



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**SALUMI ARTIGIANALI CROATI:
CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA
E MICROBIOLOGICA**

**PHYSICOCHEMICAL AND
MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF ARTISAN SALAMI FROM CROATIA**

Studente:
ALESSIO CESONI

Relatore:
PROF.SSA LUCIA AQUILANTI

Correlatori:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIĆ

DOTT.SSA GIORGIA RAMPANTI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

Elenco delle Tabelle	5
Elenco delle Figure.....	6
Acronimi e Abbreviazioni	7
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	8
1. SALUMI ARTIGIANALI COME FONTE DI DIVERSITÀ MICROBICA	9
1.1 Il processo di produzione dei salumi.....	9
1.2 Salumi mediterranei.....	11
1.3 Salami tradizionali croati.....	12
1.4 Gruppi microbici principali	13
1.4.1 Batteri lattici	14
1.4.2 Cocchi coagulasi-negativi	14
1.4.3 Muffe	15
1.4.4 Lieviti	15
1.5 Strategie per l'innovazione e il miglioramento della salubrità dei salumi fermentati	15
1.5.1 Colture starter selezionate	15
1.5.2 Ingredienti funzionali e formulazione	17
2. MATERIALI E METODI	19
2.1. Campionamento.....	19
2.2. Analisi chimico-fisiche.....	19
2.3. Analisi del colore e della struttura (texture)	20
2.4. Analisi microbiologiche	20
2.5. Isolamento, identificazione e caratterizzazione dei batteri lattici.....	23
2.5.1. Estrazione del DNA.....	23
2.5.2. Identificazione molecolare degli isolati.....	23
2.5.3. Rilevamento del gene <i>hdcA</i>	24

2.5.4.	Screening per la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS).....	25
2.6.	Analisi statistiche.....	26
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	27
3.1.	Analisi chimico-fisiche.....	27
3.2.	Analisi del colore.....	28
3.3.	Analisi della texture.....	30
3.4.	Conte vitali	31
3.5.	Identificazione e caratterizzazione di batteri lattici	33
	Conclusioni.....	36
	Bibliografia.....	37

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione del terreno di coltura MRS (de Man, Rogosa e Sharpe).	21
Tabella 2. Composizione del terreno di coltura MSA (Mannitol Salt Agar).	22
Tabella 3. Composizione del terreno di coltura VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar).	22
Tabella 4. Composizione del terreno di coltura RB (Rose Bengal Chloramphenicol Agar).	22
Tabella 5. Mix di reazione per amplificazione del DNA	23
Tabella 6. Mix di reazione per il rilevamento del gene <i>hdcA</i>	25
Tabella 7. Parametri chimico-fisici dei salami croati.	27
Tabella 8. Risultati del colore dei salami croati.	28
Tabella 9. Risultati della texture dei salami croati.	30
Tabella 10. Conte vitali dei salami croati.	31
Tabella 11. Identificazione e caratterizzazione degli isolati.	33

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Processo produttivo degli insaccati fermentati.	11
Figura 2. Campioni di salsicce fermentate croate tipo “Slavonska kobasica”.	19
Figura 3. Condizioni della PCR per l’amplificazione del gene 16S rRNA.....	24
Figura 4. Condizioni della PCR per l’amplificazione del gene <i>hdcA</i>	25
Figura 5. Colonie con aspetto mucoide indicatore di produzione di EPS-saccarosio dipendenti.	35

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

A _w	Attività dell'acqua
CNC	Cocchi coagulasi-negativi
EPS	Esopolisaccaridi
LAB	Batteri lattici
MRS.	de Man, Rogosa e Sharpe
MSA	Mannitol Salt Agar
RB	Rose Bengal
VRBGA	Violet Red Bile Glucose Agar
UFC	Unità formanti colonie
UR	Umidità relativa

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La produzione di prodotti carnei fermentati ha radici antichissime e, ancora oggi, questi prodotti rappresentano una componente essenziale della tradizione alimentare in molte culture, oltre a svolgere un ruolo di rilievo dal punto di vista economico. Sebbene la produzione di questi prodotti si basi su metodi locali e tradizionali, l'avanzamento delle conoscenze scientifiche ha reso possibile il miglioramento della loro sicurezza e qualità. Un esempio significativo di questo tipo di prodotti è rappresentato dai salumi fermentati tradizionali croati, ampiamente diffusi nel territorio nazionale. Tra le varianti più conosciute si annoverano: *Slavonski kulen*, *Baranjski kulen*, *Zimska salama*, *Kulenova seka* e *Slavonska Kobasica*. Quest'ultimo, oggetto di analisi in questa tesi, è un salume preparato principalmente con carne di maiale e grasso, la cui composizione e qualità organolettica variano significativamente in base alla specifica area di produzione, riflettendo le tradizioni regionali. Le caratteristiche peculiari di questi prodotti derivano dalla selezione degli ingredienti, ma soprattutto dalle complesse trasformazioni microbiche che avvengono durante la fermentazione e maturazione. A differenza dei prodotti industriali, in cui il processo fermentativo è spesso controllato attraverso l'aggiunta di colture starter, nei salumi tradizionali la fermentazione avviene spontaneamente, grazie alla flora microbica naturalmente presente nella carne e negli ambienti di lavorazione. Questo processo spontaneo, se da un lato contribuisce a sviluppare sapori unici e caratteristici, dall'altro comporta una certa imprevedibilità dal punto di vista della sicurezza alimentare, poiché la crescita incontrollata di microrganismi può compromettere la salubrità del prodotto. Sebbene i salumi tradizionali croati siano ampiamente consumati, la letteratura scientifica a riguardo è ancora piuttosto limitata. Nel presente lavoro di tesi, sono stati analizzati dieci salumi tradizionali croati provenienti da cinque piccoli produttori locali. I campioni sono stati sottoposti ad analisi fisico-chimiche (pH, colore, attività dell'acqua, acidità titolabile e texture) e microbiologiche. In particolare, la caratterizzazione microbiologica ha incluso: la conta vitale di batteri lattici (LAB), cocchi coagulasi-negativi (CNC) ed eumiceti, l'isolamento e l'identificazione di batteri lattici, e la caratterizzazione degli isolati attraverso l'analisi della loro capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS) e la ricerca del gene *hdcA*, associato alla produzione di istamina.

1. SALUMI ARTIGIANALI COME FONTE DI DIVERSITÀ MICROBICA

Per "salume" si intende qualsiasi prodotto alimentare a base di carne, sia cruda che cotta, conservata attraverso un processo di salatura. I salumi possono presentarsi in diverse forme: in tagli interi come prosciutto, capocollo, spalla e bresaola, oppure sotto forma di insaccati ottenuti da carne macinata, come mortadella, cotechino, zampone e salsiccia fresca. Inoltre, la carne cruda può essere sottoposta a fermentazione, un processo che porta alla produzione di insaccati fermentati (Farris et al., 2012). La fermentazione può essere spontanea, se è avviata da microrganismi naturalmente presenti nelle materie prime o nell'ambiente di produzione, o controllata, se avviata attraverso l'aggiunta di colture microbiche selezionate.

Il presente capitolo illustra il processo di produzione degli insaccati fermentati, con un focus particolare sui salumi mediterranei, e analizza i principali microrganismi coinvolti nella fermentazione e nella maturazione. Inoltre, descrive i vantaggi dell'impiego di colture starter selezionate e le nuove frontiere per ottimizzare la produzione di salumi artigianali.

1.1 Il processo di produzione dei salumi

Il processo produttivo degli insaccati fermentati è mostrato in Figura 1. La prima fase consiste nella scelta delle materie prime, ovvero le carni da utilizzare, che possono essere di origine esclusivamente suina, suina mista, oppure ovina, caprina o bovina. Il grasso che viene aggiunto alla carne è, invece, solitamente di origine suina, data la composizione in acidi grassi che si presta meglio alle varie fasi di trasformazione, conferendo morbidezza e sapore all'impasto carneo. La carne selezionata viene innanzitutto tagliata in piccoli pezzi e poi triturrata più o meno finemente, a seconda della grana desiderata per l'impasto finale. La frazione grassa può essere triturrata, se proveniente dalla gola dell'animale, oppure tagliata a cubetti se proveniente dallo strato di grasso sottocutaneo (es. di dorso, di pancia, etc). Una volta pronta, la frazione grassa viene aggiunta a quella magra (Farris et al., 2012).

Successivamente, si procede con la salagione, attraverso l'aggiunta di sale (NaCl) all'impasto, insieme a spezie, nitrati o nitriti. Il sale, in concentrazioni variabili tra il 2,5 e il 4%, viene aggiunto direttamente all'impasto, provocando un abbassamento dell'attività dell'acqua. La

salagione viene effettuata a basse temperature per favorire la penetrazione del sale nell'impasto e limitare lo sviluppo di microrganismi indesiderati. Le spezie più comunemente aggiunte sono il pepe, in grani o macinato, l'aglio, il finocchio selvatico, il peperoncino, la paprika e varie erbe aromatiche. In alcuni casi, possono essere aggiunti zuccheri fermentescibili (es. lattosio). I conservanti, come nitrati e nitriti, vengono utilizzati in Europa in conformità con la legislazione comunitaria pertinente (Reg. CE 1333/2008), che ne descrive le quantità e l'utilizzo (Aquilanti et al., 2016).

In seguito, la miscela ottenuta (carne, grasso, concia) viene inserita in budelli naturali o artificiali, in una fase nota come insaccatura. Se il budello è naturale, la forma e le dimensioni dell'insaccato sono determinate dal tratto intestinale da cui il budello è stato ricavato (intestino crasso o tenue). Il calibro influenza direttamente il periodo di stagionatura.

Quest'ultima fase si suddivide in tre fasi successive: stufatura, asciugatura e maturazione. La stufatura dura da poche ore a qualche giorno dopo l'insaccatura, mantenendo temperature intorno ai 20 °C e un'umidità relativa (UR) intorno all'85%. Queste condizioni favoriscono lo sviluppo e l'attività metabolica dei batteri lattici, che eseguono un'azione di acidificazione, abbassando il pH e inibendo parzialmente la microflora dannosa. Durante la fase di asciugatura, il metabolismo dei batteri lattici rallenta e la fermentazione lattica giunge al termine, determinando un ulteriore abbassamento del pH e dell'attività dell'acqua. In questa fase, che dura al massimo dieci giorni, la temperatura e l'umidità relativa vengono leggermente ridotte e inizia lo sviluppo di muffe sulla superficie del budello. Infine, durante la fase di maturazione avvengono numerosi processi biochimici che definiscono le caratteristiche finali del prodotto. Durante questa fase, che si estende per settimane, la temperatura e l'umidità relativa sono ulteriormente ridotte per limitare lo sviluppo dei microrganismi e prevenire un'eccessiva disidratazione degli strati più superficiali. Il prodotto subisce un'ulteriore disidratazione, associata alla diminuzione dell'umidità all'interno dell'insaccato e all'aumento della concentrazione di sale. L'attività metabolica dei cocchi coagulasi negativi, dei lieviti e delle muffe determina un innalzamento del pH e una progressiva attività lipolitica e proteolitica, con il conseguente rilascio di sostanze aromatiche che influenzeranno le caratteristiche sensoriali del prodotto finale. Le variabili di tempo, temperatura e umidità che caratterizzano il processo di stagionatura determinano la differenziazione dei vari prodotti (Farris et al., 2012).

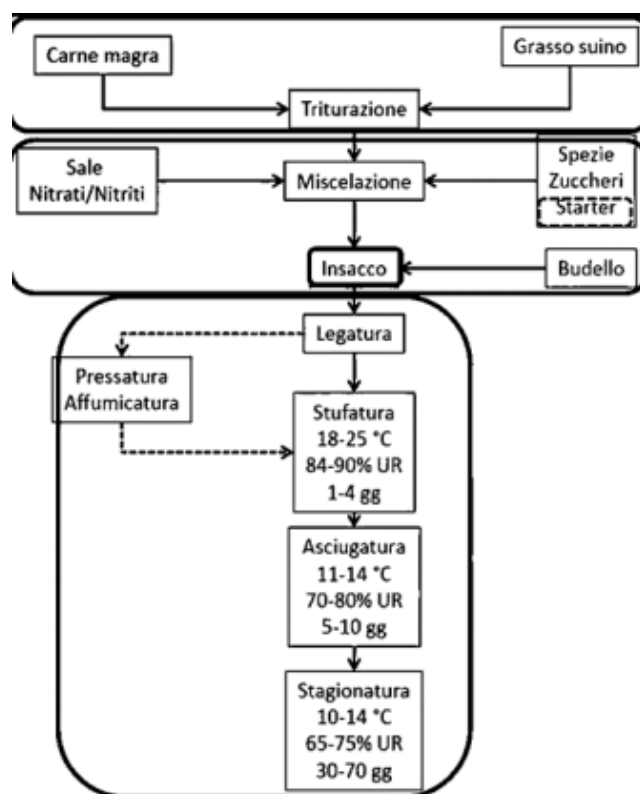


Figura 1. Processo produttivo degli insaccati fermentati.

1.2 Salumi mediterranei

La lavorazione delle carni per la produzione di salumi fermentati rappresenta uno dei settori industriali principali in Europa, particolarmente nei paesi del Mediterraneo (Barbieri et al., 2021).

Questi prodotti sono consumati da secoli in tutto il mondo e, in molti casi, costituiscono una delle principali fonti di nutrienti. Nei paesi del Mediterraneo, la produzione di carni fermentate risale all'epoca romana; questa si è poi diffusa prima in Europa e successivamente su scala globale. Nel tempo, questi prodotti si sono poi differenziati in base alle materie prime utilizzate, alle formulazioni e ai processi di produzione, essendo strettamente legati alla cultura, al patrimonio e all'identità locale delle diverse popolazioni (Prpich et al., 2021).

Ogni varietà locale è definita dalla disponibilità delle materie prime, dalle condizioni climatiche, dalle influenze religiose e dai metodi di lavorazione tramandati nel corso del tempo (Carballo, 2021).

Nei paesi del Mediterraneo, si osserva una maggiore varietà di produzione grazie alle specifiche condizioni climatiche. Sul mercato europeo esiste una vasta gamma di prodotti

fermentati, che si differenziano in base alla loro zona di produzione, acquisendo caratteristiche uniche (Talon, 2008).

Nei paesi europei, le carni crude fermentate sono rappresentate principalmente dai salumi a bassa umidità, spesso protetti da politiche volte a preservare il patrimonio culturale, l'esperienza gastronomica e il reddito economico delle aree marginali (Rossi et al., 2023).

In Europa, i salami fermentati possono essere suddivisi in tipologia nordica e mediterranea, con notevoli differenze tra queste. I prodotti nordici sono generalmente rappresentati da salumi fermentati più rapidamente e a temperature più elevate, caratterizzati da un pH finale inferiore a 5. I salumi fermentati prodotti nel sud del mediterraneo, invece, subiscono un processo di acidificazione più lento (pH compreso tra 5,3 e 6,2) e sono più estensivamente essiccate e stagionate. Spesso sono fortemente speziate e talvolta ricoperte da muffe desiderabili, il cui sviluppo è invece inibito nei salumi fermentati del Nord Europa applicando un processo di affumicatura.

Se non vengono utilizzate delle colture starter per standardizzare e controllare la produzione, si possono osservare differenze nella composizione della flora batterica di queste due tipologie di insaccati fermentati, che influenzano sia le caratteristiche chimico-fisiche che la qualità organolettica del prodotto finale. Nei salami mediterranei, caratterizzati da un pH più alto, *Lactobacillus sakei* è la specie di batteri lattici più comune, mentre le più diffuse specie di cocchi coagulasi-negativi sono *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus equorum*. Nei salami nordici, dove il pH più basso è determinato dalla particolare composizione della comunità microbica, *Pediococcus pentosaceus* è, tra i batteri lattici, la specie più abbondante, insieme a *Staphylococcus carnosus* per i cocchi coagulasi-negativi (Van Reckem et al., 2019).

Ulteriori differenze possono essere osservate dal punto di vista sensoriale e organolettico; infatti, è noto che i salami del mediterraneo sono più delicati, a differenza dei prodotti tipici del Nord Europa, caratterizzati da un sapore molto più marcato, per la maggiore abbondanza di spezie e l'affumicatura.

1.3 Salami tradizionali croati

La letteratura scientifica è, ad oggi, povera di articoli dedicati alla produzione di salumi tradizionali croati. Lešić et al. (2020) sottolineano che questi prodotti non sono stati ancora esplorati completamente, nonostante in Croazia esistano molti tipi diversi di salami fermentati naturalmente, con caratteristiche variabili a seconda degli ingredienti utilizzati nella loro formulazione e delle condizioni di lavorazione. In Croazia, la produzione di salsicce a livello artigianale è molto sviluppata; ogni prodotto assume caratteristiche uniche legate alla regione

di produzione, alle tecnologie utilizzate e alla stagionalità della produzione. La produzione di salumi artigianali segue ricette tradizionali che prevedono l'uso prevalentemente di carne di maiale di prima (tagli più magri con minore infiltrazione di grasso, es.: filetto, noce, lombo, etc.) e seconda categoria (spalla e parti inferiori della coscia), con l'aggiunta di sale e diverse spezie, insaccati in budella. Dopo l'insaccatura, i salami subiscono un processo di essiccazione e maturazione, con o senza affumicatura. L'affumicatura è tipica dei salumi artigianali della Croazia orientale.

La maturazione è la fase principale nel processo di produzione di un salame fermentato, durante la quale si verificano notevoli cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche e sensoriali del prodotto. Nelle produzioni artigianali la fermentazione è spesso spontanea; infatti, questa è condotta dalla microflora indigena specifica presente nell'alimento, che è responsabile di tutto il processo fermentativo. Essendo una fermentazione spontanea, la composizione del microbiota non è conosciuta inizialmente e può variare da prodotto a prodotto. Il microbiota può essere influenzato nel corso del tempo da vari fattori ambientali e tecnologici, delineando una microflora indigena specifica per ogni prodotto.

Nello studio condotto da Lešić et al. (2020) sono emerse significative differenze di pH tra i salami prodotti nella Croazia orientale e quelli dell'Istria. I salami della Croazia orientale, che subiscono un processo di maturazione più lungo, presentano un pH più acido, fino a 5,23, rispetto a quelli dell'Istria, il cui pH raggiunge valori fino a 6,26. Tuttavia, i valori di a_w sono risultati coerenti tra le diverse regioni, mantenendosi sempre inferiori a 0,85. Le differenze nelle formulazioni e nelle condizioni di lavorazione hanno influenzato non solo la popolazione microbica dei prodotti, ma anche la loro composizione nutrizionale, in termini di contenuto di grassi, proteine e acqua, oltre a incidere sulle proprietà sensoriali. Sebbene i valori nutrizionali siano stati considerati accettabili, gli autori suggeriscono di apportare alcune modifiche nella formulazione, principalmente riguardo alla composizione dei grassi e al contenuto di sale, per rendere il prodotto più appetibile per i consumatori, pur mantenendo elevati standard di qualità, sicurezza e accettabilità (Lešić et al., 2020).

1.4 Gruppi microbici principali

La maggior parte dei salumi fermentati è ottenuta attraverso processi convenzionali di fermentazione e maturazione, che si basano sull'attività dei microrganismi autoctoni presenti sia nelle materie prime che nell'ambiente di produzione. Tra i principali gruppi microbici coinvolti nella fermentazione degli insaccati di carne figurano i batteri lattici, che svolgono un ruolo fondamentale nell'acidificazione e quindi produzione di acidi organici. I cocchi

coagulasi negativi, che comprendono micrococchi e stafilococchi, sono responsabili dello sviluppo e della stabilizzazione del colore finale, oltre che dei processi di proteolisi e lipolisi. Anche muffe e lieviti, seppur in misura minore, contribuiscono in modo significativo al conferimento di specifiche proprietà nutrizionali e sensoriali, formando uno strato superficiale che protegge i lipidi dall'ossidazione indotta da aria e luce e il salume dall'eccessiva disidratazione (Aquilanti et al., 2016).

1.4.1 Batteri lattici

Durante la fermentazione dei prodotti carnei, i batteri lattici proliferano rapidamente fino a raggiungere una carica di 8–9 Log ufc/g per mantenersi poi stabili durante tutta la fase di stagionatura. I batteri lattici svolgono principalmente due funzioni. In primo luogo, assicurano la qualità igienico-sanitaria del prodotto finito, in quanto sono responsabili della produzione di acidi organici, principalmente acido lattico e, in minor quantità, acido acetico. Questi acidi provocano un abbassamento del pH, che inibisce lo sviluppo di batteri patogeni e alterativi, accelera il processo di disidratazione del prodotto riducendo la capacità di ritenzione idrica delle proteine, influenza la formazione e la stabilità del colore, e contribuisce all'aroma e al sapore del prodotto finale. Inoltre, alcuni ceppi producono batteriocine, sostanze di natura proteica con attività antimicrobica, che inibiscono ulteriormente la crescita di microrganismi indesiderati. Un'altra funzione fondamentale dei batteri lattici è la produzione di composti aromatici, derivanti sia dalla loro attività lipolitica (sebbene limitata) sia, soprattutto, dall'attività proteolitica. La maggior parte delle specie di batteri lattici isolate da salami tradizionali fermentati spontaneamente appartiene al gruppo dei lattobacilli, e in particolare alle specie omo-fermentanti *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus alimentarius*. Anche la specie *Pediococcus pentosaceus* è stata spesso isolata da salumi fermentati, come documentato da diversi studi (Carballo, 2021).

1.4.2 Cocchi coagulasi-negativi

Nei salami, i cocchi coagulasi-negativi sono rappresentati principalmente da Staphylococcaceae e Micrococcaceae. La maggiore resistenza al sale e la capacità di sviluppare in assenza di ossigeno favoriscono lo sviluppo delle Staphylococcaceae negli insaccati fermentati, con conte batteriche che possono raggiungere fino a 7 Log ufc/g. Il ruolo dei cocchi coagulasi-negativi si articola principalmente in tre attività metaboliche: (i) l'attività nitrato- e nitrito-reduttasica, che contribuisce allo sviluppo del tipico colore rosso delle carni fermentate. Questo è dovuto al legame che si forma tra l'ossido nitrico e la mioglobina, creando la nitrosomioglobina; (ii) l'attività catalasica, che agisce sui perossidi

accumulati durante le fasi di fermentazione. Questa attività previene l'ossidazione del ferro, la quale potrebbe alterare il colore del prodotto, e riduce l'ossidazione dei lipidi; (iii) l'attività proteolitica e lipolitica, dovuta alla presenza di lipasi e proteasi, che favorendo la decomposizione dei trigliceridi e la formazione di peptidi di piccole dimensioni e amminoacidi liberi, sono precursori dei composti volatili e aromatici. Relativamente alle Staphylococcaceae, le specie più comunemente presenti sono *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus*, mentre tra le Micrococcaceae *Kokuria varians* è predominante (Carballo, 2021).

1.4.3 Muffe

Le muffe sono microrganismi aerobi che si sviluppano principalmente sulla superficie dei salami, raggiungendo concentrazioni fino a 5 Log ufc/cm². La loro presenza è fondamentale per prevenire una eccessiva e disomogenea disidratazione del prodotto. Inoltre, le muffe proteggono il prodotto dall'irrancidimento, legato alla fotossidazione lipidica. Grazie alla loro attività lipolitica e proteolitica, le muffe contribuiscono anche alla formazione di composti aromatici, arricchendo l'aroma dei salami. Le specie maggiormente presenti sulla superficie degli insaccati sottoposti a maturazione spontanea appartengono principalmente ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* (Carballo, 2021).

1.4.4 Lieviti

I lieviti possono raggiungere cariche comprese tra 2–4 Log ufc/g. Come le muffe, anche questi microrganismi si sviluppano prevalentemente sulla superficie dei salami e sono resistenti a bassi valori di attività dell'acqua e ad alte concentrazioni di sali. I lieviti esercitano un'azione protettiva contro microrganismi patogeni e alterativi e contribuiscono allo sviluppo dell'aroma del prodotto attraverso la loro attività lipolitica e proteolitica. *Debaryomyces hansenii* è la specie più comune e predominante in questo tipo di prodotto, ma è nota anche la presenza di specie minori appartenenti ai generi *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Carballo, 2021).

1.5 Strategie per l'innovazione e il miglioramento della salubrità dei salumi fermentati

1.5.1 Colture starter selezionate

Nei salumi tradizionali, la fermentazione dipende dalla contaminazione naturale delle carni da parte del microbiota ambientale, che si sviluppa durante le fasi di macellazione e lavorazione. Questo porta alla formazione di una specifica composizione del microbiota

indigeno, che conferisce ai prodotti artigianali le loro qualità distintive. Tuttavia, sebbene la fermentazione spontanea svolga un ruolo importante nel determinare il sapore, la consistenza e la qualità del prodotto finale, essa non può garantire una standardizzazione o uniformità dei prodotti a causa dell'elevata variabilità nella quantità e nelle specie microbiche presenti. Per superare questa limitazione, è consigliato l'uso di colture starter, composte da ceppi selezionati isolati da carni fermentate spontaneamente (Osimani et al., 2023). Tali microrganismi devono essere sufficientemente competitivi per prevalere durante la fermentazione, adattarsi al prodotto e alla tecnologia di produzione impiegata, e possedere capacità metaboliche che possano influire positivamente sulla qualità e sicurezza del prodotto.

Le colture starter più utilizzate nella trasformazione delle carni comprendono principalmente batteri lattici, cocchi coagulasi-negativi e, in misura minore, lieviti e muffe (Prpich et al., 2021). L'aggiunta di colture starter all'impasto carneo consente di controllare efficacemente i processi di fermentazione e maturazione dei salami, standardizzando il processo produttivo e la qualità del prodotto finale. I microrganismi aggiunti si stabiliscono come microbiota predominante, riducendo i rischi igienici e prevenendo eventuali problematiche legate alla presenza di microrganismi indesiderati. L'utilizzo di colture starter selezionate può anche rappresentare una soluzione efficace contro i rischi microbiologici, come lo sviluppo di patogeni e microrganismi alterativi, e chimici, come la produzione di ammine biogene (Carballo, 2021).

Gli alimenti fermentati, come i salumi, sono esempi di prodotti in cui i livelli di ammine biogene possono raggiungere valori elevati a causa della decarbossilazione degli amminoacidi precursori ad opera di microrganismi fermentativi (Alvarez et al., 2014). Alcuni ceppi di batteri lattici, appartenenti ai batteri Gram-positivi, svolgono questa attività enzimatica di decarbossilazione, producendo principalmente istamina a partire dall'istidina. Alcuni ceppi di batteri lattici appartenenti alle specie *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus damnosus*, e *Pediococcus parvulus* sono risultate responsabili della produzione di ammine biogene (Rossi et al., 2011). Una strategia offerta dall'utilizzo di colture starter consiste nel selezionare specie di LAB incapaci di produrre ammine biogene, evitando così il loro accumulo e potenziali rischi per la salute umana (Alvarez et al., 2014).

Alcuni ceppi di batteri lattici hanno la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS), sostanze che facilitano la colonizzazione degli ecosistemi tramite la formazione di biofilm. A livello industriale, gli EPS sono utilizzati come stabilizzanti, emulsionanti o agenti gelificanti per modificare le proprietà reologiche e migliorare la texture del prodotto (Laranjo et al., 2017).

Le colture starter utilizzate nella produzione alimentare non solo migliorano la qualità del prodotto finale, ma possono anche apportare benefici significativi per la salute. Questo è particolarmente evidente nel caso dei probiotici, definiti come “microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell’ospite”.

I probiotici possono stimolare il sistema immunitario, migliorare la barriera della mucosa intestinale, stimolare la motilità intestinale, alleviare i sintomi di intolleranza al lattosio, produrre enzimi digestivi e protettivi, e prevenire varie malattie gastrointestinali (Hill et al., 2014). Molti batteri lattici sono considerati probiotici grazie alla loro capacità di produrre composti bioattivi, che conferiscono ulteriori benefici per la salute. Questi composti includono peptidi bioattivi con attività antiossidante e antipertensiva, ed esopolisaccaridi con proprietà anticancerogene, ipocolesterolemizzanti, antiossidanti e antipertensive (Wegh et al., 2019). Inoltre, alcuni batteri lattici hanno la capacità di produrre batteriocine, composti proteici con attività antimicrobica, inibendo la crescita di microrganismi indesiderati come *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus*.

1.5.2 Ingredienti funzionali e formulazione

Studi epidemiologici indicano che un consumo elevato di prodotti a base di carne è associato a un aumento del rischio di sviluppare diverse malattie, tra cui obesità, cancro, malattie cardiache e altre patologie croniche (Sirini et al., 2022).

I prodotti a base di carne sono importanti fonti di proteine, grassi, amminoacidi essenziali, minerali, vitamine e altri nutrienti (Biesalski, 2005). Negli ultimi anni, la domanda da parte dei consumatori per carni e prodotti a base di carne più salutari, con livelli ridotti di grassi, colesterolo, contenuti di cloruro di sodio e nitriti diminuiti, un miglior profilo degli acidi grassi e l'incorporazione di ingredienti che migliorano la salute, è in rapido aumento a livello mondiale.

Il miglioramento del valore nutrizionale dei prodotti a base di carne può essere realizzato attraverso l'aggiunta di composti funzionali, tra cui acido linoleico coniugato, vitamina E, acidi grassi omega-3 e selenio nella dieta degli animali, al fine di migliorare la produzione animale, la composizione delle carcasse e la qualità della carne fresca (Zhang et al., 2010).

Negli ultimi decenni, additivi non derivati dalla carne sono stati ampiamente utilizzati nei prodotti a base di carne per ridurre i costi di produzione e migliorare la funzionalità dei prodotti (Zhang et al., 2010). Questi additivi includono proteine vegetali, fibre alimentari, erbe e spezie. Estratti vegetali ricchi di polifenoli possono essere utilizzati per prolungare la durata di

conservazione dei prodotti a base di carne grazie alle proprietà antiossidanti e antimicrobiche (Munekata et al., 2021).

Una delle sfide principali nella produzione di prodotti a base di carne fermentata riguarda la riduzione del contenuto di sale. Una diminuzione del sale potrebbe influire sul sapore e la stabilità del prodotto, ma è necessaria per ridurre l'assunzione di sodio nella dieta e, di conseguenza, il rischio di ipertensione e malattie cardiovascolari (Ruusunen & Puolanne, 2005). Ridurre il contenuto di sale nei salami fermentati, ad esempio, può aumentare l'attività degli enzimi proteolitici, portando a una consistenza più morbida e friabile, ma potrebbe anche compromettere l'inibizione dei patogeni (Toldrá, 2006).

La sostituzione parziale del cloruro di sodio (NaCl) con cloruro di potassio (KCl) e altri esaltatori di sapidità ha dimostrato di mantenere le caratteristiche sensoriali desiderate, ridurre il contenuto di sodio e promuovere la crescita dei batteri lattici, mantenendo al contempo il pH e limitando la crescita di patogeni (Campagnol et al., 2011).

Nella produzione di insaccati fermentati, nitrati e nitriti sono utilizzati per inibire la crescita di batteri patogeni come *Clostridium botulinum*, ritardare la rancidità ossidativa, e contribuire allo sviluppo del sapore e del colore tipico dei prodotti. Tuttavia, l'esposizione a nitrosammine, composti formati dalla reazione tra ossido nitrico e ammine secondarie, è stata associata a un aumento del rischio di sviluppare il cancro, portando a una regolamentazione rigorosa del loro uso (Sindelar & Milkowski, 2012). Per ridurre l'uso di nitrati e nitriti, si possono utilizzare estratti vegetali ad alto contenuto di nitrati, in combinazione con colture starter batteriche come *Staphylococcus carnosus*, che possono convertire i nitrati in nitriti durante la fermentazione, conferendo caratteristiche simili a quelle dei prodotti stagionati tradizionali (Oliveira et al., 2021). Infine, la riduzione del grasso nei prodotti a base di carne è un'altra strategia importante per migliorare la loro salubrità. Il grasso è essenziale per la qualità sensoriale e microbiologica dei prodotti, ma è anche ricco di acidi grassi saturi e colesterolo, che sono stati associati a un aumento del rischio di malattie cardiovascolari e altre condizioni di salute (Kaur & Sharma, 2019). La sostituzione del grasso animale con oli vegetali può migliorare il profilo lipidico del prodotto, ma può anche alterare la consistenza e la capacità di ritenzione di acqua, rendendo la produzione di salumi fermentati una sfida tecnica significativa. Pertanto, è essenziale sviluppare soluzioni innovative per produrre prodotti più sani che mantengano le caratteristiche sensoriali desiderate dai consumatori (Sirini et al., 2022).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Campionamento

Per l'allestimento delle prove sperimentali, sono stati acquistati dieci salami tipo “*Slavonska kobasica*” da cinque diversi produttori locali croati, identificati come Produttore 1, 2, 3, 4 e 5 (P1, P2, P3, P4 e P5). Da ciascun produttore sono stati prelevati due lotti (S1 e S2), corrispondenti a due campioni di circa 400 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 fino al momento dell'analisi. La Figura 2 riporta uno schema del campionamento con immagini delle sezioni dei campioni. Tutti i salumi sono stati preparati con carne fermentata ed essicata di suino, sale, spezie e conservanti (E250/E251).

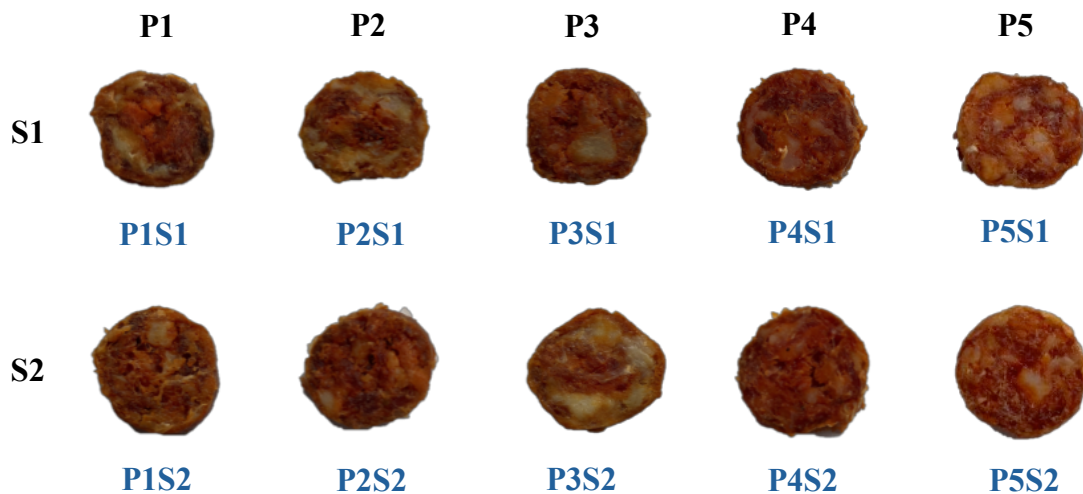


Figura 2. Campioni di salsicce fermentate croate tipo “*Slavonska kobasica*”.

2.2. Analisi chimico-fisiche

I valori di pH dei campioni di salumi croati sono stati misurati utilizzando un pH-metro equipaggiato con un elettrodo a solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italia) inserendo direttamente la sonda nei campioni. Prima delle misurazioni, lo strumento è stato calibrato utilizzando due soluzioni standard a pH 4 e 7.

L'acidità titolabile totale è stata determinata utilizzando 10 g di campione omogeneizzati in 90 mL di acqua distillata per 5 minuti a 260 rpm usando un apparecchio Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milano, Italia). I risultati sono espressi come il volume (mL) di NaOH 0.1 M aggiunto alla soluzione per raggiungere un valore di pH pari a 8,3.

L'attività dell'acqua (a_w) è stata misurata secondo il metodo ISO 18787:2017 utilizzando un apparecchio AwTherm (Rotronic).

Le analisi sono state condotte in triplicato per ogni campione, e i risultati espressi come media \pm deviazione standard.

2.3. Analisi del colore e della consistenza (*texture*)

Per la determinazione del colore dei salami è stato utilizzato il colorimetro Chroma Meter CR-200 (Minolta, Osaka, Giappone). Il colore è stato determinato su fette spesse 2 cm secondo il sistema CIE $L^*a^*b^*$. Il parametro L^* misura la luminosità, con valori da 0 (nero) a 100 (bianco); a^* indica l'intensità di rosso/verde, mentre b^* indica l'intensità di blu/giallo (Lešić et al., 2020).

Per l'analisi della texture, sono stati preparati campioni cilindrici, con un diametro di 20 mm e un'altezza di 15 mm. 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 cilindrica 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 i seguenti parametri: durezza (*hardness*), coesività (*cohesiveness*), elasticità (*springiness*), adesività (*adhesiveness*).

Le analisi sono state condotte in triplicato per ogni campione, e i risultati espressi come media \pm deviazione standard.

2.4. Analisi microbiologiche

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra, 10 g di ciascun campione di salame sono stati prelevati in condizione di sterilità e posti in sacchetti Stomacher, ai quali sono stati aggiunti 90 mL di acqua peptonata sterile (0,1% peptone, p/v). Ogni campione è stato omogeneizzato utilizzando un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator (VWR International PBI, Milano, Italia) per 5 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:

- MRS (De Man Rogosa e Sharpe, Tabella 1), per la crescita e l'enumerazione dei presunti lattobacilli, con incubazione a 30 °C per 48-72 ore. Al terreno è stato aggiunto l'antibiotico cicloesimide (0,25 g/L) per inibire la crescita degli eumiceti.
- MSA (Mannitol Salt Agar, Tabella 2), per la crescita e l'enumerazione di cocchi coagulasi negativi, con incubazione a 37 °C per 24-48 ore.
- VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar, Tabella 3), per la crescita e l'enumerazione di Enterobacteriaceae, con incubazione a 37 °C per 24 ore.
- RB (Rose Bengal Chloramphenicol Agar, Tabella 4) per la crescita e l'enumerazione degli eumiceti (lieviti e muffe), con incubazione a 25 °C per 72-96 ore.

Le analisi sono state condotte in doppio tecnico per ogni campione e i risultati delle conte vitali sono espressi come media del Log delle unità formanti colonia (ufc) per grammo di campione (Log ufc/g) \pm deviazione standard.

Tabella 1. Composizione del terreno di coltura MRS (de Man, Rogosa e Sharpe).

Componente	Concentrazione (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

Tabella 2. Composizione del terreno di coltura MSA (Mannitol Salt Agar).

Componente	Concentrazione (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

Tabella 3. Composizione del terreno di coltura VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar).

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

Tabella 4. Composizione del terreno di coltura RB (Rose Bengal Chloramphenicol Agar).

Componente	Concentrazione (g/L)
Peptone micologico	5
Potassio fosfato bibasico	1
Magnesio solfato	0,5
Glucosio	10
Rosa bengala	0,05
Agar	15
Cloramfenicolo	0,1

2.5. Isolamento, identificazione e caratterizzazione dei batteri lattici

Dalle piastre di MRS agar sono state prelevate 25 colonie di batteri lattici, poi strisciate su terreno nuovo in modo tale da ottenere delle colonie pure appartenenti ad un singolo ceppo. La purificazione è stata ripetuta per tre volte. Le piastre sono state incubate a 30 °C per 48 ore. Per garantire la corretta conservazione degli isolati purificati, è stata utilizzata una soluzione contenente glicerolo come crioprotettore per ciascun ceppo. In dettaglio, una soluzione sterile contenente glicerolo e acqua è stata mescolata (1:1) con MRS brodo (VWR). Le soluzioni ottenute sono state versate nelle corrispondenti piastre di subcoltura pura e un'ansa sterile a L è stata utilizzata per sospendere la biomassa vitale di ciascun isolato. Infine, le sospensioni risultanti sono state aliquotate in provette Eppendorf sterili e conservate a -80 °C fino al momento dell'uso.

2.5.1. Estrazione del DNA

Il DNA degli isolati purificati è stato estratto partendo dalla colonia pura, inoculata in 10 mL di MRS broth per 24 ore. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire dal pellet ottenuto in seguito alla centrifugazione delle brodocolture, utilizzando i reagenti Tissue and Cell Lysis Solution e MPC Protein Precipitation Reagent (Biosearch Technologies, Middlesex, Regno Unito). Il DNA estratto è stato conservato a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

2.5.2. Identificazione molecolare degli isolati

Il gene 16S rRNA è stato amplificato utilizzando i 2 primer universali: 27f [5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG] e 1495r [5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3'-AAGTCGTAACAAGGTAACC]. La PCR è stata condotta utilizzando il termociclatore MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Milano, Italia) in un volume finale di 25 µL e mix di reazione riportata nella Tabella 5, seguendo le condizioni riportate in Figura 3.

Tabella 5. Mix di reazione per amplificazione del DNA.

Componenti	Concentrazione iniziale	Concentration Finale	Volume per ogni tubo di reazione
MyFi mix	1X	1X	12.5 µL
27f	10 µM	1 µM	0.5 µL
1495r	10 µM	1 µM	0.5 µL

H ₂ O	Fino al volume finale
DNA	2 µL

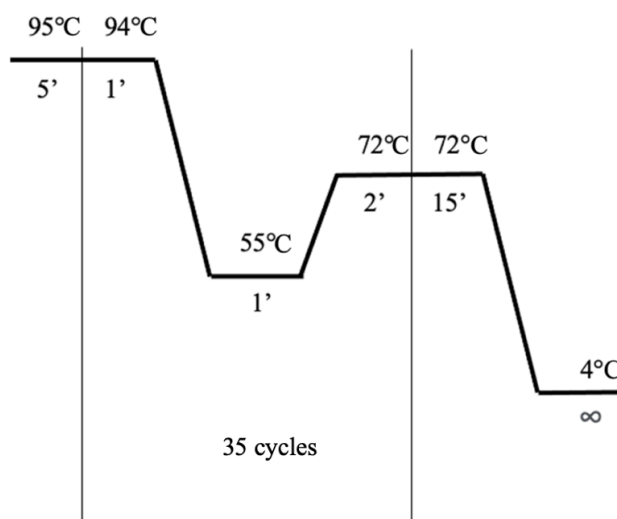


Figura 3. Condizioni della PCR per l'amplificazione del gene 16S rRNA.

L'amplificazione è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5% (p/v) in tampone Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5X contenente 0,5 µg/mL di GelRed® Nucleic Acid Gel Stain. 5 µL di ciascun amplicone sono stati miscelati con 2 µL di colorante di caricamento (Loading dye) e inseriti nei pozzetti dedicati del gel di elettroforesi. La corsa elettroforetica ha incluso l'utilizzo del HyperLadder™ 1 kb (Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA) come standard di peso molecolare. Gli ampliconi sono stati inviati a Genewiz (Takale, Regno Unito) per la purificazione e il sequenziamento. Successivamente, una ricerca BLAST è stata utilizzata per confrontare le sequenze ottenute con le sequenze di rRNA 16S dei ceppi tipo dal database GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.5.3. Rilevamento del gene *hdcA*

Il DNA estratto dagli isolati di batteri lattici è stato testato per la presenza/assenza del gene *hdcA*. In dettaglio, le reazioni di qPCR sono state eseguite utilizzando la coppia di primer Hdc1 (5'-TTGACCGTATCTCAGTGAGTCCAT-3') e Hdc2 (5'-ACGGTCATACGAAACAATACCATC-3') progettati da Fernández et al. (2006) per amplificare un frammento di 174 bp del gene *hdcA*. La mix di reazione e le condizioni della PCR sono mostrate rispettivamente nella Tabella 6 e Figura 4.

Tabella 6. Mix di reazione per il rilevamento del gene *hdcA*.

Componente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume per ogni tubo di reazione
MyFi mix	1X	1X	12,5 μ L
Hdc1	30 μ M	900 nM	1 μ L
Hdc2	30 μ M	900 nM	1 μ L
Water			Fino al volume finale (25 μ L)
DNA			2 μ L

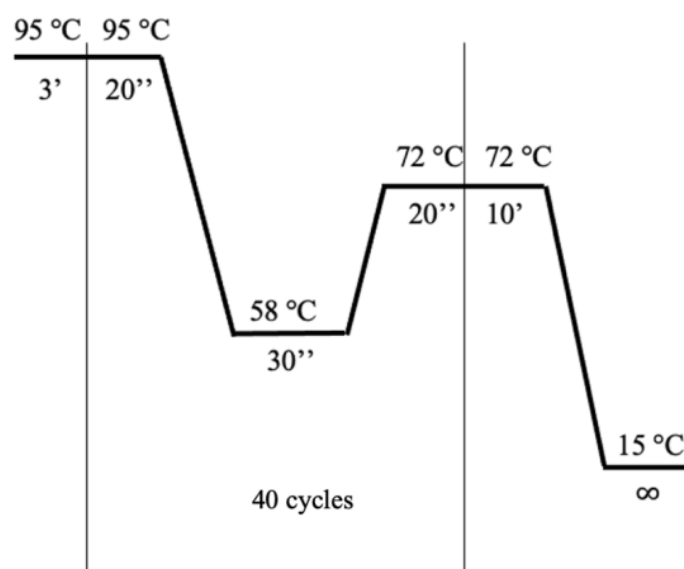


Figura 4. Condizioni della PCR per l'amplificazione del gene *hdcA*.

2.5.4. Screening per la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS)

Gli isolati sono stati testati per la capacità di produzione di EPS utilizzando la procedura precedentemente descritta da Hilbig et al. (2019) con alcune modifiche. Inizialmente, gli isolati sono stati estratti dalle soluzioni crioprotettive e subcoltivati due volte per 48 ore a 30 °C. Successivamente, aliquote di 5 μ L di ciascuna coltura batterica sono state aggiunte ai seguenti terreni solidi:

- MRS agar arricchito con saccarosio a una concentrazione di 80 g/L per favorire la sintesi di omopolisaccaridi (HoPS);

- MRS agar arricchito con estratto di lievito (VWR Chemicals) (10 g/L), estratto di carne (VWR Chemicals) (10 g/L), lattosio (Carlo Erba Reagents, Cornaredo, Italia) (20 g/L) e galattosio (VWR Chemicals) (20 g/L) per favorire la sintesi di eteropolisaccaridi (HePS).

Dopo un'incubazione di 48 ore a 30 °C, le colonie sono state classificate come positive se presentavano una consistenza filamentosa (capace di formare filamenti visibili con uno stuzzicadenti sterile) o un aspetto mucoso (visibilmente lucido e viscoso). Per ciascun isolato, le analisi sono state eseguite in duplicato.

2.6. Analisi statistiche

I dati sono stati elaborati statisticamente applicando il metodo dell'analisi della varianza (ANOVA) ad una via; le differenze tra i valori medi dei campioni sono state rivelate applicando il test HSD di Tukey (livello di significatività: $p \leq 0,05$). L'analisi è stata condotta utilizzando il Software JMP® Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Analisi chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico-fisiche dei campioni di salumi croati sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Parametri chimico-fisici dei salami croati.

	pH	Acidità titolabile	a _w
P1S1	5,17±0,07 ^b	9,3±0,7	0,83±0,02
P1S2	5,35±0,04 ^a	9±0,5	0,81±0,02
Media P1	5,26±0,11 ^B	9,15±0,6 ^C	0,82±0,02
P2S1	5,25±0,07	10±0,8	0,84±0,02
P2S2	5,29±0,04	11,6±0,4	0,83±0,02
Media P2	5,27±0,05 ^B	10,80±0,6 ^B	0,83±0,01
P3S1	5,30±0,05	9,8±0,3	0,80±0,02
P3S2	5,25±0,04	8,3±0,7	0,79±0,00
Media P3	5,28±0,05 ^B	9,05±0,4 ^C	0,80±0,01
P4S1	5,40±0,01	13,7±0,1	0,85±0,01
P4S2	5,45±0,01	13,8±0,1	0,81±0,01
Media P4	5,43±0,03 ^A	13,75±0,1 ^A	0,83±0,02
P5S1	5,45±0,04	11,3±0,2	0,82±0,01
P5S2	5,46±0,01	12,2±0,3	0,82±0,01
Media P5	5,45±0,03 ^A	11,75±0,2 ^B	0,82±0,00

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in minuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra campioni dello stesso produttore. Le lettere in maiuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra diversi produttori ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda il pH, sono stati registrati valori compresi tra $5,17 \pm 0,07$ (P1S1) e $5,46 \pm 0,01$ (P5S2). Ad eccezione dei campioni del produttore 1, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra campioni appartenenti allo stesso produttore. Tuttavia, dal

confronto tra diversi produttori, è emerso che quelli provenienti dai produttori 4 e 5 hanno mostrato valori più alti di pH rispetto a quelli dei produttori 1, 2 e 3. Questi risultati sono simili ai valori misurati da Lešic et al. (2020) in salumi del tipo *Kulenova Seka* ($5,23 \pm 0,23$) e salsicce fermentate slave ($5,32 \pm 0,37$). Invece, i valori sono più bassi rispetto ad altri prodotti provenienti dalla regione dell'Istria, che hanno mostrato valori di pH compresi tra $5,90 \pm 0,89$ e $6,26 \pm 0,47$.

Per quanto riguarda l'acidità titolabile, i risultati hanno evidenziato differenze significative tra campioni provenienti da diversi produttori; in particolare, i campioni del produttore P4 hanno mostrato valori statisticamente più alti rispetto agli altri campioni, mentre i campioni provenienti dai produttori P1 e P3 hanno mostrato i valori più bassi. I campioni dei produttori P2 e P4 hanno mostrato valori intermedi. I risultati sono coerenti con i valori di acidità titolabile misurati da Belleggia et al. (2024) in campioni di salsicce fermentate polacche.

Riguardo l'attività dell'acqua, sono stati misurati valori compresi tra $0,79 \pm 0,00$ (P3S2) e $0,85 \pm 0,01$ (P4S1). Non sono emerse differenze statisticamente significative dal confronto tra campioni dello stesso produttore e tra campioni di diversi produttori. I risultati sono coerenti con quelli solitamente riportati in letteratura per salami e salsicce fermentate (Lešic et al., 2020).

3.2. Analisi del colore

I risultati delle analisi colorimetriche dei salami croati sono riportati nella Tabella 8.

Tabella 8. Risultati del colore dei salami croati.

	L*	a*	b*
P1S1	43,50±1,74	19,57±2,58	29,46±4,17
P1S2	38,73±3,54	17,92±0,40	29,63±2,38
Media P1	41,12±3,61	18,75±1,88 ^A	29,55±3,04 ^A
P2S1	44,62±2,89	13,75±2,69	22,74±5,18
P2S2	40,86±5,66	14,51±3,83	26,26±5,79
Media P2	42,74±4,52	14,13±2,99 ^B	24,50±5,28 ^{A,B}
P3S1	38,94±3,25	14,14±1,34	20,70±5,54
P3S2	40,06±4,39	16,05±2,91	24,46±7,09
Media P3	39,50±3,51	15,09±2,28 ^B	22,58±6,05 ^{A,B}
P4S1	44,33±2,11	15,09±1,78	20,78±4,86

P4S2	41,08±4,32	15,81±2,43	21,59±3,85
Media P4	42,71±3,53	15,45±1,95 ^{A,B}	21,19±3,94 ^B
P5S1	40,06±1,72	16,64±0,50	21,91±3,21
P5S2	41,24±1,50	15,75±1,21	17,87±0,96
Media P5	40,65±1,58	16,19±0,96 ^{A,B}	19,89±3,06 ^B

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in minuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra campioni dello stesso produttore. Le lettere in maiuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra diversi produttori ($p < 0,05$).

I risultati emersi dall'analisi dei campioni hanno mostrato una forte somiglianza con i valori riportati da Lešić et al. (2020) per salami provenienti dalla Croazia orientale. I valori di L* rilevati nei salumi oggetto di studio sono compresi tra $38,73 \pm 3,54$ (P1S2) e $44,62 \pm 2,89$ (P2S1), mentre valori compresi tra $39,03 \pm 2,11$ e $40,26 \pm 3,01$ sono stati riportati da Lešić et al. (2020). Le analisi non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nei valori di L*, né all'interno dei campioni dello stesso produttore né tra quelli provenienti da produttori diversi, suggerendo una buona omogeneità cromatica tra i campioni analizzati. Per quanto riguarda il parametro a*, che indica la componente rossa del colore, sono stati misurati valori compresi tra $13,75 \pm 2,69$ (P2S1) e $19,57 \pm 2,58$ (P1S1), risultando mediamente simili a quelli misurati da Lešić et al. (2020), pari a $15,84 \pm 3,40$ e $15,89 \pm 3,25$. Dal confronto tra i diversi produttori è emerso che i campioni provenienti dai produttori P2 e P3 hanno mostrato valori inferiori rispetto a quelli del produttore P1, mentre i produttori P4 e P5 hanno mostrato valori intermedi.

I valori di b* (indice di giallo/blu) misurati nei salumi croati oggetto di studio sono risultati mediamente più elevati rispetto a quelli riportati da Lešić et al. (2020); in particolare, nei campioni di salumi provenienti dalla Croazia orientale sono stati misurati valori di b* compresi tra $16,95 \pm 2,89$ e $19,07 \pm 5,84$ (Lešić et al., 2020), mentre nei campioni analizzati in questo studio sono stati trovati valori compresi tra $17,87 \pm 0,96$ e $29,63 \pm 2,38$. Anche in questo caso sono emerse differenze statisticamente significative dal confronto tra diversi produttori, mentre non sono state riscontrate differenze tra campioni dello stesso produttore. I campioni del produttore P1 hanno mostrato valori più elevati rispetto a quelli provenienti dai produttori P4 e P5, mentre i campioni dei produttori P3 e P2 hanno mostrato valori intermedi.

3.3. Analisi della texture

I risultati dell'analisi della texture dei salami croati sono riportati nella Tabella 9.

Tabella 9. Risultati della texture dei salami croati.

	<i>Hardness</i> [N]	<i>Cohesiveness</i>	<i>Springiness</i>	<i>Adhesiveness</i>
P1S1	17,67±4,99 ^a	0,71±0,02	1,17±0,12	0,89±0,24
P1S2	7,33±2,85 ^b	0,63±0,11	1,13±0,15	0,64±0,03
Media P1	12,50±6,73 ^{A,B}	0,67±0,08	1,15±0,12	0,76±0,20 ^{A,B}
P2S1	13,04±7,93	0,67±0,07	1,17±0,12	0,77±0,07
P2S2	5,76±3,61	0,73±0,14	1,27±0,21	0,58±0,10
Media P2	9,40±6,80 ^B	0,70±0,10	1,22±0,16	0,68±0,13 ^{A,B}
P3S1	7,49±8,08	0,83±0,11	1,53±0,40	0,55±0,06
P3S2	10,92±5,88	0,70±0,04	1,10±0,00	0,60±0,11
Media P3	9,20±6,59 ^B	0,76±0,10	1,32±0,35	0,58±0,08 ^B
P4S1	18,34±11,06	0,68±0,07	1,20±0,17	0,91±0,16
P4S2	26,45±7,63	0,73±0,05	1,40±0,26	0,79±0,09
Media P4	22,40±9,59 ^A	0,71±0,06	1,30±0,23	0,85±0,14 ^A
P5S1	14,69±7,56	0,72±0,03	1,23±0,23	0,76±0,08
P5S2	16,01±4,35	0,74±0,01	1,27±0,29	0,71±0,13
Media P5	15,35±5,56 ^{A,B}	0,73±0,02	1,25±0,23	0,73±0,10 ^{A,B}

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in minuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra campioni dello stesso produttore. Le lettere in maiuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra diversi produttori ($p < 0,05$).

I valori relativi alla texture dei campioni analizzati hanno mostrato una notevole variabilità, in particolare per quanto riguarda il parametro di *hardness* (durezza), con valori tra 5,76±3,61 (P2S2) e 26,45±7,63 (P4S2). Questi risultati differiscono significativamente dai valori riportati da Šubarić et al. (2010), che hanno rilevato valori di *hardness* compresi tra 47,11 ± 1,86 e 79,77 ± 4,62 in prodotti simili. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative all'interno dei campioni dello stesso produttore soltanto per il produttore P1, mentre a livello inter-produttore sono emerse differenze statisticamente significative tra i campioni dei produttori P2 e P3, che hanno mostrato valori inferiori rispetto a quelli del produttore P4. I campioni dei produttori P1 e P5 hanno mostrato valori intermedi.

Per quanto riguarda la *cohesiveness* (coesività), i valori rilevati variano da $0,63 \pm 0,11$ (P1S2) a $0,83 \pm 0,11$ (P3S1), leggermente più elevati rispetto a quelli riportati da Šubarić et al. (2010), compresi tra $0,37 \pm 0,01$ e $0,49 \pm 0,04$. Tuttavia, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i campioni dello stesso produttore né tra quelli di produttori diversi.

Anche i valori di *springiness* (elasticità) sono risultati differenti rispetto a quelli riportati da Šubarić et al. (2010). Infatti, nei salumi croati analizzati in questo studio questo parametro è risultato compreso tra $1,10 \pm 0,00$ (P3S2) e $1,53 \pm 0,40$ (P3S1), mentre valori compresi tra $0,65 \pm 0,02$ e $0,74 \pm 0,06$ sono stati riportati da Šubarić et al. (2010). Anche per questo parametro, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative né all'interno dei campioni dello stesso produttore né tra produttori diversi.

Per quanto riguarda i valori di *adhesiveness* (adesività), sono stati misurati valori compresi tra $0,55 \pm 0,06$ (P3S1) e $0,91 \pm 0,16$ (P4S1). L'analisi statistica ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i campioni del produttore P3 e i campioni del produttore P4, mentre i campioni dei produttori P1, P2 e P5 hanno mostrato valori intermedi.

3.4. Conte vitali

I risultati delle conte vitali in piastra dei campioni di salami croati sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10. Conte vitali dei salami croati.

	Presunti lattobacilli	Cocchi coagulasi- negativi	Lieviti	Enterobacteriaceae
P1S1	$8,38 \pm 0,13^a$	$2,63 \pm 0,21$	$<1^b$	<1
P1S2	$7,61 \pm 0,00^b$	$3,00 \pm 0,00$	$3,80 \pm 0,00^a$	<1
Media P1	$8,00 \pm 0,45$	$2,81 \pm 0,25^A$	$1,90 \pm 0,50^B$	<1
P2S1	$8,21 \pm 0,00^a$	$2,15 \pm 0,21^a$	$<1^b$	<1
P2S2	$7,12 \pm 0,00^b$	$<1^b$	$7,16 \pm 0,07^a$	<1
Media P2	$7,66 \pm 0,63$	$1,08 \pm 0,21^B$	$3,58 \pm 0,10^A$	<1
P3S1	$6,84 \pm 0,07^b$	$<1^b$	$4,23 \pm 0,04^a$	<1
P3S2	$8,57 \pm 0,00^a$	$2,74 \pm 0,06^a$	$2,66 \pm 0,00^b$	<1
Media P3	$7,71 \pm 1,00$	$1,37 \pm 0,06^B$	$3,45 \pm 0,90^A$	<1
P4S1	$7,76 \pm 0,10^b$	$2,45 \pm 0,21^a$	$3,50 \pm 0,03^a$	<1
P4S2	$8,45 \pm 0,15^a$	$<1^b$	$2,34 \pm 0,00^b$	<1
Media P4	$8,10 \pm 0,41$	$1,23 \pm 0,21^B$	$2,92 \pm 0,67^{A,B}$	<1

P5S1	7,69±0,01	2,54±0,34	2,79±0,00	<1
P5S2	7,82±0,05	2,71±0,57	2,88±0,00	<1
Media P5	7,75±0,08	2,62±0,40 ^A	2,83±0,06 ^{A,B}	<1

I risultati sono espressi come media del Log ufc/g ± deviazione standard. Le lettere in minuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra campioni dello stesso produttore. Le lettere in maiuscolo in apice indicano differenze statisticamente significative tra diversi produttori (p<0,05).

Nel complesso, le analisi microbiologiche condotte hanno evidenziato la presenza di una comunità microbica attiva, composta principalmente da presunti lattobacilli, seguiti da cocchi coagulasi-negativi ed eumiceti, mentre non è stata riscontrata la presenza di batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Per quanto riguarda i presunti lattobacilli, sono stati rilevati valori compresi tra 6,84±0,07 (P3S1) e 8,57±0,00 (P3S2) log ufc/g. Ad eccezione del produttore P5, sono emerse differenze statisticamente significative tra i campioni provenienti dallo stesso produttore, mentre non sono state rilevate differenze significative tra i campioni provenienti da diversi produttori.

Per quanto riguarda i cocchi coagulasi-negativi, la carica più alta è stata riscontrata nel campione P1S2 (3 log ufc/g). Ad eccezione dei campioni provenienti dai produttori P1 e P5, è stata osservata una notevole variabilità tra campioni provenienti dallo stesso produttore.

Anche i lieviti hanno mostrato una notevole variabilità tra i campioni, con valori compresi tra <1 (P1S1 e P2S1) e 7,16±0,07 (P2S2) log ufc/g. Ad eccezione dei campioni provenienti dal produttore P5, sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra campioni provenienti dallo stesso produttore. Per quanto riguarda il confronto tra diversi produttori, i campioni provenienti dai produttori P2 e P3 hanno mostrato le cariche più elevate (3,58±0,10 e 3,45±0,90 log ufc/g, rispettivamente), mentre i campioni provenienti dal produttore P1 hanno mostrato la carica di lieviti più bassa (1,90±0,50 log ufc/g). In nessun campione sono state rilevate muffe (<1 log ufc/g).

Confrontando questi risultati con lo studio di Barbieri et al. (2021) , in cui gli autori hanno raccolto dati da salumi fermentati provenienti da diverse nazioni (Italia, Slovenia, Spagna e Croazia), il livello medio dei presunti lattobacilli nei campioni analizzati (7,84±0,21 log ufc/g) è risultato simile a quello del *Salchicòn Olvera*, un salame spagnolo con valori di 7,78±0,14 log ufc/g, ma inferiore rispetto ai campioni croati, in cui sono stati riscontrati valori superiori a 8,4 log ufc/g.

Il valore medio dei cocchi coagulasi-negativi ($3,87 \pm 0,21$ log ufc/g) è risultato superiore rispetto a quelli di alcuni salami provenienti dalla Slovenia e dalla Spagna, allineandosi con il salchicón Alhendín spagnolo ($3,65 \pm 0,22$ log ufc/g), ma inferiore rispetto ai salami italiani e croati, i quali registrano valori superiori a 5 log ufc/g (Barbieri et al., 2021).

La carica di eumiceti, pari a $3,80 \pm 0,14$ log ufc/g, è risultata in linea con la maggior parte dei campioni analizzati da Barbieri et al. (2021), in particolare con quelli croati.

Per quanto riguarda le Enterobacteriaceae, tutti i campioni analizzati da Barbieri et al. (2021), eccetto quelli croati, hanno mostrato valori inferiori a 1 log ufc/g, analogamente ai campioni analizzati in questa tesi. I salami croati analizzati da Barbieri et al. (2021), invece, hanno mostrato valori significativamente più elevati, compresi tra $2,71 \pm 0,82$ e $5,12 \pm 0,49$ log ufc/g.

3.5. Identificazione e caratterizzazione di batteri lattici

I risultati dell'identificazione e caratterizzazione dei batteri lattici isolati dai salami croati sono riportati nella Tabella 11.

Tabella 11. Identificazione e caratterizzazione degli isolati.

Produttore	Codice	Specie	<i>hdcA</i>	EPS	
				Saccarosio-dipendenti	Saccarosio-indipendenti
P1	P1a	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P1b	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	M	-
	P1c	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P1d	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P1e	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P1f	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
P2	P2a	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	M	-
	P2b	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P2c	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P2d	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
P3	P3a	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P3b	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P3c	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	M	-
	P3d	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	M	-
	P3e	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P3f	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
P4	P4a	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P4b	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-

	P4c	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P4d	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P4e	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P4f	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P4g	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
P5	P5a	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-
	P5b	<i>Latilactobacillus sakei</i>	-	-	-

Dai campioni analizzati sono stati isolati 25 ceppi di *Latilactobacillus sakei*.

L. sakei è una specie appartenente al gruppo dei batteri lattici altamente adattata all'ambiente "carne", dove cresce rapidamente, competendo con altre specie comuni nel microbiota dei prodotti a base di carne. Questa specie è spesso dominante nelle salsicce fermentate spontaneamente, anche dopo lunghi periodi di stagionatura. In condizioni difficili, *L. sakei* sfrutta l'elevata disponibilità di proteine, la capacità di crescere ad alte concentrazioni di NaCl (fino al 6,5%) e la resistenza allo stress ossidativo. Inoltre, questa specie è capace di crescere a basse temperature (20 °C e inferiori), tipiche della fermentazione e stagionatura delle salsicce di tipo mediterraneo (Amadoro et al., 2015). Grazie a queste caratteristiche, la specie *L. sakei* è riconosciuta come fondamentale nella produzione di salsicce fermentate a livello globale e spesso utilizzata come coltura starter nella produzione industriale (Zagorec & Champomier-Vergès, 2017).

Nessuno degli isolati di *L. sakei* analizzati in questo studio ha mostrato la presenza del gene *hdcA*. Il gene *hdcA* codifica per l'enzima istidina decarbossilasi, responsabile della produzione di istamina a partire dall'istidina. Nei batteri Gram-positivi, i geni responsabili della biosintesi dell'istamina sono solitamente raggruppati in un cluster chiamato *histidine decarboxylase cluster* (HDC), che include i geni *hdcP*, *hdcA* e *hdcB* (Diaz et al., 2016). Le specie *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei/paracasei*, isolate da salsicce fermentate, sono state identificate come produttori di istamina (Ruiz-Capillas et al., 2007). Sebbene non siano stati segnalati casi di intossicazione da istamina correlati alle salsicce fermentate, non è raro che tali prodotti alimentari contengano istamina e altre ammine biogene. I sintomi dell'intossicazione da istamina includono mal di testa, nausea, vomito, diarrea e ipotensione. L'utilizzo di colture starter costituite da specie incapaci di sintetizzare l'enzima istidina-decarbossilasi rappresenta una strategia per prevenire l'accumulo di istamina nei prodotti fermentati (Rampanti et al., 2024).

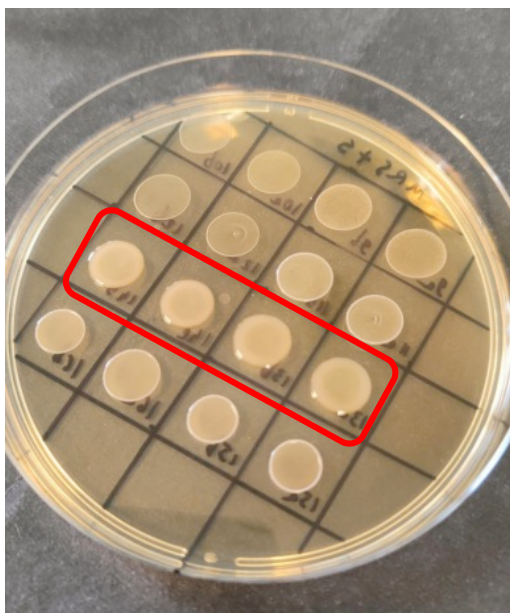


Figura 5. Colonie con aspetto mucoide indicatore di produzione di EPS-saccarosio dipendenti.

Per quanto riguarda la produzione di esopolisaccardi (EPS), nessuno degli isolati analizzati ha mostrato la capacità di produrre EPS saccarosio-indipendenti. Tuttavia, quattro isolati (P1b, P2a, P3c e P3d) hanno mostrato la formazione di colonie mucoide su terreno MRS arricchito con saccarosio (Figura 5), suggerendo una produzione di EPS *in vitro*. Come suggerito da Wang et al. (2019), ceppi di *L. sakei* produttori di EPS possono avere significative applicazioni industriali. Gli EPS sono polimeri naturali che possono migliorare le proprietà morfologiche dei prodotti alimentari, come la consistenza e la viscosità (Wang et al., 2019). In particolare, negli alimenti fermentati, come le salsicce, gli EPS possono influenzare la texture finale del prodotto, migliorandone la struttura e la stabilità durante la conservazione (Hilbig et al., 2019).

CONCLUSIONI

Il presente elaborato di tesi fornisce una prima panoramica delle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche di salumi fermentati tradizionali croati del tipo “*Slavonska kobasica*”.

Complessivamente, dai risultati delle analisi chimico-fisiche, del colore e della texture, sono emerse poche differenze tra i campioni provenienti da cinque diversi produttori locali, relative al pH e all’acidità titolabile, agli indici a^* e b^* (componenti rosso/verde e giallo/blu del colore, rispettivamente) e al parametro *hardness* (durezza) della texture. Tali differenze riflettono la variabilità delle piccole produzioni artigianali, che sono spesso influenzate da specifiche formulazioni e tecnologie di produzione utilizzate. A livello microbiologico, i batteri lattici sono risultati il gruppo microbico più abbondante, seguiti dai cocchi coagulasi-negativi e dai lieviti. Questi risultati sono coerenti con la letteratura scientifica, che sottolinea l’importanza dei LAB e CNC nel processo fermentativo dei salumi, per il miglioramento delle caratteristiche organolettiche e igienico-sanitarie del prodotto finale. Inoltre, l’assenza di Enterobacteriaceae in tutti campioni analizzati rappresenta un indicatore di elevati standard igienici durante la produzione. Complessivamente, i risultati delle conte vitali hanno mostrato una notevole variabilità tra campioni provenienti dallo stesso produttore, suggerendo la possibilità di approfondire ulteriormente queste differenze attraverso tecniche di analisi coltura-indipendenti (*next-generation sequencing*, ngs).

La campagna di isolamento ha permesso di ottenere 25 isolati identificati come *L. sakei*, specie dominante nei salumi fermentati spontaneamente. Tutti gli isolati sono risultati negativi per la presenza del gene *hdcA*, responsabile della produzione di istamina a partire dall’istidina, mentre quattro isolati (P1b, P2a, P3c e P3d) hanno mostrato la potenziale capacità di produrre EPS *in vitro*. Analisi future sulla capacità di acidificazione e la tolleranza a elevate concentrazioni di NaCl potrebbero consentire di identificare ceppi promettenti da impiegare come colture starter selezionate per la produzione di salumi tradizionali.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- Amadoro, C., Rossi, F., Piccirilli, M., & Colavita, G. (2015). Features of *Lactobacillus sakei* isolated from Italian sausages: focus on strains from Ventricina del Vastese. *Italian Journal of Food Safety*, 4(4). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5449>
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., & 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. In *International Food Research Journal* (Vol. 23, Issue 2).
- Barbieri, F., Tabanelli, G., Montanari, C., Dall'osso, N., Šimat, V., Možina, S. S., Baños, A., Özogul, F., Bassi, D., Fontana, C., & Gardini, F. (2021). Mediterranean spontaneously fermented sausages: Spotlight on microbiological and quality features to exploit their bacterial biodiversity. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112691>
- Belleggia, L., Ferrocino, I., Reale, A., Franciosa, I., Milanović, V., Garofalo, C., Cardinali, F., Boscaino, F., Cesaro, C., Rampanti, G., Cocolin, L., Aquilanti, L., & Osimani, A. (2024). Spotlight on autochthonous microbiota, morpho-textural characteristics, and volatilome of a traditional Polish cold-smoked raw sausage. *Food Research International*, 175, 113754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113754>
- Biesalski, H.-K. (2005). Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*, 70(3), 509–524. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.017>
- Campagnol, P. C. B., Santos, B. A. dos, Morgano, M. A., Terra, N. N., & Pollonio, M. A. R. (2011). Application of lysine, taurine, disodium inosinate and disodium guanylate in fermented cooked sausages with 50% replacement of NaCl by KCl. *Meat Science*, 87(3), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.10.018>

- Carballo, J. (2021). *Sausages: Nutrition, Safety, Processing and Quality Improvement*. <https://doi.org/10.3390/foods>
- Diaz, M., del Rio, B., Sanchez-Llana, E., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2016). Histamine-producing *Lactobacillus parabuchneri* strains isolated from grated cheese can form biofilms on stainless steel. *Food Microbiology*, *59*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.012>
- Farris, G.A., 2012 I Salumi. In: Gobbetti, M., Vincenzini, M. a cura di *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Milano: Casa editrice Ambrosiana, pp. 437-452
- Fernández, M., Del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2006). Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: Use in cheese production. *Journal of Dairy Science*, *89*(10), 3763–3769. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72417-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72417-1)
- Hilbig, J., Gisder, J., Prechtel, R. M., Herrmann, K., Weiss, J., & Loeffler, M. (2019). Influence of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria on the spreadability of fat-reduced raw fermented sausages (Teewurst). *Food Hydrocolloids*, *93*, 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.056>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Kaur, R., & Sharma, M. (2019). Cereal polysaccharides as sources of functional ingredient for reformulation of meat products: A review. *Journal of Functional Foods*, *62*, 103527. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103527>
- Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M. J. (2017). The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, *2017*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>
- Lešić, T., Vahcic, N., Kos, I., Zadravec, M., Sincic Pulic, B., Bogdanovic, T., Petricevic, S., Listeš, E., Škrivanko, M., & Pleadin, J. (2020). Characterization of traditional croatian household-produced dry-fermented sausages. *Foods*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/foods9080990>
- Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Bellucci, E. R. B., Domínguez, R., da Silva Barretto, A. C., & Lorenzo, J. M. (2021). *Strategies to increase the shelf life of meat and meat products with phenolic compounds* (pp. 171–205). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.008>

- Oliveira, W. A., Rodrigues, A. R. P., Oliveira, F. A., Oliveira, V. S., Laureano-Melo, R., Stutz, E. T. G., Lemos Junior, W. J. F., Paula, B. P., Esmerino, E. A., Corich, V., Giacomini, A., Rodrigues, P., Luchese, R. H., & Guerra, A. F. (2021). Potentially probiotic or postbiotic pre-converted nitrite from celery produced by an axenic culture system with probiotic lacticaseibacilli strain. *Meat Science*, *174*, 108408. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108408>
- Osimani, A., Belleggia, L., Botta, C., Ferrocino, I., Milanović, V., Cardinali, F., Haouet, M. N., Garofalo, C., Mozzon, M., Foligni, R., & Aquilanti, L. (2023). Journey to the morpho-textural traits, microbiota, and volatilome of Ciauscolo PGI salami. *Food Bioscience*, *53*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102582>
- Prpich, N. Z. P., Camprubí, G. E., Cayré, M. E., & Castro, M. P. (2021). Indigenous microbiota to leverage traditional dry sausage production. In *International Journal of Food Science* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6696856>
- Rampanti, G., Nikolovska Nedelkoska, D., Kalevska, T., Stojanovska, T., Harasym, J., Cardinali, F., Orkusz, A., Milanović, V., Garofalo, C., Bonifazi, A., Aquilanti, L., & Osimani, A. (2024). Smoked sausages of bovine meat produced in North Macedonia as a source of pro-technological lactic acid bacteria and coagulase-negative cocci. *Heliyon*, *10*(17), e37548. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37548>
- Rossi, F., Gardini, F., Rizzotti, L., La Gioia, F., Tabanelli, G., & Torriani, S. (2011). Quantitative Analysis of Histidine Decarboxylase Gene (hdcA) Transcription and Histamine Production by *Streptococcus thermophilus* PRI60 under Conditions Relevant to Cheese Making. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(8), 2817–2822. <https://doi.org/10.1128/AEM.02531-10>
- Rossi, F., Tucci, P., Del Matto, I., Marino, L., Amadoro, C., & Colavita, G. (2023). Autochthonous Cultures to Improve Safety and Standardize Quality of Traditional Dry Fermented Meats. In *Microorganisms* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051306>
- Ruiz-Capillas, C., Jiménez Colmenero, F., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, *77*(3), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.027>
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, *70*(3), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>

- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, 26(4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.011>
- Sirini, N., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., Stegmayer, M. Á., Pateiro, M., Pérez-álvarez, J. Á., Sepúlveda, N., Sosa-Morales, M. E., Teixeira, A., Fernández-López, J., Frizzo, L., & Rosmini, M. (2022). Development of Healthier and Functional Dry Fermented Sausages: Present and Future. In *Foods* (Vol. 11, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods11081128>
- Šubarić, D., Jerkovic, I., PROFILE Zvonimir Marijanović, S., Mastanjević, K., Šubarić, D., Jerković, I., Marijanović, Z., & rad, Z. (2010). *Department of Food Technology, Marko Marulić Polytechnics of Knin, Petra Krešimira IV* 30. <https://www.researchgate.net/publication/266091580>
- Talon, R. (2008). *Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.031>
- Toldrá, F. (2006). The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17(4), 164–168. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.08.007>
- Van Reckem, E., Geeraerts, W., Charmpi, C., Van der Veken, D., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2019). Exploring the Link Between the Geographical Origin of European Fermented Foods and the Diversity of Their Bacterial Communities: The Case of Fermented Meats. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02302>
- Wang, B., Song, Q., Zhao, F., Zhang, L., Han, Y., & Zhou, Z. (2019). Isolation and characterization of dextran produced by *Lactobacillus sakei* L3 from Hubei sausage. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115111. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115111>
- Wegh, C. A. M., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., & Belzer, C. (2019). Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>
- Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M.-C. (2017). *Lactobacillus sakei*: A Starter for Sausage Fermentation, a Protective Culture for Meat Products. *Microorganisms*, 5(3), 56. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030056>
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.018>

