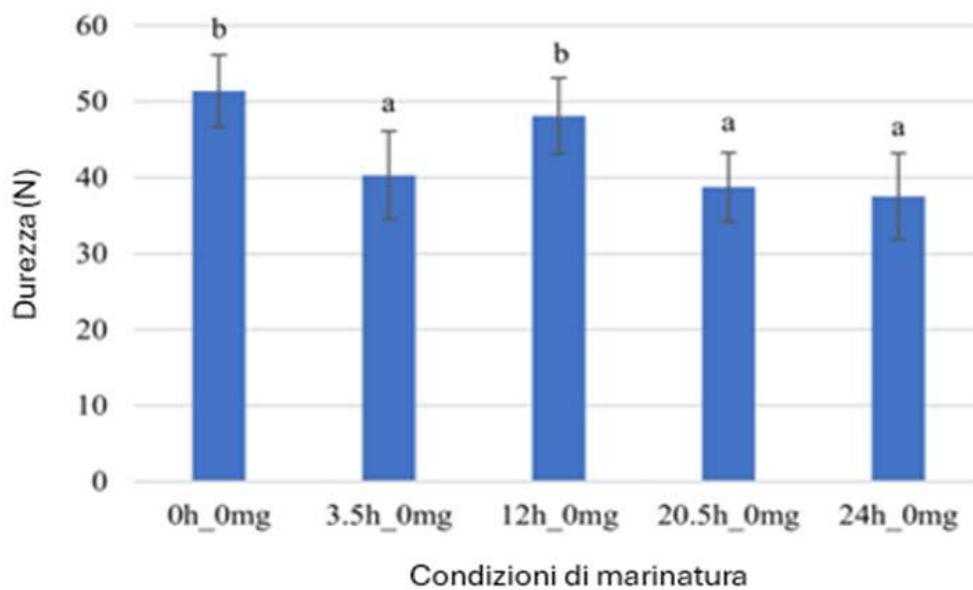


Figura 24: Effetto dell'aggiunta della soluzione di marinatura senza bromelina sulla durezza (N) di bistecche marinate per tempi di contatto crescenti (modificato da: Santos et al., 2020a).

## 4.2 Articolo n. 2:

Meat Science 180 (2021) 108563

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **Meat Science**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/meatsci](http://www.elsevier.com/locate/meatsci)





**Improving tenderness and quality of *M. biceps femoris* from older cows through concentrate feeding, zingibain protease and sous vide cooking**

Zahra B. Naqvi<sup>a,b,\*</sup>, Michael A. Campbell<sup>a,b</sup>, S. Latif<sup>b,c</sup>, Peter C. Thomson<sup>b,d</sup>, David M. McGill<sup>e</sup>, Robyn D. Warner<sup>e</sup>, Michael A. Friend<sup>f</sup>

<sup>a</sup> School of Animal and Veterinary Sciences, Charles Sturt University, Wagga Wagga, NSW 2678, Australia  
<sup>b</sup> Graham Centre for Agricultural Innovation, Albert Pugsley Place, Wagga Wagga, NSW 2678, Australia  
<sup>c</sup> NSW Department of Primary Industries, Wagga Wagga Agricultural Institute, Pine Gully Rd, Wagga Wagga, NSW 2650, Australia  
<sup>d</sup> School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, NSW 2006, Australia  
<sup>e</sup> Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, The University of Melbourne, Parkville, VIC 3010, Australia  
<sup>f</sup> Office of the Pro Vice-Chancellor (Research and Innovation) Charles Sturt University, Locked Bag 588, Wagga Wagga, NSW 2678, Australia

***Improving tenderness and quality of *M. biceps femoris* from older cows through concentrate feeding, zingibain protease and sous vide cooking.***

**Naqvi Z.B., Campbell M.A., Latif S., Thomson P.C., McGill D.M., Warner R.D., Friend M.A. (2021a). *Meat Science*, 180, 108563**

### Abstract

Il presente studio ha esaminato l'effetto della zingibaina, un enzima proteolitico presente nello zenzero, e della cottura sottovuoto sulla tenerezza e sulla capacità di ritenzione idrica del muscolo *biceps femoris* (BF; sottofesa) di 30 vacche di razza Angus (età media 6-7 anni), alimentate nel periodo di finissaggio con concentrati per 0, 28, 42 o 56 giorni. I campioni di muscolo BF sono stati cotti per 1, 8, 18 ore a 65 °C ed a 75 °C, senza alcun tipo di pretrattamento, dopo aver subito l'iniezione con una soluzione a base di sola acqua o con una soluzione contenente polvere di zenzero in concentrazione di 1 e 2 g/L, contenente zingibaina. Sui campioni sono stati valutati i seguenti parametri: perdite di cottura (*cooking loss*), contenuto totale di acqua (TWC, *total water content*), forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF, *Warner-Bratzler shear force*), contenuto in collagene e indice di frammentazione miofibrillare (MFI, *Myofibrillar Fragmentation Index*). I risultati hanno

rilevato interazioni significative tra la durata dell'alimentazione a base di concentrati nel finissaggio, iniezioni di polvere di zenzero, temperatura e tempo di cottura sui parametri qualitativi. La forza di taglio si è ridotta all'aumentare della concentrazione di zingibaina con cottura a 65 °C, ma una graduale diminuzione è stata osservata anche in caso di cottura a 75 °C. La solubilità del collagene e l'indice di frammentazione miofibrillare sono aumentati all'aumentare della concentrazione dell'enzima in campioni sottoposti a cottura a 65 °C. L'iniezione di zingibaina associata alla cottura sottovuoto hanno mostrato quindi un intenerimento delle proteine miofibrillari e del tessuto connettivo, contribuendo anche ad una maggiore solubilità del collagene nel muscolo bicipite femorale e ad una maggiore tenerezza del taglio oggetto di studio.

## **Introduzione**

Il presente lavoro si proponeva di valutare l'effetto combinato dell'iniezione di una soluzione di polvere di zenzero, contenente la proteasi zingibaina, e della cottura sottovuoto, sulla tenerezza e sulla capacità di ritenzione idrica del muscolo *biceps femoris* (sottofesa) prelevato da vacche di età avanzata alimentate con concentrati per periodi diversi durante la fase di finissaggio, precedente alla macellazione.

## **Materiali**

### **Scelta degli animali e dei regimi alimentari a base di concentrato**

80 bovini di razza Angus, di età compresa tra 6 e 7 anni, sono stati sottoposti alla fase di finissaggio ricevendo una dieta a base di concentrati per periodi diversi (0, 28, 42 e 56 giorni). I venti individui che non avevano ricevuto il concentrato (gruppo di controllo a 0 giorni) sono stati immediatamente avviati al mattatoio per la macellazione. Le restanti vacche sono state allocate in 12 box (50 x 8 m), ognuno ospitante 5 individui, destinate a ricevere l'alimentazione a base di concentrati per 3 diversi periodi (28, 42 e 56 gg). Il concentrato era composto da stoppie di grano (13% della razione totale), fieno d'orzo (11,9%), pellets premiscelati (70,8%) e farina di canola (5%). La razione per l'ingrasso è stata formulata per contenere circa il 15% di proteine grezze (CP, *crude protein*), il 40% circa di fibre neutre deterse (NDF, *neutral detergent fibre*) e una quantità minima di 10,5 MJ di energia metabolizzabile (ME, *metabolisable energy*)/kg di razione. Le vacche sono state gradualmente adattate alla nuova dieta ad alto contenuto energetico, per un periodo di 14 giorni, per ridurre il potenziale rischio di acidosi del ruminale ed evitare eventuali

problematiche nella digestione e assorbimento dei nutrienti. Il protocollo di adattamento consisteva inizialmente in un'alimentazione a base di 20% di concentrato e 80% di foraggi dal 1° al 4° giorno, successivamente, dal 5° al 9° giorno, l'alimentazione era bilanciata con il 60% di concentrato e il 40% di foraggio, ed infine l'ultima razione, somministrata per la durata prevista nella prova (28, 42 e 56 gg) era formulata con l'80% di concentrati e 20% di foraggio. La razione, somministrata *ad libitum* (a volontà), veniva distribuita due volte al giorno (alle 08.00 e alle 15.00). Tutto il bestiame aveva inoltre libero accesso all'acqua e all'ombra. Nel giorno in cui la dieta programmata terminava, i bovini venivano alimentati al mattino e quindi trasportati poi al mattatoio, dove venivano tenuti in stalla digiuni per una notte ma con accesso all'acqua. Le vacche sono state quindi tutte macellate utilizzando lo stordimento con pistola a proiettile captivo e successiva stimolazione elettrica per facilitare il dissanguamento; successivamente una sonda per rilevare la condizione di rigidità è stata applicata durante la fase di scuoiatura.

Per il presente studio la parte esterna piatta del muscolo bicipite femorale di 30 carcasse, scelte tra quelle che ricevevano alimentazione a base di concentrati per tempi diversi: è stata sottoposta a campionamento del muscolo, 6 carcasse appartenevano ai gruppi alimentati nel finissaggio con concentrati per 0, 28 e 56 giorni, mentre 12 campioni di muscolo sono stati selezionati tra le carcasse di vacche alimentate con concentrato per 42 giorni. Il bicipite femorale è stato rimosso da un solo lato di ciascuna carcassa, 24 ore dopo la macellazione, poi confezionato sottovuoto e trasportato al laboratorio universitario per le analisi. Tutti i muscoli sono stati sottoposti ad una frollatura di 14 giorni a 4 °C e successivamente congelati a -20 °C fino alle successive analisi.

### **Trattamento con iniezione di polvere di zenzero**

Per questo studio è stata utilizzata una polvere di zenzero disponibile in commercio (DigestEasy). L'uso di polvere di zenzero garantisce una minore variabilità nell'attività proteasica rispetto all'uso di estratti grezzi di radice di zenzero fresco, che presentano invece una variabilità maggiore e una concentrazione sconosciuta dei composti attivi (Ha et al., 2012). La purezza dell'enzima zingibaina presente nella polvere di zenzero è stata valutata analizzando i campioni tramite elettroforesi SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Prima di utilizzare la soluzione di polvere di zenzero contenente zingibaina, sono stati condotti studi preliminari per identificare quale fosse la concentrazione più corretta di enzima ed il volume di iniezione da utilizzare per prova sperimentale. Inizialmente, una serie di concentrazioni dal 0,25 g/L a 20 g/L sono

state preparate ed iniettate nel muscolo BF, in quantità comprese tra il 10-20% del peso iniziale del campione, tramite specifico ago (BD PercisionGlide, 1,2 mm × 38 mm) collegato ad una siringa monouso da 20 mL (Terumo Australia Pty Ltd). Successivamente all'iniezione della soluzione contenente zingibaina, è stata misurata la forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF). I risultati ottenuti dalla misurazione hanno mostrato che la concentrazione di enzima di 1 e 2 g/L iniettata in quantità pari al 16% del peso del campione ha evidenziato una tenerezza migliore; pertanto, queste due concentrazioni sono state quindi utilizzate per la presente sperimentazione. La soluzione a base di polvere di zenzero (GP, Ginger Powder) è stata preparata dissolvendo 1 g/L e 2 g/L di polvere in acqua fredda. I muscoli sono stati scongelati a 4 °C per 48 ore. Dopo aver rimosso tutto il grasso superficiale, è stato misurato il pH tramite pH-metro (TPS-WP-80) collegato ad un elettrodo a gel (Ionode IJ 44) e una sonda di compensazione della temperatura (TPS Pty Ltd., Australia), in tre punti distinti in ciascuna sezione del muscolo. Il pH-metro è stato calibrato a 25 °C con soluzioni tampone a pH 4 e 7. Il muscolo BF è stato poi tagliato in quattro pezzi uguali ed assegnato casualmente ad uno di quattro trattamenti di iniezione:

- Iniezione con 1 g/L di GP;
- Iniezione con 2 g/L di GP;
- Iniezione di sola acqua (WO, *water only*);
- Nessuna iniezione (NI, *no injection*).

Ogni campione di carne è stato pesato per calcolare l'esatto volume di iniezione (in misura del 16% del peso iniziale del campione). Le iniezioni sono state effettuate in punti equidistanti del muscolo e con volume uniforme (3-4 mL di soluzione per sito di iniezione). Il peso post-iniezione è stato poi registrato per calcolare l'aumento in percentuale del peso rispetto a quello prima dell'iniezione (differenza del peso prima e dopo l'iniezione su peso iniziale prima dell'iniezione X 100). Dopo il trattamento, i campioni sono stati sigillati sottovuoto e conservati a 4 °C per 24 ore. Dopo questo periodo i campioni sono stati rimossi dal sacchetto ed è stato misurato il pH. Dopo l'asciugatura dell'umidità superficiale con carta assorbente è stata registrata la percentuale di perdita di peso dopo l'iniezione. Infine, sono stati prelevati da ciascun muscolo campioni del peso di 5 g, per la misurazione dell'MFI (Myofibrillar Fragmentation Index) e campioni del peso di 25 g per la misurazione del contenuto totale di collagene. I campioni sono stati quindi conservati congelati a -20 °C fino all'esecuzione delle analisi.

## **Preparazione del campione e trattamento termico**

Ogni pezzo di carne trattato con iniezione è stato diviso in tre campioni, ognuno del peso medio di  $158 \pm 16$  g, e questi sono assegnati in modo casuale ai tre tempi di cottura di 1 h, 8 h e 18 h. L'intero muscolo BF è stato quindi assegnato in modo casuale ad una delle due temperature di cottura (65 e 75 °C), per un totale di 15 campioni di muscolo BF per ogni temperatura di cottura. Tutti i campioni di carne sono stati etichettati, confezionati sottovuoto e quindi cotti a 65 °C e 75 °C in due distinti bagnomaria (fusionChef, Julabo Diamond XL, Germania). La temperatura interna del campione durante la cottura è stata monitorata inserendo una sonda fino al cuore del campione di carne. Tutti i campioni sono stati cotti sottovuoto in base alla temperatura e al tempo assegnati ai vari lotti considerando tutte le combinazioni di trattamento in ciascun lotto. Dopo la cottura, i sacchetti sono stati raffreddati in bagno di ghiaccio per 15 minuti, poi aperti con cura per poter raccogliere il liquido rilasciato dalla carne (perdite di cottura, CL, *cooking loss*) in provette da 15 mL, conservate poi a -20 °C, per poter misurare la quantità di collagene termosolubile. In seguito, ogni campione è stato sotto-campionato per calcolare il contenuto di acqua totale (3-5 g) e la forza di taglio o WBSF (60-70 g), ma prima dell'analisi della forza di taglio i campioni sono stati mantenuti per 12 ore (*overnight*) a 4 °C. Il peso di ogni campione è stato misurato prima e dopo la cottura per calcolare la percentuale di perdite di cottura (CL). Il contenuto totale di acqua (TWC, *total water content*) dei campioni di carne cruda e cotta è stato misurato tramite il rapporto tra la differenza del peso del campione prima della cottura e del campione dopo la cottura con il peso del campione prima della cottura (Naqvi et al., 2021b). Le misurazioni della consistenza sono state condotte utilizzando il metodo WBSF (*Warner-Bratzler shear force*) modificato (De Huidobro et al., 2005). Ogni campione è stato tagliato in sei sottocampioni (1,0 altezza  $\times$  1,0 larghezza  $\times$  5,0 lunghezza cm). Il WBSF è stato misurato con un analizzatore della consistenza TA.XT-plus 100C (Stable Micro Systems, Surrey, UK) utilizzando una lama a V ed una cella di carico da 50 kg (Stable Micro Systems, Surrey, Regno Unito). I parametri utilizzati per i test sono stati: velocità di *pre-test* 3,0 mm/sec, velocità di *test* 1,0 mm/sec, velocità di *post-test* 3,0 mm/sec e la distanza di discesa era di 30,0 mm (variabile tra 25 e 35 mm). I campioni sono stati posizionati con il loro centro sotto la lama e sono stati orientati in modo che la lama fosse perpendicolare alla direzione delle fibre (De Huidobro et al., 2005).

### **Indice di Frammentazione Miofibrillare (MFI)**

L'indice di frammentazione miofibrillare dei campioni di muscolo BF crudi, dopo 24 ore di trattamento con iniezione di soluzione enzimatica, è stato misurato tramite il seguente procedimento. I campioni di carne sono stati inizialmente omogenizzati (Ultra-Turrax T-25, IKA, Germania) a 19.000 giri/min con un buffer freddo contenente HCl 0,1 M, EDTA (di-sodio) 1 mM e fosfato di potassio 25 mM e con pH 7. L'omogenizzato ottenuto è stato poi filtrato, con un filtro a maglie da 1 x 1 mm, ed il filtrato ottenuto è stato centrifugato a 1000 giri/min per 10 minuti a 4 °C ed i pellets di miofibrille precipitati sono stati poi risospesi nel buffer e l'intero procedimento è stato ripetuto due volte. La concentrazione proteica della sospensione finale è stata determinata tramite il test Bradford. La concentrazione proteica finale di 0,5 mg/mL è stata utilizzata per misurare l'assorbanza a 540 nm in triplicato ed il valore medio è stato poi moltiplicato per 150 per poter calcolare l'Indice di Frammentazione Miofibrillare (Naqvi et al., 2021b).

### **Il contenuto totale del collagene**

Il contenuto totale di collagene nei campioni di carne cruda, prima del trattamento di iniezione con soluzione contenente zingibaina, è stato determinato approssimando la quantità di idrossiprolina contenuta e utilizzando il metodo dell'Association of Official Agricultural Chemists (AOAC, 2000). Per ogni campione di carne, la concentrazione di idrossiprolina è stata misurata in doppio in 100 mg di polvere di carne liofilizzata. La quantità di collagene totale è stata calcolata con la seguente formula:  $[\text{Idrossiprolina} \times (7,25/1000) / (\text{peso della carne liofilizzata}/250)]$  ed espressa in mg di idrossiprolina/g di carne liofilizzata (Naqvi et al., 2021b).

### **Il contenuto di collagene termosolubile**

La quantità di collagene termosolubile è stata misurata nel liquido delle perdite di cottura, a partire dalla concentrazione di idrossiprolina ed utilizzando un fattore di conversione pari a 7,14. La quantità di collagene nel liquido delle perdite di cottura è stata moltiplicata per il volume totale del liquido rilasciato durante la cottura e il collagene solubile è stato espresso come mg/g di carne (Christensen et al., 2013).

### **Analisi statistica**

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando un modello lineare misto applicando il metodo REML (Restricted Maximum Likelihood) tramite il “pacchetto nlme”

di R v.3.5.2 (R Core Team, 2020). Per WBSF, perdite di cottura, contenuto totale di acqua e contenuto di collagene solubile, gli effetti fissi sono stati la durata dell'alimentazione a base di concentrati nel finissaggio, il trattamento di iniezione, la temperatura di cottura e il tempo di cottura, mentre gli effetti casuali sono stati il lotto di cottura, la carcassa entro lotto e la posizione all'interno della carcassa. Relativamente al contenuto totale di collagene e l'Indice di Frammentazione Miofibrillare della carne cruda come effetti fissi sono stati utilizzati la durata dell'alimentazione a base di concentrati nel finissaggio, trattamento di iniezione e l'effetto casuale, mentre gli effetti random sono stati la carcassa e la posizione all'interno della carcassa. La trasformazione logaritmica è stata applicata per eseguire l'analisi dei dati del WBSF e del contenuto di collagene e sulla base dell'analisi dei residui, alcuni outlier sono stati rimossi.

Nel modello lineare sono stati inseriti sia effetti principali che le interazioni fino al terzo grado, eliminando le interazioni non significative per ottenere il modello finale. Le medie stimate delle variabili analizzate mediante trasformazione logaritmica, sono state nuovamente trasformate nella scala originale per la presentazione dei risultati; i confronti multipli tra le medie sono stati eseguiti utilizzando il test LSD protetta di Fisher (Least Significant Difference;  $p < 0,05$ ).

## **Risultati e discussione**

Per valutare la purezza dell'enzima zingibaina presente nella polvere di zenzero questa è stata sottoposta ad elettroforesi SDS-PAGE. La tecnica SDS-PAGE ha evidenziato una parziale purezza della zingibaina: una banda presente nella soluzione di polvere di zenzero sottoposta ad elettroforesi è risultata avere un peso molecolare di 29 kDa, corrispondente a quello proprio della proteasi zingibaina (Ha et al., 2012), sebbene in altre indagini sia stata anche segnalata in un estratto di zenzero grezzo anche la presenza di una cisteina-proteasi con pesi molecolari di 29 e 31 kDa (Su et al., 2009).

### **Variazione di peso e pH associata all'iniezione di soluzione con zingibaina**

L'aumento di peso medio del campione successivamente all'iniezione con solo acqua, o di soluzione con 1 g/L o 2 g/L di polvere di zenzero è stato stimato del  $13\% \pm 2,7\%$ , in tutti i campioni. Dopo la conservazione dei campioni a 4 °C per 24 ore in sacchetti sottovuoto è stata registrata una perdita di peso del  $8,4\% \pm 2,5$ ), associata alla parziale fuoriuscita della soluzione iniettata nella carne nel sacchetto del sottovuoto. Il pH dei

campioni non è risultato influenzato né dal trattamento di iniezione e né dalla concentrazione di zingibaina in essa presente; infatti, il valore medio di pH dei muscoli BF è stato  $5,61\pm 0,03$  (prima dell'iniezione) e  $5,59\pm 0,03$  (24 ore dopo l'iniezione).

### Contenuto totale di collagene

Il contenuto totale di collagene del muscolo BF è risultato simile, cioè senza differenze significative, nei muscoli ottenuti dal lato sinistro ( $13,7\pm 0,65$ ) e destro ( $12,5\pm 0,65$ ) della carcassa. È stato osservato invece, un effetto significativo della durata dell'alimentazione a base di concentrati nel finissaggio sul contenuto totale di collagene del muscolo delle vacche oggetto di indagine, come mostrato nella Figura 25.

Le vacche sottoposte ad un regime alimentare con concentrato prima della macellazione sono risultati avere un contenuto di collagene inferiore; questo potrebbe essere dovuto al maggior turnover delle proteine muscolari, o all'aumento delle dimensioni delle fibre muscolari e conseguente diminuzione relativa del tessuto connettivo, come già osservato da Archile-Contreras et al. (2010). Quindi, una maggiore deposizione di proteine miofibrillari, dovuta da un'alimentazione a base di concentrati nella fase di finissaggio, determina una diminuzione relativa del collagene, sebbene in realtà non si tratti di una vera diminuzione ma di una diluizione in quanto il tessuto connettivo resta invariato.

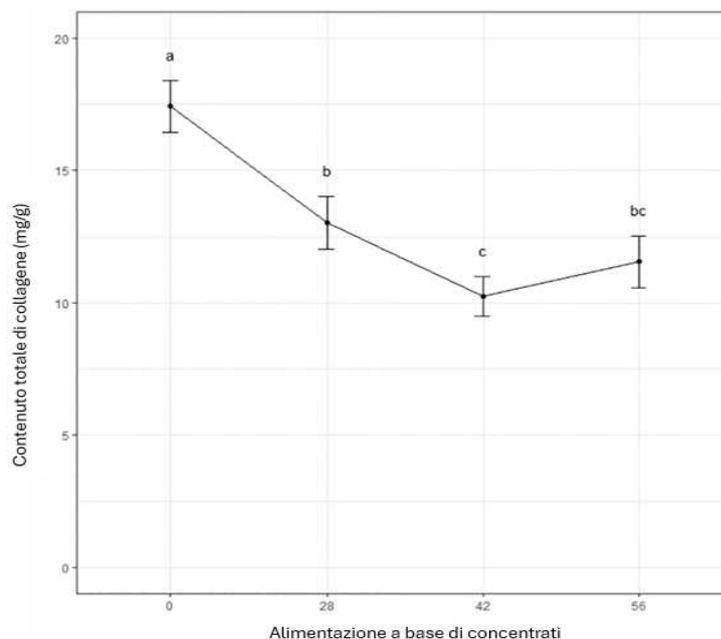


Figura 25: Effetto della durata dell'alimentazione a base di concentrati nel periodo di finissaggio (0, 28, 42 e 56 gg) sul contenuto totale di collagene (mg/g di sostanza secca) del muscolo bicipite femorale crudo (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

### Indice di Frammentazione Miofibrillare (MFI)

L'MFI è un indicatore della degradazione delle proteine miofibrillari nella banda I del sarcomero. Elevati valori di MFI sono stati associati ad una maggiore tenerezza e quindi anche ad una riduzione della forza di taglio (Cruz et al., 2020). Il presente studio ha rilevato al microscopio elettronico che l'MFI è aumentato proporzionalmente all'aumentare della concentrazione di zingibaina nella soluzione iniettata in carne cruda. È stata evidenziata una maggiore frammentazione delle mioproteine (titina) presenti nelle bande I sarcomeriche, rispetto alla frammentazione osservata nei campioni iniettati con solo acqua o campioni che non avevano subito alcun tipo di iniezione (Figura 26), come già riportato in precedenti indagini da altri autori (Anderson e Parrish, 1989; Boyer-Berri e Greaser, 1998).

	NI	WO	1 g/L	2 g/L
MFI	139.6 <sup>a</sup> ± 15.68	147.1 <sup>ab</sup> ± 15.68	150.2 <sup>b</sup> ± 15.68	153.7 <sup>b</sup> ± 15.68

Figura 26: Effetto del trattamento di iniezione (NI=nessuna iniezione, WO = iniezione di sola acqua e di soluzione con 1 g/L e 2 g/L di GP) sull'Indice di Frammentazione Miofibrillare (MFI) del muscolo bicipite femorale crudo (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

### Forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF)

Sono state identificate differenze significative nel test WBSF tra i campioni di controllo senza iniezione e quelli iniettati con soluzione contenente zingibaina, e tra quelli sottoposti a temperature e tempi di cottura diversi. La forza di taglio è risultata inferiore nei campioni di muscolo sottoposti ad iniezione rispetto a quella osservata nei campioni che non avevano ricevuto il trattamento di controllo (senza trattamento, NI) o le cui carni erano state sottoposte a trattamento con l'iniezione di sola acqua (WO). Maggiori riduzioni sono state evidenziate nei campioni trattati con soluzioni di zingibaina alla concentrazione di 2 g /L, rispetto a quelli trattati con 1 g/L di zingibaina nella soluzione iniettata. Tali riduzioni sono state influenzate anche dalla temperatura di cottura, come indicato dalla significativa interazione "trattamento di iniezione × temperatura di cottura" (Figura 27) e anche dal tempo di cottura, come indicato dalla significativa interazione "trattamento di iniezione × tempo di cottura" (Figura 28). Anche altri ricercatori hanno osservato in vitelloni di razza Frisona che campioni di muscolo pettorale profondo marinati o iniettati con estratti di zenzero al 5% di concentrazione mostravano una significativa diminuzione della forza di taglio da 64 N a 40 N (Moon, 2018).

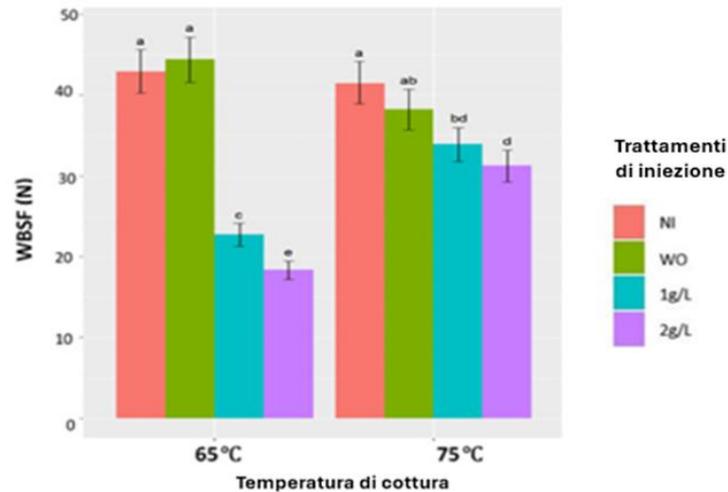


Figura 27: Effetto del trattamento di iniezione e della temperatura di cottura sulla forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF) del muscolo bicipite femorale (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

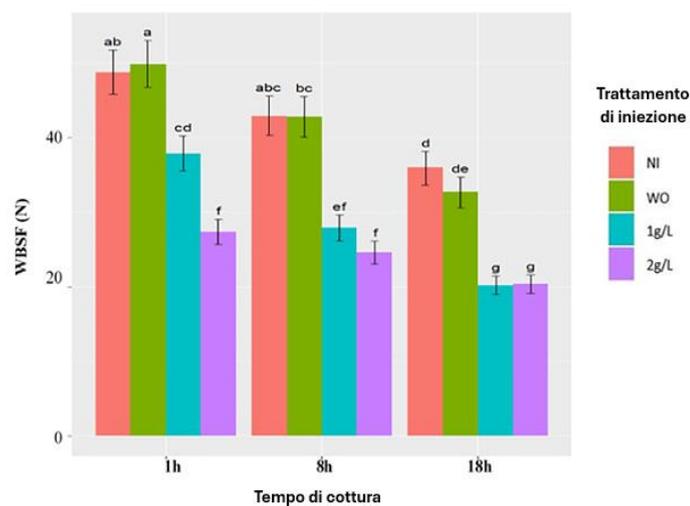


Figura 28: Effetto del trattamento di iniezione e del tempo di cottura sulla forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF) del muscolo bicipite femorale (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

Altro studio condotto sul muscolo bicipite femorale campionato da bufali ha evidenziato una riduzione lineare della forza di taglio all'aumentare della concentrazione dell'estratto di ginger, dallo 0%, 3%, 5% fino al 7% (Naveena e Mendiratta, 2004).

Il presente studio ha inoltre evidenziato l'effetto della temperatura e del tempo di cottura nel ridurre l'WBSF, ovvero la durezza, sia nei campioni di controllo che in quelli sottoposti ad iniezione di zingibaina. Una significativa riduzione della WBSF è stata registrata nei campioni iniettati con zingibaina e cotti a 65 °C, mentre quelli iniettati e sottoposti a temperatura di 75 °C hanno evidenziato una minore riduzione della forza di taglio (Figura

27). Questo effetto potrebbe essere imputabile alla attività e stabilità dell'enzima zingibaina che è massima con temperature comprese tra 60-65 °C (Ha et al., 2012).

I risultati ottenuti hanno mostrato una sola interazione a tre fattori significativa, ossia “temperatura di cottura x tempo di cottura x durata della somministrazione del concentrato” sulla forza di taglio. Lo studio ha infatti evidenziato che campioni di carne di bovini alimentati con concentrato per un periodo di 42 giorni e sottoposti alla cottura per 18 ore rispettivamente a 65 °C e 75 °C, sono risultati avere entrambi valori di WBSF più bassi (Figura 29). Il calo maggiore della WBSF è stato quello osservato in seguito all'aumento del tempo di cottura, da 1 ora a 18 ore, nei campioni di controllo cotti a 75 °C, la forza di taglio è scesa da  $54,2 \pm 6,47$  N a  $22,8 \pm 2,69$  N (Figura 29).

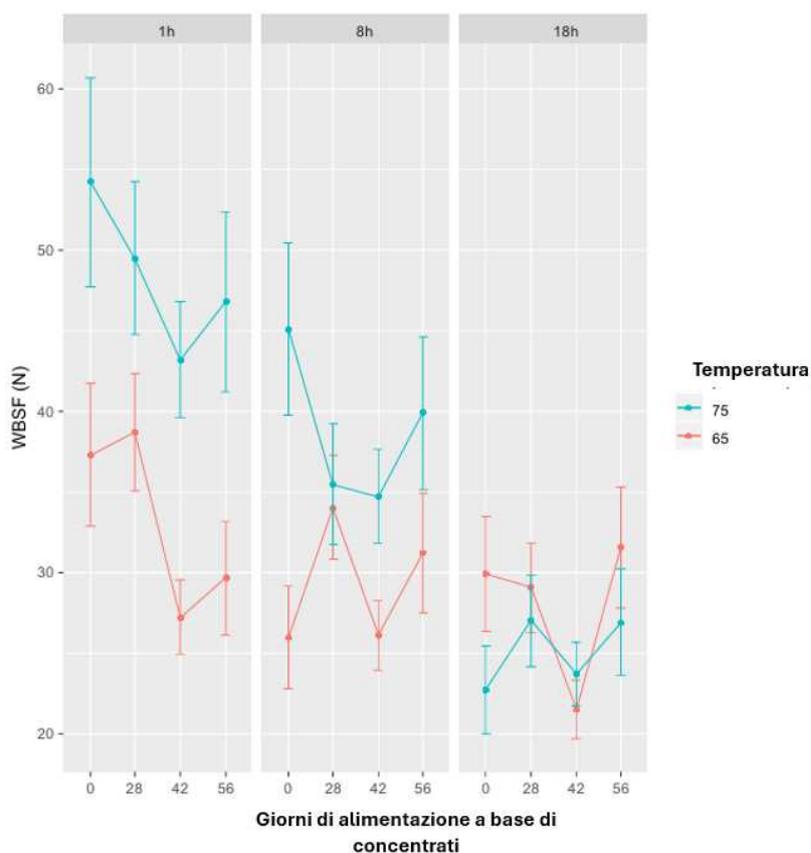


Figura 29: Effetto della durata dell'alimentazione a base di concentrati nel periodo di finissaggio (0, 28, 42 e 56 gg) sulla forza di taglio Warner-Bratzler (WBSF) del muscolo bicipite femorale cotto a 65 °C e 75 °C (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

Quindi somministrando a vacche di età avanzata, nella fase di finissaggio precedente alla macellazione, una dieta a base di concentrati energetici è possibile migliorare la qualità della carne, che acquisisce maggiore tenerezza, e quindi aumentare il valore commerciale delle loro carcasse.

## Collagene solubile

Dalla presente indagine è emerso che il contenuto di collagene termosolubile dei campioni analizzati, non è stato influenzato dalla durata del periodo di alimentazione a base di concentrati somministrati alle vacche durante la fase di finissaggio.

Il contenuto in collagene termosolubile, misurato nel liquido delle perdite di cottura (*cooking loss*) di muscoli BF di vacche di età avanzata, è invece aumentato nei campioni sottoposti ad iniezione con soluzione di polvere di zenzero contenente zingibaina in concentrazione di 2 g/L, passando da 0,22 mg/g dei campioni non sottoposti ad iniezione, a 0,39 mg/g di carne (Figura 30).

	NI	WO	1 g/L	2 g/L
<b>Collagene solubile (mg/g di carne)</b>	<b>0.22<sup>a</sup> ± 0.05</b>	<b>0.28<sup>ab</sup> ± 0.06</b>	<b>0.42<sup>c</sup> ± 0.10</b>	<b>0.39<sup>bc</sup> ± 0.09</b>

Figura 30: Effetto del trattamento di iniezione con soluzione di polvere di zenzero contenente zingibaina alle varie concentrazioni sul collagene solubile (mg/g di carne) misurato nei liquidi delle perdite di cottura rilasciati durante la cottura del muscolo bicipite femorale (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

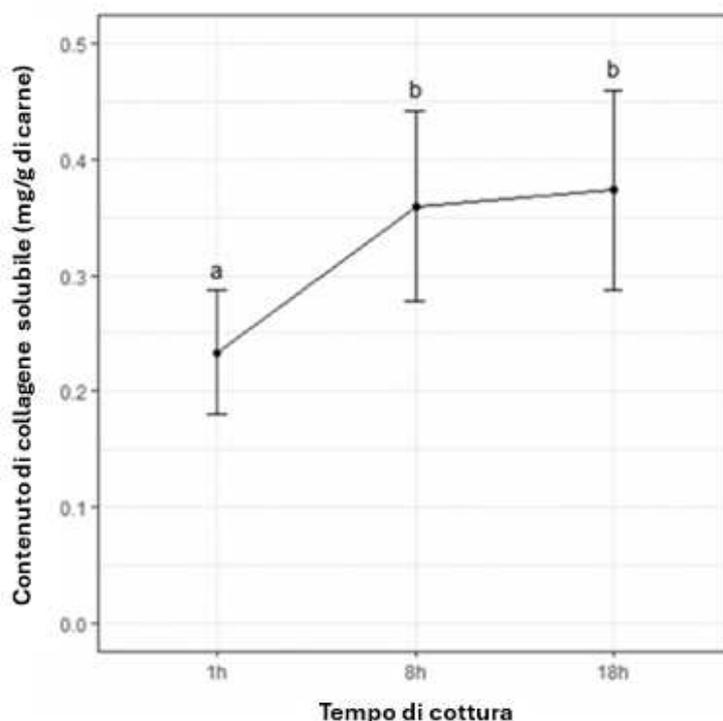


Figura 31: Effetto del tempo di cottura (1 h, 8 h, 18 h) sul collagene solubile (mg/g di carne) misurato nei liquidi delle perdite di cottura del muscolo bicipite femorale (modificato da: Naqvi et al., 2021a).

Il tenore in collagene termosolubile non è stato invece influenzato dalla temperatura di cottura, presentando valori medi di 0,26 mg/g nei campioni sottoposti a cottura a 65 °C e di 0,38 mg/g nei campioni sottoposti a cottura a 75 °C. La solubilità del collagene è stata invece significativamente condizionata dalla durata del trattamento di cottura, aumentando da 0,26±0,068 mg/g di carne nei campioni sottoposti a cottura per 1 ora, a 0,38±0,125 mg/g di carne nei campioni cotti sottovuoto per 18 ore (Figura 31), confermando quanto riportato già osservato in precedenti indagini in cui venivano riportati gli effetti della cottura sottovuoto a bassa temperatura e lunga durata sulla denaturazione del collagene con conseguente retrazione del tessuto connettivo e gelatinizzazione del collagene (Latorre et al., 2019).

### Contenuto totale di acqua e perdite di cottura

Il contenuto totale di acqua (TWC, *total water content*) dei muscoli BF crudi non trattati è risultato pari 75,39±0,29%. Dalle analisi effettuate è emerso che sia il TWC che le CL (*cooking loss*, perdite di cottura) dei campioni cotti sono stati influenzati dalla temperatura e dal tempo di cottura. In particolare, si è verificato un aumento delle CL e una diminuzione del TWC a seguito sia dell'aumento della temperatura che del tempo di cottura (Figura 32).

	65 °C			75 °C		
	1 h	8 h	18 h	1 h	8 h	18 h
Cooking loss (%)	32.3 <sup>a</sup>	39.3 <sup>b</sup>	41.3 <sup>c</sup>	43.3 <sup>d</sup>	47.0 <sup>e</sup>	47.3 <sup>e</sup>
TWC (%)	67.7 <sup>a</sup>	64.9 <sup>b</sup>	65.8 <sup>c</sup>	62.7 <sup>d</sup>	60.8 <sup>e</sup>	61.3 <sup>e</sup>

Figura 32: Effetto della temperatura e del tempo di cottura sulle perdite di cottura (*cooking loss*, %) e sul contenuto di acqua totale (TWC, %) del muscolo bicipite femorale (BP) (da: Naqvi et al., 2021a).

Tuttavia, non sono state osservate differenze significative per CL e TWC nei campioni sottoposti a 75 °C per un tempo di 8 e 18 ore. L'aumentare delle CL giustifica la riduzione del TWC del muscolo in seguito alla denaturazione delle proteine miofibrillari indotta dall'aumento del calore applicato durante la cottura. La quantità maggiore di acqua nel muscolo è presente a livello muscolare nelle miofibrille, tra i miofilamenti e tra le miofibrille ed il sarcolemma (Huff e Lonergan, 2005) che, denaturandosi con il trattamento termico applicato, portano al restringimento del muscolo e alla fuoriuscita dell'acqua in esso contenuta, con la contemporanea solubilizzazione del collagene (Purslow et al., 2016;

Vaskoska et al., 2021). Queste modificazioni strutturali indotte dal trattamento termico sul muscolo sono quindi responsabili dell'aumento delle perdite di cottura osservate.

Da questo studio sono emerse interazioni significative tra i fattori che influenzano il TWC e il CL: “tempo di cottura × trattamento di iniezione”, “tempo di cottura × durata del periodo di finissaggio con concentrati” e “trattamento di iniezione × durata del periodo di finissaggio con concentrati”. L'interazione “temperatura di cottura × trattamento di iniezione” ha evidenziato che campioni non sottoposti ad iniezione e trattati termicamente ad una temperatura di 65 °C hanno fatto registrare minori perdite di cottura (CL) e minore contenuto di acqua totale (TWC) rispetto ai campioni di carne sottoposti ad iniezione della soluzione di controllo e ai campioni trattati con le due diverse concentrazioni di zingibaina (Figura 33). Il maggior contenuto totale di acqua (TWC) è stato confermato anche dalla maggiore succosità di tutti i campioni iniettati e cotti a 65 °C rispetto a quelli che non avevano subito il trattamento di iniezione (NI) e cotti alla stessa temperatura. Con la cottura a 75 °C, è stato invece osservato un marcato aumento delle perdite di cottura (CL) ed una diminuzione del TWC in tutti i campioni iniettati rispetto ai campioni di controllo (NI) (Figura 33). L'aumento delle perdite da cottura in tutti i campioni sottoposti ad iniezione, indipendentemente dalla temperatura di cottura applicata, potrebbe essere la conseguenza della rottura meccanica del muscolo causata dalle inoculazioni multiple, che hanno comportato un'eccessiva presenza di acqua, che non riuscendo a rimanere intrappolata nella struttura muscolare, fuoriesce da questa durante la cottura.

	Temperatura di cottura	Trattamento di iniezione			
		NI	WO	1 g/L	2 g/L
Cooking loss (%)	65 °C	33.0 <sup>a</sup>	39.0 <sup>c</sup>	39.5 <sup>c</sup>	39.2 <sup>c</sup>
	75 °C	41.7 <sup>b</sup>	46.7 <sup>d</sup>	46.7 <sup>d</sup>	48.0 <sup>e</sup>
TWC (%)	65 °C	65.3 <sup>a</sup>	66.4 <sup>c</sup>	66.2 <sup>c</sup>	66.7 <sup>c</sup>
	75 °C	62.0 <sup>b</sup>	61.5 <sup>bd</sup>	61.1 <sup>d</sup>	61.7 <sup>bd</sup>

Figura 33: Effetto del trattamento di iniezione (NI = nessuna iniezione, WO = iniezione di sola acqua e di soluzione con 1 g/L GP e 2 g/L GP) e della temperatura di cottura (65 °C, 75 °C) sulle perdite di cottura (CL %) e sul contenuto totale di acqua (TWC, %) del bicipite femorale (da: Naqvi et al., 2021a).

## CAPITOLO 5. CONCLUSIONI

In base all'analisi dei due casi studio presentati, è possibile trarre alcune conclusioni sull'utilizzo di proteasi vegetali esogene nel processo di frollatura della carne.

La frollatura della carne, come già spiegato, è il processo di stagionatura della carne finalizzato a renderla più tenera e saporita. Il metodo tradizionale prevede il mantenimento della carcassa in una camera fredda, a temperature tra i 2 e i 5°C, per un periodo tra 7 e 21 giorni. La necessità di lunghi periodi di frollatura e l'elevata domanda di carne sul mercato hanno spinto l'industria a sviluppare nuovi metodi che riducano questo tempo, al fine di soddisfare le esigenze dei consumatori. Tra i metodi più innovativi per velocizzare l'intenerimento della carne e ottenere risultati più omogenei, vi è l'utilizzo di enzimi.

Dal mondo vegetale sono disponibili una vasta gamma di enzimi utilizzabili nei vari processi industriali; esempi sono la bromelina, estratta dall'ananas, e la zingibaina, derivata dallo zenzero, enzimi noti per la loro capacità di intenerire la carne, utilizzati in soluzioni di marinatura in cui la carne viene immersa o iniettata direttamente con l'ausilio di aghi.

La marinatura è una pratica da tempo conosciuta, ma oggi il processo di marinatura si è evoluto e prevede l'impiego di soluzioni contenenti enzimi che agiscono direttamente sul prodotto in combinazione con vari fattori, tra cui la concentrazione dell'enzima, il tempo di esposizione e la temperatura di cottura, che hanno effetti sul pH, sul colore, sulla succosità e sulla tenerezza della carne.

I due studi precedentemente analizzati sono focalizzati sull'uso di enzimi vegetali presenti nelle soluzioni di marinatura per apportare modificazioni significative alla carne. Sebbene l'attività dei due enzimi non sia identica, entrambi agiscono principalmente sulle proteine miofibrillari e sul collagene. La bromelina agisce prevalentemente sulle proteine miofibrillari e sul collagene ma può portare ad una eccessiva tenerezza e ad una consistenza pastosa della carne. Al contrario, la zingibaina agisce maggiormente sul collagene, con un'azione più delicata e mirata, con effetti positivi sulla succosità e sul sapore della carne.

Nel primo studio, sull'uso della bromelina, è stato osservato che la durata della marinatura, dalle 12 alle 24 ore, in una soluzione con bromelina (in concentrazioni tra 10 e 20 mg di tirosina/100 g di carne) riduce sia il pH (da 5,44 a 4,31 con la concentrazione più alta di enzima e un tempo di 3,5 ore) che la durezza della carne (da 41,30 N in campioni non marinati a 35,50 N in quelli marinati in una soluzione con 10 mg/g di bromelina).

Il secondo studio, relativo all'iniezione di zingibaina in campioni di carne, ha mostrato che la somministrazione di una dieta a base di concentrati a vacche di età avanzata prima

della macellazione, in combinazione con l'iniezione di una soluzione di zingibaina, sola acqua o nessuna iniezione, hanno effetto sulle predite di cottura, contenuto di acqua totale, e soprattutto sulla durezza della carne, quantità di collagene e indice di frammentazione miofibrillare (MFI). In particolare, l'MFI è aumentato proporzionalmente alla concentrazione di zingibaina iniettata, con una diminuzione della durezza quando il campione era sottoposto a cottura per 18 ore a 65°C per favorire l'attività enzimatica. La maggiore variazione della durezza è stata registrata nei campioni cotti a 75°C da 1 a 18 ore, passando da un valore di 54,2±6,47 N a 22,8±2,69 N. Anche la quantità di collagene solubile è aumentata proporzionalmente alla concentrazione di enzima iniettato, mentre le perdite di cottura sono risultate correlate con il contenuto di acqua totale nel campione di carne, comprensiva della quantità di soluzione iniettata per il trattamento.

Una volta stabiliti i limiti di impiego della quantità di enzimi esogeni da utilizzare, dovrà essere valutata l'esistenza di limiti di legge riguardo l'uso di tali enzimi nell'industria alimentare ed eventuali modifiche nella fase di commercializzazione del prodotto carneo crudo o trasformato. All'attualità, la denominazione del prodotto carneo trattato con enzimi vegetali non potrà essere quella di "carne fresca" ma dovrebbe essere commercializzato come "carne preparata" secondo il Regolamento (CE) N. 853/2004, Allegato I, di cui sono riportate le definizioni:

*1.10: "carni fresche": carni che non hanno subito alcun trattamento salvo la refrigerazione, il congelamento o la surgelazione, comprese quelle confezionate sottovuoto o in atmosfera controllata;*

*1.15: "preparazioni di carni": carni fresche, incluse le carni ridotte in frammenti, che hanno subito un'aggiunta di prodotti alimentari, condimenti o additivi o trattamenti non sufficienti a modificare la struttura muscolo-fibrosa interna della carne e ad eliminare quindi le caratteristiche delle carni fresche.*

Pertanto, è auspicabile che l'EFSA ed i suoi Esperti valutino e revisionino le definizioni del Regolamento (CE) N. 853/2004, e che si esprimano con un'opinione scientifica sugli eventuali rischi a cui viene esposta la carne fresca trattata con enzimi esogeni di origine vegetale, garantendo comunque la qualità del prodotto e la sicurezza del consumatore.

In conclusione, serviranno ulteriori studi scientifici e innovazioni di processo in questo settore per poter arrivare a migliorare la tenerezza della carne, che resta uno degli attributi sensoriali più importanti per il moderno consumatore.

## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Amri E., Mamboya F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104.

Anderson T., Parrish F. Jr. (1989). Postmortem degradation of titin and nebulin of beef steaks varying in tenderness. *Journal of Food Science*, 54(3), 748-749.

AOAC. (2000). Official methods of analysis: AOAC International, Rockville, MD, USA.

Appling R.D, Anthony-Chaill S.J., Mathews C.K. 2017. *Biochimica, Molecole e metabolismo*. Pearson Italia, Torino.

Archile-Contreras A.C., Mandell I.B., Purslow P.P. (2010). Disparity of dietary effects on collagen characteristics and toughness between two beef muscles. *Meat Science*, 86(2), 491-497.

Azmi S.I., Kumar P., Sharma N., Sazili A.Q., Lee S., Fitry M.R. (2023). Application of Plant Proteases in Meat Tenderization: Recent Trends and Future Prospects. *Foods*, 12, 1336.

Barekat S., Soltanizadeh N. (2018). Effects of Ultrasound on Microstructure and Enzyme Penetration in Beef Longissimus lumborum Muscle. *Food Bioprocess Technology*, 11, 680-693.

Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P. (2014). Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(8), 1012-1031.

Bolumar T., Enneking M., Toepfl S., Heinz V. (2013). New developments in shockwave technology intended for meat tenderization: Opportunities and challenges. A review. *Meat Science*, 95(4), 931-939.

Boyer-Berri C., Greaser M.L. (1998). Effect of postmortem storage on the Z-line region of titin in bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 76(4), 1034-1044.

Cardenas F.C., Olivera D.F. (2016). Texture Changes in Meat during Storage. *Reference Module in Food Sciences*, 1-5. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.03294-7.

Chakraborty S., Rao P.S., Mishra H.N. (2014). Effect of pH on Enzyme inactivation kinetics in high-pressure processed pineapple (*Ananas comosus* L.) puree using response surface methodology. *Food Bioprocess Technology*, 7, 3629–3645.

Chaurasiya R.S., Sakhare P.Z., Bhaskar N., Hebbar H.U. (2015). Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization *Journal of food science and technology*, 52, 3870-3880.

Christensen L., Ertbjerg P., Løje H., Risbo J., van den Berg F. W. J., Christensen M. (2013). Relationship between meat toughness and properties of connective tissue from cows and

young bulls heat treated at low temperatures for prolonged times. *Meat Science*, 93(4), 787-795.

Cruz P.L., Panno P.H.C., Giannotti J.D.G., de Carvalho R.V., Roberto C.D. (2020). Effect of proteases from ginger rhizome on the fragmentation of myofibrils and tenderness of chicken breast. *LWT - Food Science and Technology*, 120, 108921.

De Huidobro F.R., Miguel E., Blázquez B., Onega E. (2005). A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69(3), 527-536.

Ha M., Bekhit A.E.D.A., Carne A., Hopkins D.L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry*, 134(1), 95-105.

Honikel K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447-457.

Honikel K.O. (2014). *Conversion of Muscle to Meat: Glycolysis*. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2nd edition, Academic Press, Oxford, UK.

Hopkins D.L., Taylor R.G. (2004). *Post-mortem Muscle Proteolysis and Meat Tenderness*. In: *Muscle Development of Livestock Animals: physiology, genetics and meat quality*. CAB International Digital Library, Eds. te Pas M.F.W, Everts M.E., Haagsman H.P., pag. 363-388.

Huff-Lonergan E., Lonergan S.M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.

ISO 2917:1999. Meat and Meat Products Measurement of pH (Reference Method); *International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland*.

James B.J., Yang S.W. (2012). Effect of cooking method on the toughness of bovine M. Semitendinosus. *International Journal of Food Engineering*, 8(2), article 19. DOI: 10.1515/1556-3758.2762.

Kemp M.C., Parr T. (2012). Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. *Meat Science*, 92(3), 252-259.

Latorre M.E., Palacio M.I., Velazquez D.E., Purslow P.P. (2019). Specific effects on strength and heat stability of intramuscular connective tissue during long time low temperature cooking. *Meat Science*, 153, 109-116.

Lawrie R.A., Ledward D. (2006). *Lawrie's meat science*. Woodhead Publishing, Sawston, UK.

MacLaren D., Morton J. (2019). *Biochimica metabolica dello sport e dell'esercizio fisico*. Edi-Ermes editore, Milano.

Mandhusankha G.D.M.P., Thilakarathna R.C.N. (2021). Meat tenderization mechanism and the impact of plant exogenous proteases. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(2), February 2021, 102967. DOI: 10.1016/j.arabjc.2020.102967.

Moon S.S. (2018). Effect of proteolytic enzymes and ginger extract on tenderization of m. Pectoralis profundus from Holstein steer. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(1), 143-151.

Naqvi Z.B., Campbell M.A., Latif S., Thomson P.C., McGill D.M., Warner R.D, Friend M.A. (2021a). Improving tenderness and quality of M. biceps femoris from older cows through concentrate feeding, zingibain protease and sous vide cooking. *Meat Science*, 180, 108563.

Naqvi Z.B., Thomson P.C., Ha M., Campbell M.A., McGill D.M., Friend M.A., Warner R.D. (2021b). Effect of sous vide cooking and ageing on tenderness and water-holding capacity of low-value beef muscles from young and older animals. *Meat Science*, 175, 108435.

Naveena B.M., Mendiratta S. K. (2004). The tenderization of buffalo meat using ginger extract. *Journal of Muscle Foods*, 15(4), 235-244.

Naveena B.M., Mendiratta S.K., Anjaneyulu A.S.R. (2004). Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus Roxb* (Kachri) and *Zingiber officinale roscoe* (Ginger rhizome). *Meat Science*, 68(3), 363-369.

Nitsawang S, Hatti-Kaul R., Kanasawud P. (2006). Purification of papain from *Carica papaya latex*: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1103–1107.

Nowak D. (2011). Enzymes in Tenderization of Meat – The System of Calpains and Other Systems – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 61(4), 231-237.

Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentandreu M.A. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science*, 74(1), 44-58.

Patent KR101372321B1 (2012). Raw meat ripening method and frozen meat defrosting method. South Korea. <https://patents.google.com/patent/KR101372321B1/en>

Purslow P.P., Oiseth S., Hughes J., Warner R.D. (2016). The structural basis of cooking loss in beef: Variations with temperature and ageing. *Food Research International*, 89(1), 739-748.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing, version 3.5.2. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Ramanathan R., Mafi G.G., Yoder L., Perry M., Pfeiffer M., VanOverbeke D.L., Maheswarappa N.B. (2020). *Biochemical changes of postmortem meat during the aging process and strategies to improve the meat quality*. In: *Meat Quality Analysis - Advanced*

*Evaluation Methods, Techniques, and Technologies*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pag. 67-80.

Ramli A.N.M., Manas N.H.A., Hamid A.A.A., Hamid H.A., Illias R.M. (2018). Comparative structural analysis of fruit and stem bromelain from *Ananas comosus*. *Food Chemistry*, 266, 183-191.

Sadava D., Hillis D.H., Heller H.C., Hacker S. (2020). *La nuova biologia.blu* - Seconda edizione, Ed. Zanichelli, Bologna.

Santos D.I., Fraqueza M.J., Pissarra H., Saraiva J.A., Vicente A.A., Moldão-Martins M. (2020a). Optimization of the Effect of Pineapple By-Products Enhanced in Bromelain by Hydrostatic Pressure on the Texture and Overall Quality of Silverside Beef Cut. *Foods*, 9, 1752.

Santos D.I., Pinto C.A., Corrêa-Filho L.C., Saraiva J.A., Vicente A.A., Moldão-Martins M.E. (2020b). Effect of moderate hydrostatic pressures on the enzymatic activity and bioactive composition of pineapple by-products. *Journal of Food Processing Engineering*, 45(7), 13537.

Sjaastad Ø.V., Sand O., Hove K. (2010). *Fisiologia degli animali domestici*, Edizione a cura di Tamanini C., Casa Editrice Ambrosiana - Zanichelli Editore, Rozzano (MI).

StatSoft (2007). Statistica TM - Data Analysis Software System, version 8. StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA

Su H.P., Huang M.J., Wang H.T. (2009). Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7), 1178-1185.

Thompson E.H., Wolf I.D., Allen C.E. (1973). Ginger rhizome: A new source of proteolytic enzyme. *Food Science*, 38(4), 652-655.

Vaskoska R., Vénien A., Ha M., White J.D., Unnithan R.R., Astruc T., Warner R.D. (2021). Thermal denaturation of proteins in the muscle fibre and connective tissue from bovine muscles composed of type I (masseter) or type II (cutaneous trunci) fibres: DSC and FTIR microspectroscopy study. *Food Chemistry*, 343, 128544.

Warner R.D., Wheeler T.L., Ha M., Li X., Bekhit A.E.D., Morton J., Vaskoska R., Dunshea F.R., Liu R., Purslow P., Zhang W. (2022). Meat tenderness: advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. *Meat Science*, 185, 108657

## **SITOGRAFIA**

[https://istologia.unige.it/tessuto\\_connettivo](https://istologia.unige.it/tessuto_connettivo)

<https://www.my-personaltrainer.it>

<https://www.chimica-online.it>

<https://www.medicinadiprecisione.unicampania.it/attachments/category/71/Muscolo%20scheletrico%20e%20contrazione%20muscolare.pdf>

<https://moodle2.units.it>

<https://it.wikipedia.org/wiki/Caspasi>

<https://www.treccani.it/enciclopedia/enzima>

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei dedicare questo elaborato a tutti coloro che mi hanno accompagnato in questo percorso.

In primis, desidero ringraziare la mia relatrice, la professoressa Marina Pasquini, per la disponibilità, pazienza e soprattutto la professionalità che ha messo a mia disposizione per la realizzazione di questa tesi. I suoi consigli e rassicurazioni mi hanno aiutato a superare le difficoltà e a portare a termine questo lavoro.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, che con i loro sacrifici e rinunce hanno permesso tutto ciò. Spero e credo siate fieri di me. Un grazie non basta. Vi devo tutto.

Un enorme grazie va alla mia ragazza, che è stata sempre al mio fianco, soprattutto nei momenti più difficili, donandomi amore e comprensione. Mi hai insegnato il significato di impegno, responsabilità e serietà. Questo traguardo è in parte anche tuo.

Un grazie di cuore a mia sorella, per tutti i consigli che mi ha sempre dato. Sei sempre stata un punto di riferimento.

Ai miei nonni, che mi sono sempre stati vicini, con il loro affetto e sostegno.

Agli amici di sempre e a quelli conosciuti in questo percorso, per aver contribuito con la loro presenza alla mia crescita personale.

Un grazie a Francesco, che è stato un compagno di studi fantastico, ma soprattutto un amico, sempre disponibile ad ascoltarmi e a sostenermi durante tutto questo percorso. Avrei voluto continuare gli studi con te al mio fianco, ma sono sicuro che le nostre strade si incroceranno ancora.