

Alimenti e monossido di carbonio

di Cristian Bernardi

Abstract

The use of carbon monoxide (CO) in the packaging of meat and fish has generated considerable debate. CO is a colourless, odourless and tasteless gas; it is generated by incomplete combustion of carbon-containing materials. In organisms a small amount of CO is formed naturally through the breakdown of haemoproteins and this CO is found in foods.

Fresh meat colour is defined by the relative amount of the three derivatives of myoglobin. Deoxymyoglobin and oxymyoglobin, which are both in the reduced state, can oxidize to metmyoglobin, which has a dull brown colour. Although metmyoglobin can be slowly converted to deoxymyoglobin by enzyme-mediated reactions termed metmyoglobin-reducing activity, this ability dissipates during storage. Bacterial growth is also a major cause of fresh meat discolouration. Bacteria cause a reduction in oxygen concentration and consequently modify the colour of the meat pigment.

Carbon monoxide binds with myoglobin to produce a bright red coloured pigment, carbonilmyoglobin, which is much more stable against oxidation than oxymyoglobin due to the stronger binding of CO to the iron–porphyrin site on the myoglobin molecule.

Carbon monoxide, in combination with nitrogen and carbon dioxide, is used for fresh meat packaging in USA, Norway, Australia, New Zealand, Taiwan and Vietnam. In the USA, modified atmospheres with low levels of CO, up to 0.4%, are used commercially for meat packaging, while filtered smoke containing 30–40% CO is permitted

for pretreatment of fish.

The use of tasteless filtered smoke is being applied as an alternative to CO to treat fish. Tasteless smoke is also of concern in that there appears to be no reliable way to distinguish between products treated with CO and those treated with tasteless smoke. There are ongoing studies on the possible use of CO in fish slaughter.

Keywords.

carbon monoxide, meat colour, meat packaging

Il monossido di carbonio (CO) è una molecola composta da un atomo di carbonio e un atomo di ossigeno, legati con un triplo legame covalente e un legame dativo. Si genera per combustione incompleta di combustibili organici (carbone, legno, olio, petrolio e derivati). Negli esseri viventi il monossido è prodotto principalmente dal catabolismo del gruppo Eme, ma anche in alcuni tessuti come regolatore d'importanti funzioni organiche. Non stupisce quindi la presenza fisiologica di CO nei tessuti animali e conseguentemente negli alimenti di origine animale. Negli alimenti di origine animale alla presenza di CO naturale può sommarsi il contributo legato alla tecnica di trasformazione (affumicatura).

Colore carne

La mioglobina (Mb) costituisce il 90% dei pigmenti della carne il restante 10% è costituito dall'emoglobina (Hb). Il gruppo Eme è presente nelle molecole di Hb e di Mb, dove svolge l'azione di legare l'ossigeno, formando rispettivamente l'ossiemoglobina (O₂-Hb) e l'ossimioglobina (O₂-Mb). La Mb con l'atomo di ferro nella forma bivalente (Fe⁺⁺) ha un colore porpora (carne appena tagliata) prende il nome deossimioglobina (Deossi-Mb); avendo forte affinità per l'ossigeno, si combina molto velocemente con l'ossigeno atmosferico trasformandosi in ossimioglobina e il colore della carne si modifica da rosso scuro a rosso vivo. Nella O₂-Mb l'atomo di ferro rimane nella forma bivalente essendo un processo di ossigenazione e non

di ossidazione.

Dopo un prolungato tempo di esposizione all'aria Mb e Hb subiscono un processo ossidativo, l'atomo di ferro dallo stato bivalente (ione ferroso) passa allo stato trivalente (ione ferrico). Il Fe^{+++} non si coordina con l'istidina distale, permettendo l'accesso delle molecole d'acqua al gruppo Eme. L'atomo di Fe^{+++} lega nel suo sesto legame di coordinazione l'ossigeno di una molecola d'acqua al posto dell' O_2 . Macroscopicamente questi cambiamenti si evidenziano con la variazione del colore da rosso a marrone, quest'ultimo colore caratteristico della metamioglobina (Met-Mb). Il processo di ossidazione della Mb a Met-Mb è spontaneo e rapido nell'instaurarsi, indicando che la Met-Mb sia una molecola maggiormente stabile della Mb, e che la reazione opposta sia fortemente sfavorita. Sebbene Met-Mb può lentamente essere convertita in Deossi-Mb da reazioni enzimatiche (metmioglobina-reduttasi), quest'abilità, Metmyoglobin Reducing Ability (MRA), si riduce con la conservazione. La crescita batterica è la maggiore causa di decolorazione della carne fresca. I batteri causano una riduzione della concentrazione dell'ossigeno e conseguentemente la modifica del colore della carne. Ne consegue che una volta formatasi la Met-Mb sia difficile ripristinare la forma ridotta (Mb). Questo processo di ossidazione della superficie della carne avviene rapidamente, la velocità è influenzata dal valore di pH, in quanto una maggiore presenza di idrogenioni accelera il processo. Ad esempio si è visto che a 35 °C la vita media di O_2 -Mb di cuore bovino nei confronti dell'ossidazione è di 3.3 giorni a pH 9, di 11 h a pH 7 e meno di 30 min a pH 5. Si ricorda, infine, che il processo di ossidazione non è legato ai fenomeni di deterioramento della carne che subentrano successivamente e hanno tempi maggiori.

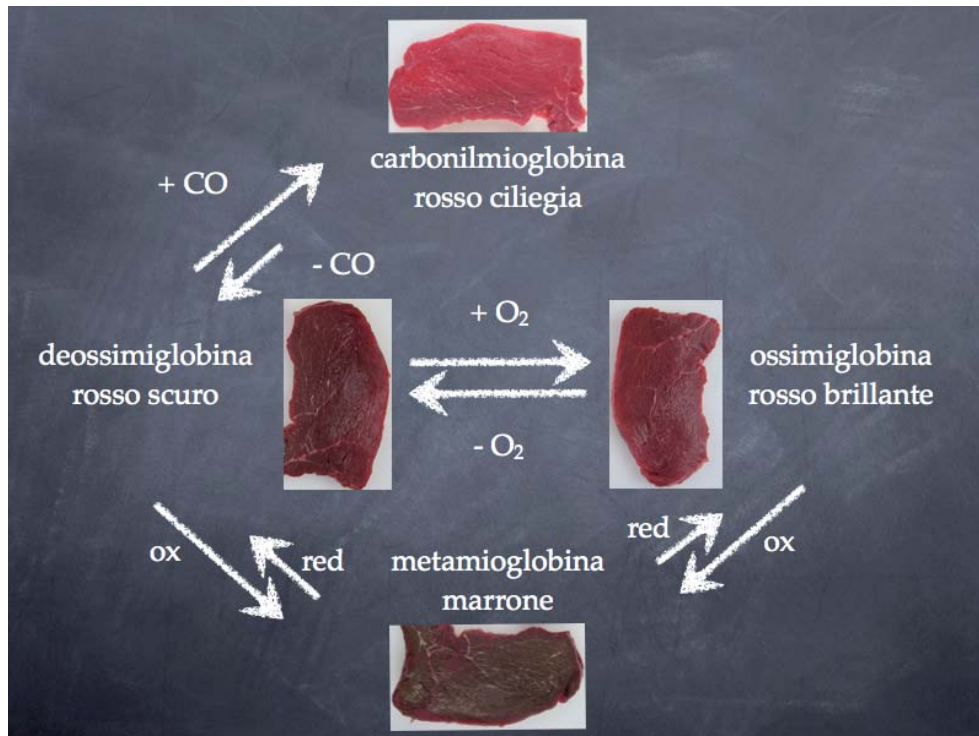


Figura n.1 - Forme di mioglobina e corrispondente colore della carne.

Legame monossido di carbonio al gruppo Eme

La molecola di CO ha un'affinità per il Fe del gruppo Eme 220 volte superiore rispetto a quella dell'ossigeno, forma un legame molto stabile; la reazione del CO con la Hb e la Mb origina rispettivamente la carbonil-emoglobina (CO-Hb) e carbonil-mioglobina (CO-Mb). La maggiore stabilità del legame fra CO e gruppo Eme spiega la pericolosità di questo gas per inalazione, in quanto occupando stabilmente il sito di legame dell'ossigeno non permette il trasporto e quindi l'ossigenazione dei tessuti. La presenza di CO-Hb aumenta l'affinità dell'emoglobina nei confronti dell'ossigeno, riducendo ulteriormente la cessione di questo ai tessuti. La CO-Mb possiede una maggiore stabilità ossidativa (evita l'ossidazione del ferro e quindi la formazione di Met-Hb) stabilizzando la forma ridotta del

ferro del gruppo Eme garantendo una maggiore costanza del colore rispetto all'O-Hb. Inoltre la CO-Mb ha mostrato una stabilità molto più elevata nei confronti della denaturazione termica, ed è in grado di conservare la sua struttura fino a valori di pH acido di 3,5 o di pH basico di 12.

I risultati spettroscopici nell'UV-VIS hanno mostrato che questa stabilità deriva dalla capacità del CO di rafforzare la struttura dell'Eme nell'Hb.

Infine l'elevata affinità del CO per il gruppo Eme permette la conversione della Met-Mb in CO-Mb, convertendo il colore marrone a rosso del muscolo ossidato. La conversione di Met-Mb in CO-Mb si verifica con atmosfere con un contenuto di CO compreso tra 1 - 5% (Sørheim et al. 1997), mentre per stabilizzare il colore sono sufficienti atmosfere con 0.3 - 0.5% di CO.

Monossido di carbonio come additivo

Per la proprietà del CO di legarsi stabilmente alla mioglobina della carne formando carbonilmioglobina, che conferisce un colore simile a quello della ossimioglobina, l'uso di CO come additivo nei gas d'imballaggio è ammesso in USA, in Norvegia, Australia, Nuova Zelanda, Vietnam e Taiwan.

Nel 1985 l'industria della carne norvegese introdusse l'uso di una miscela gassosa composta da CO 0.3-0.5%, 60-70% CO₂ e 30-40% di N₂ e in poco tempo il suo impiego raggiunse il 60% della carne confezionata venduta in Norvegia (Sørheim et al. 2001).

Nel 2002 la FDA approvò l'uso del CO nelle miscele delle atmosfere protettive (US FDA 2002 e 2004). L'elevata concentrazione di CO₂ e l'assenza di ossigeno inibiscono la replicazione batterica, mentre il basso tenore di CO mantiene il colore rosso. In un recente lavoro (Jeong et al. 2011) si è confrontato il confezionamento sottovuoto e il confezionamento in MAP con l'aggiunta di CO. Lo studio ha evidenziato come la carne confezionata in MAP con un contenuto di CO dello 0.4% aumenta la sua colorazione rossa nei

primi 7 giorni di conservazione, in seguito il colore resta stabile fino all'apertura della confezione (35 giorni dopo il confezionamento); dopo di che l'intensità del rosso decresce meno rapidamente rispetto alla carne confezionata sottovuoto. Nei sottoprodotti della macellazione come il sangue, il possibile impiego del CO per la sua capacità di stabilizzare il colore rosso legandosi al ferro del gruppo Eme, permetterebbe un maggiore impiego del sangue nell'industria alimentare, in quanto la colorazione scura ne limita l'utilizzo (Fontes *et al.* 2010).

Valutazioni tossicologiche dell'uso del CO come gas di confezionamento

I ricercatori norvegesi hanno calcolato che un uomo in un ambiente con un livello di CO pari a 57 mg/m³ (livello accettato nei luoghi di lavoro, in USA) inalerebbe un quantitativo di CO di almeno 14 volte superiore a quello assorbito con il consumo di 225g di carne confezionata in atmosfera satura di CO e nell'ipotesi che l'uomo fosse in grado di assorbire il 100% del CO dall'apparato gastro-enterico (Sørheim *et al.* 1997). I medesimi ricercatori hanno stimato che la carne confezionata con 1% di CO produce circa 0.1 mg di CO per kg, quindi la quantità di CO eventualmente assorbita dall'organismo non influenzerebbe il livello di COHb nel sangue.

Future applicazione del monossido di carbonio

Il CO potrebbe essere applicato nella macellazione degli animali, analogamente a quanto già avviene per la fase di stordimento dei suini con l'impiego di anidride carbonica.

L'anidride carbonica non è un gas utilizzabile nei pesci in quanto il tempo necessario per raggiungere la morte è inaccettabilmente lungo e provocherebbe stress e inutile sofferenza. Il CO è stato proposto come gas anestetico prima della macellazione dei mammiferi e dei pesci allevati. I vantaggi sarebbero legati al loro benessere e ad una migliore colorazione delle carni. Attualmente i metodi di

macellazione nel pesce allevato non garantiscono un livello adeguato di benessere (EFSA, 2009), sono quindi allo studio sistemi meno stressanti. In questo contesto Mantilla et al. (2008) studiarono le differenze tra metodi di eutanasia nella tilapia (*Oreochromis niloticus*), in particolare l'impiego di CO confrontato con l'acqua e ghiaccio. I risultati non presentano una differenza significativa fra i due metodi sotto il profilo del benessere animale e della qualità dei filetti ottenuti, si verifica solo un netto miglioramento nella colorazione delle carni e della sua durata nella conservazione. Analogamente BJORLYKKE *et al.* (2011) hanno studiato l'effetto dell'impiego del CO per anestetzizzare i salmoni prima della macellazione, nella sperimentazione i tempi di esposizione variavano da 10 a 30 minuti. I salmoni in 5-6 minuti raggiunsero la narcosi, a 7-8 minuti furono in narcosi profonda. Dopo la macellazione mediante percussione e dissanguamento i salmoni narcotizzati presentarono una più rapida insorgenza del *rigor mortis* e un precoce abbassamento del pH rispetto ai salmoni non narcotizzati. Nonostante il più repentino abbassamento del pH il valore finale di pH fu il medesimo (6.3) non influenzando altri parametri come il drip-loss; la rapida discesa del pH e il precoce rigor mortis fu spiegato per la minor disponibilità di ossigeno e di conseguenza un accelerato metabolismo anaerobico. Dopo la macellazione il colore delle carni dei due gruppi di salmone non era distinguibile visivamente, mentre era chiaramente distinguibile dopo 10 giorni di conservazione, infatti le carni dei salmoni trattati con CO mantennero la colorazione inalterata. Dal punto di vista del benessere nessun parametro fisiologico misurato ha dimostrato una differenza significativa fra i gruppi.

Legislazione Comunitaria

Il monossido di carbonio non è previsto tra i gas d'imballaggio nella normativa italiana e comunitaria:

D.M. 27 febbraio 1996, n. 209. Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per

la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CE, n. 94/35/CE, n. 94/36/CE, n. 95/2/CE e n. 95/31/CE.

Reg. (CE) 16-12-2008 n. 1333/2008 Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo agli additivi alimentari.

Legislazione USA

Il CO è un composto utilizzato in MAP con una concentrazione massima di 0.4%, la FDA considera il CO un composto generalmente riconosciuto sicuro (GRAS). L'impiego permette il mantenimento del colore rosso vivo della carne e anche l'utilizzo contemporaneo di miscele prive di O₂ e con un elevato contenuto di CO₂, allungando la vita commerciale del prodotto.

Legislazione canadese

Il Canada non permette l'importazione e la commercializzazione di pesce trattato con CO, in quanto non previsto nella lista degli additivi e per il falso aspetto di freschezza che conferisce al pesce. Il rilevamento di un colore innaturale è motivo sufficiente per rifiutare il prodotto (Prince C. 1999).

Legislazione giapponese

Il Ministero della Salute giapponese vieta l'utilizzo del monossido di carbonio nel pesce (Ministry of Health and Welfare of Japan (1995)). Il metodo per la verifica di residui di CO nel pesce si avvale della gas cromatografia, in breve se in un campione di tonno si determina un contenuto di CO superiore alle 200 p.p.m. il campione viene considerato sospetto, quindi si analizza nuovamente lo stesso campione dopo averlo conservato a 5°C per 48 ore. Se il contenuto di CO è diminuito rispetto alla prima analisi è confermato il trattamento con CO.

R1

Porfirina

La porfirina, dal greco porphyra (porpora), è un macrociclo eterociclico costituito da quattro subunità di pirrolo legate tramite quattro ponti metinici =CH- posti in posizione alfa rispetto all'azoto dell'eterociclo. I derivati porfirinici, detti genericamente "porfirine" sono composti chimici dall'importante ruolo biologico, in quanto hanno la capacità di coordinare diversi metalli ad esempio: il Magnesio (Mg) presente nella clorofilla o il Ferro (Fe) presente nei citocromi, nell'emoglobina e mioglobina. La biosintesi prevede la formazione di porfobilinogeno (pirrolo), successivamente dall'unione di quattro molecole di porfobilinogeno si ha la formazione della protoporfirina (anello tetrapirrolico) e successivamente l'inserimento della molecola del ferro.

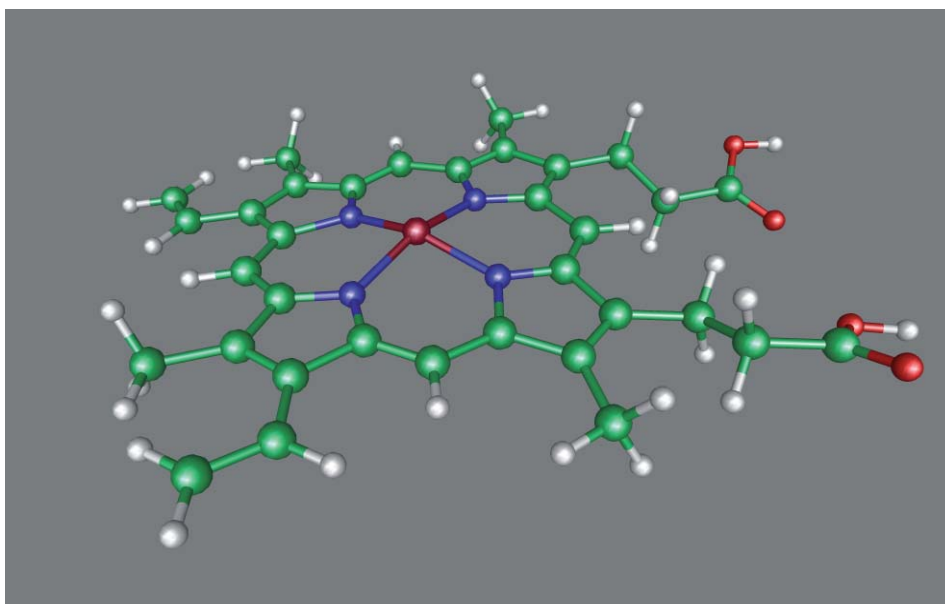


Figura n. 2 - Struttura Eme, in rosso l'atomo di Fe, in blu gli atomi di N, in verde gli atomi di carbonio, in rosso gli atomi di O e in grigio gli atomi di H.

R2

Biosintesi del monossido di carbonio

Il monossido di carbonio (CO) è una molecola con attività fisiologica, viene prodotta nel catabolismo del gruppo Eme ad opera dell'enzima Eme-ossigenasi. L'enzima Eme-ossigenasi è presente in due forme (isoenzimi), una forma presente soprattutto a livello di milza e fegato (EO-1), responsabile della distruzione dell'Eme nel catabolismo dei globuli rossi. Una seconda forma presente a livello cerebrale e a livello intestinale (EO-2) coinvolta nel turnover delle porfirine e nella biosintesi di CO, dove svolge un'azione neurotrasmettitrice nella regolazione della motilità della muscolatura bianca insieme all'ossido d'azoto (NO). La molecola CO condivide alcune delle proprietà chimiche e biologiche del NO.

R3

Mioglobina

La mioglobina è una proteina globulare, costituita da 153 residui aminoacidici, formata da 8 alfa eliche; la conformazione garantisce un ambiente idrofobico all'interno della proteina, questa idrofobicità incrementa la forza dei legami deboli (legami idrogeno, legami di Van der Waals), inoltre evita l'accesso delle molecole d'acqua nella tasca che contiene il gruppo Eme, preservando così la sua efficienza. Il Fe del gruppo Eme può formare 2 legami, uno su ciascuna della 2 facce del piano dell'eme e che formano il V e il VI sito di coordinazione. Nella mioglobina il V sito di coordinazione è occupato da un'istidina (His F8) della proteina, chiamata istidina prossimale. Nella deossimioglobina, il sesto sito di coordinazione è vuoto e perciò è disponibile per il legame con l'ossigeno. Il legame della molecola di ossigeno al sesto sito di coordinazione dello ione ferro causa un notevole riordinamento degli elettroni del ferro che diventa più piccolo e può così spostarsi nel piano della porfirina. Il legame dell'ossigeno al ferro dell'eme è accompagnato dal parziale trasferimento di un elettrone dallo ione ferroso all'ossigeno. La struttura che si forma può essere descritta come un complesso tra lo ione ferrico e lo ione superossido. Per evitare possibili danni causati dal rilascio dell'ossigeno sotto forma di ione superossido nella tasca idrofobica in cui è alloggiato l'eme si trova un altro residuo di istidina (His E7) chiamata istidina distale, che forma un legame H con l'ossigeno. In questo modo la componente proteica della mioglobina controlla la reattività intrinseca dell'eme, rendendolo più adatto a legare reversibilmente l'ossigeno.

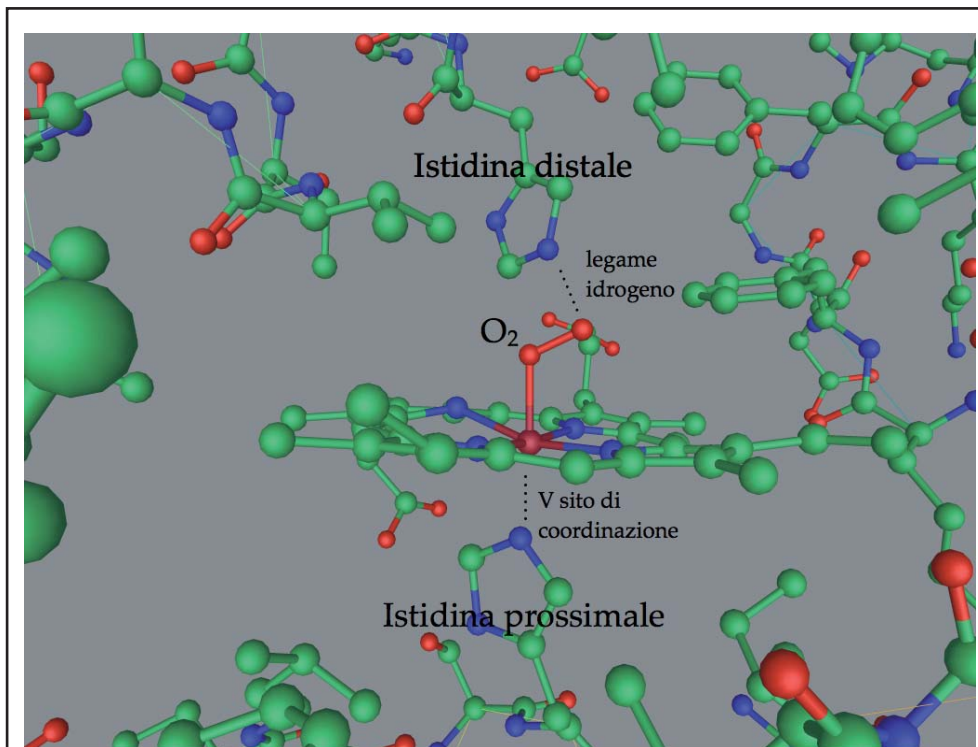


Figura n. 3 – Particolare di mioglobina: il gruppo Eme inserito nella struttura proteica si evidenziano le due istidine (prossimale e distale), la molecola di ossigeno legata nel VI sito di coordinazione del ferro e il legame idrogeno tra ossigeno e istidina distale.

R4

Clearsmoke

Il sistema Clearsmoke è un sistema di generazione di fumo e di filtrazioni successive alla generazione che permette di ottenere una miscela di gas composta in ordine decrescente da azoto, CO₂, CO, O₂, metano, idrogeno e una piccola componente di fenoli e aldeidi. Gli alimenti trattati con questo sistema non hanno il tipico aroma di affumicato, per effetto dell'abbattimento della maggior parte dei composti aromatici del fumo, ma acquistano una colorazione rossa per effetto del CO presente. Questo genere di affumicamento non è ammesso nell'Unione Europea ad eccezione dell'Olanda, che ha ottenuto una deroga per la commercializzazione dei prodotti così trattati sul proprio territorio.

Bibliografia

1. Bjørlykke, G.A., Roth, B., Sørheim, O., Kvamme, B.O., Slinde, E. (2011). The effects of carbon monoxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Food Chemistry in press.
2. EFSA (2009). Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed Atlantic salmon. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare, pp. 1-77, Parma: The EFSA Journal.
3. Fontes, P.R., Gomide, L.A.M., Fontes, E.A.F., Ramos, E.M., Ramos, A.L.S. (2010). Composition and color stability of carbon monoxide treated dried porcine blood. Meat Science, 85, 472-480.
4. Jeong, J. Y., Claus, J. R. (2011). Color stability of ground beef packaged in a low carbon monoxide atmosphere or vacuum. Meat Science, 87, 1-6.
5. Mantilla, D., Kristinsson, H.G., Balban, M.O., Otwell, W.S., Chapman, F.A., and Raghavan, S. (2008). Carbon Monoxide Treatments to Impart and Retain Muscle Color in Tilapia Fillets. Journal of Food Science, 73 (5), C390-C399.
6. Ministry of Health and Welfare of Japan (1995). Practice of carbon monoxide inspection in raw fishes. *Notice of Einyu no. 10, Eika no. 7* (In Japanese).
7. Prince, C. (June 17 1999). Fish treated with carbon monoxide. Communiqué of Canadian Food Inspection Agency.
8. Sørheim, O., Aune, T., & Nesbakken, T. (1997). Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. Trends in Food Science & Technology, 8, 307- 312.
9. Sørheim, O., Nissen, H., Aune, T., & Nesbakken, T. (July 24–28 2001). Use of carbon monoxide in retail meat packaging. Proceedings of the 54th reciprocal meat conference (pp. 47-51). Indianapolis, IN, USA: American Meat Science Association.
10. US FDA. (2002). United States Food and Drug Administration. Agency response letter. GRAS notice No. GRN 000083.

Washington, D.C., USA [On-line: <http://www.cfsan.fda.gov/rdb/opa-g083.html>] Accessed September 19, 2008.

11. US FDA. (2004). United States Food and Drug Administration. Agency response letter. GRAS notice No. GRN 000143. Washington, D.C., USA [On-line: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153974.htm>] Accessed June 23, 2010.

Allegato 1

Confronto ed evoluzione del colore in tranci di tonno trattati e non trattati con CO

Materia prima: tonno a pinne gialle pescato in Oceano Indiano orientale.



Figura n. 4 - Fette di tonno a pinne gialle pescato in Oceano Indiano orientale. Fette fotografate immediatamente dopo l'acquisto.



Figura n. 5 - Fette di tonno a pinne gialle pescato in Oceano Indiano orientale. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 1 di conservazione.



Figura n. 6 - Fette di tonno a pinne gialle pescato in Oceano Indiano orientale. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 2 di conservazione, a temperatura di refrigerazione.



Figura n. 7 - Fette di tonno a pinne gialle pescato in Oceano Indiano orientale. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 6 di conservazione, a temperatura di refrigerazione.

Allegato 2

Confronto ed evoluzione del colore in tranci di pesce spada trattati e non trattati con CO

Materia prima: pesce spada pescato in Mediterraneo.



Figura n. 8 - Fette di pesce spada pescato in Mediterraneo. Fette fotografate immediatamente dopo l'acquisto.



Figura n. 9 - Fette di pesce spada pescato in Mediterraneo. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 1 di conservazione.

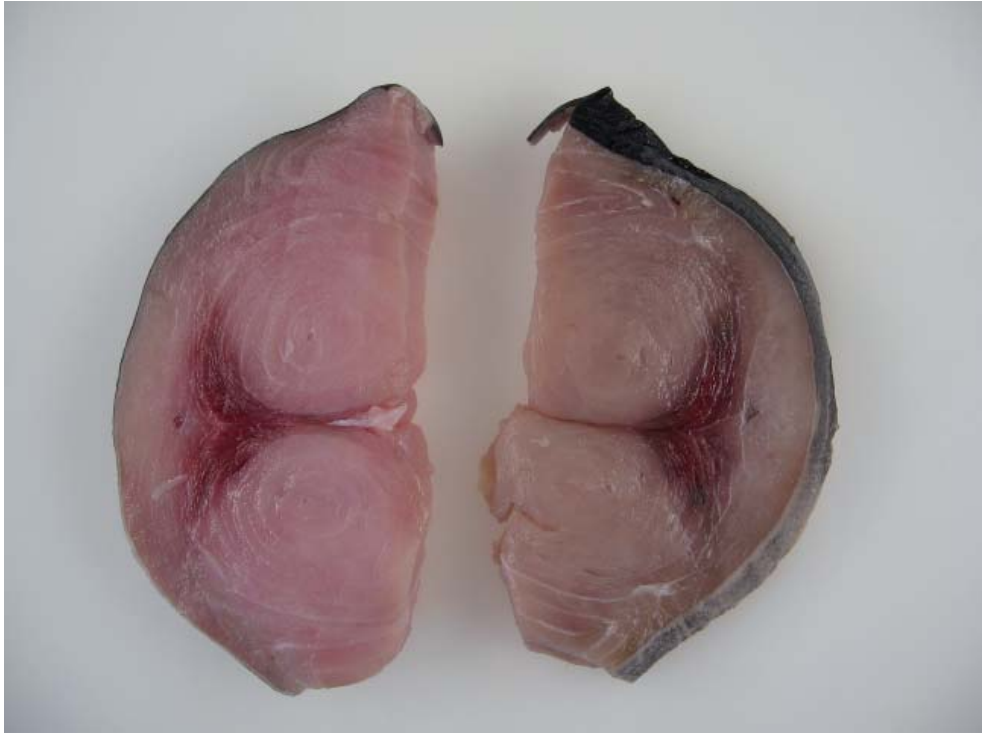


Figura n. 10 - Fette di pesce spada pescato in Mediterraneo. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 2 di conservazione, a temperatura di refrigerazione.

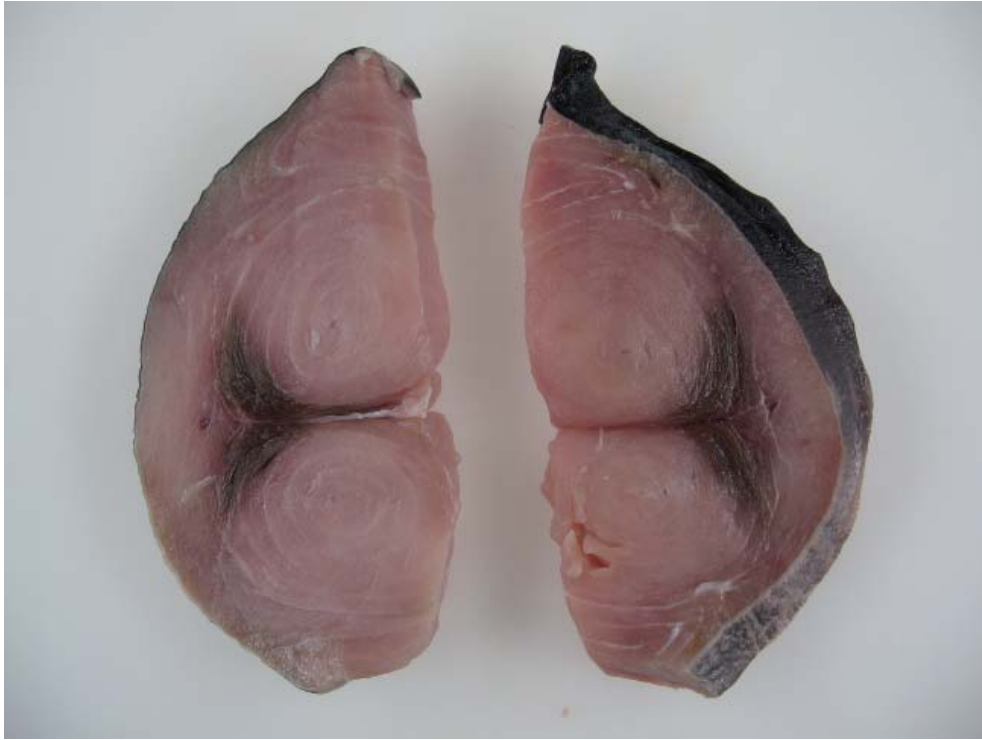


Figura n. 11 - Fette di pesce spada pescato in Mediterraneo. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 6 di conservazione, a temperatura di refrigerazione.

Allegato 3

Confronto ed evoluzione del colore in fette di carne trattate e non trattate con CO

Materia prima: bistecca di scamone di bovino adulto nato, allevato e macellato in Francia, sezionato in Italia.



Figura n. 12 - Bistecca di scamone, bovino adulto. Fette confezionate in atmosfera protettiva, fotografate immediatamente dopo l'apertura.



Figura n. 13 - Bistecca di scamone, bovino adulto. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 1 di conservazione.



Figura n. 14 - Bistecca di scamone, bovino adulto. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 2 di conservazione a temperatura di refrigerazione.



Figura n. 15 - Bistecca di scamone, bovino adulto. Confronto tra fetta trattata con CO (a sinistra) e una fetta non trattata con CO (a destra). Giorno 6 di conservazione a temperatura di refrigerazione.