



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE
MICROBIOLOGICA E FISICO-CHIMICA
DEL SUDŽUK, UN SALAME
FERMENTATO MONTENEGRINO

MICROBIOLOGICAL AND
PHYSICOCHEMICAL
CHARACTERIZATION OF SUDŽUK, A
MONTENEGRIN FERMENTED SALAMI

Studente:
DAVIDE COTANI

Relatore:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ

Correlatore:
PROF.SSA CRISTIANA GAROFALO

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Una panoramica del posizionamento tecnologico e sociale delle carni fermentate (Leroy, 2013)	9
Figura 2: Caratteristica forma a ferro di cavallo del Sudžuk	19
Figura 3: Sezione trasversale del Sudžuk	20
Figura 4: Ciclo termico seguito per la PCR	29
Figura 5: Immagini delle fette dei salami acquisite con lo scanner	36
Figura 6: Carica dei presunti lattobacilli (MRS), lattococchi (M17), cocchi coagulasi negativi (MSA) e <i>Pseudomonas</i> spp. (PAB) nei salami Sudžuk.	37
Figura 7: Biota batterico dei salami Sudžuk	39
Figura 8: Micobiota dei salami Sudžuk	41

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di Sudžuk riportate sulle etichette dei prodotti analizzati.	22
Tabella 2: Composizione del terreno di coltura M17.....	25
Tabella 3: Composizione del terreno di coltura MRS (de Man Rogosa Sharpe).....	25
Tabella 4: Composizione del terreno di coltura MSA (Mannitol salt agar).....	26
Tabella 5: Composizione del terreno di coltura PAB (Pseudomonas agar base).....	27
Tabella 6: Sequenze dei primers utilizzati per amplificare il DNA batterico (16S-F e 16S-R) e fungino (NL4-R e LS2-MF).....	28
Tabella 7: Composizione della miscela di reazione PCR usata per l'amplificazione del DNA batterico e fungino.....	28
Tabella 8: Parametri chimico-fisici del Sudžuk.....	32
Tabella 9: Valori dei principali componenti chimici del Sudžuk.....	33
Tabella 10: Concentrazione delle ammine biogene (mg/Kg) nei salami Sudžuk.....	34
Tabella 11: Media e deviazione standard del colore dei salami Sudžuk.....	35
Tabella 12: Struttura (texture) dei salami Sudžuk.....	37

INDICE

ELENCO DELLE FIGURE	2
ELENCO DELLE TABELLE	3
1. INTRODUZIONE	6
1.1 L'evoluzione storica dei prodotti carnei fermentati	6
1.2 La tecnologia di produzione dei salumi	9
1.3 La fermentazione come metodo di conservazione dei salumi	12
1.4 I gruppi microbici principali	13
1.4.1 Batteri lattici	13
1.4.2 Cocchi coagulasi negativi	14
1.4.3 Lieviti e muffe	15
1.5 Utilizzo delle colture starter nella produzione dei salumi.....	15
1.6 Salame Sudžuk.....	18
2. SCOPO DEL LAVORO	21
3. MATERIALI E METODI	22
3.1 Campionamento.....	22
3.2 Analisi della struttura (<i>texture</i>) e del colore	23
3.3 Analisi fisico-chimiche	23
3.4 Conte vitali in piastra.....	24
3.5 Analisi metagenomica dei salami <i>Sudzuk</i>	27
3.6 Analisi statistiche	30
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	31
4.1 Risultati analisi chimico-fisiche.....	31
4.2 Risultati dell'analisi del colore	35
4.3 Risultati dell'analisi della struttura (<i>texture</i>)	36
4.4 Risultati delle conte vitali	37
4.5 Risultati delle analisi metagenomiche	39

5. CONCLUSIONI.....	43
BIBLIOGRAFIA	44

1. INTRODUZIONE

1.1 L'evoluzione storica dei prodotti carnei fermentati

Gli insaccati carnei fermentati sono il risultato delle trasformazioni microbiologiche, biochimiche, fisiche e sensoriali che avvengono durante la maturazione di un impasto carneo composto da parti magre, grasso e vari ingredienti e/o additivi (Branciarri et al., 2020). Questo impasto viene insaccato in budelli naturali o artificiali e viene maturato in determinate condizioni di temperatura e umidità. Si tratta di un gruppo di prodotti molto eterogenei, i quali spesso rappresentano il patrimonio e l'identità culinaria del luogo di produzione. Tuttavia, la loro tipicità e i loro aspetti salutistici non sono sempre stati indenni. Ad esempio, già nel 1868, Justus Liebig affermò che l'utilizzo del lievito nella produzione del pane ne deteriorava la qualità nutrizionale. Queste preoccupazioni riguardanti la fermentazione si estendevano anche agli insaccati carnei fermentati. Nel 1906, un insegnante belga di economia domestica scriveva: "I cibi devono essere freschi; fermentati causano indigestione" (Mathieu, 1906). Entrambi gli esempi riflettono quelle che erano le preoccupazioni inerenti ai prodotti fermentati nel XIX secolo, e che persistettero fino al XX secolo.

Al giorno d'oggi, invece, diversi alimenti fermentati vengono elogiati per le loro proprietà nutritive e benefiche. Inoltre, ai cibi fermentati viene spesso attribuita una storia lunga e romantica, il che li rende ancor più affascinanti per i consumatori. Le etichette mettono in evidenza la loro affidabilità, soprattutto quelli che mantengono una nota tradizionale, contribuendo ad aumentarne l'apprezzamento tra i consumatori (Geyzen et al., 2012; Guerrero et al., 2009). Tuttavia, nonostante l'apprezzamento generale per i cibi fermentati, alcuni di questi prodotti possono ancora suscitare un certo grado di sospetto, in particolare per quanto riguarda i potenziali impatti negativi che possono avere sulla salute. I prodotti industrializzati vengono a volte percepiti come di bassa qualità; perciò, stanno emergendo nuove strategie per influenzarne la qualità e la salubrità, anche se ad oggi il processo di fermentazione della carne è ormai consolidato. Tuttavia, si osserva un contrasto tra il concetto di innovazione e di originalità perché negli stratagemmi di marketing vengono

impiegate diciture come “artigianali”, su prodotti che poi non hanno un giusto equilibrio tra qualità, sicurezza, tradizione e innovazione (Leroy, 2013).

La carne fresca è un alimento altamente nutriente, ma a causa della sua natura estremamente deperibile, la sua conservazione è sempre stata una grande sfida fin dalle prime civiltà umane. Nel corso dei secoli sono state sviluppate tecniche di conservazione che prevedono l'uso di una salatura ed asciugatura spinta in condizioni climatiche appropriate (Zeuthen, 2007). Queste tecniche hanno permesso di ridurre l'attività dell'acqua nella carne, proteggendola dal deterioramento e preservando la salute del consumatore, impedendo lo sviluppo di microrganismi patogeni. Se per i pezzi di carne interi era sufficiente una semplice salatura ed essiccazione, per le parti di carne sminuzzata, i ritagli di carcasse e il grasso, si è rilevato necessario un ulteriore processo di fermentazione a causa della maggiore instabilità ossidativa e microbica di tali componenti. Pertanto, il composto di carne e grasso, tritato e salato, veniva solitamente inserito nei budelli, che originariamente erano ottenuti dagli intestini degli animali, per creare delle condizioni di anaerobiosi, favorendo il processo di fermentazione e contribuendo alla conservazione e alla sicurezza del prodotto (Zeuthen, 2007).

Successivamente, si scoprì che le carni fermentate ottenevano le loro caratteristiche finali attraverso la produzione di acido lattico da parte di determinate specie di batteri lattici che si sviluppavano nell'ambiente anaerobico creato all'interno dell'insaccato, a cui seguiva una fase di essiccamento per stabilizzare e maturare ulteriormente il prodotto (Leroy et al., 2006; Ravyts et al., 2012). Questa sequenza di azioni comprendenti processi di salatura, farcitura, fermentazione ed essiccazione, crea una combinazione di ostacoli antimicrobici che contribuiscono alla lunga conservazione dei prodotti fermentati. La fermentazione, combinata con la salagione, l'essiccamento e a volte l'affumicatura, sono strategie di conservazione della carne che risalgono a tempi molto antichi. Nonostante non sia possibile stabilire con precisione l'origine esatta di questi processi, il materiale iconografico ritrovato, scoperto dagli storici, suggerisce che queste tecniche fossero probabilmente utilizzate già nell'antico Egitto, mentre le prime fonti che documentano la produzione di salsicce fermentate risalgono ai Sumeri (Pearson e Tauber, 1984). Secondo Lucke (2000), probabilmente la produzione dei salumi ha avuto origine nelle regioni temperate dell'area mediterranea questo perché il clima è particolarmente favorevole per il processo di maturazione. Nel Nord Europa invece, dove le condizioni climatiche non consentono un'essiccazione estesa e un'adeguata maturazione, furono introdotti ulteriori trattamenti di affumicatura per prevenire il deterioramento batterico e lo sviluppo incontrollato di muffe.

Inoltre, questi prodotti sono caratterizzati di bassi valori di pH che inibiscono ulteriormente la crescita di microrganismi patogeni.

Sebbene la fermentazione della carne possa essere percepita come una tecnologia antica, i processi sono mutati durante il corso dei secoli per un cambiamento degli standard tecnologici, dovuto all'insorgere non solo di problemi di sicurezza, ma anche per migliorarne l'efficienza complessiva del processo. Questi cambiamenti sono divenuti particolarmente evidenti negli ultimi decenni. Generalmente parlando, il segmento alimentare è stato radicalmente trasformato a causa dell'urbanizzazione e dagli stili di vita condotti dai consumatori, nonché a causa dell'industrializzazione e globalizzazione della produzione e distribuzione di alimenti (Gezyen et al., 2012). Questo ha creato nuove priorità relative ai costi, alla sicurezza, alla standardizzazione, alla distribuzione, ecc. Dagli anni '50 in poi, le tempistiche utilizzate per le fermentazioni sono diventate più brevi ed uniformi, contribuendo a un miglior margine di profitto e alla competitività del prodotto finale (Ordoñez e de la Hoz, 2007). Un'accelerazione considerevole è stata raggiunta attraverso l'inoculo, di colture starter commerciali, nell'impasto, l'uso di nitriti, nitrati, acceleranti di polimerizzazione (es: ascorbato), l'uso di temperature di fermentazione più elevate, l'utilizzo di camere termostate per un migliore il controllo del processo e talvolta anche l'aggiunta di acidificanti chimici, ove permesso (Roncalés, 2007; Sindelar e Milkowski, 2012; Zeuthen, 2007). Inoltre, nella maggior parte dei casi, i budelli naturali sono stati sostituiti da budelli sintetici, più economici e standardizzati, compromettendo la percezione di autenticità del salume stesso. Il paradigma della semplice efficienza e riduzione dei costi si è evoluto, su richiesta del consumatore, in una mentalità industriale che integra qualità, sicurezza e elementi tradizionali, confondendo così il confine tra innovazione e tradizione (Leroy, 2013). Nella Figura 1 è mostrata una panoramica del posizionamento tecnologico e sociale delle carni fermentate, considerando il contesto conflittuale di apprezzamento e sfiducia tra tradizione e innovazione, che ha portato al riemergere di elementi tradizionali nei processi industriali innovativi.

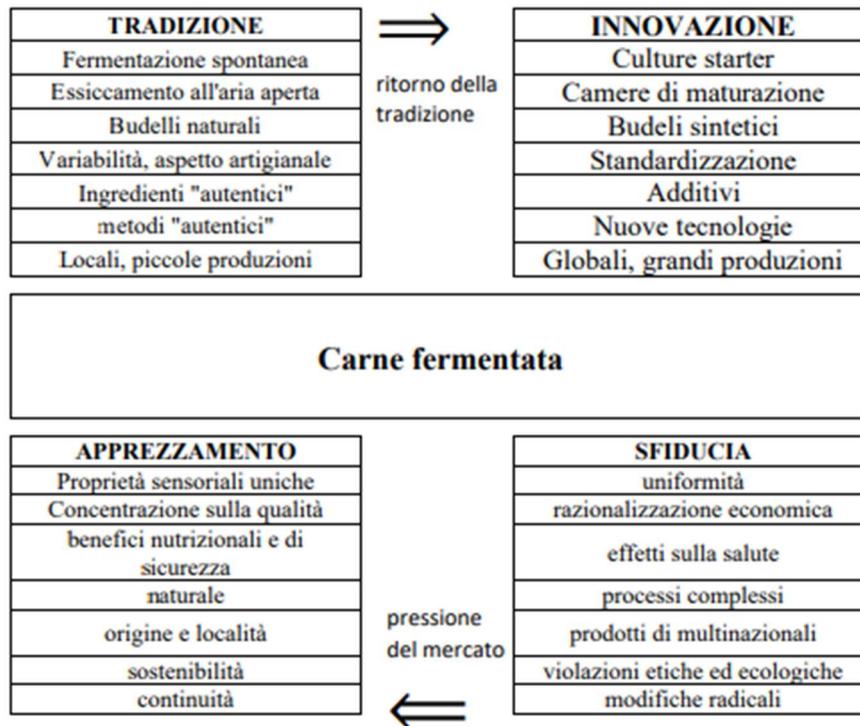


Figura 1. Una panoramica del posizionamento tecnologico e sociale delle carni fermentate (Leroy, 2013)

1.2 La tecnologia di produzione dei salumi

La parola “salame” deriva molto probabilmente dalla parola latina medievale “salumen”. furono i romani a gettare le prime basi per l’attuale produzione dei salami e poi grazie agli emigrati europei furono esportate le tecniche di produzione in tutto il mondo, comprese le Americhe e l’Australia (Zeuthen, 2007). La linea di produzione del salame inizia con la macinatura o “triturazione” della carne e del grasso in tagli di piccole dimensioni. A questa miscela vengono aggiunti sale, spezie, e, in alcuni casi anche zuccheri, erbe aromatiche e altri ingredienti. Dopo l’omogeneizzazione, la miscela viene inserita all’interno di un involucro, naturale o artificiale, e sottoposta al processo di fermentazione e maturazione, che avviene contemporaneamente alla fase di essiccamento. L’uso dei conservanti è generalmente adottato seguendo la legislazione comunitaria pertinente (Reg. CE 1333/2008), a meno che non sia soggetto ad altri regolamenti come i prodotti a denominazione protetta. Infatti, la stagionatura della carne è un processo che prevede l’aggiunta di cloruro di sodio (NaCl) per ridurre la disponibilità di acqua e nitriti/nitrati alla carne, per garantirne la sicurezza e prolungarne la durata di conservazione. È una delle strategie di conservazione più antiche ed è stata adottata dall’umanità per lungo tempo (Toldrá e Hui, 2014). Nei secoli passati, nitrati

e nitriti erano presenti come impurità nel sale utilizzato per la conservazione della carne, e in quelle epoche si utilizzavano quantità considerevolmente superiori rispetto ad oggi. È solo a partire dalla fine del XIX secolo che si è compreso il vero ruolo di questi sali nella conservazione degli alimenti, grazie a vari studi.(Pegg e Honikel, 2014).

Nella moderna industria della carne, il sale viene utilizzato come aromatizzante o “esaltatore di sapidità”, ed è anche responsabile delle proprietà strutturali desiderate delle carni lavorate. Inoltre, il sale svolge un ruolo batteriostatico. Nello specifico i nitrati e nitriti aggiunti alle carni:

- Svolgono un effetto antimicrobico, esercitato attraverso l'inibizione delle vie metaboliche, la limitazione dell'assorbimento di ossigeno o il sequestro del ferro. Tradizionalmente gli effetti di questi composti azotati sono principalmente indirizzati a inibire la crescita di clostridi, ma è ben documentata la loro efficacia contro enterobatteri, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* ;
- sono coinvolti nella formazione del colore, che dipende dalla formazione di ossido nitrico, in grado di reagire con molti substrati, tra cui il ferro presente nella mioglobina e nella metamioglobina, portando allo sviluppo del tipico colore rosso/rossastro dei salumi;
- hanno un effetto antiossidante, sono in grado di rallentare le reazioni ossidative e il processo di irrancidimento grazie alla loro rapida reazione con l'ossigeno;
- sono coinvolti nella formazione di aromi, potenziati dalla soppressione dell'irrancidimento (Patarata et al., 2021).

Tra i vari componenti dei salami troviamo anche le spezie, la cui aggiunta svolge diversi ruoli importanti; oltre ai loro effetti sull'aroma e sul sapore, alcune spezie contengono composti antiossidanti e possono, attraverso il loro contenuto di manganese, aumentare il tasso di produzione di acido durante la fermentazione del salume (Hugas et al., 2002).

Le carni fermentate sono complessi ecosistemi microbici in cui coesistono batteri, lieviti e muffe. Durante il processo di fermentazione, si osserva una notevole diversità microbica evidenziata dalla presenza di diverse specie, nonché da ceppi della stessa specie. I processi fisici e chimici che si verificano durante la fermentazione e maturazione influenzano lo sviluppo dell'aroma degli insaccati fermentati (Flores et al., 2004). Anche se molti prodotti tipici a base di carne fermentata vengono ancora realizzati attraverso tecnologie tradizionali senza l'uso di colture starter selezionate, nella moderna produzione di

insaccati fermentati, l'uso di colture starter è diventato sempre più comune per poter garantire la sicurezza e la standardizzazione del prodotto, come ad esempio un sapore e un colore costanti, oltre ai tempi di maturazione più brevi. Le colture starter sono preparati che contengono microrganismi, i quali tramite la loro attività metabolica conferiscono le caratteristiche desiderate nei prodotti fermentati. L'ampio utilizzo delle colture starter è il risultato del progressivo spostamento della produzione di salumi dai piccoli produttori locali agli impianti di trasformazione su larga scala, oltre che della crescente consapevolezza dei rischi per la salute dei consumatori. Infatti, l'introduzione delle colture starter è diventata essenziale per abbreviare il periodo di maturazione, garantire lo sviluppo del colore e migliorare il sapore e la sicurezza del prodotto (Gardini et al., 2001; Cocolin et al., 2006).

Predominano in gran parte due ampi gruppi di batteri; i batteri lattici (LAB, lactic acid bacteria) e i cocchi coagulasi-negativi (CCN o CNC, coagulase negative cocci) o (gram-positivi)-catalasi-positivi (GCC+/CPC, gram-positive-catalase-positive cocci), che comprende sia micrococchi sia stafilococchi coagulasi-negativi (SNC, coagulase-negative staphylococci) (Aquilanti et al., 2016). Il processo di acidificazione che è il risultato della fermentazione degli zuccheri in acido lattico da parte di LAB, svolge un ruolo fondamentale nella prevenzione del deterioramento e della crescita dei patogeni. I CCN sono invece coinvolti nei processi proteolitici e lipolitici contribuendo in modo significativo alla formazione delle caratteristiche organolettiche finali del prodotto (Hammes e Hertel, 1998). Essi sono anche responsabili della riduzione dei nitrati e della formazione del colore, nonché della prevenzione dell'irrancidimento. Oltre ai batteri, anche i lieviti e i funghi filamentosi svolgono un ruolo importante nel processo di fermentazione. Essi contribuiscono formando un film superficiale che fornisce una protezione contro l'eccessiva disidratazione e l'ossidazione della frazione lipidica causata dall'ossigeno e dalla luce (Gardini et al., 2001; Cocolin et al., 2006).

Perciò, si può affermare che i salumi possono essere classificati secondo differenti criteri, per esempio in base alla loro attività dell'acqua finale e/o al pH, o in base alle condizioni di processo applicate, come la durata della maturazione o l'uso dell'affumicatura (Luke, 2000). Usando questi criteri, emergono due ampie categorie di prodotti carnei fermentati europei; prodotti del nord Europa e del sud Europa (Talon et al., 2007). I prodotti del nord Europa (come ad esempio i salami tedeschi e ungheresi) subiscono una veloce fermentazione con un pH inferiore a 5 e spesso vengono affumicati, mentre le produzioni del sud dell'Europa (Italia, Francia, Grecia, Spagna) possono essere suddivisi in due sottocategorie principali: quelli stagionati, con una maturazione superiore alle 4 settimane e un'attività dell'acqua

inferiore a 0,90 e quelli semi-stagionati, con un periodo di maturazione inferiore a 4 settimane e un'attività dell'acqua compresa tra 0,90 e 0,95. Questi prodotti mediterranei solitamente non vengono affumicati e presentano sulla superficie un microbiota costituito da muffe, lieviti e GCC+/CPC (Luke, 2000).

In relazione alle tradizioni e alle preferenze dei consumatori le tipologie dei salumi possono variare notevolmente in differenti paesi e regioni. Gli ingredienti e le tecniche di produzione adottate differiscono considerevolmente all'interno di ciascuna di queste categorie, inoltre la maggior parte dei prodotti europei segue procedure tradizionali di fermentazione e maturazione, e fanno affidamento sull'attività di microorganismi autoctoni appartenenti ad una comunità estremamente eterogenea che deriva sia dalle materie prime che dall'ambiente di produzione (Chevallier et al., 2006).

1.3 La fermentazione come metodo di conservazione dei salumi

La fermentazione della carne è un processo che deriva dalla produzione di acido lattico da parte di alcune specie di LAB selezionati dall'ambiente anaerobico degli insaccati, a cui segue poi una fase di asciugatura per stabilizzare e far maturare ulteriormente il prodotto (Lücke e Hechelmann 1987). I prodotti a base di carne fermentata sono molto popolari e vengono prodotti in grande quantità. I motivi della persistenza delle carni fermentate sono probabilmente legati alle loro proprietà sensoriali uniche e specifiche, alla loro praticità e al loro presunto radicamento nel patrimonio culinario e culturale. Le inimitabili caratteristiche sensoriali delle carni fermentate sono attribuite a una serie di trasformazioni biochimiche e fisico/chimiche che avvengono nell'impasto della salsiccia durante la fermentazione e la maturazione (Ravits et al., 2012). A causa del processo di acidificazione, che provoca la denaturazione delle proteine, in combinazione all'alta concentrazione di sale, si forma una tipica consistenza gelatinosa, che porta all'emulsione dei globuli di grasso. Lo sviluppo specifico del colore deriva dalle interazioni tra la mioglobina presente nella carne e il monossido di azoto, originato dai nitrati/nitriti presenti nel sale aggiunto per stagionatura e conservazione. Infine, il sapore complesso dei salumi fermentati è dovuto alle trasformazioni ossidative, principalmente di acidi grassi insaturi, e alle complesse interazioni tra l'impasto del salume e i microrganismi. Di conseguenza, lo sviluppo del sapore non dipende solo dalle materie prime e dalle condizioni di lavorazione, ma anche da come questi fattori influenzano la composizione, le dinamiche della comunità e il metabolismo del microbiota del salume (Janssens et al., 2012; Ravits et al., 2010). Le carni fermentate sono pronte al consumo, facili da trasportare o conservare, hanno un alto valore nutrizionale e sono molto stabili in termini

di gusto, caratteristiche e sostenibilità. Fin dall'antichità la fermentazione delle carni ha consentito la conservazione della carne durante i mesi di scarsità e ne ha permesso il trasporto su grandi distanze geografiche. Per la loro notevole stabilità, i prodotti a base di carne fermentata e altri prodotti a base di carne essiccata, venivano persino utilizzati come merce di scambio o facevano parte delle provviste dei viaggiatori circolanti in tutta Europa (IVSI, 2012).

Fin dai suoi primi utilizzi, la fermentazione della carne ha generato un'impressionante varietà di ricette e tipologie di prodotti, suddivisi in specialità regionali con le proprietà uniche in termini di aspetto generale, sapore e consistenza. La differenziazione è legata al tipo e alla proporzione delle materie prime e di altri ingredienti alla granulometria delle particelle di carne e grasso, alla forma e al calibro della salsiccia, al tipo di budello, ai trattamenti termici e climatici, alla durata di ogni passaggio tecnologico, al contenuto di umidità risultante, alla presenza di microbiota autoctono per la fermentazione e all'applicazione di trattamenti di marinatura, affumicatura o modellatura, ecc (Guerrero et al., 2009).

1.4 I gruppi microbici principali

La popolazione microbica degli insaccati fermentati dipende da quella dei vari costituenti che entrano a far parte del prodotto finito (carni, involucri, sale, spezie) considerando poi anche la probabile presenza di vari microrganismi contaminanti derivanti da utensili, apparecchiature impiegate e superfici di lavoro, sia quelli di origine umana, provenienti dal ripetuto contatto del prodotto con le mani dell'operatore. Questo tipo di contaminazione, oltre a non essere utile ai fini della maturazione, potrebbe risultare anche dannosa perché potrebbe apportare microrganismi patogeni al prodotto finito (Sperber, 2009). Al contrario, i microrganismi derivanti dalle materie prime hanno un ruolo molto importante ai fini del processo di stagionatura. La composizione del microbiota delle carni è influenzata dalle condizioni fisiologiche dell'animale prima della macellazione e dai metodi di macellazione e di conservazione utilizzati. Numerosi studi hanno evidenziato che la comunità microbica dei prodotti carnei fermentati è principalmente costituita da LAB, CCN, lieviti e muffe (Rantsiou e Cocolin, 2006).

1.4.1 Batteri lattici

Il termine batteri lattici è usato per definire un gruppo ampio e diversificato di microrganismi. Può essere descritto come un gruppo di cocchi e bastoncelli Gram-positivi,

non sporigeni, anaerobi, microaerofili o anaerobi facoltativi, che producono acido lattico come principale prodotto finale durante la fermentazione dei carboidrati (Molly et al., 1996). I batteri lattici presenti nei salumi fermentati, e nei prodotti carnei in genere, sono principalmente omofermentanti, ed in misura minore eterofermentanti, e sono responsabili del catabolismo dei glucidi, e della conseguente produzione di acido lattico, acido acetico, acido formico, alcool etilico, acido propionico, CO₂, acido butirrico, etc. (Urso et al., 2006). Generalmente non possiedono forti proprietà proteolitiche o lipolitiche, sebbene sia stato osservato un certo grado di attività peptidasi e lipasi per alcuni ceppi microbici. *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, e *Lactiplantibacillus plantarum* sono le principali specie di LAB che si trovano solitamente nella carne e nei prodotti a base di carne, compresi i salumi fermentati prodotti con diversi processi produttivi (Hugas et al., 1993; Kittisakulnam et al., 2017; Pisacane et al., 2015). Gli insaccati ottenuti dopo un breve tempo di maturazione, presentano un sapore acido con poco aroma: queste due caratteristiche sono date dalla presenza di lattobacilli e pediococchi che ne rappresentano la flora dominante. Al contrario, gli insaccati ottenuti con un tempo di maturazione più lungo presentano un maggior numero di lattobacilli rispetto ai pediococchi (Demeyer et al., 1986). Le esopeptidasi prodotte dai lattobacilli, insieme alle ammino-peptidasi muscolari della carne contribuiscono alla generazione di amminoacidi liberi, contribuendo così al sapore.

1.4.2 Cocchi coagulasi negativi

Per garantire la qualità sensoriale degli insaccati fermentati è necessario il contributo dei cocchi coagulasi negativi, nella quale *Staphylococcus* e *Kocuria* sono i generi più rappresentativi del gruppo GCC⁺ (Morot-Bizot et al., 2006). Il microbiota caratteristico dei salumi fermentati è rappresentato da specie come *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus equorum*. Sono state identificate anche altre specie come *Staphylococcus succinus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus haemolyticus* (Cocolin et al., 2001; Talon e Leroy, 2011; Mainar et al., 2017). In particolare, *S. xylosum* e *S. carnosus* modulano l'aroma attraverso la conversione di amminoacidi, in particolare gli amminoacidi a catena ramificata come leucina, isoleucina e valina, e acidi grassi liberi. Tuttavia, la generazione dell'aroma dipende dalla varietà del salume e dalla tecnologia usata per la sua produzione. Ad esempio, per i salumi a maturazione breve, l'aumento della concentrazione degli stafilococchi inoculati può incrementare la produzione di aldeidi con catena ramificata, mentre nei salumi a maturazione

lunga, la situazione è più complessa, in quanto la produzione di aromi è particolarmente pronunciata e un'alta concentrazione di inoculo favorisce la formazione di acidi ramificati e solfiti, mentre bassi livelli favoriscono la produzione di diacetile e acetil-estere (Tiener et al., 2004). Oltre a contribuire al sapore, i CCN prevengono anche la formazione di sapori sgradevoli e possono essere utilizzati per inibire l'ossidazione degli acidi grassi insaturi, grazie alle loro attività nitrato reductasi e antiossidante (Montel et al., 1998; Barrière et al., 2001).

1.4.3 *Lieviti e muffe*

I salami fermentati sono molto comuni nell'area mediterranea. È stato dimostrato che l'inoculazione superficiale dei salami con le muffe, ad esempio con le diverse specie del genere *Penicillium* o *Mucor*, contribuisce alla qualità sensoriale. Questo contributo è mediato dall'ossidazione del lattato, dalla proteolisi, dalla degradazione degli amminoacidi, dalla lipolisi, dalla lipossidazione, dal ritardo dell'irrancidimento e dalla riduzione della perdita di acqua dovuta all'evaporazione più lenta (Sunesen e Stahnke, 2003; Benito et al., 2004). Inoltre, le muffe contribuiscono all'attrattiva complessiva del prodotto finale grazie al loro caratteristico aspetto bianco o grigiastro, alla stabilizzazione del colore attraverso l'attività della catalasi, al consumo di ossigeno e alla protezione dalla luce e alla facilità di desquamazione della pelle. Tuttavia, come per le colture starter dei ceppi batterici, la selezione di ceppi di muffa da utilizzare come le colture starter deve essere effettuata con molta attenzione poiché le capacità proteolitiche e lipolitiche possono differire significativamente tra i ceppi. Per quanto riguarda i lieviti, il loro ruolo nella formazione del sapore dei salumi non è ben caratterizzato.

1.5 **Utilizzo delle colture starter nella produzione dei salumi**

Negli ultimi decenni, l'inoculo delle colture starter è diventato un approccio ampiamente adottato nella produzione di alimenti fermentati. Queste colture, composte da miscele indefinite o definite di microrganismi, selezionati sulla base delle loro proprietà tecnologiche, venivano riprodotte da istituzioni o industrie specializzate e distribuite ai produttori di alimenti già nel 1895 in Danimarca (Doe e Smith, 2005). Le colture starter prendono il sopravvento sugli agenti di deterioramento e sui patogeni perché sono ben adattate alla struttura e alle condizioni fisico-chimiche dell'alimento, rendendo l'ambiente favorevole alla loro crescita a scapito dei microrganismi dannosi o alterativi (Laranjo et al.,

2019). In particolare, i LAB fermentano i carboidrati naturalmente presenti nelle materie prime o aggiunti nella formulazione, abbassando rapidamente il pH degli alimenti e producendo acido lattico (Castellone et al., 2021).

La carica dei microrganismi benefici potrebbe non essere sufficientemente alta per prendere rapidamente il sopravvento sui microrganismi dannosi, rallentando il processo di produzione e rendendolo disomogeneo. Al contrario, le colture starter avviano la fermentazione nel modo corretto e possono essere classificate sulla base di diversi criteri (Doe e Smith., 2005):

- complessità della composizione: i) colture miste, composte da molte specie o ceppi in rapporti non definiti; ii) colture a composizione definita, composte da un numero limitato di specie o ceppi in rapporti noti e definiti;
 - substrato utilizzato per la riproduzione (latte, siero, etc.);
 - riproduzione in condizioni artigianali o presso istituzioni specializzate;
 - temperatura ottimale di crescita (mesofile, termofile);
 - presenza di ceppi aromatizzanti;
 - funzioni (starter primari, colture aggiuntive o secondarie, probiotici);
 - modo con cui vengono conservate/distribuite (liquide, congelate, liofilizzate)
- (Ruminantia, 2023).

Il ruolo svolto dai microrganismi utili negli insaccati fermentati è molto più complesso di quello svolto dai microrganismi nei formaggi. Per ottenere un salume maturo occorre infatti l'azione sinergica di diversi gruppi di microrganismi (LAB, CCN, lieviti e muffe) che svolgono i seguenti ruoli:

- **Creazione di un ambiente ostile per la crescita di agenti di deterioramento e patogeni:**

Le materie prime sarebbero facilmente deteriorabili, mentre invece molti alimenti fermentati possono essere conservati a temperatura ambiente grazie alla:

- produzione di acidi organici (specialmente acido lattico, per la fermentazione dei carboidrati o zuccheri presenti nella materia prima) che abbassano il pH dell'alimento rendendolo inospitale per la maggior parte dei patogeni e degli agenti di deterioramento;
- produzione di sostanze inibitorie naturali (batteriocine) con azione simile agli antibiotici. Le batteriocine sono a tutti gli effetti dei conservanti naturali, sono piccole proteine che possono essere prodotte da molti LAB ed inibiscono lo sviluppo di microrganismi patogeni ed agenti di deterioramento. Queste sostanze inibitorie

inoltre possono essere prodotte da alcune muffe che crescono sulla superficie dei salami;

- creazione di un ambiente riducente, che inibisce la crescita dei microrganismi aerobi;
- competizione: anche se gli alimenti sono ricchi di nutrienti, alcune sostanze sono limitanti e i microrganismi che crescono più velocemente possono consumarle a scapito di altri (Springer, 2020).

- **Produzione di acido lattico:**

L'acido lattico conferisce un sapore acidulo ai prodotti ma ha anche una funzione importante nell'ottenere la consistenza caratteristica: a pH 5,3 le proteine della carne coagulano, trattenendo meno acqua, che può essere più facilmente allontanata per essiccamento, rendendo il prodotto più consistente ed affettabile. Per comprendere l'importanza di questo fenomeno, è sufficiente confrontare l'affettabilità di una salsiccia fresca con quella di una salsiccia fermentata. Nel primo caso, il prodotto tende a sfaldarsi, mentre nel secondo caso, le fette risultano più compatte e le particelle di carne e grasso sono saldamente legate tra loro.

- **Attività proteolitica e lipolitica:**

Le proteine e il grasso della carne fresca non sono molto sapidi, mentre i prodotti della loro decomposizione (peptidi e aminoacidi dalle proteine; acidi grassi dal grasso) hanno sapori, e talvolta odori pronunciati. Questi prodotti vanno a loro volta incontro ad ulteriori processi di trasformazione (enzimatica o puramente chimica) producendo il sapore e l'aroma, caratterizzati da centinaia di composti volatili e solubili (Bressanini, 2016).

- **Condizionamento dell'aspetto del prodotto:**

- produzione di un colore rosso stabile; mentre la carne fresca perde rapidamente il colore rosso vivo una volta esposta all'aria, gli insaccati fermentati hanno un colore rosso e stabile anche dopo essere stati affettati. Il colore stabile deriva dalla formazione della nitrosomioglobina, che si ottiene dall'interazione della mioglobina (proteina rossa presente nella carne) con l'ossido nitrico, prodotto per azione biologica (dalla riduzione dei nitrati a nitriti, che possono essere ridotti ulteriormente ad ossido nitrico) o anche soltanto chimica (i nitriti si trasformano spontaneamente in ossido nitrico in ambiente acido);
- formazione di una superficie dall'aspetto desiderabile: in molti insaccati la superficie è coperta da una patina bianca, che può essere ottenuta con la crescita di muffe

specifiche. La patina protegge il prodotto dall'essiccamento eccessivo e dalla luce e può facilitare (insieme alla crescita di lieviti) la separazione del budello dalla fetta del prodotto maturo (McKenna et al., 2005).

- **Protezione dall'irrancidimento:**

Gli insaccati sono ricchi di grassi, che si possono irrancidire per azione fisica, chimica o biologica. Molti microrganismi utili presenti nella carne producono l'enzima catalasi, che degrada l'acqua ossigenata prodotta da alcuni microrganismi e che potrebbe ossidare i grassi. La crescita di muffe sulla superficie del prodotto protegge il grasso dall'azione della luce e limita l'accesso dell'ossigeno, riducendo l'irrancidimento ossidativo (Ranjana et al., 2020).

- **Riduzione del livello di sostanze tossiche:**

Oltre all'inibizione di microrganismi tossigeni, i microrganismi utili possono contribuire ulteriormente a ridurre la presenza di sostanze tossiche negli insaccati tramite:

- Eliminazione dei nitriti: anche se i nitriti svolgono alcuni ruoli utili, livelli residui eccessivi possono causare intossicazioni o favorire la produzione di nitrosammine cancerogene. Gli stafilococchi presenti naturalmente negli insaccati o aggiunti come coltura starter sono in grado di ridurre completamente i nitriti a sostanze volatili, eliminandoli;
- Prevenzione della produzione di micotossine: molte muffe sono in grado di produrre delle tossine, che hanno effetti acuti o cronici (alcune sono cancerogene). La crescita di muffe utili sulla superficie dei salumi previene la crescita di muffe tossigene (Gobbetti et al., 2018).

1.6 Salame Sudžuk

Il Sudžuk è un salame fermentato tradizionale, la cui provenienza non è certa, ma si suppone sia turca (Jašić et al., 2012). Il prodotto finito si riconosce per la sua forma a ferro di cavallo e il gusto caratteristico. La carne utilizzata per la sua produzione proviene da ruminanti, principalmente mucche e pecore più anziane e ingrassate. È preferibile la carne grassa; se si utilizza carne magra è necessario aggiungere la sugna. Il contenuto massimo di grassi nella carne può arrivare fino al 15%.

La preparazione della miscela per il sudžuk inizia con un'adeguata preparazione della carcassa che, dopo la macellazione, deve essere adeguatamente raffreddata e drenata in una cella fredda durante la notte. Successivamente la carne viene tagliata e lasciata sotto sale per

un'altra notte. La carne salata viene macinata con un tritacarne, mescolata con una percentuale dello 0,7% di spezie: aglio 0,3%, pepe 0,1%-0,3% e zucchero 0,3% (Jašić et al., 2012). Come involucro del sudžuk si utilizzano viscere di mucca o di pecora pulite e rivoltate. L'intestino può essere utilizzato immediatamente dopo la pulizia, oppure può essere salato e conservato per un anno a una temperatura di 4°C e con un'umidità relativa del 75%-80% per un utilizzo successivo (Jašić et al., 2012). Dopo aver riempito e controllato che non si formino sacche d'aria, le estremità del salume vengono legate a forma di ferro di cavallo e appese per tutta la notte a scolare su un bastone. Infine, i salami subiscono l'affumicatura.

L'affumicatura avviene con fumo freddo e la distanza dei salami dalla fonte di calore deve essere di circa 3 m. Il legno ottimale per la produzione del fumo è il faggio. Per il completamento del processo di affumicatura, ci vogliono 10 giorni. Successivamente i salami vengono trasferiti in un altro locale di essiccazione e stagionatura dove rimangono per altri 10 giorni. L'essiccazione avviene a 15°C-20°C e con un'umidità relativa dell'80%-90% (Jašić et al., 2012). Il tempo totale necessario per preparare il sudžk è di circa 21 giorni.

Il sudžuk è di per sé un pasto completo e può essere consumato da solo con qualche bevanda come spuntino, con pane caldo e “kajmak” (una tipologia di latticino di origine turca), oppure con “ustipci” (pasta fritta). Nella Figura 2 è mostrata la caratteristica forma a ferro di cavallo del salame finito, mentre nella Figura 3 è mostrata la sezione trasversale del Sudžuk.



Figura 2: Caratteristica forma a ferro di cavallo del Sudžuk



Figura 3: Sezione trasversale del Sudžuk

Al giorno d'oggi questo salume è prodotto secondo una vecchia ricetta, utilizzando solo carne di manzo, sale comune e spezie, senza starter microbici, nitriti e altri additivi alimentari. Tradizionalmente, viene prodotto durante l'inverno, quando le temperature dell'aria sono di circa 0 °C o inferiori e l'umidità relativa è elevata. Tuttavia, a causa dell'aumento della domanda dei consumatori, viene spesso prodotto al di fuori della stagione invernale, anche durante il periodo estivo, quando le condizioni climatiche sono meno appropriate per questo tipo di produzione (Ikonić et al., 2019).

2. SCOPO DEL LAVORO

La fermentazione è una tecnica antica usata per prolungare la conservazione e migliorare la qualità e le proprietà sensoriali degli alimenti. Oggi, molti metodi di fermentazione tradizionali sono stati industrializzati, utilizzando starter microbici selezionati per standardizzare il processo e le caratteristiche degli alimenti. Tuttavia, questa pratica ha portato alla diffusione globale di un numero limitato di ceppi microbici, riducendo così la biodiversità alimentare. Studiare il microbiota e le caratteristiche fisico-chimiche degli alimenti a fermentazione spontanea è essenziale per caratterizzare il prodotto e isolare nuovi ceppi tecnologici autoctoni, con l'obiettivo di preservare la biodiversità e le specificità del prodotto.

La presente Tesi di Laurea è stata condotta nell'ambito del progetto bilaterale (Italia-Montenegro) intitolato "Valorizzazione e innovazione di alimenti fermentati tradizionali del Montenegro" (FOODVALUE), numero ME23GR01, finanziato in parte dal Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale (MAE). Lo scopo della presente tesi di laurea è stato quello di effettuare una caratterizzazione chimico-fisica e microbiologica del salame montenegrino Sudžuk. A tale scopo, diciotto campioni di salame Sudžuk sono stati prelevati da tre produttori locali montenegrini situati nei comuni di Franca, Bijelo Polje e Rozaje. Ogni produttore ha fornito sei campioni, suddivisi in tre lotti da due campioni ciascuno. La caratterizzazione del microbiota di tale insaccato è stata eseguita utilizzando tecniche coltura-dipendenti e analisi metagenomiche. Una migliore conoscenza di questi alimenti tradizionali montenegrini, unitamente alla conservazione del loro patrimonio microbico e genetico, rappresenta uno strumento fondamentale per porre le basi necessarie a garantire l'innovazione di tali prodotti a livello industriale e per ottenere dei marchi di protezione della qualità e autenticità di questi alimenti.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Per l'allestimento delle prove sperimentali, sono stati acquistati diciotto salami *Sudžuk*, da tre diversi produttori locali montenegrini identificati come Produttore A, B e C. Da ciascun produttore sono stati prelevati tre lotti, ognuno composto da due campioni di 350 g. I campioni sono stati trasportati a temperatura ambiente nelle loro confezioni originali e, una volta arrivati in laboratorio, sono stati conservati a +4°C. Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche dei salami indicate sulle etichette dei campioni analizzati.

Tabella 1: Caratteristiche dei campioni di Sudžuk riportate sulle etichette dei prodotti analizzati.

Parametro	Produttore A	Produttore B	Produttore C
Data di produzione-Lotto I	13.05.2023	06.07.2023	03.05.2023
Data di produzione-Lotto II	19.06.2023	06.07.2023	03.05.2023
Data di produzione-Lotto III	02.06.2023	21.07.2023	10.07.2023
Valore energetico	1800,91 kJ/434,881 Kcal	N.r	1516 kJ/365 Kcal
Proteine	24,59 g/100 g	N.r	20 g/100 g
Carboidrati	0,12 g/100 g	N.r	0,2 g/100 g
Zucchero	0,12 g/100 g	N.r	0,2 g/100 g
Contenuto di grasso	37,33 g/100 g	N.r	N.r
Acidi grassi saturi totali	17,96 g/100 g	N.r	13 g/100 g
Contenuto di sale	4,12 g/100 g	N.r	3,5 g/100 g
Regolatore di acidità	E575	N.r	N.r
Antiossidante	E301	N.r	N.r
Conservante	E250	N.r	E250

3.2 Analisi della struttura (*texture*) e del colore

Per l'analisi della struttura (*texture*), sono stati preparati campioni cilindrici per ciascun campione, con un diametro di 20 mm e un'altezza di 15 mm. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti ad una compressione uniassiale utilizzando il CT3-4500 Texture Analyzer (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro MA, USA) dotato di una sonda di 36 mm di diametro (mod. TA-AACC36) con una velocità di 1,5 mm/s e una deformazione non distruttiva (40%) (Osimani et al., 2023). Per effettuare la misurazione, tutti i campioni sono stati posizionati tra la base di supporto dello strumento e la cella di carico, alla quale è stato attribuito un valore di 4500 g. Attraverso questa valutazione sono stati estratti tre parametri principali: durezza (*hardness*), coesione (*cohesiveness*) ed elasticità (*springiness*).

Per la determinazione del colore dei salami è stato utilizzato il colorimetro Chroma Meter CR-200 (Minolta, Osaka, Japan). Il colore è stato determinato su fette spesse 2 cm secondo il sistema CIE $L^*a^*b^*$ (L^* , chiaro; a^* , rosso/verde; b^* , blu/giallo). Le immagini dei salami sono state ottenute tagliandole longitudinalmente (spessore di 7 mm) e acquisendo le sezioni trasversali utilizzando lo scanner ENVY 6200 Series (HP, Palo Alto, CA, USA) come descritto precedentemente da Osimani et al., (2023). I risultati sono stati espressi come media di sei campioni per ciascun produttore \pm deviazione standard.

3.3 Analisi fisico-chimiche

L'attività dell'acqua (a_w) dei salami è stata misurata secondo il metodo ISO 21807:2004 utilizzando un apparecchio AwTherm (Rotronic).

Per la valutazione dei restanti parametri fisico-chimici, i campioni di salame Sudžuk sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati" dove:

- l'umidità/materia secca è stata determinata con il metodo gravimetrico (PRT.PGBT.202 Rev. 000 2007);

- il contenuto di sale (cloruro di sodio) è stato determinato tramite analisi con cromatografia ionica (PRT.LMB5.025 Rev. 000 2018);
- le proteine sono state valutate con il metodo Kjeldahl (AOAC, 981.10) (PRT.PGBT.248 Rev. 001 2017);
- i grassi sono stati determinati con estrazione eterea (AOAC, 991.36) (PRT.PGBT.204 Rev. 001 2017);
- le ceneri sono state valutate con il metodo AOAC, 920.153 (PRT.PGCHIM.206 Rev. 008 2015);
- gli acidi grassi saturi e insaturi sono stati determinati tramite gascromatografia (PRT.LMB5.002 Rev. 006 2020);
- il contenuto di ammine biogene è stato determinato tramite il metodo HPLC con rilevazione UV-visibile (PRT.LMB5.024 Rev. 002 2021);
- il numero di perossidi nelle sostanze grasse è stato valutato secondo il metodo AOAC 965.33 (PRT.PGBT.211 Rev. 002 2015).

I risultati sono stati espressi come media di sei campioni per ciascun produttore \pm deviazione standard.

3.4 Conte vitali in piastra

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra, sono stati prelevati 10 g da ogni salame, aggiunti a 90 mL di acqua peptonata sterile (0,1% peptone, p/v) e posti in sacchetto Stomacher in condizione di sterilità. Ogni campione è stato omogeneizzato utilizzando omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator (VWR International PBI, Milano, Italia) per 2 minuti a 260 rpm. Successivamente, 1 mL di ogni omogenato è stato utilizzato per l'allestimento di diluizioni scalari decimali. Da ciascuna diluizione decimale sono stati prelevati rispettivamente, 1 mL per l'allestimento della semina per inclusione e 0,1 mL per l'allestimento della semina per spandimento su terreni di coltura specifici per diversi gruppi di microrganismi:

- M17, la cui composizione è riportata nella Tabella 2, per la crescita e l'enumerazione dei presunti lattococchi;
- MRS (De Man Rogosa e Sharpe), la cui composizione è riportata nella Tabella 3, per la crescita e l'enumerazione dei presunti lattobacilli;

La selettività di entrambi è stata incrementata aggiungendo l'antibiotico cicloesimide (0,250 g/L). È stato utilizzato il metodo per inclusione e le piastre sono state incubate a 37°C per 48-72 h.

Tabella 2: Composizione del terreno di coltura M17

Componente	Composizione (g/L)
Glicerofosfato disodico	19
Agar	15
Lattosio	5
Estratto di carne	5
Peptone di soia	5
Peptone	2,5
Triptosio	2,5
Estratto di lievito	2,5
Acido ascorbico	0,50
Magnesio solfato	0,25

Tabella 3: Composizione del terreno di coltura MRS (de Man Rogosa Sharpe)

Componente	Composizione (g/L)
Glucosio	20
Agar	15
Digerito enzimatico di caseina	10
Estratto di carne	10
Sodio acetato	5
Estratto di lievito	4
Fosfato di dipotassio	2
Triammonio citrato	2
Tween 80	1
Magnesio solfato	0,2
Manganese solfato	0,05

- *Mannitol Salt Agar* (MSA), un terreno di coltura selettivo e differenziale per la crescita e l'enumerazione di stafilococchi (coagulasi negativi e positivi), la cui composizione è riportata nella Tabella 4. Questo terreno contiene un'elevata concentrazione di sodio cloruro che inibisce la crescita di gran parte dei microrganismi, ad eccezione degli stafilococchi. La fermentazione del mannitolo causa un'acidificazione del mezzo, che determina un viraggio dell'indicatore, il rosso fenolo, da rosso a giallo. I cocci coagulasi positivi crescono ottimamente sul terreno e danno origine a colonie di colore giallo circondate da un alone dello stesso colore, mentre i cocci coagulasi-negativi, in quanto incapaci di emo-agglutinare, producono colonie piccole con aloni di colore porpora-rossastro dopo che le piastre sono state incubate per 24-48 h a 37°C in aerobiosi.

Tabella 4: Composizione del terreno di coltura MSA (*Mannitol salt agar*)

Componente	Composizione (g/L)
Sodio cloruro	75
Agar	15
D-mannitolo	10
Digerito pancreatico di caseina	5
Digerito peptidico di tessuto animale	5
Estratto di carne	1
Rosso fenolo	0,025

- *Pseudomonas Agar Base* (PAB), la cui composizione è riportata nella Tabella 5, è il terreno di coltura utilizzato per la crescita e l'enumerazione dei presunti *Pseudomonas* spp. Tale terreno è costituito da una miscela liofilizzata di cetrimide, acido fusidico e cefaloridina e viene impiegato per l'arricchimento selettivo del terreno. Le piastre sono poi state incubate a 30 °C per 24-48 ore.

Tabella 5: Composizione del terreno di coltura PAB (*Pseudomonas agar base*)

Componente	Composizione (g/L)
Peptone di gelatina	16
Caseine idrolizzate	10
Solfato di potassio	10
Cloruro di magnesio	1,4
Agar	11,5

I risultati delle conte vitali per ogni gruppo microbiologico sono stati espressi come media di sei campioni per ciascun produttore \pm deviazione standard.

3.5 Analisi metagenomica dei salami *Sudzuk*

3.5.1 Estrazione del DNA microbico

Le aliquote da 1,5 mL degli omogenati (diluizione 10^{-1}) preparati precedentemente per le conte vitali sono state centrifugate a 14000 g per 10 minuti per raccogliere le cellule microbiche, che sono state poi utilizzate per l'estrazione del DNA microbico totale utilizzando il kit E.Z.N.A. Soil DNA (Omega Bio-tek, GA, USA).

La quantità e la purezza del DNA estratto sono state verificate con il Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Il DNA estratto è stato conservato a -20°C prima delle successive analisi.

3.5.2 Amplificazione del DNA batterico e fungino tramite PCR

Il DNA estratto dai campioni è stato utilizzato per l'analisi metagenomica (batteri e funghi) dopo essere stato amplificato tramite PCR. La V3-V4 regione del gene 16S rRNA batterico è stato amplificato utilizzando la coppia dei primers 16S-F e 16S-R (Klindworth et al., 2013), mentre il gene 26S rRNA del DNA fungino è stato amplificato utilizzando la

coppia dei primers NL4-R e LS2-MF (Mota-Gutierrez et al., 2019). Le sequenze di tutti i primers sono riportate nella Tabella 6.

Tabella 6: Sequenze dei primers utilizzati per amplificare il DNA batterico (16S-F e 16S-R) e fungino (NL4-R e LS2-MF)

16S-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCGTCGGCAGCGTCAGAT GTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTCGTGGGCTCGGAG ATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC
NL4-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTCCGTGTTTCAAGAC GG
LS2-MF	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGTCGAGTTGTTTGGGA AT

La composizione della miscela di reazione PCR (batteri e funghi) di volume totale di 25 μL è riportata nella Tabella 7.

Tabella 7: Composizione della miscela di reazione PCR usata per l'amplificazione del DNA batterico e fungino

Componenti	Volume iniziale (μL per ogni campione)
Mastermix*	12.5 μL
Primer forward (10 μM) (16S-F e LS2-MF)	2.5 μL
Primer reverse (10 μM) (16S-R e NL4-R)	2.5 μL
H ₂ O**	5,5 μL
DNA	2 μL

* Taq DNA polimerasi mastermix (MyFi Mix, Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, Ohio, USA);

** Acqua deionizzata sterile per biologia molecolare (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Le amplificazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore “Mastercycler® X50” (Eppendorf, Hamburg, Germania), seguendo il ciclo termico riportato in **Figura 4**.

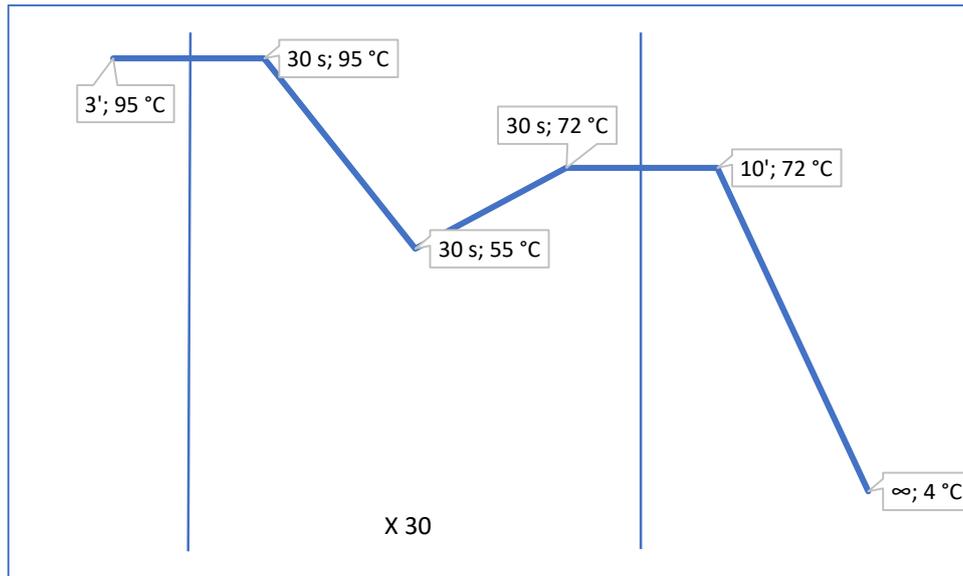


Figura 4: Ciclo termico seguito per la PCR

3.5.3 Separazione e analisi degli acidi nucleici mediante elettroforesi su gel di agarosio

I prodotti della PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio concentrato all'1.5% (p/v), utilizzando il tampone Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989) e GelRed (10000X) (Biotium, Fremont, CA, USA) come intercalante. La migrazione elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 100 V utilizzando il marcatore molecolare “HyperLadder™ 100bp” (Bioline, BiolineReagents Ltd, Regno Unito). Dopo l'elettroforesi le bande di prodotti della PCR su gel sono state visualizzate tramite luce UV ($\lambda = 260$ nm) ed il gel è stato quindi fotografato impiegando il sistema COMPLETE PHOTO XT101 (Explera, Jesi (AN), Italia).

3.5.4 Analisi metagenomica (Illumina)

I prodotti della PCR sono stati inviati all'Università degli Studi di Torino per l'analisi metagenomica. Il sequenziamento *paired-end* (2x250 bp) è stato eseguito utilizzando il MiSeq Illumina con la chimica V2, seguendo le istruzioni del produttore. I dati grezzi sono stati analizzati utilizzando il software QIIME2 (Bolyen et al., 2019), dove i primer e gli adattatori sono stati rimossi con *Cutadapt* e successivamente filtrati per qualità utilizzando l'algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2016). Infine, le basi di bassa qualità e le sequenze

chimeriche sono state filtrate per ottenere *Amplicon Sequence Variants* (ASV). Per l'assegnazione tassonomica del biota batterico è stato utilizzato il database del gene 16S rRNA di *Greengenes*, mentre per il microbiota è stato utilizzato il database costruito manualmente (Mota-Gutierrez et al., 2018). L'assegnazione tassonomica risultante di ciascun ASV è stata verificata manualmente due volte utilizzando il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

3.6 Analisi statistiche

Il Tukey Honest Significant Difference (HSD) test ($P < 0.05$) è stato effettuato per valutare le differenze statisticamente significative tra i vari produttori utilizzando software JMP® Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Risultati analisi chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico-fisiche dei salami vengono riportati nelle tabelle 8 e 9. Nella Tabella 8 sono riportati i valori dei principali parametri fisici del *Sudžuk* che sono: pH, a_w , umidità e numero dei perossidi.

Per quanto riguarda il pH si può notare che vi è una variazione statisticamente significativa a livello del produttore B che risulta avere un valore medio superiore (5.43 ± 0.18) rispetto ai valori inerenti ai produttori A e C, che invece non risultano statisticamente differenti tra di loro (4.96 ± 0.05 per il produttore A e 5.05 ± 0.04 per il produttore C). Questi valori risultano essere inferiori rispetto ad altri risultati ottenuti dallo studio del pH degli insaccati fermentati prodotti a Fabriano, nella Regione Marche (Cardinali et al., 2018), e notevolmente inferiori rispetto ai dati ottenuti da uno studio effettuato sui salami DOP Varzi, Brianza e Piacentino (Di Cagno et al., 2008).

Per quanto riguarda invece il parametro dell' a_w , non sono state rilevate delle differenze significative tra i diversi produttori, con un range compreso tra 0.87 ± 0.03 (produttore C) e 0.89 ± 0.02 (produttore B). Tali valori di a_w risultano essere concordi con altri dati riportati da uno studio effettuato su dei salami italiani (Rocchetti et al., 2012).

Al contrario, nei valori riportati per il numero di perossidi, notiamo solamente una variazione statisticamente significativa a livello del valore medio riferito al produttore B (8.67 ± 1.21 O₂/Kg) che è risultato essere anche il valore medio più basso.

Tabella 8: Parametri chimico-fisici del Sudžuk

Produttore	pH	a_w	Umidità (RH%)	Numero perossidi meq O₂/Kg
A	4.96±0.05 ^b	0.88±0.03 ^a	32.18±5.89 ^{ab}	17.50±5.61 ^a
B	5.43±0.18 ^a	0.89±0.02 ^a	38.14±7.22 ^a	8.67±1.21 ^b
C	5.05±0.04 ^b	0.87±0.03 ^a	24.38±0.98 ^b	21.50±1.97 ^a

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha = 0.05$)

Nella Tabella 9 è riportata la composizione chimica dei salami analizzati. Non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i produttori, tranne per il produttore B, che mostra valori statisticamente inferiori rispetto agli altri produttori per quanto riguarda la concentrazione delle proteine (18,27±1,95 g/100g) e le ceneri (3,40±0,36 g/100g). La concentrazione dei carboidrati era nel range che va da un valore medio minimo di 3.05±3.03 g/100g (produttore B) a un valore medio massimo di 4.49±2.44 g/100g (produttore C)). La concentrazione dei lipidi era nel range da 34.12±7.43 g/100g (produttore A) a 39.01±3.92 g/100g (produttore C). La concentrazione del sale era uguale nei salami di tutti i tre produttori (2.76±0.00 g/100g).

Per quanto riguarda gli acidi grassi insaturi totali, monoinsaturi totali, polinsaturi totali e omega 6, non ci sono le differenze statisticamente significative tra i tre produttori. Per quanto riguarda gli omega 3, il produttore C mostra i valori più alti (0.17±0.04 g/100g). Per quanto riguarda invece la quantità di acidi grassi saturi totali, il produttore C (21.14±4.15 g/100g) mostra i valori statisticamente più alti rispetto il produttore A (16.11±2.72 g/L).

Tabella 9: Valori dei principali componenti chimici del Sudžuk

Componente	Produttore A	Produttore B	Produttore C
Carboidrati	3.52±1.81 ^a	3.05±3.03 ^a	4.49±2.44 ^a
Proteine	24.70±1.55 ^a	18.27±1.95 ^b	26.73±1.18 ^a
Lipidi	34.12±7.43 ^a	37.15±7.84 ^a	39.01±3.92 ^a
Sale	2.76±0.00 ^a	2.76±0.00 ^a	2.76±0.00 ^a
Ceneri	5.49±0.40 ^a	3.40±0.36 ^b	5.38±0.21 ^a
Acidi grassi insaturi totali	15.64±2.87 ^a	19.00±2.48 ^a	17.87±5.81 ^a
Acidi grassi monoinsaturi totali	17.12±2.76 ^a	18.17±2.29 ^a	16.92±1.94 ^a
Acidi grassi polinsaturi totali	0.81±0.13 ^a	0.84±0.21 ^a	0.96±0.24 ^a
Acidi grassi saturi totali	16.11±2.72 ^b	18.15±4.04 ^{ab}	21.14±4.15 ^a
omega 3	0.13±0.01 ^b	0.13±0.03 ^b	0.17±0.04 ^a
omega 6	0.52±0.06 ^a	0.56±0.15 ^a	0.65±0.21 ^a

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha=0.05$)

Nella Tabella 10 sono riportati i valori delle ammine biogene. Con il termine “ammine biogene” si intendono dei composti organici azotati ampiamente presenti negli alimenti fermentati. Un'eccessiva assunzione di queste sostanze può causare problemi di salute come mal di testa, vertigini, nausea e vomito, oltre a possedere un elevato potere cancerogeno (Doeun et al., 2017). Le colture starter, utilizzate nella fermentazione degli insaccati di carne, risultano essere responsabili della produzione di questi composti. Risulta interessante notare come, nella tabella sottostante, la putrescina e la tiramina si sono rivelate essere le ammine maggiormente presenti all'interno dei prodotti in accordo con quanto riportato da altri autori in seguito a studi effettuati su insaccati fermentati provenienti da altri paesi (soppressata, chorizo e fuet) (Suzzi e Gardini, 2003). La formazione di tiramina negli insaccati fermentati è data dall'attività decarbossilica di vari microrganismi fermentanti o contaminanti tra cui varie specie di *Lactobacillus* ed *Enterococcus*, mentre la formazione della putrescina è associata alla presenza di *Pseudomonas spp*, ad alcune specie di

Lactobacillus e a vari generi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Durlu-Özkay et al., 2001). Ulteriori studi hanno riportato che le concentrazioni di ammine biogene sono molto eterogenee, in quanto la loro concentrazione varia a seconda del tipo di prodotto e dalle tecniche di produzione (Komprda et al., 2004). Come si può osservare dalla tabella sottostante, ci sono state delle differenze significative tra i vari produttori. Interessante notare come, per la cadaverina, si è riscontrato un valore estremamente alto (281.5 ± 204.1) per il produttore B, mentre per i produttori A (14.0 ± 17.2) e C (26.3 ± 23.4) sono stati ottenuti dei valori più concordi tra loro. Elevati contenuti di cadaverina sono sinonimo di cattive condizioni igieniche o il risultato di un'adozione errata di procedure di produzione, come l'aumento eccessivo della temperatura durante la fermentazione, la maturazione o lo stoccaggio (Bover-Cid, 2000). Per la fenilettilammina si è ottenuto un solo valore al di sotto del limite di rilevabilità per il produttore C, analogo discorso può essere fatto per la spermina nel medesimo produttore e per la triptamina sia nel produttore C che nel produttore A. Per l'istamina, è stato riscontrato un valore molto alto nel produttore A (102.7 ± 88.6) a dispetto dei produttori B (50.3 ± 29.5) e C (87.5 ± 66.0), mentre per la putrescina sono stati ottenuti dei dati contrari in quanto per il produttore A si è riscontrato un valore nettamente più basso (31.2 ± 29.0) rispetto ai produttori B (287.5 ± 215.4) e C (355.2 ± 86.3). Infine, è interessante notare che l'unica sostanza ad avere dei valori vicini tra di loro, è risultata essere la tiramina con il valore più basso riscontrato per il produttore A (171.7 ± 83.7) e il valore più alto per il produttore B (297.8 ± 196.2), per il produttore C abbiamo ottenuto un valore pari a 228.5 ± 119.5 .

Tabella 10: Concentrazione delle ammine biogene (mg/Kg) nei salami Sudžuk

Ammine biogene	Produttore A	Produttore B	Produttore C
Cadaverina	14.0 ± 17.2^b	281.5 ± 204.1^a	26.3 ± 23.4^b
Fenilettilammina	3.0 ± 7.3^a	7.8 ± 19.2^a	$<1^a$
Indice BAI	20.8 ± 18.1^a	97.8 ± 55.9^a	242.2 ± 251.6^a
Istamina	102.7 ± 88.6^a	50.3 ± 29.5^a	87.5 ± 66.0^a
Putrescina	31.2 ± 29.0^b	287.5 ± 215.4^a	355.2 ± 86.3^a
Spermidina	$<1^a$	1.2 ± 2.9^a	32.7 ± 58.1^a
Spermina	8.5 ± 4.5^a	6.3 ± 7.2^a	$<1^a$
Tiramina	171.7 ± 83.7^a	297.8 ± 196.2^a	228.5 ± 119.5^a
Triptamina	$<1^a$	10.8 ± 26.5^a	$<1^a$

Valori espressi come media \pm deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha = 0.05$)

4.2 Risultati dell'analisi del colore

Come si può notare dai risultati riportati nella Tabella 11, la valutazione del parametro del colore dei campioni di *Sudžuk*, provenienti da tre produttori differenti, ha evidenziato che non ci sono state delle differenze statisticamente significative al livello del parametro L* (chiaro). Infatti, possiamo osservare dei valori compresi in un range che va da 41,38±3.17 (produttore C) a 44,30±5.75 (produttore A).

Anche per il parametro a* (rosso/verde) non si sono verificate variazioni significative, dato che sono stati ottenuti dei valori compresi tra 12.36±5.75 (produttore C) e 15.36±0.84 (produttore B). Infine, per quanto concerne il parametro b* (blu/giallo), possiamo notare le uniche variazioni significative tra i tre produttori. Infatti, come riportato in tabella, il valore di b* rilevato nel salame *Sudžuk* del produttore B (10.51±3.35) risulta essere statisticamente superiore rispetto ai valori medi rilevati per gli altri due produttori (5.58±1.27 per il produttore A e 4.33±1.24 per il produttore C). Il parametro b* denota gli opposti blu-giallo, con valori < 0 verso il blu e valori > 0 verso il giallo. Questo risultato potrebbe indicare l'irrancidimento dei grassi dovuto all'ossidazione lipidica come conseguenza del processo di affumicatura (Osimani et al., 2023).

Tabella 11: Media e deviazione standard del colore dei salami *Sudžuk*

Produttore	L*	a*	b*
Produttore A	44.30±5.75 ^a	14.59±1.79 ^a	5.58±1.27 ^b
Produttore B	41.48±5.25 ^a	15.36±0.84 ^a	10.51±3.35 ^a
Produttore C	41.38±3.17 ^a	12.36±5.75 ^a	4.33±1.24 ^b

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha = 0.05$)

Nella **Figura 5** sono mostrate le immagini delle fette dei salami (spessore di 7 mm) acquisite utilizzando lo scanner.



Figura 5: Immagini delle fette dei salami acquisite con lo scanner

4.3 Risultati dell'analisi della struttura (*texture*)

Dall'analisi della struttura dei salami *Sudžuk* sono emerse delle differenze statisticamente significative tra i tre produttori a livello del parametro di durezza (*Hardness*). Come riportato in Tabella 12, possiamo notare il valore medio riferito al solo produttore B (3.80 ± 2.06) risulta essere statisticamente inferiore rispetto ai valori medi associati al produttore A (28.76 ± 12.96) e al produttore C (19.14 ± 8.70). Per quanto concerne i valori riferiti al parametro di coesione (*Cohesiveness*), non sono state mostrate differenze statisticamente significative con valori compresi tra 0.80 ± 0.05 (produttore C) e 0.87 ± 0.06 (produttore A). Analogamente, anche per il parametro elasticità (*Springiness*) non sono state evidenziate differenze significative con dei valori medi compresi tra 1.57 ± 0.21 (produttore C) e 1.72 ± 0.21 (produttore A).

Tabella 12: Struttura (texture) dei salami Sudžuk

Produttore	Durezza (Hardness) (N)	Coesione (Cohesiveness)	Elasticità (Springiness)
A	28.76±12.96 ^a	0.87±0.06 ^a	1.71±0.25 ^a
B	3.80±2.06 ^b	0.85±0.15 ^a	1.72±0.21 ^a
C	19.14±8.70 ^a	0.80±0.05 ^a	1.57±0.21 ^a

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha=0.05$)

4.4 Risultati delle conte vitali

I risultati delle conte vitali in piastra sui campioni di salame *Sudžuk* dei tre differenti produttori presi in esame sono mostrati nella *Figura 6*.

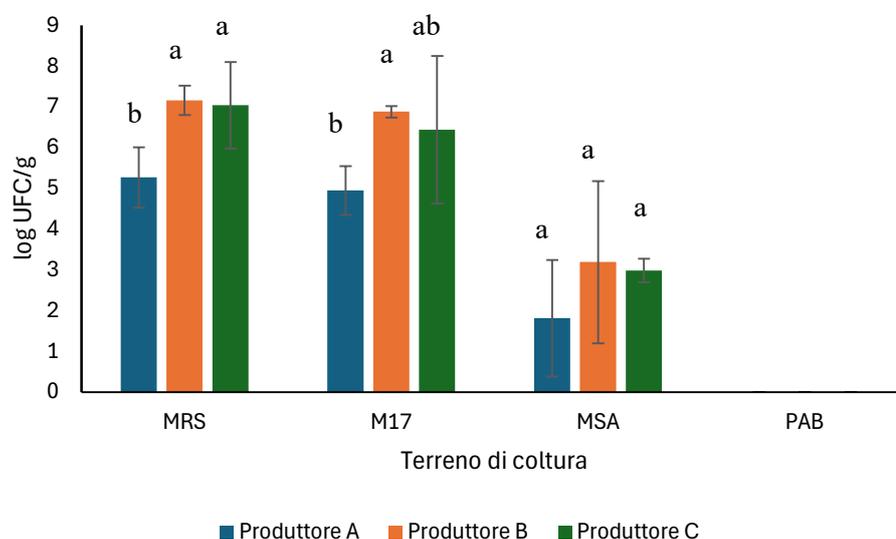


Figura 6: Carica dei presunti lattobacilli (MRS), lattococchi (M17), cocchi coagulasi negativi (MSA) e *Pseudomonas* spp. (PAB) nei salami Sudžuk.

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test ($\alpha=0.05$).

Nel complesso, dalle analisi effettuate, è stata rivelata la presenza di una comunità microbica attiva composta principalmente da lattobacilli, cocchi coagulasi negativi e lattococchi, mentre non sono stati rilevati batteri del genere *Pseudomonas*. In maggior dettaglio possiamo notare che per i lattobacilli, a livello dei produttori B e C, non ci sono delle variazioni statisticamente significative con dei valori pari a 7.16 ± 0.32 log UFC/g per il produttore B e un valore pari a 7.04 ± 1.06 log UFC/g per il produttore C. Diversamente, il produttore A ha mostrato la carica statisticamente più bassa di questo gruppo di microrganismi con un valore pari a 5.27 ± 0.74 log UFC/g. Analogo discorso si può fare per quanto riguarda la presenza di lattococchi, con il solo produttore A che presenta un valore statisticamente inferiore (4.95 ± 0.60 log UFC/g) rispetto al produttore B (6.88 ± 0.14 log UFC/g). I batteri lattici sono i principali responsabili della fermentazione lattica a partire dal glucosio con produzione di acido lattico (Galli, 2005). Da notare inoltre, che sia i lattococchi che i lattobacilli sono responsabili nella produzione, all'interno dei prodotti a base di carne, di tiamina (Anderegg et al., 2020; Del Rio et al., 2024; Liu et al., 2024). Generalmente, il carico di batteri lattici nei campioni di Sudzuk analizzati nel presente lavoro di tesi è risultato inferiore a quello riportato da Colo et al., (2015) dopo l'analisi dei salami Sudžuk bosniaci alla fine dei 28 giorni di fermentazione, che mostrava valori superiori a 9 log UFC/g. Diversamente, i nostri risultati sono coerenti con quanto riportato da precedenti studi effettuati sui salumi fermentati provenienti dai paesi dell'Europa meridionale (Osimani et al., 2023).

Discorso diverso deve essere fatto per i CCN in quanto a livello statistico non sono stati rivelate differenze significative tra i tre produttori con valori compresi tra 1.81 ± 1.43 log UFC/g (produttore A) e 3.19 ± 1.99 log UFC/g (produttore B). I nostri risultati mostrano valori inferiori rispetto a quelli riportati da Sırıken et al. (2006), i quali hanno evidenziato che il 23% dei campioni di Sudzuk prodotti nella provincia di Afyon (Turchia) conteneva più di 6 log UFC/g di micrococchi/stafilococchi. Al contrario, i nostri risultati sono coerenti con quanto riportato da precedenti studi effettuati sui salumi prodotti con carne di maiale (Champi et al., 2020) e negli impasti di carne utilizzati nella produzione del Ciauscolo (Osimani et al., 2023). Da notare inoltre, che i CCN contribuiscono allo sviluppo di un piacevole colore rosso nel prodotto finale.

Per quanto riguarda la presenza di *Pseudomonas* spp. non è stato possibile rilevare la loro presenza nei campioni analizzati. Questo è un indicatore molto importante, che ci fa capire l'elevata qualità delle materie prime utilizzate e dei processi produttivi effettuati.

4.5 Risultati delle analisi metagenomiche

I risultati dell'analisi metagenomica del biota batterico nei salami Sudzuk ottenuti dai tre produttori diversi sono riportati nella Figura 7. *Latilactobacillus sakei* è evidenziato come la specie predominante nei salami del produttore A e B, con un'abbondanza relativa del 78% nel produttore A e del 30% nel produttore B. Nel produttore A, i batteri del genere *Lactobacillus* erano presenti al 17%, mentre nel produttore B, oltre a *Latilactobacillus sakei*, i microrganismi rilevati in maggior numero sono stati: *Lactococcus lactis* con una percentuale del 19%, e *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus* e *Bacillus*, tutti con una percentuale dell'8%. Nel produttore C, i batteri del genere *Pediococcus* erano dominanti con il 48% dell'abbondanza relativa, seguiti da *Latilactobacillus sakei* con il 40%. I batteri del genere *Clostridium* erano presenti esclusivamente nel produttore B in una piccola percentuale (1%), mentre quelli del genere *Acinetobacter* (5%) erano presenti solo nei salami del produttore C.

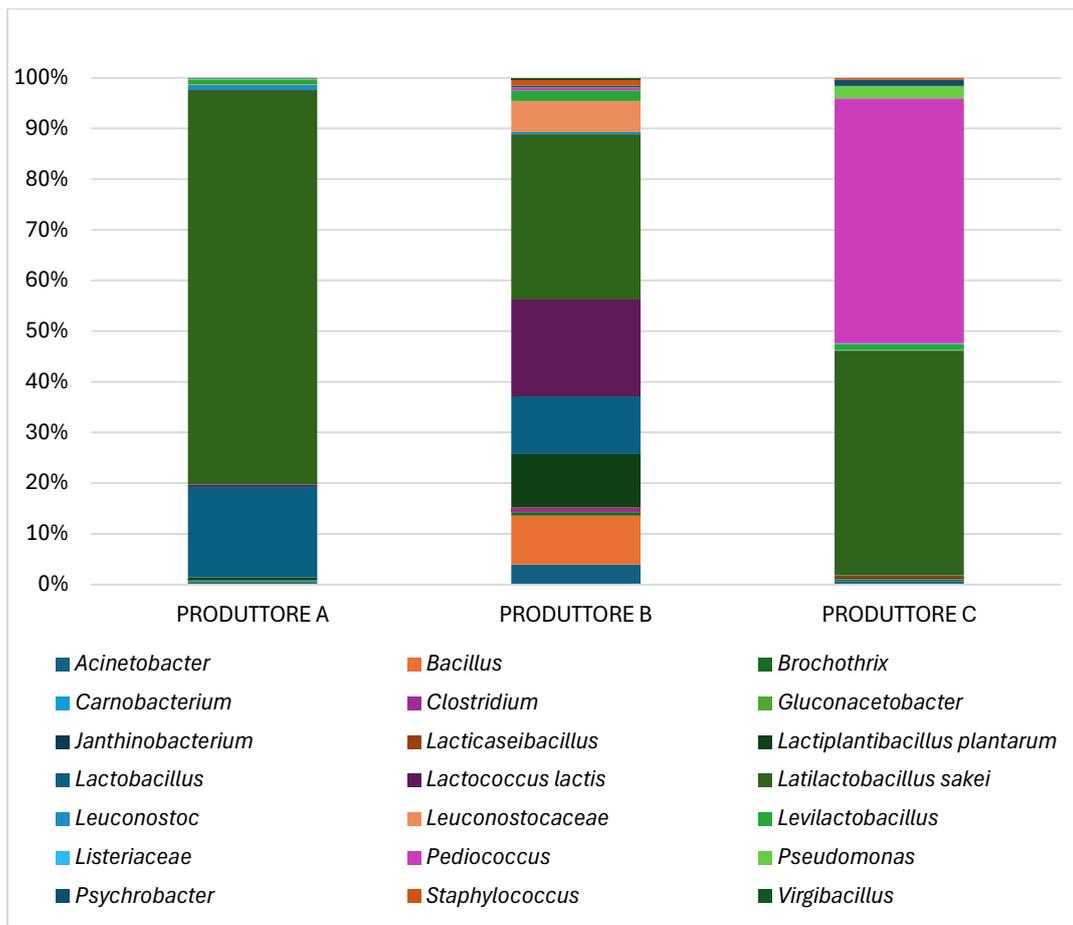


Figura 7: Biota batterico dei salami Sudzuk

Altre differenze che possiamo notare sono: la mancanza di *Staphylococcus*, *Virgibacillus* e di *Janthinobacterium* nel produttore A, la completa assenza di *Carnobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Janthinobacterium* e di *Listeriaceae* nei salumi del produttore B. Infine nel produttore C, si osserva l'assenza di *Gluconacetobacter* e di *Virgibacillus*. Questo ci dà un'indicazione di quanto sia variegato il microbiota dei salumi, provenienti da 3 produttori diversi. Interessante notare come *Lactobacillus sakei* è risultato essere, su 2 produttori su 3, il genere microbico dominante andando a confermare l'adattamento di tale microrganismo sugli insaccati fermentati come riportato su precedenti studi effettuati su salumi italiani (es. Salame Milano, Ciauscolo) e salumi provenienti da altri paesi del Mediterraneo (es. Chorizo, Fuet) (Aquilanti et al., 2016). Per quanto riguarda *Pediococcus*, i risultati riportati dal test hanno confermato in parte quanto analizzato in studi passati effettuati su insaccati fermentati (es. Ciauscolo, Chorizo) che riportavano le specie del genere *Pediococcus* presenti con bassa frequenza (Aquilanti et al., 2016). Tuttavia, ciò non si è rivelato essere così per il produttore C, in quanto *Pediococcus* si è rivelato essere il genere dominante. Risulta interessante notare che questo genere microbico è solitamente aggiunto come coltura starter in quanto responsabile della produzione di batteriocine con un importante effetto antilisteriale (Albano et al., 2007). Vengono anche utilizzate come colture protettive contro il comune deterioramento degli alimenti (Porto et al., 2017).

I risultati dell'analisi metagenomica del microbiota nei salami Sudzuk ottenuti dai tre produttori diversi sono riportati nella Figura 8.

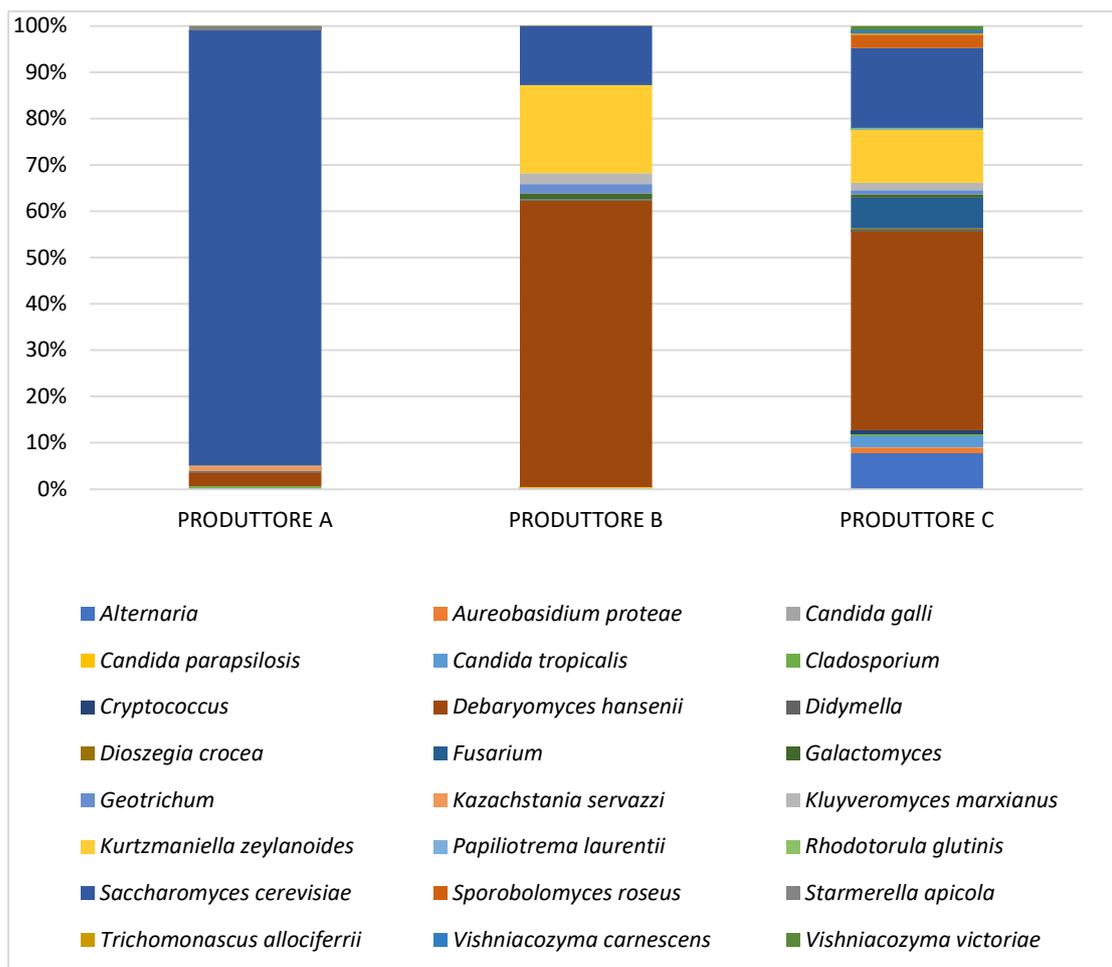


Figura 8: Micobiota dei salami Sudžuk

L'analisi ha mostrato delle differenze importanti tra i 3 produttori. *Saccharomyces cerevisiae* è stata identificata come la specie dominante nei salami ottenuti dal produttore A, con una percentuale del 93%, mentre per i produttori B e C la specie dominante si è rivelata essere *Debaryomyces hansenii* con una presenza del 61% nel produttore B e con una percentuale del 42% nel produttore C. E' interessante evidenziare il fatto che *Debaryomyces hansenii* si è rivelato essere il secondo microrganismo maggiormente presente nei salami del produttore A con una percentuale del 3%, mentre *Saccharomyces cerevisiae* è risultato essere il secondo genere microbico maggiormente presente nel produttore C con una percentuale del 17%, mentre nel produttore B è risultato essere il terzo microrganismo più presente, con un valore del 13%, dietro a *Kurtzmaniella zeylanoides* che si è dimostrato essere, sempre per il produttore B, il secondo microrganismo maggiormente presente con una percentuale del 19%. Sempre quest'ultima specie fungina, con una percentuale

dell'11%, è risultata essere la terza specie fungina maggiormente presente nel produttore C. Le specie *Candida galli* e *Candida parapsilosis* sono state identificate esclusivamente nel produttore B in una percentuale minima dello 0,2% e 0.1%, rispettivamente. Per quanto riguarda invece *Candida tropicalis*, possiamo notare una presenza del 2,4% esclusivamente nel produttore C. Altre specie presenti esclusivamente nei salami dell'ultimo produttore sono quelle appartenenti ai generi *Alternaria* e *Fusarium*, con una percentuale del 7,5% e 6.4%, rispettivamente. Tutte queste osservazioni ci vanno ad indicare quanto risulta essere variegata la popolazione fungina all'interno dei salami provenienti da questi 3 produttori diversi.

Possiamo quindi affermare, che nel presente studio, è stata osservata una varietà significativa di specie e generi microbici sia per i funghi che per i batteri. Per quanto riguarda i funghi sono stati identificati 24 specie o generi diversi nei prodotti. Tra questi, i generi più frequentemente riscontrati sono stati *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Kazachstania*, e *Geotrichum*, presenti in diverse percentuali nei campioni, con alcune specie come *Saccharomyces cerevisiae* che generalmente mostrano una abbondanza relativa molto alta, indicando una presenza comune e potenzialmente significativa nel contesto del prodotto analizzato.

Per quanto riguarda i batteri, la distribuzione percentuale varia notevolmente tra i campioni, con alcune specie che dominano in specifici prodotti, suggerendo un'influenza significativa delle condizioni specifiche del prodotto sulla composizione batterica. Questa diversità microbica riscontrata nei prodotti può avere implicazioni importanti sia per la qualità del prodotto che per la salute umana, a seconda delle caratteristiche specifiche dei generi e delle specie presenti. Ad esempio, molti dei funghi e batteri identificati sono noti per la loro capacità di influenzare le proprietà organolettiche del prodotto, nonché per il loro potenziale ruolo probiotico o patogeno. In conclusione, l'analisi delle specie microbiche nei prodotti ha rivelato una notevole diversità di funghi e batteri, con alcune specie che mostrano una prevalenza significativa. Questa diversità è fondamentale per comprendere l'impatto microbiologico sui prodotti e per sviluppare strategie adeguate di controllo della qualità e sicurezza alimentare.

5. CONCLUSIONI

La tutela e la valorizzazione dei prodotti alimentari tradizionali partono dallo studio della matrice alimentare, al fine di definire potenziali parametri di qualità che possano essere riconosciuti dai consumatori. Con tale obiettivo in mente, i produttori alimentari, sia che operino a livello industriale o artigianale, potrebbero utilizzare uno qualsiasi dei parametri definiti come base per la standardizzazione del prodotto. I risultati ottenuti dal presente studio di tesi di laurea hanno consentito di tracciare per la prima volta un quadro del microbiota, delle caratteristiche morfo-strutturali e della composizione chimico-fisica dei tradizionali salami affumicati a freddo montenegrini (*Sudžuk*).

Nonostante l'assenza di un disciplinare di produzione ben definito, i campioni analizzati hanno mostrato tratti morfo-tissutali comuni, confermando così la solidità e la diffusione sul territorio della lavorazione tradizionale. Interessante è che la microbiologia di questo specifico insaccato si è rivelata essere molto variegata, con una presenza più o meno marcata in ciascuno dei salami delle varie specie microbiche. L'unica tipologia di microrganismo di cui si è analizzata una frequenza costante è stato inevitabilmente *Lactobacillus sakei* e a questo proposito, ulteriori studi potrebbero chiarire l'effetto di questo batterio lattico pro-tecnologico sui tratti morfo-strutturali (es. produzione di EPS), sulla sicurezza (es. produzione di batteriocine) o sulla parte sensoriale (es. attività enzimatiche) in questa tipologia di salumi affumicati.

Inoltre, appare molto importante sottolineare che in nessuno dei campioni dei prodotti sottoposti ad analisi microbiologiche sono risultati presenti i patogeni alimentari quali, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Questo rappresenta un indice di alta qualità delle materie prime utilizzate e dell'igiene del processo di produzione.

BIBLIOGRAFIA

- Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T., & Teixeira, P. (2007). "Characterization of microbial population of 'Alheira' (a traditional Portuguese fermented sausage) with respect to its safety." *Food Microbiology*, 24(4), 324-328.
- Anderegg, J., Gonsalves, A. E., & Del Rio, D. (2020). "Vitamin biosynthesis by lactic acid bacteria: Advances and applications." *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 73-79.
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Clementi, F., & Tavoletti, S. (2016). "Microbial and Sensory Characterization of Naturally Fermented Sausages of Central Italy." *Journal of Food Science*, 81(2), M297-M306.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. (2016). "The microbial ecology of traditional salami from Marche region (central Italy) characterized by culture-dependent and culture-independent methods." *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1461-1470.
- Barrière, C., Leroy, S., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., & Talon, R. (2001). "Diversity and adaptation of *Staphylococcus carnosus* in the production of fermented sausages." *International Journal of Food Microbiology*, 66(1-2), 31-40.
- Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., & Córdoba, M. G. (2004). "Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented sausages for industrial meat fermentation processes." *Food Microbiology*, 21(6), 549-558.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2." *Nature Biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Bover-Cid S., Izquierdo-Pulido M. & Vidal-Carou M.C. Influence of Hygienic Quality of Raw Materials on Biogenic Amine Production during Ripening and Storage of Dry Fermented Sausages. *J Food Protect* 2000; 63: 1544-1550
- Branciari, R., Roila, R., Ranucci, D., Urbani, E., & Galarini, R. (2020). "Innovative Analytical Methods for the Authentication of Dry-Cured Meats: Application of Near Infrared Spectroscopy." *Foods*, 9(11), 1578.
- Bressanini, D. (2016). "La scienza della carne. La chimica della griglia e del barbecue." Gribaudo.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). "DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data." *Nature Methods*, 13(7), 581-583.
- Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Aquilanti, L., Taccari, M., Garofalo, C., ... & Clementi, F. (2018). "Microbial dynamics of different types of fermented sausages during ripening." *Italian Journal of Food Safety*, 7(3), 62-68.
- Castellone, V., Bancalari, E., & Gatti, M. (2021). "Lactic Acid Bacteria Contribution to Sensory Characteristics and Safety of Fermented Sausages: A Review." *Foods*, 10(11), 2611.
- Champi, S., Cabrol, C., & Sicard, D. (2020). "The impact of fermentation process on the microbial community and the volatile profile of Ciauscolo sausage." *Meat Science*, 162, 108016.
- Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., & Castello, J. (2006). "Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage." *Food Control*, 17(3), 171-179.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., & Comi, G. (2001). "Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods." *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 3116-3120.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., & Comi, G. (2006). "Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages." *FEMS Yeast Research*, 6(5), 692-701.
- Colo, E., Frigo, F., Franzetti, L., & Martino, G. P. (2015). "Microbiological quality of fermented sausages produced in different regions of Bosnia and Herzegovina." *Meat Science*, 110, 273-278.
- Del Rio, D., Guglielmetti, S., & Gabbi, C. (2024). "Fermentation and its impact on food quality and safety: A modern approach." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(2), 230-244.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., ten Brink, B., Hagen, B., Montel, M. C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., & Vandendriessche, F. (2000). "Control of bioflavour and safety in fermented sausages: First results of a European project." *Food Research International*, 33(3-4), 171-180.
- Di Cagno, R., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., & Parente, E. (2008). "Influence of indigenous starter cultures on the microbiological, physicochemical and safety characteristics of Pecorino Abruzzese cheese." *International Journal of Dairy Technology*, 61(4), 257-265.
- Doe, E. D., & Smith, C. D. (2005). "Commercial Starter Cultures: Historical Development and Current Applications." *Journal of Food Protection*, 68(8), 1806-1812.

- Doeun, D., Davaatseren, M., & Chung, M. S. (2017). "Health risks of mycotoxins in fermented meat products." *Toxins*, 9(12), 363.
- Durlu-Özkaya F., Ayan K. & Vural N. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Sci* 2001; 58: 163-166
- Flores, M., Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., & Belloch, C. (2004). "Yeast Strains as Potential Biocontrol Agents against Spoilage Microorganisms in Dry-Cured Sausages." *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 251-257.
- Galli, V., Venturi, M., Conte, A., & Baruzzi, F. (2005). "Lactic acid bacteria in the fermentation of Italian sausages: Potential starter cultures." *Italian Journal of Food Science*, 17(1), 49-57.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M. A., Paparella, A., & Suzzi, G. (2001). "Use of Nisin-Activated Packaging Film for Increasing the Safety of Pecorino Cheese." *Food Microbiology*, 18(6), 689-696.
- Geyzen, A., Scholliers, P., & Leroy, F. (2012). "Innovative Traditionalism as a Driver for Sustainable Meat Production and Consumption." *Sustainability*, 4(11), 3082-3097.
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., & Calasso, M. (2018). "Artisanal Italian fermented meats: Back to the future." *Microorganisms*, 6(1), 26.
- Guerrero, L., Claret, A., & Verbeke, W. (2009). "Consumers' Health Attitude and Perception of Processed Meat Products." *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 521-528.
- Guerrero, L., Guardia, M. D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., Sajdakowska, M., Sulmont-Rossé, C., Issanchou, S., Contel, M., & Scalvedi, M. L. (2009). "Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study." *Appetite*, 52(2), 345-354.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (1998). "New developments in meat starter cultures." *Meat Science*, 49, S125-S138.
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. T. (2002). "Functionality of Starter Cultures." *Meat Science*, 62(3), 219-230.
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, T. (1993). "Fermentation and safety of Spanish dry sausages." *Meat Science*, 35(2), 255-270.
- Ikonić, P., Tasić, T., Džinić, N., & Tomović, V. (2019). "Production of traditional dry fermented sausages in Southern Serbia." *Acta Alimentaria*, 48(1), 13-23.
- IVSI (Istituto Valorizzazione Salumi Italiani). (2012). "I salumi: Una storia italiana." *Manuale dei salumi italiani*. IVSI.
- Janssens, M., Myter, N., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2012). "Community Dynamics of Coagulase-Negative Staphylococci and Lactic Acid Bacteria in Modified

- Atmosphere Packaged Artisan-Type Cooked Ham at Different Storage Temperatures." *Food Microbiology*, 31(2), 185-194.
- Jašić, M., Muratović, H., & Karabegović, I. (2012). "Traditional fermented meat products in Bosnia and Herzegovina." *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77(1), 23-27.
- Kittisakulnam, S., Chokesajjawatee, N., & Zendo, T. (2017). "Lactic acid bacteria from raw meat and their role in meat fermentation." *Food Science and Technology Research*, 23(4), 563-573.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). "Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies." *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1.
- Komprda, T., Smela, D., Pechova, P., Kalhotka, L., Stencl, J., and Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 67:607–616.
- Laranjo, M., Potes, M. E., & Elias, M. (2019). "Role of Starter Cultures on the Safety of Fermented Meat Products." *Frontiers in Microbiology*, 10, 853.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2013). "Fermented Foods: Fermented Meat Products." In *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., Vol. 2, pp. 872-882). Academic Press.
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). "Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation." *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270-285.
- Liu, W., Li, D., Sun, Z., & Zeng, X. (2024). "Biosynthesis of vitamins by lactic acid bacteria and bifidobacteria." *Trends in Food Science & Technology*, 100, 293-302.
- Lucke, F. K. (2000). "Utilization of Microorganisms in Meat Processing." In *Microbial Production: From Genes to Biotechnology* (pp. 341-354). Springer.
- Lücke, F. K., & Hechelmann, H. (1987). "Starter cultures for dry sausages and raw ham." In *Developments in Food Microbiology* (Vol. 3, pp. 157-191). Elsevier.
- Mainar, M. S., Juan, B., Fernando, B., & Maite, S. (2017). "Characterization of Staphylococcus species isolated from artisanal dry fermented sausages from Aragon, Spain." *Journal of Food Protection*, 80(1), 100-104.
- McKenna, D. R., Nall, J. A., & Savell, J. W. (2005). "Lipolysis and oxidative rancidity in pork fat muscle systems." *Meat Science*, 70(2), 411-416.
- Molly, K., Demeyer, D., & Johansson, G. (1996). "The microbiota of Belgian fermented sausages in relation to their nutritional composition." *European Food Research and Technology*, 202(2), 106-112.

- Montel, M. C., Reitz, J., Talon, R., Berdague, J. L., & Rousset-Akrim, S. (1998). "Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odour characteristics of dry sausages." *Food Microbiology*, 15(6), 553-562.
- Morot-Bizot, S. C., Talon, R., & Leroy, S. (2006). "Development of a PCR-RFLP method for identification of Staphylococcus species isolated from food." *International Journal of Food Microbiology*, 107(3), 223-229.
- Mota-Gutierrez, J., Hernández, M., Capozzi, V., & Benech, R. O. (2019). "Evaluation of PCR-DGGE analysis and 454 pyrosequencing as tools to determine fungal diversity in traditionally and industrially produced 'Longaniza' sausage." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1285-1293.
- Mota-Gutierrez, J., Hernández, M., Hernández, A., & Capozzi, V. (2018). "Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented sausages for industrial meat fermentation processes." *Food Microbiology*, 70, 35-43.
- Ordoñez, J. A., & de la Hoz, L. (2007). "Mediterranean Products." In *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 333-346). Blackwell Publishing.
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Garofalo, C., Clementi, F., & Pasquini, M. (2023). "Microbial dynamics of fermented sausages produced in central Italy." *International Journal of Food Microbiology*, 339, 108973.
- Patarata, L., Lorenzo, J. M., & Fraqueza, M. J. (2021). Nitrate Is Nitrate: The Status Quo of Using Nitrate through Vegetable Extracts in Meat Products. *Foods*, 10(12), 3019.
- Pearson, A. M., & Tauber, F. W. (1984). *Processed Meats*. Springer US.
- Pegg, R. B., & Honikel, K. O. (2014). "Principles of Curing." In *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (pp. 61-73). John Wiley & Sons.
- Pisacane, V., Callegari, M. L., Puglisi, E., Dallolio, G., Roncaglia, L., Rebecchi, A. (2015). "Microbial analyses of pork fermented sausages." *Annals of Microbiology*, 65(1), 341-350.
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O., & Gomes, B. C. (2017). "Application of lactic acid bacteria (LAB) as a biopreservative to control fungal spoilage in food products." *Food Control*, 73, 246-256.
- Ranjana, M., Sudhir, K., & Ashish, D. (2020). "Role of Moulds in Meat Fermentation: A Review." *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 51-58.
- Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2006). "Enumeration and identification of yeasts and moulds associated with Italian dry fermented sausages." *Food Microbiology*, 23(7), 626-630.
- Ravyts, F., Steen, L., Goemaere, O., Paelinck, H., & De Vuyst, L. (2012). "The Microbiology of Fermentation and Ripening of European Dry Fermented Sausages: A Review." *Food Microbiology*, 29(2), 239-252.

- Ravyts, F., Steen, L., Goemaere, O., Paelinck, H., & De Vuyst, L. (2010). "The Microbial Dynamics of a Novel Belgian Sausage during Ripening." *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 36-46.
- Rocchetti, G., Gallo, A., Masoero, F., Dall'Asta, C., & Nocetti, M. (2012). "Determination of water activity in different cheese varieties using low-resolution NMR relaxometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5949-5956.
- Roncalés, P. (2007). "Processing of Spanish Dry-Cured Ham." In *Dry-Cured Meat Products* (pp. 123-147). CRC Press.
- Ruminantia. (2023). "La conservazione delle colture starter." *Ruminantia Magazine*.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). "Human Safety Controversies Surrounding Nitrate and Nitrite in the Diet." *Nitrite Curing of Meat: The N-Nitrosamine Problem and Nitrite Alternatives*, 21-44. Springer.
- Siriken, B., Mehmet, B., & Aydin, A. (2006). "Microbiological quality of traditionally produced sucuk (Turkish dry-fermented sausage)." *Food Control*, 17(4), 335-339.
- Sperber, W. H. (2009). "Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages." In *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 1-40). Springer.
- Springer, M. (2020). "Microbial Competition in Fermented Foods." *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), 287-296.
- Sunesen, L. O., & Stahnke, L. H. (2003). "Mould starter cultures for dry sausages – Selection, application and effects." *Meat Science*, 65(3), 935-948.
- Suzzi G. & Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 41-54
- Talon, R., and Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentation. *Meat Sci.*, 89:303–309.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Latorre-Moratalla, M., Vidal-Carou, M. C., Zanardi, E., Conter, M., & Lebecque, A. (2007). "Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry sausages using autochthonous starter cultures." *International Journal of Food Microbiology*, 120(3), 146-154.
- Tiener, S., Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., & Talon, R. (2004). "Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French fermented sausages and the role of *Staphylococcus xylosus* in aroma formation." *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 252-260.
- Toldrá, F., & Hui, Y. H. (2014). *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. John Wiley & Sons.

- Urso, R., Comi, G., & Coccolin, L. (2006). "Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: Isolation, identification and molecular characterization." *Systematic and Applied Microbiology*, 29(8), 671-680.
- Zeuthen, P. (2007). "Preservation and Shelf-Life Extension." In *Food Preservation Techniques* (pp. 65-92). CRC Press.

RINGRAZIAMENTI

Si conclude così un capitolo della mia vita, nella quale ho acquisito conoscenze fondamentali per intraprendere la mia futura carriera, superando difficoltà ed ostacoli che all'inizio sembravano insormontabili.

Un ringraziamento sincero e sentito alla Dottoressa Vesna Milanovic e alla Professoressa Cristiana Garofalo per avermi dato la possibilità di essere, rispettivamente, la mia Relatrice e Correlatrice ed aver contribuito alla stesura della tesi, grazie alla loro disponibilità in qualsiasi momento.

Un ringraziamento importante va ai miei genitori Paolo e Frediana e a mio fratello Riccardo, per i sacrifici da loro sostenuti per permettermi di iniziare questo percorso universitario, rendendomi la persona che sono tutt'ora, standomi vicino sempre e comunque, un semplice grazie non è sufficiente.

Vorrei ringraziare la mia ragazza Eva per esserci sempre stata lungo questo percorso fino alla fine, non riesci neanche a immaginare quanto sei stata fondamentale ogni giorno e ogni istante. Ti amo.

Una dedica speciale ai miei amici che ogni giorno hanno condiviso con me gioie, sacrifici e successi senza voltarmi mai le spalle.