



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

STUDIO DEL MICROBIOTA DI SALSICCE FERMENTATE
ESSICcate OLANDESI
STUDY OF THE MICROBIOTA OF DUTCH DRY-FERMENTED
SAUSAGES

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
SOFIA PROPERZI

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

STUDIO DEL MICROBIOTA DI SALSICCE FERMENTATE ESSICcate
OLANDESI
STUDY OF THE MICROBIOTA OF DUTCH DRY-FERMENTED SAUSAGES

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
SOFIA PROPERZI

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1. L'evoluzione storica dei salumi fermentati.....	6
1.2. L'importanza della fermentazione come metodo di conservazione dei salumi.....	7
1.3. Il processo produttivo degli insaccati fermentati.....	7
1.3.1.L'evoluzione del microbiota durante il processo produttivo degli insaccati fermentati.....	9
1.3.1.1. I batteri lattici.....	11
1.3.1.2. I cocchi coagulasi negativi.....	13
1.3.1.3. Gli eumiceti.....	13
1.4. Il microbiota degli insaccati fermentati originari dell'area del Mediterraneo.....	14
2. SCOPO DEL LAVORO.....	18
3. MATERIALE E METODI.....	19
3.1. Campionamento.....	19
3.2. Analisi microbiologiche.....	20
3.3. Composizione terreni coltura.....	20
3.4. Analisi chimico-fisiche.....	22
3.5. Determinazione del contenuto di acido lattico.....	23
3.6. Determinazione del contenuto di acido acetico.....	23
3.7. Analisi statistiche.....	24
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	25
4.1. Risultati analisi microbiologiche.....	25
4.2. Risultati analisi chimico-fisiche.....	28
5. CONCLUSIONE.....	30
6. BIBLIOGRAFIA.....	31

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione del terreno di coltura MRS.....	20
Tabella 2. Composizione del terreno di coltura MSA	21
Tabella 3. Composizione del terreno di coltura VRBGA.....	21
Tabella 4. Composizione del terreno di coltura RB + Cloramfenicolo.....	21
Tabella 5. Composizione del terreno di coltura SBA.....	22
Tabella 6. Composizione del terreno di coltura PAB.....	22
Tabella 7. Risultati delle conte vitali di batteri ed eumiceti nel <i>Droge Wrost</i>	25
Tabella 8. Parametri fisico-chimici di <i>Droge Wrost</i>	28

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Popolazione microbica delle carni triturate.....	Errore. Il segnalibro non è definito.
Figura 2: Tipologia di salami fermentati dell'area del Mediterraneo.....	15
Figura 3: Salsicce fermentate essiccate olandesi <i>Droge Wrost</i>	19

1. INTRODUZIONE

Con il termine ‘salume’ identifichiamo qualsiasi prodotto alimentare che sia realizzato con carne cruda o cotta, e sottoposta a salatura. I salumi possono essere commercializzati sia in parti anatomiche intere, come il prosciutto, il capocollo, la spalla e la bresaola, sia all’interno di insaccati a seguito della triturazione, come la mortadella, il cotecchino, lo zampone e la salsiccia fresca. Inoltre, la carne cruda può essere sottoposta al processo di fermentazione, dando origine, ad esempio, agli insaccati fermentati (Farris *et al.*, 2012).

1.1. L’evoluzione storica dei salumi fermentati

La fermentazione, combinata ad altri metodi quali la salagione, l’essiccamento e l’affumicatura, è una strategia per la conservazione della carne che risale a tempi molto antichi (Lucke, 2000). L’origine di tale metodo e la combinazione ad altre tecniche di preservazione non è esattamente nota, tuttavia il materiale iconografico ritrovato dagli storici ha dimostrato che queste tecniche erano probabilmente utilizzate già nell’antico Egitto (Pearson & Tauber, 1984). Tra i primi reperti storici relativi alla fermentazione, ritroviamo dei resti di salami nella tomba di Ramses III (1166 a.C.), e la descrizione di un metodo per la conservazione del prosciutto crudo nel testo antico “De Agricoltura”, scritto da Catone Il Censore (234/149 a.C.) (Aquilanti *et al.*, 2016). Successivamente, nel VII-VIII secolo a.C., anche Omero fa riferimento, nel ventesimo canto dell’Odissea, a prelibatezze a base di carne di maiale e di vari insaccati, composti da grasso e sangue, ma ancora distanti dagli attuali salami stagionati. Inoltre, si suppone che gli insaccati fermentati abbiano avuto un ruolo di spicco anche nella cultura etrusca, ponendo le basi per lo sviluppo di una solida tradizione salumiera italiana (Farris *et al.*, 2012).

In Italia, a partire dal XII secolo, si sono diffuse svariate figure professionali, tra cui i beccai, relative alla produzione e alla trasformazione delle carni. In seguito, durante il XIV secolo, si sono affermati lardaroli e salsicciai, mestieri che hanno permesso la messa a punto di una serie di tipologie di insaccati fermentati, le cui ricette appaiono varie, diversificate e ben dettagliate. Tra il 1600 e il 1700, la trasformazione delle carni subì un cambiamento importante, dovuto sia all’urbanizzazione che al divieto di allevare maiali all’interno delle mura cittadine. Intorno alla metà del XX secolo, diverse realtà artigianali si sono evolute in vere e proprie industrie, dando vita all’attuale percorso di innovazione nel rispetto della tradizione (Farris *et al.*, 2012).

1.2. L'importanza della fermentazione come metodo di conservazione dei salumi

La carne fresca è un alimento altamente nutriente ma allo stesso tempo estremamente deperibile, tanto che la sua conservazione ha rappresentato da subito una grande sfida. Le prime tecniche di preservazione si sono basate sull'aggiunta di sale e sull'asciugatura spinta in condizioni climatiche appropriate (Zeuthen, 2007). In seguito, tali tecniche sono state combinate alla fermentazione, caratterizzata dallo sviluppo e dalla proliferazione di microrganismi in grado sia di aumentare la conservabilità del prodotto finale sia di migliorare le caratteristiche sensoriali dello stesso.

La fermentazione può essere naturale, come avveniva per le popolazioni antiche, o guidata. La fermentazione naturale è indotta dalla microflora spontanea e può essere caratterizzata da eventi indesiderati che influenzano negativamente le proprietà sensoriali ed igieniche del prodotto finale. Tuttavia, tra i limiti di tale metodo, emerge in particolar modo la presenza di una ridotta quantità di batteri lattici, che mostrano una limitata competitività ed uno scarso vigore di crescita. Tale condizione consente la proliferazione di batteri che possono risultare nocivi per la salute dell'uomo, tra cui *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e ulteriori microrganismi che possono sintetizzare amine biogene. Queste ultime sono sostanze azotate a basso peso molecolare ottenute dalla decarbossilazione degli aminoacidi. Le amine biogene sono presenti principalmente negli alimenti ad alto contenuto proteico, come gli insaccati fermentati, in cui istamina e tiramina sono quelle maggiormente isolate. L'alto contenuto di tali composti può risultare dannoso per la salute dell'uomo, in quanto possono provocare ad esempio emicrania, sbalzi di pressione e alterazioni della frequenza cardiaca. Infine, la fermentazione spontanea può essere guidata anche da batteri lattici eterofermentanti obbligati, che provocano la formazione di anidride carbonica, creando cavità nel prodotto finale. Risulta quindi evidente che affidare il prodotto alla fermentazione naturale comporta numerose incognite durante il processo di produzione. D'altra parte, la fermentazione guidata consiste nell'aggiunta di colture selezionate nell'impasto, con lo scopo di realizzare fermentazioni standardizzate, veloci e sicure da un punto di vista igienico (Farris *et al.*, 2012).

1.3. Il processo produttivo degli insaccati fermentati

La materia prima utilizzata per la produzione di un insaccato fermentato inizia con la scelta delle carni utilizzate, che possono essere di origine esclusivamente suina, suina mista o esclusivamente diversa da quella suina, ad esempio ovina, caprina, bovina e bufalina. Il grasso utilizzato è sempre di origine suina, poiché la sua composizione in acidi grassi si presta meglio ai processi di trasformazione, conferendo morbidezza e sapore (Farris *et al.*, 2012).

La preparazione degli insaccati fermentati ha inizio con il taglio della carne in piccoli pezzi e la seguente triturazione della stessa, che può essere più o meno spinta a seconda della grana dell'impasto finale che si vuole ottenere. Per quanto riguarda la frazione grassa, essa viene sottoposta alla triturazione se proveniente dalla gola dell'animale, altrimenti viene sottoposta al taglio in cubetti se proveniente dallo strato di grasso che si trova sotto la cute dell'animale. In seguito, la frazione grassa risultante viene addizionata a quella magra (Farris *et al.*, 2012). Successivamente avviene la salagione, attraverso l'aggiunta di sale (NaCl), che può essere addizionato di spezie e nitrati o nitriti. Tale fase avviene attraverso l'aggiunta diretta del sale macinato (in concentrazione compresa tra il 2,5 e il 4%) all'impasto, provocandone l'abbassamento dell'attività dell'acqua (a_w). La salagione deve avvenire ad una bassa temperatura, sia per favorire la penetrazione del sale all'interno dell'impasto sia per limitare la proliferazione di microrganismi indesiderati. Tra le spezie che possono essere addizionate, il pepe è il più diffuso, utilizzato in forma intera, spaccata o in polvere. Alcuni insaccati prevedono l'impiego di altre spezie ed erbe aromatiche, come aglio, semi di finocchio, peperoncino e peperone dolce. Inoltre, possono essere aggiunti zuccheri fermentescibili, quali glucosio, saccarosio e lattosio (Farris *et al.*, 2012). Per quanto riguarda l'uso dei conservanti (nitrati e nitriti), in ambito europeo, essi possono essere adottati in base alla legislazione comunitaria pertinente (Reg. CE 1333/2008), a meno che i prodotti risultanti non siano soggetti ad altre leggi (ad esempio, prodotti DOP, Denominazione di Origine Protetta) (Aquilanti *et al.*, 2016).

La miscela ottenuta viene inserita in involucri chiamati budelli (insaccatura), che possono essere di origine naturale o artificiale. Nel caso dell'uso di budelli di origine naturale, la forma e l'aspetto finale dell'insaccato saranno date dal tratto intestinale adoperato (intestino crasso o intestino tenue). Il calibro dei budelli utilizzati è direttamente proporzionale al periodo di stagionatura. Quest'ultima viene suddivisa in tre fasi, quali la stufatura, l'asciugatura e la maturazione. Con la stufatura ha inizio la fermentazione ad opera dei batteri lattici, con il conseguente abbassamento sia del pH che dell' a_w nell'insaccato. Queste condizioni provocano una parziale inibizione di buona parte della microflora dannosa, ad eccezione delle spore batteriche. La fase di stufatura ha una durata variabile, da poche ore a qualche giorno dall'insaccatura, a temperature intorno ai 20 °C e un'umidità relativa intorno all'85%. Successivamente, con la fase di asciugatura, la fermentazione lattica giunge al termine, i valori di pH e di a_w si abbassano ulteriormente e sulla superficie del budello si comincia ad evidenziare lo sviluppo delle muffe. Durante l'asciugatura, sia la temperatura che l'umidità relativa subiscono un lieve decremento per una durata variabile che può essere estesa fino a

10 giorni. Infine, la maturazione, denominata anche “stagionatura in senso stretto”, è caratterizzata da una limitata evoluzione del microbiota e numerosi processi biochimici che vanno ad affinare il prodotto finale. Durante tale fase, che viene estesa per settimane, la temperatura e l’umidità relativa vengono controllate al fine di impedire una disidratazione eccessiva degli strati più superficiali. La maturazione è caratterizzata da una riduzione d’umidità all’interno dell’insaccato e dal conseguente aumento della concentrazione di sale. In questo modo, viene accentuata l’azione selettiva verso determinati gruppi microbici ancora presenti e viene favorita la denaturazione delle proteine, in quanto perdono la capacità di interagire con le molecole d’acqua. Inoltre, per azione dei cocchi coagulanti negativi e delle muffe sviluppatesi sul budello, si osserva un innalzamento del pH e una progressiva idrolisi delle proteine per effetto dell’attività degli enzimi microbici, con il conseguente rilascio di peptidi ed aminoacidi responsabili delle caratteristiche sensoriali del prodotto finale. Le condizioni di tempo, temperatura e umidità che vengono adottate durante il processo di stagionatura costituiscono gli elementi che vanno a differenziare e quindi identificare gli insaccati fermentati prodotti (Farris *et al.*, 2012).

Risulta chiaro come il processo appena descritto si basi in gran parte sull’azione di differenti popolazioni microbiche virtuose, che contribuiscono nella definizione di un eterogeneo panorama di insaccati fermentati, in possesso di particolari note qualitative.

1.3.1. L’evoluzione del microbiota durante il processo produttivo degli insaccati fermentati

Le caratteristiche fisiche e biochimiche della carne fanno sì che essa rappresenti un ottimo ambiente per la proliferazione di svariati gruppi microbici. I microrganismi che caratterizzano tale materia prima già dalle prime fasi di lavorazione provengono solitamente dalla pelle e dagli organi interni dell’animale stesso, dagli operatori addetti alla sua manipolazione e dall’ambiente di lavorazione. La popolazione microbica più comunemente presente nelle carni triturate e destinate alla preparazione di insaccati fermentati è presentata in dettaglio nella Figura 1. Generalmente, il microbiota è dominato da microrganismi Gram-negativi, tra cui *Pseudomonas* spp. ed Enterobacteriaceae, e Gram-positivi, tra cui *Brochrothrix thermosphacta*, micrococchi e stafilococchi. Sono frequenti inoltre muffe, tra cui *Penicillium* spp., e lieviti, tra cui *Debaryomyces* spp. (Farris *et al.*, 2012).

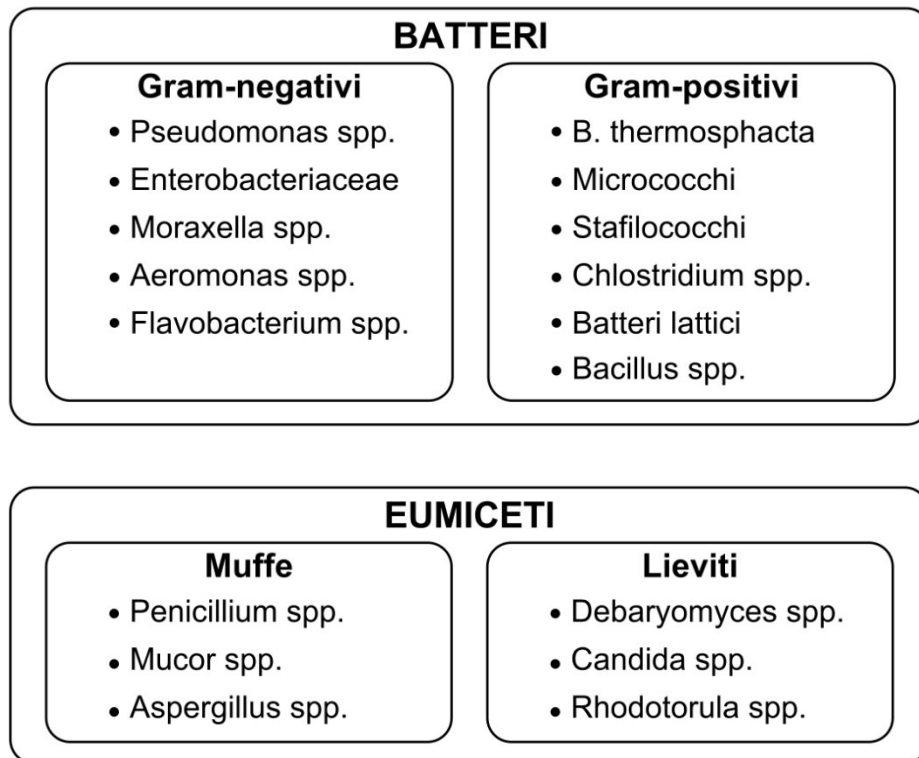


Figura 1. La popolazione microbica che caratterizza le carni triturate e destinati alla preparazione di insaccati fermentati.

Le prime operazioni del processo di preparazione degli insaccati, quindi taglio e triturazione della carne, determinano un sostanziale incremento della superficie di esposizione della materia prima. Tale condizione promuove la crescita e la moltiplicazione dei microorganismi presenti, in particolare di quelli aerobi, anaerobi facoltativi o aerotolleranti. In seguito, come accennato in precedenza, l'impiego di sale provoca l'abbassamento dell'attività dell'acqua dell'impasto a valori inferiori a 0,97, in modo tale da garantire l'inibizione di una buona parte dei batteri Gram-negativi, che comprendono svariati microrganismi alterativi e/o patogeni (Farris *et al.*, 2012). L'utilizzo di nitrati e/o nitriti permette di contrastare l'insorgenza di patogeni sporigeni anaerobi, in particolare di *Clostridium* spp. Per quanto riguarda invece l'aggiunta di zuccheri fermentescibili, essi promuovono lo sviluppo di batteri pro-tecnologici, tra cui i batteri lattici, nella prime fasi di fermentazione. Anche la tecnologia di produzione degli insaccati fermentati va a caratterizzare l'evoluzione del microbiota dell'impasto. In

particolare, durante l'insaccatura vengono instaurate condizioni di parziale anaerobiosi, che favorisce lo sviluppo di batteri lattici e stafilococchi coagulasi negativi. (Farris *et al.*, 2012) Durante la maturazione, avviene una variazione della popolazione microbica, che è influenzata da un insieme di fattori intrinseci, tra cui pH, a_w , potenziale redox e presenza di sostanze inibenti, ed estrinseci, tra cui temperatura e umidità. Tali condizioni porteranno alla morte dei batteri Gram-negativi presenti nella popolazione microbica iniziale, a favore di gruppi microbici alotolleranti, suddivisibili in:

- microrganismi pro-tecnologici, rappresentati in particolare da batteri lattici omofermentanti, tra cui *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., cocchi coagulasi negativi, tra cui *Staphylococcus* spp., e da eumiceti, tra cui *Penicillium* spp. e *Debaryomyces hansenii*;
- microrganismi alterativi, rappresentati in particolare da alcune specie di enterococchi, tra cui *Enterococcus faecium* ed *E. faecalis*, *Serratia marcescens*, *Brochothrix thermosphacta* e batteri lattici eterofermentati obbligati;
- microrganismi patogeni, rappresentati in particolare da *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp., *Clostridium botulinum* e *Salmonella* spp.

Numerosi studi che si sono occupati della caratterizzazione del microbiota dei prodotti carni fermentati hanno mostrato la prevalenza di batteri lattici *in primis*, seguiti da cocchi coagulasi negativi ed eumiceti (Rantsiou & Cocolin, 2006).

1.3.1.1. I batteri lattici

I batteri lattici presenti nei salumi fermentati e in generale nei prodotti carni sono caratterizzati da attività metaboliche in cui gli zuccheri vengono utilizzati per la produzione di energia, con la conseguente sintesi di acido lattico e di altri composti secondari, tra cui acido acetico, acido formico, acido propionico, acido butirrico, alcool etilico e CO₂ (Urso *et al.*, 2006). La scarsa presenza di ossigeno (microaerobiosi) presente all'interno degli insaccati fermentati fa sì che si creino le condizioni necessarie per il loro sviluppo. I batteri lattici, oltre a possedere una forte attività acidificante, contribuiscono alla formazione di sostanze antimicrobiche, come batteriocine (polipeptidi) ed etanolo. Inoltre, grazie ad un elaborato sistema proteolitico, scaturito da differenti tipi di enzimi, come proteinasi e peptidasi, essi sono in grado di degradare l'elevato contenuto di proteine della materia prima in aminoacidi, fondamentali per la crescita di tali microrganismi (Farris *et al.*, 2012).

All'interno degli insaccati fermentati, i batteri lattici principalmente presenti sono omofermentanti obbligati, mentre, in misura minore, sono eterofermentati obbligati o facoltativi. I principali generi appartenenti a tale gruppo microbico sono:

- *Lactobacillus*, le cui specie più diffuse sono *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* (Leroy *et al.*, 2006), *Lactobacillus coryniformis*, insieme, in misura minore, a *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*;
- *Pediococcus*, le cui specie più diffuse sono *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*;
- *Leuconostoc*, le cui specie più diffuse sono *Leuconostoc carnosus* e *Leuconostoc gelidum*.

Durante la maturazione dell'insaccato, i lattobacilli, tramite l'alta produzione di acido lattico, riducono il pH dell'insaccato, passando dai valori iniziali di 5.8-6 a valori finali lievemente più acidi di 5-5.3. Questa azione acidificante, che avviene entro i primi giorni di maturazione, incide notevolmente sulla qualità del prodotto finale, poiché i) determina l'insolubilizzazione delle proteine, la cui conseguente coagulazione causa la graduale disidratazione del prodotto fermentato e quindi l'acquisizione di una texture compatta ed elastica, ii) contribuisce alla fissazione del colore rosso all'interno dell'insaccato, attraverso l'ossidazione dei nitriti; iii) impedisce lo sviluppo di microrganismi indesiderati, responsabili del deterioramento delle caratteristiche sensoriali e/o di una scarsa qualità igienico-sanitaria (Farris *et al.*, 2012).

Più in dettaglio, il sapore e l'aroma dell'insaccato sono dati dalla combinazione di due attività metaboliche durante il processo di fermentazione, quali:

1. attività acidificante: la produzione di acido lattico derivante dalla degradazione degli zuccheri conferisce buona parte delle caratteristiche sensoriali degli insaccati fermentati. La presenza di questo acido è dovuta anche alla reazione di ossidazione degli acidi grassi e alla degradazione dell'aminoacido alanina. Un sapore acido adeguato è correlato al contenuto di acido lattico e dei suoi stereoisomeri. Tuttavia, una produzione eccessiva di tali sostanze, unitamente all'acido acetico prodotto dai batteri lattici eterofermentati, potrebbe conferire al prodotto note sgradevoli.
2. attività proteolitica: l'aroma del prodotto finale deriva in gran parte dalla scissione delle proteine, provocata principalmente dalle peptidasi dei batteri lattici, con il rilascio di piccoli peptidi e amminoacidi liberi. Questi ultimi possono essere ulteriormente degradati dai lattobacilli con la formazione di composti che definiscono il *flavour* dei salumi fermentati, tra cui 2- e 3-metil butanale e 2-metilpropanale (Larroure *et al.*, 2000).

1.3.1.2. I cocchi coagulasi negativi

I cocchi coagulasi negativi, le cui specie più frequentemente isolate all'interno degli insaccati fermentati sono *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus simulans* (Cocolin *et al.*, 2001b), possiedono una buona attività proteolitica ma una scarsa attività acidificante. Tramite la proteolisi, tali microrganismi liberano peptidi ed aminoacidi, causando così l'aumento del pH che caratterizza gli ultimi stadi della maturazione. La proteolisi garantisce inoltre una maggiore affettabilità e un caratteristico sapore al prodotto finale.

Oltretutto, i cocchi coagulasi negativi sintetizzano lipasi, la cui azione determina il rilascio di varie sostanze aromatiche ed acidi organici, che conferiscono al prodotto finale un gusto piacevole e un buon odore (Cocolin *et al.*, 2001a). Degne di nota sono anche la degradazione dei perossidi lipidici, che impedisce fenomeni di irrancidimento, e le attività nitrato e nitrito-reduttasiche, da cui dipende la produzione di NO₂, HNO₂ e NO. Il monossido di azoto risulta indispensabile per la nitrosazione della mioglobina, che influisce sul colore dell'insaccato fermentato.

1.3.1.3. Gli eumiceti

Le muffe colonizzano in modo più o meno uniforme la parte esterna dell'insaccato, precisamente la superficie del budello. Tuttavia, la loro colonizzazione non si arresta sulla parete esterna, ma penetrano in profondità nel corso della fase di maturazione. Questo 'passaggio' provoca un'uniforme disidratazione del prodotto, evitando indurimenti e incrostazioni dati da un'eccessiva asciugatura dell'involucro. In particolare, la penetrazione delle muffe all'interno avviene quando la fermentazione lattica giunge al termine e si registrano quindi i minimi valori di pH. Durante questa fase, le muffe utilizzano come fonte di energia l'acido lattico, provocando un innalzamento del pH. Tali microrganismi sono inoltre implicati i) nella proteolisi e nella lipolisi, che risultano rilevanti per la definizione del sapore del prodotto finale, ii) nella protezione delle molecole lipidiche dall'azione della luce, che favorisce la loro ossidazione e quindi il loro irrancidimento, iii) nell'assimilazione dei nitrati. Infine, dal momento che le muffe si sviluppano in corrispondenza del budello, queste impediscono la stretta aderenza dello stesso all'impasto, facilitandone il distacco al momento del consumo. I ceppi fungini osservati maggiormente sulla superficie degli insaccati sottoposti a maturazione spontanea appartengono principalmente ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*. (Farris *et al.*, 2012)

I lieviti, seppur presenti generalmente in misura minore, si ritrovano più frequentemente sulla superficie del salume. Anche in questo caso, l'attività proteolitica e quella lipolitica

contribuiscono alla definizione del sapore finale. Come le muffe, la loro proliferazione in corrispondenza del budello impedisce l'aderenza di quest'ultimo all'impasto. La specie *Debaryomyces hansenii* è quella maggiormente presente nei salumi, ma è nota anche la presenza di specie minori, appartenenti ai generi *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Rantsiou & Cocolin 2006).

1.4. Il microbiota degli insaccati fermentati originari dell'area del Mediterraneo

Secondo lo studio di Lucke (2000), la produzione degli insaccati fermentati ha avuto origine presumibilmente nelle regioni temperate dell'area mediterranea, dato il suo clima particolarmente favorevole al processo di maturazione, ed è ancora molto diffuso in questi paesi. Infatti, l'Europa risulta il continente in cui si ha la maggior produzione di salsicce fermentate, le quali sono generalmente prodotte da carne di maiale o, in misura minore, di manzo, vitello, etc. (Talon *et al.*, 2004). La maggior parte dei prodotti europei segue procedure tradizionali di fermentazione e maturazione, e fanno affidamento sull'attività di microorganismi autoctoni appartenenti a comunità estremamente eterogenee che derivano sia dalle materie prime che dall'ambiente di produzione (Chevallier *et al.*, 2006).

Le salsicce fermentate possono essere classificate secondo differenti criteri, per esempio in base all'attività dell'acqua e/o al pH del prodotto finale, o in base alle condizioni di processo applicate, per esempio la durata della maturazione, l'uso dell'affumicatura, etc. (Luke, 2000). Secondo tali criteri, si hanno due grandi categorie di prodotti carnei fermentati europei, identificati come prodotti del Nord Europa e del Sud Europa (Talon *et al.*, 2007). I prodotti del Nord Europa, tra cui i salami tedeschi e ungheresi, subiscono una fermentazione veloce, sono generalmente affumicati e sono caratterizzati da un pH inferiore a 5. I prodotti del Sud Europa, provenienti in particolar modo dall'area mediterranea (Italia, Francia, Grecia, Spagna, Portogallo), non sono generalmente affumicati, presentano sulla superficie muffe, lieviti e cocchi Gram-positivi, e si distinguono in: i) asciutti, con una maturazione superiore alle 4 settimane e un'attività dell'acqua inferiore a 0,90, o ii) semi-asciutti, con una maturazione inferiore alle 4 settimane e un'attività dell'acqua compresa tra 0,90 e 0,95 (Luke, 2000). Il grado di fermentazione dei prodotti carnei fermentati europei può variare in base, in particolar modo, alle temperature adottate, con un pH finale lievemente acido che può essere compreso tra 5,0 e 6,2 (García-Varona *et al.*, 2000; Rantsiou *et al.*, 2005a; Aymerich *et al.*, 2006; Lebert *et al.*, 2007).

Negli ultimi due decenni sono emerse numerose ricerche dedicate alla caratterizzazione dell'ecologia microbica dei salami fermentati, tra cui le salsicce secche, prodotti nelle aree del

Mediterraneo. Gli studi effettuati riguardano gli insaccati prodotti senza l'aggiunta di colture starter, e quindi tramite un processo fermentativo guidato dai microrganismi presenti naturalmente nella materia prima, nell'ambiente circostante o durante la manipolazione del prodotto. Attraverso l'utilizzo di metodiche di identificazione fenotipiche e/o biomolecolari, sono state analizzate le maggiori comunità microbiche presenti negli insaccati fermentati originari dell'Italia, della Spagna, del Portogallo, della Grecia e della Francia. (Aquilanti *et al.*, 2016).

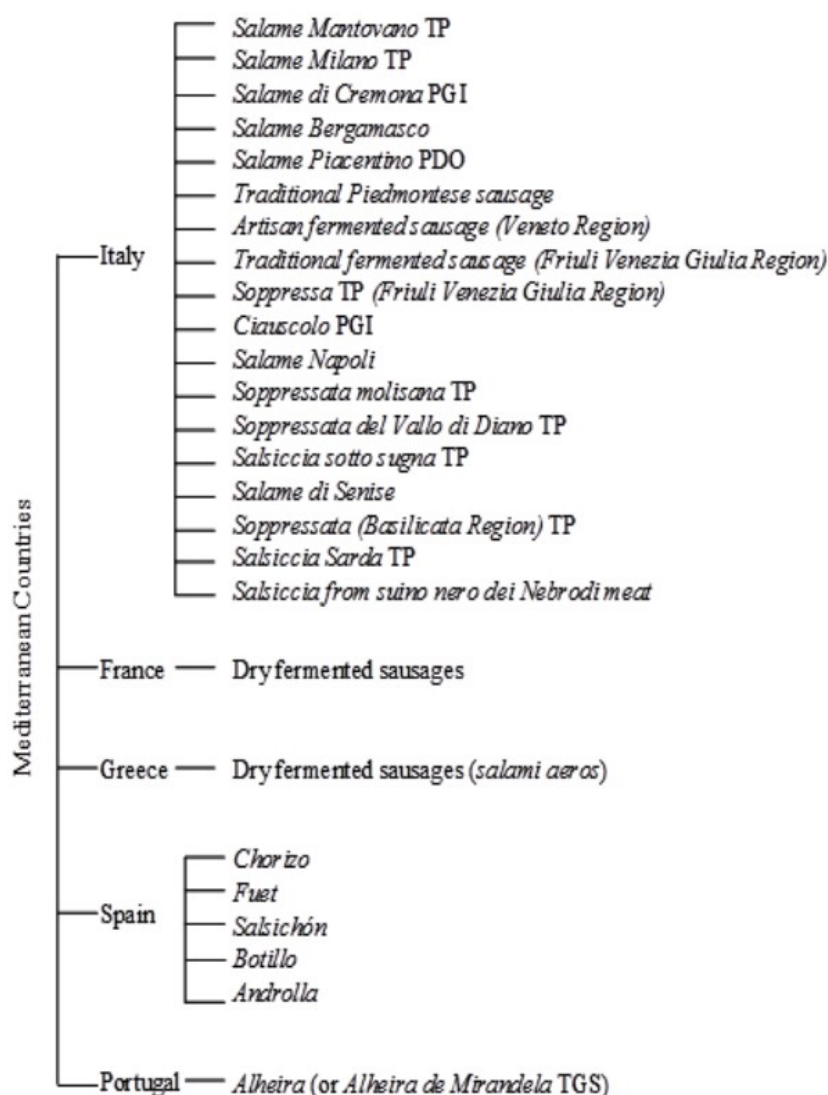


Figura 2. Tipologie di salami fermentati originari dell'area del Mediterraneo presi in esame dalla comunità scientifica.

Le principali comunità batteriche coinvolte nella produzione di insaccati fermentati italiani, comprendono batteri lattici, con una carica microbica media di circa 8,0 Log UFC g⁻¹, e cocchi coagulasi negativi, con una carica microbica media di circa 6,0 Log UFC g⁻¹. I primi includono maggiormente le specie *L. sakei* e *L. curvatus*, mentre i secondi includono maggiormente la specie *S. xylosus*.

Uno studio scientifico riguardante il microbiota di salsicce essiccate fermentate provenienti dalla Spagna e dal Portogallo, si è incentrato sulla caratterizzazione della popolazione microbica dei lattobacilli (Rovira *et al.*, 1997). In tale ricerca, le specie predominanti includono *L. sakei*, *L. brevis* e *L. plantarum*, la cui carica è stata stimata intorno a 8,0 Log UFC g⁻¹. Inoltre, sono state effettuate delle conte vitali per enumerare i cocchi coagulasi negativi, che hanno raggiunto il valore di circa 7,0 Log UFC g⁻¹, con *S. xylosus* come specie predominante.

In Grecia, la salsiccia secca fermentata dal nome *salami aeros* è una tra le produzioni più rilevanti dell'industria alimentare della carne (Samelis *et al.*, 1998). Vari studi effettuati su tale produzione sono stati condotti utilizzando un approccio convenzionale, basato sull'isolamento di ceppi microbici in piastra e sulla relativa caratterizzazione biochimica. La popolazione microbica del prodotto in questione è rappresentata dalle specie di batteri lattici eterofermentanti facoltativi *L. sakei* e *L. curvatus*, oltre a cocchi coagulasi negativi delle specie *Staphylococcus saprophyticus* e *S. xylosus*. In questo caso, le conti vitali di entrambe le popolazioni microbiche si sono attestate intorno a 7,0 Log UFC g⁻¹.

Infine, la preparazione di salsicce secche fermentate di origine francese, principalmente prodotte nelle regioni del Rodano-Alpi e dell'Alvernia, è ancora in gran parte eseguita attraverso procedure tradizionali. Infatti, gli studi scientifici al riguardo si basano sulla caratterizzazione di insaccati fermentati prodotti su piccola scala. Tali prodotti hanno fatto registrare delle conte vitali di batteri lattici e cocchi coagulasi negativi di 7,0 e 6,5 Log UFC g⁻¹, rispettivamente (Chevallier *et al.*, 2006). Per quanto riguarda le specie maggiormente isolate, troviamo *L. sakei* tra i batteri lattici e *Staphylococcus equorum* tra i cocchi coagulasi negativi.

Facendo riferimento alle cariche dei due principali gruppi microbici coinvolti durante la fase di fermentazione e maturazione degli insaccati fermentati, risulta evidente che i batteri lattici sono più numerosi dei cocchi coagulasi negativi. Nei batteri lattici, prevalgono lattobacilli eterofermentanti facoltativi, le cui specie *L. sakei* e *L. curvatus* sono state riscontrate in quasi tutti i prodotti presi in esame. Per quanto riguarda la popolazione microbica dei cocchi

coagulasi negativi, *Staphylococcus xylosus* è risultato predominante, ad eccezione dei campioni originari della Francia (Aquilanti *et al.*, 2016)

Ad oggi, la letteratura scientifica presenta un numero limitato di studi riguardanti la caratterizzazione del microbiota degli insaccati fermentati non originari dell'area del Mediterraneo. Tali prodotti, seppur mantenendo un processo produttivo simile a quello precedentemente descritto, possono mostrare delle peculiarità che si basano sull'origine della materia prima e sui microrganismi naturalmente presenti all'interno della stessa. Ad esempio, la produzione di salsicce secche fermentate originarie dell'Olanda non ha ottenuto ancora un adeguato interesse da parte della comunità scientifica. Per questi motivi, il presente lavoro di tesi si propone di offrire un primo studio riguardante l'ecologia microbica di tali prodotti.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo della tesi è quello di ottenere informazioni riguardanti il microbiota che caratterizza la trasformazione di salsicce secche fermentate olandesi. Queste ultime, che prendono il nome di *Droge Worst*, sono tipiche del Nord dei Paesi Bassi e sono ottenute dalla fermentazione spontanea e dalla successiva essiccazione di carne suina. Ad oggi, infatti, non sono presenti studi scientifici riguardanti la biodiversità microbica di tale prodotto, che può essere in questo modo confrontato con altre salsicce fermentate di diversa origine.

A tale scopo sono stati analizzati 12 campioni di *Droge Worst* reperibili in commercio, ottenuti da 2 differenti produttori (6 campioni per ogni produttore). Le analisi condotte comprendono:

- analisi microbiologiche quali: enumerazione dei seguenti gruppi microbici presenti: batteri lattici, cocchi coagulasi negativi, Enterobacteriaceae, enterococchi, eumiceti e Pseudomonadaceae;
- analisi chimico-fisiche quali: misurazione del pH, dell'attività dell'acqua, dell'acidità totale titolabile e della concentrazione di organici, quali acido acetico e acido lattico.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento

Sono state sottoposti ad analisi 12 campioni di *Droge Worst* acquistati da due differenti produttori olandesi. I campioni di ogni produttore provengono da un unico lotto, pertanto sono stati ordinati come segue: DWA1-6 ottenuti dal produttore A; DWB1-6 ottenuti dal produttore B. Ogni campione del produttore A consiste in 110 g di salsiccia di carne di suino fermentata ed essiccata, mentre ogni campione del produttore B consiste in 90 g dello stesso prodotto.



Figura 3. Salsicce fermentate essiccate olandesi *Droge Worst*.

3.2. Analisi microbiologiche

Aliquote di 10 g di ciascun campione sono state addizionate a 90 mL di acqua sterile contenente 1 g/L di peptone. La sospensione è stata omogeneizzata con il dispositivo Stomacher (400 Circulator, International PBI, Milano, Italia) per 5 minuti a 260 rpm. Sono state quindi allestite diluizioni seriali decimali per l'enumerazione dei seguenti microrganismi:

i) batteri lattici (LAB) su terreno De Man, Rogosa e Sharpe agar (De Man et al., 1960) (MRS agar) (addizionato di 250 mg/L di cicloesimide per prevenire la crescita di eumiceti) incubato a 37 °C per 48-72 ore; ii) cocchi coagulasi negativi enumerati su mezzo di crescita Mannitol Salt Agar (MSA) (Chapman, 1945) con incubazione a 37 °C per 24-48 ore; iii) Enterobacteriaceae enumerate su mezzo di crescita Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) con incubazione a 37 °C per 24 ore (Garofalo et al., 2017); iv) eumiceti enumerati su Rose Bengal Chloramphenicol Agar con incubazione a 25 °C per 72-96 ore; v) enterococchi enumerati su Slanetz Bartley Agar (SBA) con incubazione a 37 °C per 48 ore; vi) Pseudomonadaceae enumerate su Pseudomonas Agar Base (PAB) con supplemento selettivo Cetrimide-Fucidin-Cephalosporin (CFC) e incubati a 30 °C per 24-48 h. Per ogni campione le analisi sono state eseguite in triplo tecnico su due replicati biologici e i risultati delle conte vitali sono espressi come media del Log delle unità formanti colonia (ufc) per grammo di campione \pm deviazione standard.

3.3. Composizione terreni di coltura

In base ai gruppi microbici da enumerare, sono stati utilizzati differenti terreni di coltura, la cui composizione viene riportata nelle seguenti tabelle:

- De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (WVR Chemicals) (De Man et al., 1960):

Componente	Concentrazione (g/l)
Digerito enzimatico di caseina	10g/l
Estratto di carne	10g/l
Estratto di lievito	4g/l
Glucosio	20g/l
Fosfato di dipotassio	2g/l
Acetato di sodio	5g/l
Triammonio citrato	2g/l
Solfato di magnesio	0,2g/l
Solfato di manganese	0,05g/l
Tween 80	1.08g/l
Agar	15g/l

Tabella 1. Composizione del terreno di coltura MRS.

- Mannitol Salt Agar (MSA) (WVR Chemicals) (Chapman, 1945):

Componente	Concentrazione (g/l)
Idrolisato peptico di tessuto animale	7g/l
Idrolisato pancreatico di caseina	5g/l
Estratto di carne	1g/l
Cloruro di sodio	75g/l
D-Mannitolo	10g/l
Rosso fenolo	0,025g/l
Agar	15g/l

Tabella 2. Composizione del terreno di coltura MSA.

- Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (WVR Chemicals) (Garofalo et al., 2017):

Componente	Concentrazione (g/l)
Digerito enzimatico di tessuti animali	7g/l
Estratto di lievito	3g/l
Glucosio	10g/l
Cloruro di sodio	5g/l
Sali biliari n. 3	1,5g/l
Rosso neutro	0,03g/l
Cristal violetto	0,002g/l
Agar	15g/l

Tabella 3. Composizione del terreno di coltura VRBGA.

- Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB) (WVR Chemicals) (Belleggia et al., 2020):

Componente	Concentrazione (g/l)
Peptone micologico	5.00g/l
Potassio fosfato bibasico	1.00g/l
Magnesio solfato	0.50g/l
Glucosio	10.00g/l
Rosa bengala	0.05g/l
Agar	15.00g/l
Cloramfenicolo	0.10g/l

Tabella 4. Composizione del terreno di coltura RB + Cloramfenicolo.

- Slanetz Bartley Agar (SBA) (WVR Chemicals) (Slanetz & Bartley, 1957):

Componente	Concentrazione (g/l)
Triptose	20g/l
Estratto di lievito	5g/l
Glucosio	2g/l
Potassio fosfato bibasico	4g/l
Sodio azide	4g/l
Trifenil tetrazolio cloruro (TTC)	1g/l
Agar	10g/l

Tabella 5. Composizione del terreno di coltura SBA.

- Pseudomonas Agar Base (PAB) (WVR Chemicals) (Mead & Adams, 1977):

Componente	Concentrazione (g/l)
Peptone gelatinizzato	16g/l
Caseine idrolisate	10g/l
Solfato di potassio	10g/l
Cloruro di magnesio	1,6g/l
Agar	11,5g/l

Tabella 6. Composizione terreno di coltura PAB.

3.4. Analisi chimico-fisiche

I valori di pH dei campioni di *Droge Worst* sono stati determinati con un pHmetro equipaggiato con un elettrodo a solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italy). L'acidità titolabile totale (TTA) è stata determinata usando 10 g dei campioni di *Droge Worst*, i quali sono stati omogeneizzati in 90 mL di acqua distillata per 5 minuti a 260 rpm usando un apparecchio Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milan, Italy). I risultati sono espressi come il volume totale (mL) di NaOH 0.1 M usato per raggiungere un pH di 8,3. L'attività dell'acqua (a_w) è stata misurata secondo il metodo standard ISO 21807:2004 attraverso l'apparecchio Aqualab 4TE (Meter Group, Pullman, USA). La concentrazione di acido acetico e acido lattico è stata misurata con l'Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format) test kit e con il D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) test kit, entrambi della compagnia Megazyme (Bray, Ireland). Per ogni campione le misurazioni sono state effettuate in doppio, e i risultati sono espressi come media \pm deviazione standard.

3.5. Determinazione del contenuto di acido lattico

Per stabilire la presenza e la concentrazione di acido lattico è stato utilizzato il kit di analisi fornito dalla Megazyme D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) test kit con le seguenti procedure:

- diluizione del campione: la quantità di acido lattico presente nella cuvetta (cioè negli 0,1 mL di campione analizzato) deve essere compresa tra 0,5 e 30 mg, quindi il campione deve essere diluito a sufficienza per ottenere una concentrazione di acido lattico tra i 0,005 e 0,30 g/L. Se il valore è inferiore al limite di determinazione, occorrerà utilizzare un maggior quantitativo di campione oppure, in alternativa, aumentare il volume da aggiungere alla cuvetta fino a 1,5 mL, accertandosi che la somma dei componenti del campione (con acqua distillata) sia di 1,6 mL;
- chiarificazione del campione, tramite l'uso delle seguenti soluzioni: i) soluzione di Carrez 1, ottenuta dalla solubilizzazione di 3,60 g di esacianoferrato di potassio in 100 mL di acqua distillata; ii) soluzione di Carrez 2, ottenuta dalla solubilizzazione di 7,20 g di solfato di zinco in 100 mL di acqua distillata; iii) NaOH 100 mM. La procedura prevede l'inserimento di 5 g di campione in un matraccio da 100 mL e l'aggiunta di 60 mL di acqua distillata. Successivamente, vengono addizionati nel matraccio 5 mL di soluzione di Carrez 1, 5 mL della soluzione di Carrez 2 e 10 mL di NaOH 100 mM, facendo attenzione a miscelare a seguito di ogni soluzione. Infine, si porta a volume con acqua distillata per poi filtrare il tutto con carta da filtro;
- determinazione del contenuto di acido lattico: la soluzione filtrata va pipettata nelle cuvette da analizzare, a seguito dell'aggiunta di soluzioni fornite in dotazione dal kit, per poi eseguire la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 340 nm.

3.6. Determinazione del contenuto di acido acetico

Per stabilire la presenza e la concentrazione di acido acetico è stato utilizzato il kit di analisi fornito dalla Megazyme Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format) test kit con le seguenti procedure:

- diluizione del campione: la quantità di acido acetico presente nella cuvetta (cioè negli 0,1 mL di campione analizzato) deve essere compresa tra 0,3 e 25 mg, quindi il campione deve essere diluito a sufficienza per ottenere una concentrazione di acido acetico tra i 0,03 e 0,25 g/L. Se il valore è inferiore al limite di determinazione, occorrerà utilizzare un maggior quantitativo di campione oppure, in alternativa,

aumentare il volume da aggiungere alla cuvetta fino a 2ml, accertandosi che la somma dei componenti del campione (con acqua distillata) sia di 2,1ml;

- chiarificazione del campione (la procedura è identica a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico);
- determinazione del contenuto di acido acetico (la procedura è identica a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico).

3.7. Analisi statistiche

Per l'analisi statistica è stato utilizzato l' Honest Significant Difference (HSD) test (livello di significatività 0,05) di Tukey-Kramer, al fine di valutare le differenze tra i campioni con un'analisi unidirezionale della varianza (ANOVA). Inoltre, è stato usato il software JMP Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) per effettuare tutti i test.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Analisi microbiologiche

I risultati delle conte vitali in piastra sui campioni di salsicce secche fermentate olandesi sono riportati nella Tabella 7.

Campione	Lattobacilli mesofili presunti	Stafilococchi coagulasi negativi	Enterococchi	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae	Eumiceti
DWA1	6,71±0,01	6,26±0,02	3,76±0,09	< 1,00	< 1,00	5,67±0,12
DWA2	6,00±0,02	6,35±0,08	2,90±0,08	< 1,00	< 1,00	5,42±0,03
DWA3	6,29±0,01	6,33±0,02	4,05±0,05	< 1,00	< 1,00	5,17±0,05
DWA4	5,78±0,00	6,36±0,06	2,22±0,11	< 1,00	< 1,00	5,30±0,02
DWA5	6,20±0,03	6,21±0,03	3,71±0,10	< 1,00	< 1,00	5,24±0,03
DWA6	4,66±0,26	5,98±0,06	4,38±0,10	< 1,00	< 1,00	5,45±0,00
DWB1	7,54±0,10	3,01±0,10	2,19±0,16	< 1,00	< 1,00	< 1,00
DWB2	7,60±0,02	2,46±0,02	1,39±0,12	< 1,00	< 1,00	< 1,00
DWB3	7,80±0,02	2,53±0,10	2,84±0,03	< 1,00	< 1,00	< 1,00
DWB4	8,07±0,01	2,00±0,06	1,59±0,16	< 1,00	< 1,00	< 1,00
DWB5	7,74±0,01	2,92±0,11	1,90±0,08	< 1,00	< 1,00	< 1,00
DWB6	7,89±0,02	2,48±0,17	2,06±0,03	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Media						
Produttore A (DWA1 – DWA6)	5,94±0,70	6,25±0,14	3,50±0,80	0,00±0,00	0,00±0,00	5,37±0,18
Produttore B (DWB1 – DWB6)	7,77±0,19	2,57±0,36	1,99±0,51	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Tabella 7. Risultati delle conte vitali di batteri ed eumiceti nel *Droge Wrost*.

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. *Produttore A, campioni DWA1-DWA6; Produttore B, campioni DWB1-DWB6.

L'enumerazione dei lattobacilli mesofili presunti ha mostrato dei valori compresi tra 4,66 ± 0,26 (campione DWA6) e 8,07 ± 0,01 Log UFC g⁻¹ (campione DWB4). La differenza tra le medie dei produttori A e B, che si attestano rispettivamente a 5,94 ± 0,70 e 7,77 ± 0,19 Log UFC g⁻¹, è risultata statisticamente significativa. I valori riportati risultano inferiori a quelli pubblicati negli studi di Fernández-López *et al.* (2008), Prado *et al.* (2019) e Di Cagno *et al.*

(2008), relativi alla caratterizzazione di insaccati fermentati tradizionali di origine europea, in cui le conte vitali dei lattobacilli mesofili presunti raggiungono sempre valori superiori a 8,0 Log UFC g⁻¹. Tale differenza, riscontrata soprattutto per il produttore A, potrebbe essere ricondotta ad un processo di fermentazione e/o essiccamento dei prodotti analizzati nel presente studio di Tesi maggiormente esteso, che avrebbe creato le condizioni idonee per la competizione con altri gruppi microbici, quali gli stafilococchi coagulasi negativi.

Le conte vitali degli stafilococchi coagulasi negativi oscillano tra 2,00 ± 0,06 (campione DWB4) e 6,36 ± 0,06 Log UFC g⁻¹ (campione DWA4). I valori più elevati registrati per gli insaccati fermentati del produttore A (media di 6,25 ± 0,14 Log UFC g⁻¹) sono risultati statisticamente significativi rispetto a quelli del produttore B (media di 2,57 ± 0,36 Log UFC g⁻¹). A conferma di quanto precedentemente ipotizzato sull'estensione della fase di fermentazione e/o essiccamento, nel produttore A le conte vitali degli stafilococchi coagulasi negativi, che caratterizzano in genere le ultime fasi della maturazione degli insaccati fermentati, superano quelle dei batteri lattici.

Per quanto riguarda gli enterococchi, microrganismi ubiquitari presenti nel suolo, nelle acque di superficie, nei vegetali e, in particolar modo, nei tratti digestivi di animali a sangue caldo, sono state registrate delle conte vitali comprese tra 1,39 ± 0,12 (campione DWB2) e 4,38 ± 0,10 Log UFC g⁻¹ (campione DWA6). Anche in questo caso, sono emerse delle differenze statisticamente significative tra i due produttori A e B, le cui medie sono 3,50 ± 0,80 e 1,99 ± 0,51 Log UFC g⁻¹, rispettivamente. La presenza degli enterococchi negli alimenti, specialmente di origine animale come formaggi, carne e salumi, è stata spesso documentata (Hwanhlem *et al.*, 2011). Classificati come appartenenti al gruppo microbico dei batteri lattici, gli enterococchi vengono considerati pro-tecnologici nella fermentazione dei prodotti lattiero-caseari, grazie al loro elaborato sistema proteolitico e lipolitico, al loro potenziale impiego come probiotici e alla produzione di batteriocine. D'altra parte, in alcune carni processate, vengono considerati alterativi a causa della loro limitata competitività e della conseguente blanda attività fermentativa (Hugas *et al.*, 2003).

Sia le conte vitali delle Enterobacteriaceae che delle Pseudomonadaceae mostrano dei valori particolarmente bassi, infatti risultano inferiori a 1,00 Log UFC g⁻¹ in entrambi i produttori. La famiglia delle Enterobacteriaceae comprende svariati microrganismi patogeni, tra cui *Escherichia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. La presenza di tali microrganismi viene considerata come indicatore della qualità microbiologica e igienico-sanitaria di vari prodotti alimentari. La loro assenza nelle salsicce secche fermentate è dovuta all'instaurarsi di condizioni sfavorevoli per la loro sopravvivenza, tra cui la presenza di sale, l'abbassamento

dell'attività dell'acqua e la produzione di acidi organici durante il processo fermentativo (Fernández-López et al., 2008). Anche negli studi condotti da Fernández-López *et al.*, (2008) e Gonzales-Barron *et al.*, (2015), che si sono occupati di caratterizzare il profilo microbiologico di salsicce secche fermentate tradizionali di origine, rispettivamente, spagnola e portoghese, i microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae sono stati inattivati e quindi sono risultati assenti nelle conte vitali in seguito alla fermentazione. Per quanto riguarda la famiglia delle Pseudomonadaceae, essa comprende numerose specie che vengono riconosciute come principale causa del deterioramento di alimenti freschi stoccati in un ambiente aerobio. Tra queste specie troviamo *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* e *Pseudomonas putida*, spesso isolate da prodotti a base di carne. Per questi motivi, la ricerca di tali microrganismi viene spesso effettuata nella microbiologia degli alimenti per identificare una potenziale alterazione del prodotto analizzato, come nel caso del presente studio di Tesi.

I risultati sull'enumerazione degli eumiceti hanno mostrato una netta discrepanza a livello dei produttori. Infatti, per il produttore A le conte vitali sono comprese tra $5,17 \pm 0,05$ (campione DWA3) e $5,67 \pm 0,12$ Log UFC g⁻¹ (campione DWA1), mentre per il produttore B sono in tutti i casi inferiori a 1,00 Log UFC g⁻¹. Ciò può essere attribuito a differenze che possono interessare i microrganismi naturalmente presenti nella materia prima, le condizioni ambientali e la manipolazione del prodotto durante la sua preparazione, e le fasi del processo produttivo e i relativi metodi utilizzati. I valori registrati negli insaccati fermentati del produttore A risultano in linea con quelli ottenuti da Fernández-López *et al.* (2008), in cui gli eumiceti delle salsicce secche fermentate tradizionali spagnole hanno raggiunto $4,26 \pm 0,61$ Log UFC g⁻¹. Il ruolo del gruppo microbico in questione, basato principalmente sull'azione lipolitica, rimane tuttavia secondario quando comparato all'attività dei batteri lattici e dei cocchi coagulasi negativi (Capita et al., 2006). Tuttavia, secondo Ferreira et al., (2006, 2007), il profilo organolettico del prodotto finale risente fortemente dell'azione degli eumiceti.

4.2. Analisi chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico fisiche, comprendenti attività dell'acqua (a_w), pH, acidità totale titolabile, concentrazione di acido lattico e di acido acetico, sui campioni di salsicce secche fermentate olandesi sono riportati nella Tabella 8.

Campione	Attività dell'acqua (a_w)	pH	Acidità totale titolabile (mL NaOH 0,1 M)	Acido lattico (g/100g)	Acido acetico (g/100g)
DWA1	0,841±0,001	5,45±0,01	11,7±0,3	1,491±0,006	0,047±0,001
DWA2	0,847±0,001	5,45±0,01	15,1±0,1	1,485±0,006	0,041±0,002
DWA3	0,838±0,001	5,63±0,00	12,6±0,0	1,506±0,001	0,049±0,000
DWA4	0,845±0,000	5,42±0,01	14,6±0,1	1,502±0,002	0,050±0,001
DWA5	0,847±0,005	5,50±0,01	15,2±0,1	1,637±0,000	0,042±0,002
DWA6	0,840±0,001	5,47±0,00	16,1±0,3	1,595±0,007	0,058±0,001
DWB1	0,783±0,001	5,52±0,02	14,7±0,1	1,552±0,004	0,270±0,001
DWB2	0,791±0,000	5,46±0,00	13,8±0,2	1,451±0,002	0,220±0,004
DWB3	0,784±0,001	5,40±0,01	13,1±0,1	1,497±0,006	0,109±0,001
DWB4	0,785±0,001	5,56±0,01	12,3±0,1	1,436±0,001	0,190±0,006
DWB5	0,781±0,001	5,45±0,01	12,4±0,3	1,163±0,004	0,183±0,000
DWB6	0,781±0,003	5,46±0,00	12,7±0,0	1,387±0,006	0,228±0,001
Media					
Produttore A (DWA1 – DWA6)	0,843±0,004	5,48±0,08	14,2±1,7	1,536±0,064	0,048±0,006
Produttore B (DWB1 – DWB6)	0,784±0,004	5,47±0,06	13,1±0,9	1,414±0,135	0,200±0,054

Tabella. 8 Parametri fisico-chimici di *Droge Wrost*.

I valori sono espressi come media \pm deviazione standard.

I valori di attività dell'acqua (a_w) registrati sono compresi tra $0,781 \pm 0,003$ (campione DWB6) e $0,847 \pm 0,005$ (campione DWA5). La media del produttore A si attesta a $0,843 \pm 0,004$, mentre la media del produttore B si attesta a $0,784 \pm 0,004$, evidenziando delle differenze statisticamente significative. La misurazione dell' a_w effettuata da Fernández-López et al. (2008) e Gonzales-Barron et al. (2015) in salsicce secche fermentate tradizionali di origine

europea ha fatto registrare, rispettivamente, $0,898$ e $0,923 \pm 0,003$. Tale variazione potrebbe essere causata da una potenziale estensione del periodo di maturazione degli insaccati analizzati nel presente studio di Tesi, durante il quale avviene la maggiore perdita di acqua all'interno dell'impasto.

Per quanto riguarda il pH, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i campioni presi in esame, tant'è che il dato più basso ottenuto è di $5,40 \pm 0,01$ (campione DWB3), mentre il più alto è di $5,63 \pm 0,00$ (campione DWA3). I risultati sono in linea con quelli relativi alle salsicce secche fermentate analizzate da Fernández-López et al. (2008) e Gonzales-Barron et al. (2015), in cui i pH si attestano rispettivamente a $5,22 \pm 0,07$ e $5,44 \pm 0,05$.

L'acidità totale titolabile oscilla tra $11,7 \pm 0,3$ (campione DWA1) e $16,1 \pm 0,3$ mL di NaOH 0,1 M (campione DWA6). Tra i due produttori non sono emerse differenze statisticamente significative, infatti la media del produttore A è di $14,2 \pm 1,7$, mentre la media del produttore B è di $13,1 \pm 0,9$.

La determinazione degli acidi organici nei campioni di salsicce secche fermentate olandesi ha mostrato una netta differenza tra la concentrazione di acido lattico rispetto a quella di acido acetico. Infatti i valori di acido lattico registrati sono compresi tra $1,163 \pm 0,004$ (campione DWB5) e $1,637 \pm 0,000$ (campione DWA5) g/100g, mentre i valori di acido acetico registrati sono compresi tra $0,041 \pm 0,002$ (campione DWA2) e $0,270 \pm 0,001$ g/100g (campione DWB1). I valori di acido lattico ottenuti nel presente studio di Tesi appaiono lievemente superiori rispetto a quelli ottenuti da Fernández-López et al., (2008), in cui i campioni di salsicce secche fermentate spagnole dal nome *salchichón* hanno fatto registrare dati intorno allo 0,8%. Degna di nota è la differenza statisticamente significativa della quantità di acido acetico tra i due produttori, infatti per il produttore A si registra una media di $0,048 \pm 0,006$ g/100g e per il produttore B si registra una media di $0,200 \pm 0,054$ g/100g. Dai risultati si può supporre che la fermentazione guidata dai batteri lattici degli insaccati fermentati del produttore A sia principalmente di tipo omolattico, mentre per gli insaccati fermentati del produttore B si evidenzia una maggiore produzione di acido acetico, che viene sintetizzato in buona parte durante una fermentazione eterolattica.

5. CONCLUSIONI

Il presente studio di Tesi offre un primo sguardo alle interazioni tra gruppi microbici e alle caratteristiche chimico-fisiche delle salsicce secche fermentate olandesi *Droge Worst*.

Come per altri insaccati fermentati presi in esame dalla letteratura scientifica, i batteri lattici e i cocchi coagulasi negativi si sono confermati le maggiori popolazioni microbiche presenti all'interno di tali prodotti. La loro duplice funzione, relativa sia alla qualità organolettica che a quella igienico-sanitaria, rimane dunque di primaria importanza durante l'intero processo fermentativo.

Per quanto riguarda gli enterococchi e i lieviti, il loro ruolo all'interno dei campioni di *Droge Worst* rimane secondario. Tuttavia, potrebbero influire sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finale, grazie alle loro attività di proteolisi e/o lipolisi.

Importante sottolineare l'assenza nel prodotto finito di microrganismi appartenenti alle famiglie Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, entro le quali si colloca la maggior parte di microrganismi deterioranti e indicatori di scarsa igiene.

In conclusione, risultano necessari ulteriori studi per l'identificazione e la caratterizzazione a livello molecolare delle maggiori specie che intervengono durante la produzione delle salsicce secche fermentate olandesi. In questo modo, potrebbero essere maggiormente chiarite le dinamiche di evoluzione del microbiota, evidenziando il ruolo delle specie microbiche presenti.

6. BIBLIOGRAFIA

Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A. and Clementi, F. 2016. Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. *International Food Research Journal* 23(2): 429-445.

Aymerich, T., Martín, B., Garriga M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S. and Hugas, M. 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100(1): 40-49.

Chapman, G. 1945. The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci. *Journal of Bacteriology* 50(2):201–203.

Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E. and Talon, R. 2006. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control* 17(6): 446-453.

Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C. and Comi, G. 2001a. A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science* 58(1): 59-64.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001b. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16s rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5113-5121.

Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C. and Comi, G. 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research* 6(5): 692-701.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 23, Wiley-Blackwell, pp. 130-135.

Farris, G.A. Gobbetti, M., Neviani, E., Vincenzini, M. 2012. I salumi-Capitolo 20. In Coppola, and Tremonte, P. *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Milano: Casa editrice Ambrosiana, pp. 437-452

García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I. and Rovira, J. 2000. Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54(3): 189-195.

Garofalo, C., Bancalari, E., Milanović, E., Cardinali, F., Osimani, A., Savo Sardaro, M.,L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., Gatti, M., 2017. Study of the Bacterial Diversity of Foods: PCR-DGGE Versus LH-PCR. *International Journal Food of Food Microbiology* 242: 24-36.

Larrouture, C., Ardaiillon, V., Pépin, M., & Montel, M. C. 2000. Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology*, Vol. 17, pp. 563-570.

Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M.C. and Talon, R. 2007. Diversity of micro-organisms in environments and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science* 76(1): 112-122.

Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 270-285.

Lucke, F. K. 2000. Fermented Meats. In: *Microbiological safety and quality of food*, Lund, B., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. pp. 420-444.

Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichard, J., Tòth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G. and Cocolin, L. 2005a. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology* 22(1): 19-28.

Rantsiou, K. and Cocolin, L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 108(2): 255-267.

Rovira, A., Nieto, J.C., Rodriguez, A., Reguera, J.I. and Gonzàles, Z. 1997. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia* 13(2): 201-208.

Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlasi, M. and Pappa, A. 1998. Stability and safety of traditional greek salami – a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44(1-2): 69-82.

Talon, R., Leroy-Setrin, S. and Fadda, S. 2004. Dry fermented sausages – Chapter 23. In Y.H. Hui, L. Meunier-Goddik, A.S. Hansen, J. Josephsen, W.-K. Nip, &P.S. Stanfield, et al., *Handbook of food and beverage fermentation technology*. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 397-416

Talon, R., Leroy, S. and Lebert, I. 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77(1): 55-62.

Urso, R., Comi, G. and Cocolin, 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. A historical prospective of meat fermentation. In: F. Toldrà, *Handbook of fermented meat and poultry*. USA: Blackwell Publishing. pp. 3-8.

Belleggia, L., Milanović, V., Ferrocino, I., Cocolin, L., Haouet, M.N., Scuota, S., Maoloni, A., Garofalo, C., Cardinali, F., Aquilanti, L., Mozzon, M., Foligni, R., Pasquini, M., Trombetta, M.F., Clementi, F. and Osimani, A. 2020. Is there any still undisclosed biodiversity in Ciauscolo salami? A new glance into the microbiota of an artisan production as revealed by high-throughput sequencing. *Meat Science* 165: 108-128.

Slanetz, L.W. and Bartley, C.H. 1957. Number of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74(5): 591–595.

Mead, G.C. and B.W. Adams 1977. A selective medium for the rapid isolation of *Pseudomonas* associated with poultry meat spoilage. *British Poultry Science* 18:661-670.

Di Cagno, R., Lopez, C.C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W.P. and Gobbetti, M. 2008. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science* 79: 224–235.

Pradoa, N., Sampayoa, M., González, P., Lombób, F. and Díaza, J. 2019. Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Science* 156: 118–124.

Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Pereira, A.P., Gomes, A., Araújo, J.P, Saavedra, M.J., Estevinho, L. Butler, F., Pires, P. and Dias, T. 2015. Relating physicochemical and microbiological safety indicators during processing of linguíça, a Portuguese traditional dry-fermented sausage. *Food Research International* 78: 50–61.

Fernandez-Lopez, J., Sendra, E., Sayas-Barbera, E., Navarro, C. and Pe´rez-Alvarez, J.A. 2008. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchicho´n” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science* 80: 410–417.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S. 2001. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control* 22(3-4):401-407. ·

Hugas, M., Garriga, M. and Aymerich, M.T. 2003. Functionalty of enterococci in meat products *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 88, pp. 223-233.

Capita, R., Llorente-Marigomez, S., Prieto, M. and Allonso-Calleja, C. 2006. Microbiological Profiles, pH, and Titratable Acidity of Chorizo and Salchichón (Two Spanish Dry Fermented Sausages) Manufactured with Ostrich, Deer, or Pork Meat. *Journal of Food Protection* 69 (5): 1183–1189.

Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F. 2007. Chemical and microbiological characterisation of ‘Salpicao de Vinhais’ and ‘ChouriC, a de Vinhais’: Traditional dry sausages produced in the north of Portugal. *Food Microbiology* 24: 618-623.

Ferreira, V., Barbosa, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silvia, F., Monteiro, M. 2006. Chemical and microbiological characterization of Aldeira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Science* 73: 570-575.