



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**COCCHI COAGULASI-NEGATIVI E LORO
APPLICAZIONE ALLA PRODUZIONE DI
PRODOTTI CARNEI FERMENTATI**

COAGULASE-NEGATIVE COCCI AND THEIR APPLICATION IN
THE PRODUCTION OF FERMENTED MEAT PRODUCTS

TIPO TESI: COMPILATIVA

Studente:
ALESSANDRO BORRACCINO

Relatore:
PROF.SSA LUCIA AQUILANTI

Correlatore:
DOTT.SSA GIORGIA RAMPANTI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

A nonna Sabina.

INDICE

ELENCO DELLE FIGURE.....	5
1. INTRODUZIONE	6
2. INSACCATI FERMENTATI: CARATTERISTICHE PRINCIPALI, PROCESSO PRODUTTIVO E MICROBIOTA CARATTERIZZANTE	7
2.1 Fermentazione	7
2.1.1 Fermentazione come metodo di conservazione degli insaccati.....	9
2.2 Processo produttivo degli insaccati fermentati e fasi caratterizzanti	10
2.3 Microbiota degli insaccati fermentati.....	15
2.3.1 Microrganismi alterativi e patogeni.....	16
2.3.2 Microrganismi tecnologici	23
2.4 Colture starter e loro impiego nella produzione di insaccati fermentati	33
3. COCCHI COAGULASI-NEGATIVI: CARATTERISTICHE E PRINCIPALI ATTIVITÀ DI INTERESSE TECNOLOGICO SVOLTE DURANTE LA MATURAZIONE DEGLI INSACCATI FERMENTATI	35
3.1 Classificazione e habitat.....	35
3.2 Principali specie di interesse nella produzione di insaccati fermentati ..	37
3.3 Metabolismo principale e vie metaboliche alternative.....	38
3.3.1 Respirazione aerobia.....	38
3.3.2 Respirazione anaerobia.....	39
3.3.3 Metabolismo fermentativo.....	39
3.3.4 Vie metaboliche alternative	40
3.4 Attività nitrato-reduttasica.....	41
3.4.1 Inibizione microrganismi patogeni	41
3.4.2 Fissazione del colore rosso vivo	42
3.5 Attività proteolitica.....	43
3.6 Attività lipolitica.....	44
3.7 Attività catalasica	45
3.8 Produzione di batteriocine.....	46

4. COCCHI COAGULASI-NEGATIVI: POTENZIALI RISCHI PER IL CONSUMATORE.....	48
4.1 Ammine biogene	48
4.1.1 Ammine biogene prodotte da cocchi coagulasi-negativi nei salumi fermentati	50
4.1.2 Meccanismo di produzione.....	51
4.1.3 Effetti tossicologici e legislazione	52
4.2 Antibiotico-resistenza.....	53
4.2.1 Resistenza naturale e resistenza acquisita.....	55
4.2.2 Principali specie antibiotico-resistenti.....	56
5. CONCLUSIONE	58
BIBLIOGRAFIA	60

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Conversione del nitrato in nitrito, generazione NO e formazione nitrosomioglobina	43
Figura 2. 21 batteriocine prodotte dagli stafilococchi.....	46
Figura 3. Ammine biogene: struttura chimica e loro amminoacidi precursori .	52
Figura 4. Esempi di batteri con resistenza intrinseca.....	55
Figura 5. La resistenza agli antibiotici può essere naturale, o acquisita mediante trasferimento genico verticale o orizzontale	56

1. INTRODUZIONE

Gli insaccati fermentati rappresentano un elemento fondamentale della tradizione alimentare italiana, costituendo al contempo un modello biotecnologico semplice ma ingegnoso per la conservazione della carne. Sebbene questi prodotti rispondano alla necessità storica delle popolazioni di trasformare una materia prima altamente deperibile, come la carne fresca, in un prodotto più durevole, il loro valore va ben oltre la sfera gastronomica, abbracciando un ricco patrimonio culturale e umano, tramandato attraverso secoli di tradizioni locali (Farris *et al.*, 2012).

I salami, in particolare, sono il risultato di un processo fermentativo complesso e variegato, che coinvolge un impasto di carne fresca tritata, lardo suino, sale ed eventuali additivi. La qualità igienico-sanitaria e le caratteristiche fisiche e sensoriali del prodotto sono garantite dall'attività biochimica di diversi microrganismi benefici, insieme agli enzimi endogeni della carne, che agiscono durante il processo di fermentazione.

Un gruppo microbico particolarmente rilevante in questo processo è quello dei cocchi coagulasi-negativi. Questi microrganismi, presenti naturalmente nelle carni e talvolta aggiunti come colture starter, svolgono attività fondamentali per la sicurezza del prodotto, contribuendo al suo mantenimento salubre e alla definizione del profilo aromatico e sensoriale. Per questo motivo, vengono considerati microrganismi virtuosi. Tuttavia, nonostante il loro utilizzo diffuso, l'impiego dei cocchi coagulasi-negativi solleva ancora alcune preoccupazioni circa la loro sicurezza alimentare. In effetti, diversi studi hanno evidenziato che alcune specie appartenenti a questo gruppo possono, in determinate circostanze, rappresentare un rischio per la salute del consumatore (Cocolin *et al.*, 2022).

2. INSACCATI FERMENTATI: CARATTERISTICHE PRINCIPALI, PROCESSO PRODUTTIVO E MICROBIOTA CARATTERIZZANTE

2.1 Fermentazione

La fermentazione, dal verbo latino *fervere*, è stata definita da Louis Pasteur come “*la vie sans l’air*”, ovvero la vita senz’aria (Bourdichon *et al.*, 2012). La fermentazione è, infatti, un processo metabolico che si manifesta essenzialmente in assenza di ossigeno (O₂). Tramite tale processo determinati microrganismi sono in grado di produrre energia sotto forma di ATP mediante la degradazione di molecole organiche, come ad esempio il glucosio, in acidi organici, gas e alcoli (Mani, 2018).

Per millenni l’uomo ha utilizzato la tecnica della fermentazione al fine di soddisfare eventuali esigenze di conservazione degli alimenti. Secondo alcune ricostruzioni storiche, già nell’antico Egitto si producevano alimenti fermentati quali pane e birra, mentre in Europa tale tecnica era prevalentemente destinata alla produzione di differenti tipologie di latticini fermentati.

Ad oggi, la fermentazione è diffusa e praticata a livello mondiale, in quanto oltre ad aumentare la *shelf-life* dell’alimento, attraverso tale tecnica si è in grado di ottenere alimenti contraddistinti da un elevato profilo nutrizionale e da caratteristiche organolettiche più gradevoli. Di conseguenza, per soddisfare l’enorme domanda di tali prodotti e, allo stesso tempo, per assicurarne una maggiore sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario, i tradizionali metodi di fermentazione sono stati gradualmente sostituiti, perlomeno a livello industriale, da processi standardizzati. Infatti, la produzione a livello industriale di prodotti

fermentati prevede l'utilizzo di colture starter selezionate che garantiscono una eccellente omogeneità dei prodotti a livello qualitativo. Al contrario, le tecniche tradizionali di fermentazione, anche dette fermentazioni spontanee, sfruttano la flora microbica naturalmente presente nelle matrici alimentari che non garantiscono la stessa ripetibilità nel tempo delle fermentazioni controllate e che portano all'ottenimento di prodotti caratterizzati da picchi di qualità più o meno elevati (Giuffrè e Giuffrè, 2024).

Oltre ad incrementare la *shelf-life* e migliorare la qualità organolettica e nutrizionale dell'alimento, il processo di fermentazione è potenzialmente in grado di inibire la crescita della maggior parte dei microrganismi patogeni. Tale caratteristica è dovuta alla produzione *in situ* di acidi organici e presenta un'importanza fondamentale soprattutto nei paesi in via di sviluppo, in quanto è in grado di assicurare la salubrità dell'alimento anche in assenza di refrigerazione o di altri mezzi di conservazione. Proprio nei paesi in via di sviluppo la fermentazione viene utilizzata anche nella produzione di bevande, in modo particolare nelle aree in cui non è possibile garantire la sicurezza igienico-sanitaria dell'acqua. Attraverso tale tecnologia si diminuisce significativamente il rischio di trasmissione delle cosiddette "*waterborne diseases*", ovvero infezioni causate dall'uso diretto o indiretto di acqua contaminata da microrganismi patogeni (Motarjemi, 2002).

La produzione di acidi organici come l'acido lattico e l'acido acetico o di sostanze come l'alcol etilico e gas, quali ad esempio l'anidride carbonica (CO₂) direttamente all'interno dell'alimento è essenzialmente dovuta alla crescita e al metabolismo di vari microrganismi. Tali microrganismi, come precedentemente accennato, sono in grado di utilizzare i carboidrati presenti nell'alimento come fonte di energia attraverso differenti vie metaboliche producendo come metaboliti primari o secondari le sostanze sopra descritte. La produzione di acido lattico, operata da differenti gruppi batterici attraverso la fermentazione lattica, viene sfruttata prevalentemente dall'industria casearia per la produzione di formaggi, lattici fermentati e yogurt. Per quanto concerne, invece, l'etanolo e l'anidride carbonica, prodotti principali dalla fermentazione alcolica tipica dei lieviti, questi svolgono un ruolo chiave nella produzione di bevande fermentate e lievitati.

2.1.1 Fermentazione come metodo di conservazione degli insaccati

La carne fresca è un alimento notevolmente nutriente e, allo stesso tempo, estremamente deperibile, tanto che la sua conservazione ha rappresentato una grande sfida per le prime civiltà umane. Di conseguenza, nel corso del tempo l'uomo ha sviluppato diverse tecniche di conservazione che includono, fra le prime, l'aggiunta di sale attraverso un processo noto come salagione o salnitrazione e l'essiccazione. Il principale effetto di tali tecniche di trasformazione consiste nella riduzione del valore dell'attività dell'acqua (a_w) e nella conseguente protezione delle carni trasformate dal deterioramento e dallo sviluppo di microrganismi patogeni. Tuttavia, sebbene per alcuni tagli di carne interi la semplice salagione o asciugatura sono sufficienti ad aumentare la conservabilità del prodotto, per le carni macinate così come per i ritagli di carcassa e grasso, caratterizzati da una maggiore instabilità ossidativa e microbica, tali procedure non sono sufficienti. Pertanto, nel corso del tempo, le tecniche di conservazione basate sulla aggiunta di sale e l'essiccamento sono state utilizzate in combinazione a processi di fermentazione, sia per aumentare la conservabilità degli insaccati fermentati sia per conferire agli stessi caratteristiche organolettiche uniche (Leroy *et al.*, 2013)

Fra le varie tipologie di fermentazione esistenti, la più sfruttata in ambito alimentare al fine di aumentare la *shelf-life* degli alimenti è sicuramente la fermentazione lattica. Infatti, il lattato prodotto attraverso tale fermentazione acidifica rapidamente l'impasto carneo creando delle condizioni ambientali di difficile sopravvivenza per i microrganismi patogeni.

Nei lattici fermentati, ad esempio, essendo il latte a tutti gli effetti un substrato altamente deperibile in quanto caratterizzato da un pH pressoché neutro e da una elevata quantità di proteine, vitamine e minerali, una repentina acidificazione al di sotto di un valore di pH pari a 4,5 inibisce fortemente la sopravvivenza e la crescita di microrganismi patogeni. Nel latte, la produzione di acido lattico che ne causa l'acidificazione è favorita dalla presenza di un'ampia quantità di zuccheri fermentescibili, come il lattosio. Come già accennato, analogamente a quanto accade per i lattici fermentati, anche in alcuni prodotti carnei si sfrutta la fermentazione lattica per impedire lo sviluppo di microrganismi patogeni.

Tuttavia, a differenza del latte, la carne contiene pochissimi zuccheri fermentescibili, evidenza questa che limita l'efficacia della fermentazione lattica nel raggiungere un idoneo livello di acidità. Per ovviare a tale problematica, soprattutto nelle produzioni industriali, la fermentazione può essere spinta mediante l'aggiunta di zuccheri durante la fase di impastamento (Nout, 2001). Anche altri interventi messi in atto nei vari passaggi produttivi quali l'insaccatura, la salagione e la stagionatura, possono favorire importantissime trasformazioni microbiologiche, biochimiche, fisiche e sensoriali, che nel loro complesso ostacolano lo sviluppo di microrganismi patogeni e alterativi. L'insaccatura prevede, infatti, l'inserimento dell'impasto carneo all'interno di un involucro, che può essere naturale, come il budello di un animale, o di sintesi. In questo modo si crea già dalle prime fasi di lavorazione un ambiente caratterizzato dall'assenza di ossigeno. Durante la salatura, invece, vengono principalmente aggiunti all'impasto: sale, che diminuisce la quantità di acqua libera per la proliferazione microbica; conservanti, che impediscono lo sviluppo di specifici microrganismi patogeni; e colture starter, inoculate con lo scopo di guidare e controllare il processo di fermentazione. Infine, durante la stagionatura, in una prima fase si pone l'insaccato in condizioni di temperatura e umidità favorevoli all'attività microbica, per poi progredire pian piano verso condizioni ambientali idonee al raggiungimento del grado di umidità desiderato (Leroy *et al.*, 2013). L'acido lattico prodotto durante la stagionatura da parte dei batteri lattici, attraverso l'azione combinata con altri microrganismi come i cocchi coagulasi-negativi, congiuntamente all'aggiunta di sale e additivi (nitrati e nitriti), impedisce lo sviluppo di microrganismi patogeni e favorisce il prolungamento della *shelf-life* (Nout, 2001).

2.2 Processo produttivo degli insaccati fermentati e fasi caratterizzanti

Secondo la Gazzetta Ufficiale (4-10-2005, n. 231, art. 16) “*Si intende per «salame» il prodotto di salumeria, costituito da carni ottenute da muscolatura striata appartenente alla carcassa di suino con aggiunta di sale ed eventualmente di carni di altre specie animali, macinate e miscelate con grasso suino in proporzioni variabili, ed insaccato in budello naturale o artificiale*”.

Nella letteratura scientifica internazionale, gli insaccati fermentati sono, spesso, definiti come una miscela di carne tritata e grasso aggiunti di sale, conservanti (nitrati e/o nitriti), zuccheri e spezie, insaccati in budelli naturali o sintetici e sottoposti a fermentazione ed essiccazione (Hugas *et al.*, 1997).

I tagli magri utilizzati per la produzione di insaccati fermentati possono originare da suino o altri animali (avicoli, ovini, cinghiale), di allevamento o selvatici. Il grasso utilizzato è, invece, sempre di origine suina, in quanto quest'ultimo presenta una composizione in acidi grassi che si presta meglio ai vari processi di trasformazione, conferendo morbidezza e sapore all'impasto carneo (Farris *et al.*, 2012).

La preparazione degli insaccati fermentati a base di carni suine ha inizio con la sezionatura delle mezzene, ossia delle due parti in cui viene tagliata, in senso longitudinale, la carcassa degli animali macellati; a questa segue la selezione dei tagli magri e la rifilatura degli stessi per l'eliminazione di ossa, cartilagini, tessuto connettivo e grasso intermuscolare. Alla rifilatura segue la triturazione che viene condotta o al coltello o attraverso l'utilizzo di tritacarne, dotati di trafile, attraverso le quali è possibile ottenere una carne tritata caratterizzata da una grana più o meno grossolana a seconda della tipologia di impasto che si vuole ottenere (Zambonelli *et al.*, 2001). Alla frazione magra viene poi aggiunta quella grassa, sottoposta anch'essa a triturazione se proveniente dalla gola del suino o a cubettatura se, invece, proveniente dallo strato di grasso localizzato al di sotto della cute dell'animale. Terminata la fase di triturazione si procede alla salagione che, come suggerisce il nome, consiste nell'aggiunta all'impasto di sale (NaCl) e spezie ed eventualmente additivi (nitrati e/o nitriti). Il sale, aggiunto all'impasto in quantità compresa tra il 2,5 e il 4% sul peso dell'impasto, provoca una riduzione del valore di acqua libera. Tale condizione costituisce un primo ostacolo nei confronti della proliferazione di microrganismi indesiderati, in quanto questi ultimi richiedono tendenzialmente valori di acqua libera elevati per la proliferazione. Tra le spezie che possono essere aggiunte all'impasto il pepe nero è sicuramente il più utilizzato, soprattutto nei salumi mediterranei, in forma di grani, spaccato o macinato. Altre spezie ed erbe aromatiche utilizzate per migliorare le qualità organolettiche dei salumi fermentati sono, ad esempio, l'aglio, la paprica, i semi di finocchio e il

peperoncino (Farris *et al.*, 2012). Possono, inoltre, essere aggiunti agenti antiossidanti come l'acido ascorbico e/o zuccheri fermentescibili utili a spingere la fermentazione lattica quali glucosio, saccarosio o lattosio in misura compresa tra lo 0.2 e l'1% sul peso dell'impasto (Zambonelli *et al.*, 2001). Infine, l'impasto carneo può essere aggiunto di colture starter, con la finalità di guidare e controllare la fermentazione e di assicurarne l'esito tecnologico, attraverso una rapida acidificazione dell'impasto e il miglioramento della qualità organolettica e sensoriale del prodotto finito (Leroy *et al.*, 2006).

Alla fase di salagione, segue la fase di insaccatura, nella quale l'impasto carneo viene inserito all'interno di involucri, detti budelli, di origine animale o artificiale, utilizzando insaccatrici che lavorano sottovuoto. L'impiego di budelli naturali, corrispondenti a tratti dell'intestino tenue o crasso di suini, ovini, bovini o equini, fa sì che il salume si caratterizzi per qualità organolettiche particolarmente pronunciate ma allo stesso tempo forme e calibri totalmente differenti (Farris *et al.*, 2012). I budelli di sintesi sono, invece, ottenuti da pelli di animali opportunamente lavorate oppure da polimeri, quali poliammide, cellulosa, o collagene. Il vantaggio di impiegare budelli sintetici caratterizzati da un calibro costante è quello di poter ottenere prodotti dal peso altrettanto costante (Zambonelli *et al.*, 2001). Il calibro dei budelli (siano essi naturali o di sintesi) è un parametro di fondamentale importanza nel processo produttivo dei salumi, in quanto questo, oltre ad influenzare il peso finale del prodotto, è direttamente proporzionale al periodo di stagionatura dello stesso. Proprio in base alla durata del periodo di stagionatura si distinguono salami a breve, media e lunga stagionatura. A livello industriale, quest'ultima fase viene condotta in celle di maturazione dove è possibile regolare temperatura e umidità relativa. La maturazione è suddivisa in tre sottofasi, denominate rispettivamente stufatura, asciugatura e maturazione. La stufatura, di durata variabile compresa tra poche ore fino a qualche giorno, è condotta a temperature (T) attorno ai 20° e umidità relativa (UR) compresa tra 84 e 90%. Durante la stufatura ha inizio la fermentazione operata dai batteri lattici, con un conseguente abbassamento del pH dell'insaccato. L'ambiente acido assieme alla presenza di sale all'interno dell'impasto crea, quindi, sin dalle prime fasi della stagionatura le condizioni necessarie per ostacolare lo sviluppo dei microrganismi

indesiderati. Al termine della stufatura ha inizio l'asciugatura. Questa fase ha una durata di circa dieci giorni ed è condotta a valori di UR compresi tra 80 e 90%; in corrispondenza dell'asciugatura, la fermentazione operata dai batteri lattici porta il pH ad assestarsi attorno a valori finali compresi tra 5 e 5,3. Tali valori, prossimi al punto isoelettrico delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari della carne, favoriscono la coagulazione delle proteine con una conseguente graduale perdita di umidità da parte dell'insaccato e l'acquisizione di peculiari caratteristiche strutturali e reologiche quali una notevole compattezza ed elasticità. Si ha, quindi, la formazione di un gel proteico che determina la struttura del prodotto e che ne favorisce la disidratazione. Inoltre, l'acidificazione dell'impasto favorisce la conversione dei nitriti (NO_2^-) in ossido nitrico (NO) secondo una reazione che prende il nome di reazione di disproporzione dei nitriti. A seguito di tale reazione, l'ossido nitrico appena formatosi reagisce con la mioglobina formando la nitrosomioglobina, pigmento di fondamentale importanza per la stabilizzazione del colore rosso vivo. Terminata l'asciugatura, ha inizio la maturazione, anche detta "stagionatura in senso stretto". Durante questa fase, che si caratterizza per una durata variabile che va da alcuni giorni ad alcuni mesi, in base alla tipologia e al calibro dell'insaccato, T e UR sono gradualmente ridotte fino a valori compresi rispettivamente negli intervalli 65-80% e 10-15° C, al fine di evitare una disidratazione troppo repentina dell'insaccato. La perdita di acqua da parte dell'insaccato deve, infatti, avvenire nel modo più uniforme possibile, onde evitare la formazione di una pellicola superficiale che si origina a seguito di una troppo rapida evaporazione degli strati esterni del salume. Tale pellicola andrebbe a costituire una vera e propria barriera che impedirebbe il completo scambio di umidità con l'ambiente esterno da parte dell'insaccato (Farris *et al.*, 2012).

Generalmente, la maturazione è caratterizzata più che da una evoluzione in senso stretto del microbiota, da numerosi eventi biochimici responsabili dei caratteri aromatici, sensoriali e reologici dell'insaccato, nonché della sicurezza igienico-sanitaria dello stesso. Infatti, durante la stagionatura in senso stretto si verifica un'intensa attività microbica che agisce in parallelo alla azione delle lipasi e proteasi endogene della carne. Ciò è dovuto al fatto che le cellule batteriche, dopo circa 20-30 giorni dal termine dello sviluppo, vanno incontro ad un processo detto

autolisi, che si manifesta mediante il dissolvimento della parete cellulare. Come diretta conseguenza di tale fenomeno, le cellule batteriche rilasciano il loro complesso enzimatico ancora attivo nell'impasto carneo. Tra gli enzimi che influenzano maggiormente la maturazione e che sono di interesse tecnologico per il settore dei salami si evidenziano in modo particolare le proteasi e le lipasi liberate dai batteri lattici e dai micrococchi. Le proteasi di origine microbica affiancano gli enzimi proteolitici presenti nei tessuti animali, come le catepsine, già attivi nella idrolisi delle proteine sarcoplasmatiche della carne. L'azione congiunta degli enzimi endogeni e le proteasi di origine microbica causano la liberazione di composti a minor peso molecolare come peptidi e amminoacidi, con il conseguente miglioramento delle caratteristiche sensoriali dell'insaccato (Zambonelli *et al.*, 2001). Infatti, i piccoli peptidi e gli amminoacidi che si liberano a seguito dell'attività proteolitica sono i diretti precursori di alcuni composti volatili che, nel loro complesso, definiscono il profilo aromatico dell'insaccato. Fra i composti volatili che maggiormente concorrono alla definizione del quadro aromatico del prodotto finale vi sono sicuramente alcune metilaldeidi come il 2,3-metilbutanale e il 2-metilpropanale, derivanti dalla degradazione della leucina, l'isoleucina e la valina, ovvero amminoacidi caratterizzati dalla presenza di una catena laterale ramificata. Allo stesso modo, anche per quanto concerne l'idrolisi della frazione lipidica si ha un'azione combinata delle lipasi endogene della carne e quelle di origine microbica. Più nel dettaglio, gran parte dell'attività lipolitica che si manifesta durante la maturazione può essere attribuita ad alcuni ceppi di micrococchi e stafilococchi, le cui lipasi mostrano una notevole attività nei confronti di monogliceridi, digliceridi e trigliceridi. Le aldeidi, sia sature sia insature, e i metilchetoni che si originano a seguito di tale processo di idrolisi della frazione grassa ricoprono un ruolo fondamentale nella definizione del profilo aromatico e sensoriale dei salumi fermentati (Farris *et al.*, 2012).

Oltre alle attività enzimatiche di origine microbica, un grande contributo al profilo aromatico e sensoriale dei salumi fermentati è determinato dallo sviluppo di muffe sulla superficie del budello, durante la stagionatura. Le muffe svolgono, infatti, una duplice funzione, rispettivamente la deacidificazione e la regolazione dell'umidità dell'insaccato. La deacidificazione è una diretta conseguenza del fatto che il

micelio, penetrando all'interno dell'impasto con le sue ife, non dispone più degli zuccheri inizialmente presenti, ma solo dei prodotti della fermentazione, tra cui l'acido lattico. Le muffe utilizzano il lattato presente nell'impasto carneo, prodotto dai batteri lattici, come fonte di carbonio, determinandone la deplezione e di conseguenza l'innalzamento del pH (Zambonelli *et al.*, 2001). Tale fenomeno avviene in maniera centripeta dall'esterno verso l'interno dell'insaccato, e il raggiungimento di una disacidificazione uniforme al cuore del prodotto coincide con la fine del processo di maturazione (Farris *et al.*, 2012). Per quanto riguarda la regolazione dell'umidità dell'impasto, colonizzando la superficie esterna del budello, le muffe sottraggono acqua, in caso di alta umidità o, al contrario, ne impediscono l'evaporazione in caso di bassa umidità; in tal modo, le muffe mantengono l'umidità del salume ad un livello pressoché costante e prevengono l'eccessiva asciugatura superficiale, essenziale per garantire il distacco del budello dall'impasto al momento del taglio (Zambonelli *et al.*, 2001). Tuttavia, il contributo più importante offerto dalle muffe, almeno sotto il profilo sensoriale, è legato alla loro notevole attività proteolitica e lipolitica. Sono proprio alcuni ceppi di muffe di interesse tecnologico a contribuire in maniera più marcata agli eventi proteolitici e lipolitici che si verificano durante il periodo di maturazione, grazie ad un sistema enzimatico decisamente più complesso rispetto a quello dei batteri lattici e dei micrococchi (Farris *et al.*, 2012).

2.3 Microbiota degli insaccati fermentati

Le carni utilizzate per la preparazione degli insaccati fermentati vengono naturalmente contaminate fin dalle prime fasi di lavorazione delle carcasse (eviscerazione, taglio delle mezzene e sezionatura delle stesse, etc.) da un'ampia gamma di microrganismi, alcuni dei quali di interesse tecnologico e, quindi, utili ai fini della trasformazione, come batteri lattici, cocchi coagulasi-negativi, lieviti e muffe (Farris *et al.*, 2012).

Altri microrganismi contaminanti le carni sono, al contrario, indesiderati, in quanto responsabili del deterioramento del prodotto o di patologie alimentari, quali intossicazioni e infezioni; altri ancora sono semplicemente considerati né utili né

dannosi per la trasformazione o la salute del consumatore (Farris *et al.*, 2012). I principali gruppi di batteri che causano il deterioramento degli alimenti a base di carne includono i generi *Brochotryx*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc* e *Proteus*. Per quanto concerne, invece, i principali microrganismi patogeni che potenzialmente possono contaminare la carne e i prodotti carnei, sono note le specie *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus* (Kaveh *et al.*, 2023).

2.3.1 *Microrganismi alterativi e patogeni*

Le dinamiche microbiche che dovrebbero instaurarsi durante le fasi di fermentazione e maturazione degli insaccati fermentati prevedono, almeno teoricamente, la progressiva scomparsa dei microrganismi alterativi e patogeni e il conseguente sopravvento dei microrganismi di interesse tecnologico. Tuttavia, è ben noto il rischio che microrganismi patogeni o alterativi possano persistere nell'impasto carneo, causando rispettivamente fenomeni di deterioramento e patologie alimentari.

Per quanto concerne i principali fenomeni di deterioramento dei salumi fermentati, questi sono descritti di seguito.

Ammuffimento

Fenomeno che si manifesta durante la fase di maturazione; determinato dallo sviluppo di muffe appartenenti ai generi *Mucor* e *Aspergillus*, spesso in conseguenza di valori di T e UR degli ambienti di maturazione troppo elevati. Inizialmente l'attività metabolica delle muffe sviluppatasi sul budello interessa prevalentemente le porzioni superficiali dell'insaccato, che assume un aspetto viscido e untuoso. Successivamente, il fenomeno può espandersi anche verso gli strati più interni dell'insaccato causando sgradevoli variazioni dei caratteri sensoriali del prodotto, talvolta pregiudicandone il consumo.

Colorazione anomala

Fenomeno facilmente rilevabile ad occhio nudo in quanto questo si manifesta attraverso l'assunzione da parte dell'impasto di una colorazione grigiastrea. Tale difetto è attribuibile ad un processo fermentativo particolarmente lento o a fenomeni enzimatici legati all'azione di ceppi batterici appartenenti ai generi *Bacillus*, *Pseudomonas* ed *Enterococcus*.

Difetto di consistenza

Difetto dovuto alla eccessiva attività proteolitica di ceppi riconducibili ai generi *Pseudomonas* e *Bacillus* o ad una inadeguata acidificazione dell'impasto. In questo caso il salume non presenta i caratteri reologici di compattezza ed elasticità desiderati.

Irrancidimento

Fenomeno che interessa la componente lipidica, legato alla formazione di composti maleodoranti e dal sapore acre. Attribuibile all'attività enzimatica di specie fungine ascritte al genere *Aspergillus* e di ceppi batterici dei generi *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Putrefazione

Fenomeno che determina simultaneamente la comparsa di *off-flavours* e la perdita di consistenza dell'insaccato. Dovuto alla proliferazione di microrganismi putrefattivi riconducibili ai generi *Clostridium*, *Serratia*, *Brochotrix* e *Pseudomonas*.

Rigonfiamento

Difetto caratterizzato dalla formazione di cavità all'interno del prodotto, dovuta alla produzione di CO₂ a seguito dell'attività metabolica di alcuni microrganismi quali enterobatteri, lattobacilli eterofermentanti e lieviti (Farris *et al.*, 2012).

Per quanto concerne i microrganismi patogeni, questi possono essere presenti negli insaccati fermentati, spesso a causa di eventi di contaminazione crociata legati all'uso di attrezzature e/o superfici contaminate o personale coinvolto nelle fasi di lavorazione e/o vendita al dettaglio (Holck *et al.*, 2017). Diversi studi hanno rivelato la presenza di microrganismi patogeni non solo nei prodotti finali, ma anche in varie fasi della produzione, sollevando preoccupazioni sia per i produttori che per le autorità sanitarie. I principali microrganismi patogeni che possono contaminare gli insaccati fermentati sono elencati di seguito.

Escherichia coli

E. coli è una specie di batteri Gram-negativi, di morfologia bastoncellare, parte della flora normale residente del tratto gastro intestinale umano e animale. I ceppi patogeni ascritti alla specie *E. coli* sono raggruppati nei gruppi o patotipi elencati di seguito, sulla base di differenze sierologiche e patologiche:

EHEC – *E. coli* enteroemorragici.

VTEC ovvero STEC- *Escherichia coli* enteroemorragici produttori di verocitotossina (anche detta tossina Shiga-like 1) e tossina Shiga-like 2.

ETEC – *E. coli* enterotossigeni.

EPEC – *E. coli* enteropatogeni.

I ceppi VTEC costituiscono un sottogruppo di ceppi enteroemorragici (EHEC), il cui capostipite è il ceppo O157:7, considerato il sierotipo più noto e pericoloso. I ceppi EHEC provocano gravi infezioni intestinali, che possono presentare sintomi quali diarrea emorragica accompagnata da forti crampi addominali. Nei casi più gravi l'infezione da EHEC può portare alla sindrome emolitico-uremica,

caratterizzata da insufficienza renale acuta e anemia emolitica. Essendo fortemente resistente agli ambienti acidi, il ceppo O157:7 può sopravvivere ai processi di fermentazione che caratterizzano lo schema produttivo degli insaccati fermentati e rappresentano quindi un potenziale rischio per la salute del consumatore. Sono pertanto necessarie strategie efficaci per la riduzione/eliminazione del VTEC lungo tutta la catena "*dal campo alla tavola*" (Holck *et al.*, 2017).

Salmonella spp.

Salmonella è un genere di batteri Gram-negativi, bastoncellari, responsabili di infezioni alimentari dette salmonellosi, ovvero zoonosi che possono essere trasmesse in via diretta o indiretta dagli animali agli esseri umani.

Il genere *Salmonella* comprende due specie: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. I due sierotipi di *S. enterica* più comunemente associati alle infezioni umane sono Enteritidis e Typhimurium. Il sierotipo Enteritidis è associato a uova e pollame, mentre Typhimurium è associato alla carne di maiale e di bovino e può essere, quindi, rinvenuto negli insaccati fermentati. La maggior parte delle salmonellosi si manifesta con febbre, dolori addominali, nausea e talvolta vomito. I sintomi sono, generalmente, lievi e la maggior parte delle infezioni si risolve spontaneamente in pochi giorni, anche se in alcuni soggetti, possono talvolta insorgere complicazioni gravi come setticemia o episodi di eccessiva disidratazione. Gli animali infetti sono la principale fonte di *Salmonella* e la trasmissione agli alimenti avviene attraverso eventi di contaminazione fecale o crociata. Nella letteratura scientifica è documentato il coinvolgimento di salmonelle in diversi focolai legati al consumo di insaccati fermentati. Gli episodi segnalati comprendono prevalentemente salumi prodotti con carne di maiale contaminata dal sierotipo Typhimurium. Come per altri patogeni, anche nel caso del genere *Salmonella* è di fondamentale importanza l'impiego di colture starter per minimizzare il rischio di sviluppo di tali microrganismi (Holck *et al.*, 2017).

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes è un microrganismo Gram-positivo, ubiquitario e agente eziologico della listeriosi, una rara infezione caratterizzata da un alto tasso di mortalità, in particolare nei soggetti vulnerabili come gli anziani e gli immunocompromessi. In questi individui, *L. monocytogenes* può provocare gravi complicazioni come setticemia e meningoencefalite, mentre nelle donne in gravidanza può causare aborto. Si ritiene che la maggior parte delle infezioni causate da questo batterio siano di origine alimentare, in particolare legate al consumo di carne e prodotti a base di carne (ad esempio i salumi) non trattati termicamente, contaminati con cariche pari o superiori a 100 ufc/g. Sebbene *L. monocytogenes* possa contaminare l'impasto carneo durante le fasi iniziali del processo di produzione, la forte acidificazione nonché la riduzione dei valori di acqua libera ($aw \leq 0,90$) legate all'azione dei microrganismi limitano la crescita di questo patogeno nei salumi fermentati (Meloni, 2015; Holck *et al.*, 2017).

Staphylococcus aureus

S. aureus è un batterio Gram-positivo che risiede comunemente sulla cute e sulle mucose degli esseri umani e degli animali. I microrganismi ascritti a questa specie producono un'ampia gamma di enterotossine, che rappresentano una delle principali cause di intossicazione alimentare a livello mondiale; quest'ultima si verifica tipicamente dopo l'ingestione di alimenti contaminati, in particolare prodotti carnei e lattiero-caseari non adeguatamente refrigerati o comunque conservati a temperature permissive, che favoriscono la crescita del batterio e la produzione di tossine.

Questa condizione è dovuta al fatto che *S. aureus* non compete in modo efficace con la microflora autoctona, ma trova un ambiente più favorevole alla sua crescita negli alimenti lavorati, dove la microflora residente antagonista è parzialmente distrutta. Alcuni esempi sono rappresentati dagli alimenti trattati termicamente o da quelli in cui il processo di lavorazione conferisce un vantaggio selettivo a *S. aureus*. Quest'ultimo caso include i salumi stagionati, come il prosciutto crudo, dove lo

sviluppo di *S. aureus* è favorito dalle elevate quantità di sale usate nella fase di salagione, ben tollerate dal patogeno (Holck *et al.*, 2017).

Clostridium botulinum

C. botulinum è un batterio Gram-positivo, anaerobio obbligato che, se presente in un alimento, costituisce una grave minaccia per la salute del consumatore. Ciò è dovuto alla sua capacità di produrre neurotossine estremamente potenti e capaci di formare endospore resistenti a diversi stress (termico, chimico, osmotico, etc). Le neurotossine botuliniche vengono prodotte dalle cellule vegetative in fase attiva di moltiplicazione dopo la germinazione delle spore e, in caso di ingestione dell'alimento contaminato, queste causano un'intossicazione alimentare detta "botulismo alimentare" che si manifesta inizialmente mediante sintomi quali nausea e vomito, seguiti nelle ore successive da problemi alla vista e paralisi flaccida muscolare, con conseguente blocco respiratorio e morte del soggetto. La pericolosità della tossina botulinica è strettamente collegata al suo meccanismo d'azione. Una volta ingerita, quest'ultima si lega ai recettori della membrana cellulare presinaptica, attraversa la membrana mediante endocitosi e agisce esercitando una azione endopeptidasica sulle proteine SNARE localizzate a livello della sinapsi neuromuscolare. Ciò inibisce il rilascio dell'acetilcolina, un neurotrasmettitore che regola le contrazioni muscolari, con il conseguente blocco della trasmissione neuromuscolare e paralisi flaccida (Hellmich *et al.*, 2018). Ad oggi, sono stati descritti quattro gruppi fisiologicamente distinti di *C. botulinum*, tra cui il Gruppo I (proteolitico) e il Gruppo II (non proteolitico) responsabili di quasi tutti i casi di botulismo alimentare. I ceppi di *C. botulinum* appartenenti al Gruppo I producono neurotossine botuliniche di tipo A, B e/o F; la loro crescita è inibita a 10 °C o temperature inferiori, a un pH \leq 4,6, in presenza del 10% di NaCl o a un'attività dell'acqua inferiore a 0,94. I ceppi appartenenti al Gruppo II producono neurotossine botuliniche di tipo B, E e F, e sono in grado di crescere e formare tossine a 3 °C, ma non crescono né producono neurotossine a un pH inferiore a 5, a una concentrazione di NaCl superiore al 5% e a valori di a_w inferiori a 0,97 (Hospital *et al.*, 2016). La combinazione di bassi valori di pH, elevata

concentrazione di sale e bassa attività dell'acqua (a_w), unitamente all'aggiunta di nitrati e nitriti di sodio e potassio all'impasto, fa sì che *C. botulinum* non abbia la possibilità di proliferare e di produrre la tossina botulinica negli insaccati fermentati, garantendo la salubrità del prodotto. Generalmente il rischio legato alla presenza di *C. botulinum* è maggiore nei prodotti non fermentati rispetto a quelli fermentati. (Holck *et al.*, 2017).

Clostridium perfringens

Come *C. botulinum*, anche *C. perfringens* è un microrganismo Gram-positivo, anaerobio e sporigeno in grado di produrre tossine. È un microrganismo ubiquitario in quanto diffuso nel suolo, nei vegetali e nel tratto intestinale dell'uomo e degli animali. I ceppi di *C. perfringens* vengono suddivisi in 5 principali gruppi: A, B, C, D, E sulla base della capacità di produrre 4 principali tipi di tossine: α , β , ϵ e ι . Le tossine prodotte da *C. perfringens* durante la sporulazione del microrganismo sono in grado di causare tossinfezioni raramente mortali e dal decorso rapido. *C. perfringens* cresce generalmente in alimenti ricchi di proteine quali prodotti avicoli e carnei conservati a T superiori a 12°.

Campylobacter jejuni

C. jejuni è un bacillo Gram-negativo, microaerofilo, con morfologia bastoncellare ricurva o a forma di spirale, non-sporigeno, mobile per la presenza di un flagello polare ad uno o entrambi i poli. Agente eziologico di una infezione alimentare nota come campilobatteriosi. Cresce prevalentemente nell'intestino degli animali ed è particolarmente sensibile a particolari condizioni di stress quali temperature inferiori a 30° C, elevata acidità dell'ambiente e bassi valori di a_w e, pertanto, la sua presenza in insaccati fermentati è molto rara.

Bacillus cereus

B. cereus è un batterio Gram-positivo, con morfologia bastoncellare, aerobio facoltativo, sporigeno; causa due tipi di intossicazione alimentare: la malattia emetica e la sindrome diarroica. La fonte primaria di contaminazione da endospore di *B. cereus* è il suolo, attraverso il quale queste ultime possono contaminare svariati alimenti di origine vegetale e, attraverso i mangimi, anche alimenti di origine animale. Le endospore presentano un'elevata abilità di sopravvivenza a condizioni ambientali avverse e possono essere presenti in molti alimenti, anche disidratati, tra cui carne suina e derivati. Il controllo di *B. cereus* viene tendenzialmente attuato mediante l'applicazione di trattamenti termici ad elevate temperature, la riduzione dei valori di a_w o la riduzione del pH fino a valori inferiori a 4,5.

Yersinia enterocolitica

Y. enterocolitica è un batterio Gram-negativo, psicrotrofo, responsabile della yersiniosi, una infezione prevalentemente associata al consumo di carne suina cruda o non adeguatamente cotta e ad altri alimenti di origine animale. Anche per tale patogeno, un adeguato piano di autocontrollo è essenziale per limitare possibili contaminazioni crociate (Farris *et al.*, 2012).

2.3.2 *Microrganismi protecnologici*

Batteri lattici

I batteri lattici fanno parte della flora microbica naturale delle carni fresche e del microbiota intestinale umano. Essi costituiscono un gruppo di batteri che presenta caratteristiche morfologiche, metaboliche e fisiologiche simili. Sono, infatti, Gram-positivi, anaerobi, aerotolleranti, catalasi negativi, asporigeni, con morfologia coccica o bastoncellare. Dalla fermentazione dei carboidrati producono principalmente acido lattico, se omofermentanti, o una miscela di acido lattico, acido acetico e/o etanolo e CO₂, se eterofermentanti. Poiché i batteri lattici non posseggono l'abilità di sintetizzare alcuni elementi fondamentali della catena di

trasporto degli elettroni, come il citocromo, questi non sono in grado di generare energia sotto forma di ATP mediante la formazione di un gradiente protonico (Khalid, 2011). Per tale motivo, ottengono energia dalla fermentazione dei carboidrati, utilizzando fonti di carbonio endogene anziché l'ossigeno come accettori finali di elettroni. Essendo catalasi negativi, in presenza di ossigeno utilizzano l'enzima perossidasi per scindere i composti tossici dell'ossigeno come il perossido di idrogeno (H₂O₂).

I batteri lattici sono microrganismi particolarmente esigenti dal punto di vista nutrizionale, soprattutto per quanto riguarda i fattori di crescita come amminoacidi, vitamine, basi azotate e minerali. Alcune specie sono in grado di produrre peptidi caratterizzati da attività antimicrobica denominati batteriocine che, congiuntamente all'azione di inibizione esercitata mediante l'acidificazione del substrato, contribuiscono notevolmente ad aumentare la qualità igienico-sanitaria del prodotto (Mokoena, 2017).

Negli Stati Uniti i batteri lattici sono riconosciuti come di sicuro impiego dalla *Food and Drug Administration* (FDA) essendo inclusi nella lista dei microrganismi GRAS (*Generally Recognized As Safe*). In Europa, questi hanno ricevuto lo status QPS (*Qualified Presumption of Safety*) dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) (Kaveh *et al.*, 2023).

Nel 1920 il microbiologo danese Sigurd Orla-Jensen utilizzò come caratteri distintivi per una prima classificazione dei batteri lattici la morfologia cellulare, la temperatura ottimale di crescita e i prodotti della fermentazione. In base alle osservazioni di Orla Jensen, i batteri lattici vennero inizialmente suddivisi nei seguenti gruppi: (i) termobatteri, con un *optimum* di temperatura a 40-45°C (corrispondenti agli attuali omofermentanti obbligati, termotrofi); (ii) streptobatteri, cocchi in catenelle con temperatura ottimale di crescita pari a 30°C (corrispondenti agli attuali omofermentanti obbligati mesofili); e beta-batteri, mesofili grandi produttori di gas (corrispondenti agli attuali eterofermentanti).

Tali caratteri sono ancora oggi molto importanti nella moderna classificazione dei batteri lattici (Khalid, 2011). Attualmente il gruppo dei batteri lattici è incluso nel

phylum dei Firmicutes, classe Bacilli, ordine Lactobacillales (Mokoena, 2017). Quest'ultimo include le seguenti famiglie (Zheng *et al.*, 2020).

Lactobacillaceae: comprende i generi *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Pediococcus*, *Schleiferilactobacillus*, *Secundilactobacillus*;

Streptococcaceae: comprende i generi *Streptococcus* e *Lactococcus*;

Enterococcaceae: comprende il genere *Enterococcus*;

Leuconostocaceae: comprende i generi *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella*;

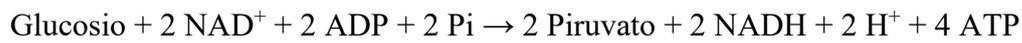
Carnobacteriaceae: comprende il genere *Carnobacterium*.

La famiglia Lactobacillaceae include le specie di maggiore interesse nel processo di fermentazione della carne, ovvero *Lactobacillus sakei* (riclassificato *Latilactobacillus sakei*), *Lactobacillus plantarum* (riclassificato *Lactiplanctibacillus plantarum*) e *Lactobacillus curvatus* (riclassificato *Latilactobacillus curvatus*) (Kaveh *et al.*, 2023). Altre specie frequentemente isolate da insaccati fermentati sono *Lactobacillus casei* (riclassificato *Lacticaseibacillus casei*), *Lactobacillus paracasei* (riclassificato *Lacticaseibacillus paracasei*), *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici* (Rantsiou *et al.*, 2005) (Albano *et al.*, 2007).

I batteri lattici possono metabolizzare zuccheri esosi come il glucosio o zuccheri pentosi come il ribosio, lo xilosio e l'arabinosio. A seconda della tipologia di enzima chiave della fermentazione che partecipa al processo, e quindi, di conseguenza, ai prodotti della fermentazione che ne derivano, i batteri lattici possono essere suddivisi in omofermentanti ed eterofermentanti.

Nella fermentazione omolattica, i batteri lattici utilizzano il glucosio come fonte di carbonio per produrre il piruvato attraverso il processo di glicolisi, per poi

convertirlo ad acido lattico. Il processo di glicolisi è caratterizzato da una serie di reazioni che avvengono in assenza di ossigeno, all'interno del citosol della cellula, attraverso le quali una molecola di glucosio a 6 atomi di carbonio viene degradata in due molecole di piruvato a 3 atomi di carbonio. Durante la glicolisi la cellula spende 2 molecole di ATP e ne produce 4:



Vi è pertanto un guadagno netto di due molecole di ATP.

Il processo di glicolisi può essere schematicamente suddiviso in due fasi principali: una fase di investimento ed una di rendimento energetico. La fase di investimento comprende un totale di cinque reazioni, come dettagliato di seguito.

Il glucosio subisce una prima fosforilazione e viene convertito in glucosio-6-fosfato (G6P); tale reazione è catalizzata dall'enzima esochinasi e prevede l'idrolisi di una molecola di ATP ad ADP con conseguente trasferimento del gruppo fosfato sul carbonio 6 del glucosio.

Il G6P appena formatosi va incontro ad una isomerizzazione ad opera dell'enzima fosfoglucoisomerasi (o glucosio-6-fosfato isomerasi) a formare fruttosio-6-fosfato (F6P).

L'enzima fosfofruttochinasi catalizza una seconda reazione di idrolisi di un ulteriore ATP e di trasferimento del gruppo fosfato liberato sul carbonio 1 del F6P a formare fruttosio 1,6-bisfosfato.

Il fruttosio 1,6-bisfosfato viene scisso in diidrossiacetone fosfato (DHAP) e gliceraldeide-3-fosfato (G3P) ad opera dell'enzima chiave della fermentazione omolattica, l'aldolasi.

L'enzima trioso fosfato isomerasi catalizza una reazione di isomerizzazione del diidrossiacetone fosfato precedentemente formatosi in gliceraldeide-3-fosfato.

Pertanto, al termine della fase di investimento si hanno in totale due molecole di G3P che verranno poi sfruttate nella seconda fase di rendimento energetico che caratterizza il processo di glicolisi.

La fase di rendimento energetico comprende anch'essa un totale di cinque reazioni, che si articolano come di seguito descritto.

La G3P viene fosforilata e ossidata a 1,3-bifosfoglicerato; tale reazione è catalizzata dall'enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, il quale utilizza il cofattore NAD^+ che a seguito della reazione di ossidoriduzione viene ridotto a NADH.

L'1,3-bifosfoglicerato perde un gruppo fosfato grazie all'azione dell'enzima fosfoglicerato chinasi formando il 3-fosfoglicerato. Il gruppo fosfato viene trasferito dalla chinasi ad un ADP formando in questo modo una molecola di ATP, secondo una reazione che viene definita fosforilazione a carico del substrato. In corrispondenza di tale reazione si ha quindi in totale la produzione di due molecole di ATP (una per ciascuna delle due molecole di 1,3-bifosfoglicerato) che bilanciano il consumo energetico delle prime 5 reazioni della fase di investimento.

Il 3-fosfoglicerato viene convertito in 2-fosfoglicerato ad opera dell'enzima fosfoglicerato mutasi.

Il 2-fosfoglicerato subisce la perdita di una molecola d'acqua secondo una reazione di disidratazione catalizzata dall'enzima enolasi, a seguito della quale si ha la conversione del 2-fosfoglicerato in fosfoenolpiruvato (PEP).

Il fosfoenolpiruvato cede il gruppo fosfato ad un ulteriore ADP formando una molecola di ATP e si converte a piruvato, secondo una reazione di fosforilazione a carico del substrato catalizzata dall'enzima piruvato chinasi. In corrispondenza di quest'ultima reazione si ha, quindi, la produzione di due molecole di ATP che rappresentano il guadagno energetico netto dell'intero processo di glicolisi e la formazione del piruvato, intermedio chiave per il processo di fermentazione omolattica (Chaudry *et al.*, 2023).

Il piruvato ottenuto attraverso la glicolisi viene, infatti, poi ridotto ad acido lattico grazie all'azione dell'enzima lattato deidrogenasi; in questo modo viene prodotto lattato come unico prodotto della fermentazione che, pertanto, si definisce omolattica (Wang *et al.*, 2021). È proprio la riduzione del piruvato a lattato e la conseguente ossidazione del cofattore enzimatico NADH a NAD^+ il passaggio vero e proprio che definisce il processo di fermentazione. Il microrganismo attua tale

reazione di ossidoriduzione in quanto, se il NADH formatosi durante la glicolisi non venisse riossidato a NAD^+ , il ciclo non potrebbe ripetersi e di conseguenza la cellula non ricaverebbe più energia sotto forma di ATP mediante tale processo (Chaudry *et al.*, 2023).

Per quanto concerne la fermentazione eterolattica, questa è caratterizzata dalla produzione in rapporto equimolare di: acido lattico, alcol etilico e/o acido acetico e CO_2 . Diversamente dalla fermentazione omolattica, la fermentazione eterolattica non sfrutta il processo di glicolisi per la degradazione del glucosio, bensì una via alternativa che prende il nome di shunt dell'esoso monofosfato o via dei pentoso fosfati (PPP) (Bintsis, 2018). La via dei pentoso fosfati è un processo metabolico attraverso il quale i batteri lattici sono in grado di convertire zuccheri esosi in zuccheri pentosi e di generare NADH. La PPP ha inizio a partire dal glucosio-6-fosfato generato mediante la prima reazione di fosforilazione che caratterizza il processo di glicolisi e presenta due fasi ben distinte, come di seguito descritto.

1) Fase ossidativa

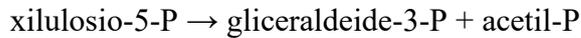
Il G6P viene ossidato dall'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi generando NADH e producendo 6-fosfogluconolattone, il quale viene poi idrolizzato dalla fosfogluconolattasi in 6-fosfogluconato. Il 6-fosfogluconato va incontro, a questo punto, a una reazione di decarbossilazione ossidativa catalizzata dall'enzima 6-fosfogluconato deidrogenasi, in seguito alla quale si ha la produzione di una seconda molecola di NADH e la liberazione di una molecola di CO_2 , con conseguente passaggio da una molecola a 6 atomi di carbonio a una molecola a 5 atomi di carbonio denominata ribulosio-5-fosfato. Il ribulosio-5-fosfato viene infine convertito a ribosio-5-fosfato o xilulosio-5-fosfato.

2) Fase non ossidativa

Questa fase comprende una serie di reazioni reversibili che prevedono la riconversione dei pentosi in esosi e che coinvolgono alcuni intermedi glicolitici come il fruttosio-6-fosfato e la gliceraldeide-3-fosfato (Patra *et al.*, 2014).

Proprio lo xilulosio-5-fosfato prodotto al termine della fase ossidativa della PPP rappresenta l'intermedio fondamentale della fermentazione eterolattica, sul quale

agisce l'enzima chiave fosfochetolasi. Tale enzima catalizza la scissione per via fosforolitica dello xilulosio-5-fosfato in acetil-fosfato e gliceraldeide-3-fosfato (G3P).



La fosfochetolasi ha un'importanza fondamentale in quanto permette di percorrere una variante catabolica della via dei pentoso fosfati, consentendo il metabolismo degli zuccheri nei batteri eterofermentanti (Henard *et al.*, 2015). Come è facilmente intuibile, infatti, la G3P ottenuta mediante la scissione dello xilulosio-5-fosfato viene metabolizzata ad acido lattico seguendo essenzialmente la via omofermentativa (EMP + riduzione del piruvato in lattato) con relativa produzione di due molecole di ATP.

L'acetil fosfato invece, a seconda della presenza o meno di ossigeno nell'ambiente può avere due destini differenti, come di seguito illustrato.

- 1) In condizioni di anaerobiosi l'acetil fosfato si riduce in un primo momento ad acetaldeide, la quale a sua volta si riduce in etanolo. La doppia riduzione è resa necessaria dal fatto che nelle precedenti reazioni sono stati prodotti due NADH, che in questo modo possono essere rigenerati mediante ossidazione a NAD⁺.
- 2) In condizioni di aerobiosi l'acetil fosfato non dovendo provvedere all'ossidazione del NADH (che avviene a carico dell'ossigeno), è convertito in acido acetico permettendo la fosforilazione di una molecola di ADP con produzione di ATP (Bintsis, 2018).

In conclusione, è possibile classificare i batteri lattici in base al metabolismo dei carboidrati nelle classi di seguito descritte.

Batteri lattici omofermentanti obbligati: possiedono l'enzima aldolasi ed effettuano la fermentazione omolattica, utilizzando la via di Embden-Meyerhof-Parnas, con produzione principalmente di lattato come prodotto finale della fermentazione, ad es. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus* (riclassificato *Amylolactobacillus amylophilus*), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus*.

Batteri lattici eterofermentanti obbligati: non possiedono nel loro bagaglio enzimatico l'enzima aldolasi ed effettuano la fermentazione eterolattica, utilizzando la via dei pentoso-fosfati e producendo acido lattico, acido acetico e/o etanolo e CO₂ come prodotti finali della fermentazione, ad es. *Lactobacillus brevis* (riclassificato *Levilactobacillus brevis*), *Lactobacillus fermentum* (riclassificato *Limosilactobacillus fermentum*), e *Lactobacillus reuteri* (riclassificato *Limosilactobacillus reuteri*).

Batteri lattici eterofermentanti facoltativi: possono effettuare entrambe le fermentazioni, metabolizzando gli esosi attraverso la via omofermentativa e i pentosi attraverso la via eterolattica, ad es. *Lactobacillus plantarum* (riclassificato *Lactiplantibacillus plantarum*), *Lactobacillus casei* (riclassificato *Lacticaseibacillus casei*), *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus pentosus* (riclassificato *Lactiplantibacillus pentosus*).

Muffe

Le muffe sono organismi pluricellulari appartenenti al regno dei funghi che presentano come caratteristica peculiare comune quella di possedere un metabolismo strettamente aerobio. Tali microrganismi sono, pertanto, in grado di sviluppare unicamente sulla superficie degli alimenti traendo il nutrimento necessario per la propria crescita attraverso le ife, ovvero strutture filamentose capaci di penetrare all'interno del substrato e che nel loro complesso formano il cosiddetto micelio fungino, ossia l'apparato vegetativo del fungo. Le muffe, pur essendo generalmente considerate microrganismi alteranti a causa della loro attività fortemente proteolitica e lipolitica, possono avere un ruolo fondamentale in alcuni processi produttivi, come quelli dei salumi e dei formaggi. La loro capacità di liberare composti aromatici, che arricchiscono il profilo sensoriale del prodotto finale, e di svolgere funzioni secondarie vantaggiose, le rende essenziali in queste produzioni, dove la loro attività contribuisce positivamente alla qualità del prodotto (Zambonelli *et al.*, 2001). In particolare, per quanto concerne il processo di produzione degli insaccati fermentati le muffe svolgono le seguenti azioni: (i) provocano un innalzamento del pH utilizzando il lattato prodotto dai batteri lattici

attraverso la fermentazione lattica; (ii) esercitano una forte attività proteolitica e lipolitica di fondamentale importanza per la definizione del profilo sensoriale e aromatico del prodotto finito; (iii) partecipano all'assimilazione dei nitrati; (iv) proteggono le molecole lipidiche dall'azione della luce, impedendone l'irrancidimento; (v) regolano gli scambi di umidità tra l'insaccato e l'ambiente esterno.

I ceppi fungini che si riscontrano maggiormente sulla superficie di un salame sottoposto a maturazione spontanea appartengono tendenzialmente al genere *Penicillium*; minore è, invece, la presenza di ceppi appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Mucor*. Relativamente ai ceppi di *Penicillium*, questi sono per lo più ascritti alle specie *P. verrucosum* var. *cyclopium* e *P. crysogenum*, produttrici di un micelio di colore verde. Meno frequente è, invece, la presenza di ceppi riferibili alle specie *P. nalgiovense* e *P. gladioli*, produttori di miceli bianchi. I ceppi di alcune specie appartenenti al genere *Aspergillus*, come *A. candidus* e *A. versicolor*, sono caratterizzati da un elevato grado di xerofilia, il che significa che sono in grado di svilupparsi in ambienti con bassa umidità. Questi ceppi tendono a proliferare nelle fasi più avanzate della maturazione, come evidenziato da Farris *et al.* (2012). Tuttavia, le muffe selezionate e utilizzate come colture starter nella produzione di insaccati fermentati, appartengono esclusivamente al genere *Penicillium*, in quanto queste presentano una maggiore adattabilità alle condizioni ambientali e alle fasi di sviluppo necessarie per ottenere un buon risultato nei prodotti finiti.

Nel contesto commerciale, si tende a preferire specie di muffe con micelio bianco, poiché queste risultano esteticamente più gradevoli rispetto a quelle con micelio verde. Il micelio bianco è spesso percepito dai consumatori come un indicatore di qualità. Tuttavia, è importante sottolineare che, prima ancora del genere di appartenenza e del colore del micelio, il criterio principale per la selezione di un ceppo da utilizzare come coltura starter è la sua capacità di produrre micotossine (Zambonelli *et al.*, 2001).

Le micotossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi filamentosi o muffe, con basso peso molecolare. Questi composti, chimicamente e tossicologicamente eterogenei, possono trovarsi in alimenti e mangimi, rappresentando un grave rischio

per la salute umana e animale. L'esposizione alle micotossine può derivare dal consumo di alimenti contaminati di origine vegetale o animale, come carne e uova, o dall'esposizione ad aria e polvere contenenti tossine. Sebbene l'effetto acuto di queste sostanze possa essere meno comune, l'esposizione cronica può portare a gravi problemi di salute, come danni al fegato, ai reni e aumentare il rischio di patologie oncologiche.

Alcuni degli esempi più rilevanti di micotossine per la salute pubblica includono aflatossine, ocratossine, tricoteceni, zearalenone, fumonisine e tossine tremorgeniche, che possono avere effetti dannosi sul corpo umano. Pertanto, evitare l'utilizzo di muffe produttrici di micotossine nei processi alimentari è cruciale per garantire la sicurezza alimentare (Zain, 2010).

Lieviti

I lieviti sono organismi unicellulari appartenenti al regno dei funghi generalmente presenti in misura esigua negli insaccati fermentati. Le carni, infatti, non rappresentano l'ambiente ideale per lo sviluppo di tali microrganismi. La difficoltà dei lieviti di svilupparsi nelle carni si riflette in maniera ancora più marcata all'interno degli insaccati fermentati, data l'elevata concentrazione di sale presente nell'impasto che inibisce la crescita di gran parte delle specie, fatta eccezione per *Debaryomyces hansenii*, ad oggi la più isolata da tali prodotti (Farris *et al.*, 2012).

Sicuramente meno frequente è la presenza di specie minori appartenenti ai generi *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Rantsiou & Cocolin 2006). Il principale contributo di questi microrganismi alla produzione di insaccati fermentati è collegabile alla loro attività proteolitica e lipolitica, attraverso le quali essi partecipano attivamente alla definizione del profilo sensoriale finale del prodotto. Alcuni autori sostengono, inoltre, che alcuni ceppi di *D. hansenii* siano capaci di concorrere positivamente alla fissazione del colore rosso vivo dell'impasto carneo, senza il necessario coinvolgimento di additivi quali nitrati e nitriti (Farris *et al.*, 2012).

Cocchi coagulasi-negativi

I cocchi coagulasi-negativi sono batteri Gram-positivi, mesofili, alotolleranti, aerobi obbligati o anaerobi facoltativi, che presentano una morfologia cellulare coccica e svolgono diverse funzioni di interesse tecnologico nel processo di produzione degli insaccati fermentati (Zambonelli *et al.*, 2001). I cocchi coagulasi-negativi, infatti, oltre a possedere una forte attività proteolitica e lipolitica in grado di liberare composti aromatici particolarmente gradevoli, posseggono l'enzima nitrato-reduttasi attraverso il quale sono in grado di ridurre i nitrati in nitriti. Tale capacità ha come diretta conseguenza la stabilizzazione del colore rosso vivo dell'impasto carneo mediante la formazione di nitrosomioglobina, caratteristica questa particolarmente gradita al consumatore.

2.4 Colture starter e loro impiego nella produzione di insaccati fermentati

Le colture starter microbiche sono delle formulazioni individuali o miste di ceppi selezionati, di sicuro impiego per la salute del consumatore e in grado di avviare e guidare il processo fermentativo (Laranjo *et al.*, 2017; Zambonelli *et al.*, 2001). I microrganismi più efficienti da utilizzare nella formulazione di colture starter per i prodotti artigianali/locali sono quelli isolati dalla microflora residente o autoctona dei salumi fermentati. Ciò è dovuto al fatto che tali microrganismi sono ben adattati alle condizioni ecologiche, ambientali e di lavorazione, risultando quindi in grado di svilupparsi in maniera più efficace (Cruxen *et al.*, 2019). L'esigenza di produrre e utilizzare le colture starter nasce dal fatto che le fermentazioni spontanee, ossia quelle condotte esclusivamente dai microrganismi naturalmente presenti nelle materie prime, non sono in grado di fornire risultati standardizzati in termini di qualità e sicurezza dell'alimento, non essendo direttamente controllabili. Talvolta negli insaccati ottenuti mediante fermentazione spontanea la popolazione di batteri lattici è particolarmente ridotta e caratterizzata da una scarsa competitività; tali condizioni consentono lo sviluppo di microrganismi alterativi o patogeni che dovrebbero essere al contrario inibiti. Un ulteriore svantaggio rilevabile nelle fermentazioni spontanee è rappresentato dalla frequente presenza di istamina e tiramina, due amine tossiche, la cui origine è attribuibile alle attività metaboliche

di alcuni microrganismi indesiderati (Farris *et al.*, 2012). Di conseguenza, l'impiego di colture di avviamento è diventata una pratica fondamentale per assicurare l'esito favorevole dei processi di fermentazione, in maniera particolare negli impianti di produzione su larga scala. In particolare, l'introduzione delle colture starter è essenziale per ridurre il periodo di stagionatura, garantire lo sviluppo del colore, migliorare il sapore e aumentare la sicurezza del prodotto. D'altro canto, è necessario evidenziare che l'utilizzo di colture starter, il cui scopo principale è quello di ottenere un risultato costante nel tempo, può comportare la perdita di caratteristiche organolettiche peculiari e di possibili picchi di qualità riscontrabili negli insaccati ottenuti mediante fermentazione spontanea (Franciosa *et al.*, 2018). La maggior parte delle colture di avviamento ad oggi disponibili in commercio e utilizzate per la produzione di insaccati fermentati consiste di miscele di batteri lattici (principalmente *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp.) e cocchi coagulasi-negativi (principalmente *Staphylococcus* spp. e *Kocuria* spp.) (Laranjo *et al.*, 2017). I parametri più importanti da valutare nella formulazione di una coltura starter destinata alla preparazione di insaccati fermentati sono stati delineati per la prima volta nel 1974; questi sono brevemente riportati in elenco (Farris *et al.*, 2012): (i) tolleranza e crescita a concentrazioni di sale elevate (6%) e in presenza di 100 ppm di nitrito; (ii) capacità di crescita in un *range* di temperatura compreso tra 15 e 40° C; (iii) nessuna produzione di *off-flavours*; (iv) nessuna produzione di metaboliti tossici; (v) assenza di patogenicità; (vi) intensa riduzione dei nitrati.

Relativamente all'efficienza tecnologica una coltura selezionata deve inoltre: (i) predominare sul microbiota naturale presente nell'impasto carneo; (ii) mostrare una o più attività metaboliche desiderate; (iv) partecipare attivamente ai principali fenomeni biochimici che caratterizzano la maturazione dell'insaccato.

Infine, per quanto concerne l'aspetto economico è opportuno che una coltura starter: (i) possa essere conservata mediante congelamento o liofilizzazione senza mostrare un'eccessiva perdita di attività; (ii) mantenga le principali attività metaboliche per lunghi periodi; (iii) sia di semplice utilizzo e manipolazione.

3.COCCHI COAGULASI-NEGATIVI: CARATTERISTICHE E PRINCIPALI ATTIVITÀ DI INTERESSE TECNOLOGICO SVOLTE DURANTE LA MATURAZIONE DEGLI INSACCATI FERMENTATI

3.1 Classificazione e habitat

I cocchi coagulasi-negativi sono un gruppo di batteri eterogeneo e non tassonomicamente definito, il cui nome connota la morfologia coccica e l'assenza dell'enzima coagulasi nei microrganismi che vi appartengono. Comprende due principali generi di interesse alimentare: *Staphylococcus* e *Kocuria* (precedentemente classificato come *Micrococcus*).

La classificazione attuale del genere *Staphylococcus* è la seguente: phylum: Firmicutes, classe: Bacilli, ordine: Bacillales, famiglia: Staphylococcaceae, genere: *Staphylococcus*.

Il genere *Staphylococcus* comprende 53 specie e 27 sottospecie; di queste, 40 specie e 25 sottospecie includono stafilococchi coagulasi-negativi. Gli stafilococchi sono microrganismi Gram-positivi, anaerobi facoltativi, catalasi-positivi, immobili e asporigeni, caratterizzati da una notevole tolleranza nei confronti di elevate concentrazioni di sale (la maggior parte dei ceppi sopravvive in presenza del 10% di NaCl) e che si presentano come microrganismi dalla morfologia coccica generalmente disposti in gruppi irregolari di cellule a forma di grappolo. Gli stafilococchi vengono classificati come coagulasi-positivi o coagulasi-negativi in base alla loro capacità di produrre l'enzima coagulasi. La produzione di coagulasi è considerata un fattore di virulenza e pertanto gli stafilococchi coagulasi-positivi

come, ad esempio, *Staphylococcus aureus*, sono considerati microrganismi patogeni in quanto capaci di causare infezioni o intossicazioni alimentari. Al contrario, gli stafilococchi coagulasi-negativi non producendo tale enzima, sono generalmente considerati innocui e vengono sfruttati nella produzione di diversi alimenti come formaggi e insaccati fermentati. Ciò nonostante, gli stafilococchi coagulasi-negativi non hanno ancora ottenuto lo status QPS per l'uso in alimenti e mangimi nell'Unione Europea. La maggior parte delle specie del genere *Staphylococcus* fa parte della normale microflora della pelle e delle mucose umane e animali e, di conseguenza, sono presenti anche nelle carni non trasformate e in prodotti derivati, anche nel caso in cui non vengano deliberatamente aggiunti (Heo *et al.*, 2020).

Di seguito la classificazione del genere *Kocuria*: phylum: Actinobacteria, classe: Actinobacteria, ordine: Micrococcales, famiglia: Micrococcaceae, genere: *Kocuria*.

Il genere *Kocuria* comprende attualmente circa 26 specie, fra le quali spiccano *Kocuria varians* e *Kocuria rosea* tra le più rappresentative. Il genere comprende cocci Gram-positivi, aerobi, catalasi-positivi e coagulasi-negativi. Il genere *Kocuria* è stato descritto per la prima volta come *Micrococcus* nel 1995 e successivamente riclassificato come nuovo genere a causa dell'eterogeneità delle varie specie di micrococchi, evidenziata dalle analisi filogenetiche e chemiotassonomiche. Le varie specie del genere *Kocuria* possono essere rinvenute in diversi ambienti, come ad esempio la pelle dei mammiferi, latte e prodotti lattiero-caseari, frutti di mare e prodotti a base di carne fermentata e non fermentata. Seppur tali microrganismi vengano generalmente considerati come commensali, alcune specie hanno in realtà mostrato attività patogena in grado di causare malattie anche gravi come endocarditi, meningiti o infezioni del tratto urinario (Ramos *et al.*, 2021).

Data la grande somiglianza fra i microrganismi appartenenti ai generi sopracitati, la loro identificazione soprattutto negli alimenti potrebbe risultare particolarmente complicata. In generale, la suscettibilità al lisozima e alla bacitracina, insieme alla resistenza alla lisostafina possono essere utilizzate come indicatori utili per la differenziazione fenotipica dei generi *Kocuria* e *Staphylococcus*. Tuttavia, per

identificazioni più accurate sono necessarie tecniche come la spettrometria di massa a desorbimento/ionizzazione laser assistita da matrice e il sequenziamento del gene codificante il 16S rRNA (Ramos *et al.*, 2021).

3.2 Principali specie di interesse nella produzione di insaccati fermentati

Molteplici studi condotti relativamente alle diverse produzioni di salumi in Europa hanno dimostrato come, all'interno del gruppo dei cocchi coagulasi-negativi vi sia una notevole prevalenza di ceppi ascrivibili al genere *Staphylococcus*. Fra questi, in quasi tutte le produzioni europee è possibile evidenziare una netta predominanza della specie *S. xylosum*. Tale supremazia all'interno del gruppo può essere attribuita alla capacità particolarmente pronunciata di tale specie di resistere alle elevate concentrazioni di sale presenti nell'impasto e al buon grado di adattabilità mostrato rispetto alle condizioni ambientali che caratterizzano l'insaccato fermentato (Farris *et al.*, 2012). Le uniche eccezioni sono rappresentate dai salumi fermentati prodotti in Grecia, dove si registra la prevalenza della specie *S. saprophyticus*, e in Francia, dove prevale la specie *S. equorum* con *S. saprophyticus* o *S. succinus* come specie co-dominanti (Aquilanti *et al.*, 2016). Complessivamente, le specie che rappresentano la maggior parte dei ceppi di cocchi coagulasi-negativi isolati dai salumi fermentati sono quattro: *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. succinus* e *S. xylosum* (Heo *et al.*, 2020). La carica di stafilococchi nel prodotto finito raggiunge tendenzialmente valori compresi tra 10^6 e 10^7 ufc/g anche se possono essere registrati valori ancora più elevati soprattutto negli strati immediatamente sottostanti al budello (Cocolin *et al.*, 2022). Nel contesto degli insaccati fermentati, i ceppi appartenenti al genere *Kocuria* sono riscontrabili in misura minore rispetto ad altri microrganismi, come quelli del genere *Staphylococcus*. Questa presenza limitata potrebbe essere dovuta al metabolismo strettamente aerobico di *Kocuria*, che predilige ambienti ricchi di ossigeno. Per questo motivo, i ceppi di *Kocuria* sono più abbondanti nelle fasi iniziali della maturazione, quando l'ossigeno è presente in quantità elevate nell'impasto. Con il passare del tempo, man mano che l'ossigeno residuo diminuisce, si osserva una maggiore prevalenza di specie ascritte al genere *Staphylococcus*, in grado di sopravvivere in condizioni di anaerobiosi.

Tuttavia, è importante notare che in insaccati con un elevato rapporto tra superficie di esposizione e volume, come quelli più sottili o con una maggiore superficie esterna, si registra una permanenza significativa di ceppi di *Kocuria*, in particolare delle specie *K. varians* e *K. kristinae*. Questi ceppi tendono a persistere anche quando le condizioni aerobiche diminuiscono, come sottolineato da Farris *et al.* (2012).

3.3 Metabolismo principale e vie metaboliche alternative

Le specie microbiche appartenenti al genere *Staphylococcus* posseggono un metabolismo di tipo anaerobio facoltativo, mentre le specie del genere *Kocuria* posseggono un metabolismo strettamente aerobio. Nonostante presentino una risposta differente nei confronti dell'ossigeno, entrambe le vie metaboliche condividono come step preliminare la via glicolitica per l'ossidazione del glucosio ad acido piruvico.

Tutti i cocchi coagulasi-negativi, potendo svilupparsi in presenza di ossigeno, posseggono, oltre all'enzima piruvato deidrogenasi, gli enzimi chiave del ciclo di Krebs, o ciclo degli acidi tricarbossilici, in grado di catalizzare la decarbossilazione ossidativa del piruvato ad acetil CoA. I cocchi coagulasi-negativi sono, pertanto, in grado di convertire il piruvato prodotto dalla glicolisi in acetilcoenzima A, il quale viene poi utilizzato come metabolita di partenza nel ciclo degli acidi tricarbossilici. Attraverso le otto reazioni che caratterizzano il ciclo di Krebs, a partire dal CoA vengono prodotti CO₂, ATP e NADH. Il NADH ottenuto, dato il suo potere riducente, viene impiegato nella catena di trasporto degli elettroni con conseguente formazione di un gradiente protonico transmembrana.

3.3.1 Respirazione aerobia

La respirazione aerobia caratterizza l'intera totalità delle specie dei cocchi coagulasi-negativi. Mediante il NADH prodotto nel ciclo degli acidi tricarbossilici si ha la formazione di un gradiente protonico che consente il passaggio degli elettroni all'ossigeno che funge da accettore finale mediante l'utilizzo di

trasportatori che presentano potenziali crescenti di riduzione. Nei cocchi coagulasi-negativi la catena di trasporto degli elettroni include un complesso enzimatico che prende il nome di succinato deidrogenasi, un sistema di menachioni e un minimo di due citocromi.

Tale via metabolica è attiva nei cocchi coagulasi-negativi appartenenti ad entrambi i generi *Staphylococcus* e *Kocuria*. La produzione teorica totale dell'intera catena di reazioni è di 38 molecole di ATP per ciascuna molecola di glucosio ossidata.

3.3.2 Respirazione anaerobia

La respirazione anaerobia è condotta esclusivamente dalle specie di cocchi coagulasi-negativi che presentano l'enzima nitrato-reduttasi all'interno del loro bagaglio enzimatico. In questo caso è il nitrato a fungere da accettore finale di elettroni, e non l'ossigeno. Tendenzialmente il meccanismo di passaggio degli elettroni è il medesimo della respirazione aerobia, fatta eccezione per il citocromo o che viene sostituito dall'enzima nitrato-reduttasi. A seguito di tale processo, che assicura una resa energetica inferiore rispetto alla respirazione aerobia, si ha la produzione di nitrito. Nel caso in cui una specie di cocchi coagulasi-negativi possieda anche l'enzima nitrito-reduttasi, il nitrito prodotto precedentemente verrà poi a sua volta ridotto a monossido di azoto all'interno dell'insaccato, espletando funzioni di fondamentale importanza quale l'inibizione di *Clostridium botulinum* e la formazione del complesso nitrosomioglobina.

3.3.3 Metabolismo fermentativo

In assenza di ossigeno le specie anaerobie facoltative, appartenenti al genere *Staphylococcus*, ottengono energia mediante l'ossidazione del glucosio a piruvato, attraverso la via glicolitica. A tale processo segue poi una fase di ossidazione del NADH con conseguente riduzione del piruvato. Azione che, in presenza di ossigeno, viene condotta dall'enzima piruvato deidrogenasi. Tuttavia, in condizioni di anaerobiosi, il destino del piruvato, in funzione delle specie, può variare a seconda della maggiore o minore affinità rispetto a tre enzimi: la lattato

deidrogenasi NAD^+ -dipendente, la α -aceto lattato sintetasi e la piruvato formato liasi. Generalmente l'affinità più elevata è posseduta dall'enzima lattato deidrogenasi, che permette la riossidazione del NADH in NAD^+ e la formazione di acido lattico, meccanismo analogo a quanto visto per i batteri lattici. Parallelamente al lattato, possono formarsi acido acetico ed etanolo; in ciascuno dei due casi interviene l'enzima piruvato formato liasi che porta alla produzione di acido formico e acetyl CoA. Quest'ultimo può essere convertito prima ad acetaldeide dalla acetaldeide deidrogenasi e successivamente ad etanolo ad opera di un alcool deidrogenasi, sfruttando la riossidazione del NADH a NAD^+ , oppure in acido acetico ad opera dell'enzima fosfo transacetilasi. Nel caso in cui si abbia, invece, l'intervento dell'enzima α -acetolattato sintetasi sul piruvato, quest'ultimo viene convertito in acetolattato che a sua volta va incontro ad una decarbossilazione con formazione di acetoino o butandiolo come prodotti finali, e riossidazione del NADH a NAD^+ (Cocolin *et al.*, 2022).

3.3.4 Vie metaboliche alternative

I cocchi coagulasi-negativi hanno anche la capacità di utilizzare l'arginina come fonte alternativa di energia in substrati poveri di carboidrati, come la carne. Tale amminoacido è particolarmente abbondante nella carne cruda, con una concentrazione di circa 6 mg/100 g. In condizioni anaerobiche o microaerofile, l'arginina viene utilizzata dai batteri come fonte energetica alternativa attraverso il metabolismo dell'arginina (*arginine deiminasi pathway* - ADI). Il ciclo ADI comprende tre reazioni enzimatiche che avvengono nel citosol e che complessivamente catalizzano la conversione di una mole di arginina in una mole di ornitina, producendo una mole di CO_2 , due moli di NH_3 e una mole di ATP. L'utilizzo di tale via metabolica da parte dei cocchi coagulasi-negativi varia considerevolmente sia a livello di specie che di ceppo e risulta piuttosto comune anche in specie di interesse per la produzione di insaccati fermentati come *S. carnosus* (Mainar *et al.*, 2016).

3.4 Attività nitrato-reduttasica

Un'azione di imprescindibile importanza svolta dai cocchi coagulasi-negativi nel processo di produzione degli insaccati fermentati consiste nella riduzione dei nitrati, che vengono addizionati in forma ossidata, in nitriti. Tale attività è resa possibile grazie alla presenza di una reduttasi intracellulare.

3.4.1 Inibizione microrganismi patogeni

Il primo vantaggio della riduzione dei nitrati a nitriti è legato all'aspetto igienico-sanitario del prodotto. I nitriti infatti hanno un'azione inibente nei confronti dei microrganismi patogeni come *Clostridium botulinum* (Farris *et al.*, 2012). Anche se il funzionamento di tale meccanismo non è stato ancora ad oggi completamente chiarito, sembra che l'inibizione si basi su una serie di intermedi di reazione come il monossido di azoto (NO), il triossido di diazoto (N₂O₃), il perossinitrito (ONOO⁻), il diossido di azoto (NO₂) e gli S-nitrosotoli (RSNO). Questi composti agiscono su diverse molecole e strutture bersaglio tramite N-nitrosilazione, S-nitrosilazione, formazione di disolfuri e perossidazione lipidica, compromettendo così le funzioni di enzimi, proteine, pareti cellulari e membrane di tali microrganismi patogeni. Nel caso di *C. botulinum*, si ritiene che l'azione battericida dei complessi nitrosilici miri a proteine ferro-zolfo come la ferredossina o la piruvato reduttasi e idrogenasi, oltre a inattivare gli enzimi aconitasi e ferrochelasi. Si stima che siano necessari circa 80-150 mg di nitrito di sodio per kg di carne per inibire la crescita di microrganismi patogeni. Attualmente, l'utilizzo di nitrato di sodio (E251), nitrato di potassio (E252), nitrito di sodio (E250) e nitrito di potassio (E249) nei prodotti fermentati a base di carne è debitamente regolamentato (Mainar *et al.*, 2016). La legislazione europea, ad esempio, consente l'aggiunta di una quantità massima di nitrato e nitrito pari a 150 mg/kg per ciascuno di tali additivi; per i salumi a lunga stagionatura, è consentito aggiungere un massimo di 250 mg/kg di nitrato, nel caso in cui non siano aggiunti nitriti. Tuttavia, la crescente domanda da parte dei consumatori di prodotti più salutari, assieme alla richiesta da parte di alcuni stati membri dell'UE di adottare regolamenti più restrittivi, potrebbe portare a una revisione futura dei livelli di nitrato e nitrito attualmente consentiti dalla

legislazione europea per la produzione di prodotti a base di carne (Hospital *et al.*, 2016). Tali richieste sono una diretta conseguenza del fatto che l'utilizzo dei nitrati e dei nitriti come additivi alimentari può avere un impatto negativo sulla salute del consumatore, data la loro capacità di formare composti potenzialmente cancerogeni detti nitrosammine, sia direttamente nell'alimento e sia all'interno del corpo umano. Una prima strategia adottata da alcuni trasformatori per ovviare all'aggiunta di sali di nitrito e nitrato è consistita nell'aggiunta all'impasto carneo di estratti da vari vegetali quali spinaci, sedano o bietola, naturalmente ricchi di nitrato. Tale soluzione era finalizzata non tanto a ridurre il rischio di sviluppo di nitrosammine, quanto più a evitare di dichiarare in etichetta l'utilizzo di additivi alimentari. Tuttavia, nel 2018 la Commissione europea ha chiaramente specificato che i già menzionati estratti, evidentemente utilizzati con una chiara e precisa funzione tecnologica, debbano essere obbligatoriamente considerati e dichiarati come additivi alimentari e non come aromatizzanti. Altre strategie utilizzate si basano sull'uso di derivati vegetali, come oli essenziali o derivati di frutta e verdura che, in alcuni casi, possono solo parzialmente sostituire nitrato e nitrito nelle loro funzioni antimicrobiche (Tabanelli *et al.*, 2022).

3.4.2 Fissazione del colore rosso vivo

Il secondo effetto apportato dall'attività nitrato-reduttasica dei cocchi coagulasi-negativi nell'ambito della produzione dei salumi fermentati è di natura estetica e commerciale. Mediante la riduzione dei nitrati in nitriti, infatti, i cocchi coagulasi-negativi favoriscono la fissazione del colore rosso vivo della carne, elemento particolarmente gradito dal consumatore. Tale effetto è reso possibile dalla formazione del complesso nitrosomioglobina, un composto che deriva dall'interazione tra la mioglobina muscolare contenuta nella carne e la molecola altamente reattiva di ossido nitrico (NO) che si genera durante la fase di maturazione. In particolare, il nitrato funge da precursore del nitrito, essendo convertito in questo secondo composto dall'enzima nitrato-reduttasi presente in molte specie di cocchi coagulasi-negativi. In condizioni acide ($\text{pH} < 5.5$), che tipicamente si riscontrano nei salumi fermentati, il nitrito genera NO, il quale

legandosi con la mioglobina forma la nitrosomioglobina, responsabile della fissazione del colore rosso vivo. La formazione di questo complesso impedisce l'ossidazione della mioglobina a metamioglobina, caratterizzata da un colore grigiastro indesiderato (Mainar *et al.*, 2016). Pertanto, è opportuno evidenziare come in questo caso i batteri lattici contribuiscano indirettamente alla fissazione del colore rosso, percepito dal consumatore come un indice di qualità, attraverso l'acidificazione dell'impasto carneo legata alla produzione di lattato (Mainar *et al.*, 2016).

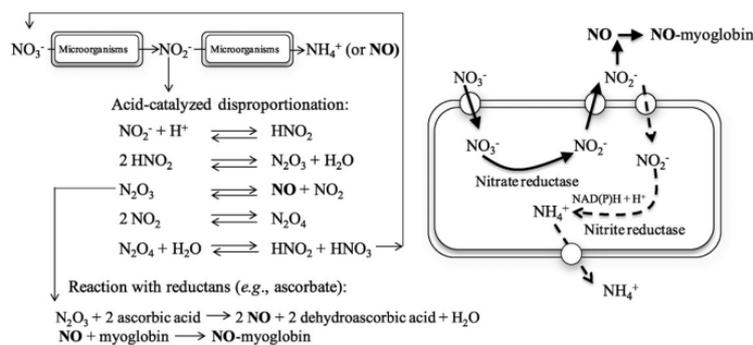


Figura 1. Conversione del nitrato in nitrito, generazione NO e formazione nitrosomioglobina (Mainar *et al.*, 2016).

3.5 Attività proteolitica

La proteolisi, ovvero la progressiva degradazione e demolizione delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari della carne, rappresenta uno dei processi più importanti per la definizione del profilo aromatico dell'insaccato. A seguito dell'idrolisi di tali proteine vengono liberati infatti piccoli peptidi e amminoacidi che fungono da precursori di alcuni composti aromatici di notevole rilevanza. Per diverso tempo l'attività di degradazione delle proteine è stata attribuita solamente all'azione degli enzimi endogeni della carne, specialmente da proteasi quali catepsine e calpaine. Tuttavia, è stato dimostrato come i fenomeni proteolitici che caratterizzano gli insaccati fermentati siano in realtà il risultato della simultanea azione sia degli enzimi endogeni della carne, sia delle proteasi di origine microbica. In modo particolare le proteasi espresse dai cocchi coagulasi-negativi concorrono considerevolmente al rilascio di amminoacidi liberi (Farris *et al.*, 2012). Numerosi

ceppi riferibili sia al genere *Staphylococcus* sia *Kocuria*, oltre a presentare proteasi e peptidasi in grado di scindere proteine e peptidi con conseguente formazione di amminoacidi, sono in grado di esercitare un'azione di deamminazione mediante il distacco del gruppo amminico e di decarbossilazione mediante il distacco del gruppo carbonilico dell'amminoacido. Mediante tali azioni di deamminazione e di decarbossilazione i cocchi coagulasi-negativi sono in grado di convertire gli amminoacidi liberi come, ad esempio, la leucina in composti aromatici quali il 3-metil butanale, il 3-metil butanolo e il 3-metil butanoico (Cocolin *et al.*, 2022). Tali composti sono stati spesso associati al profilo aromatico dei salumi fermentati (Mainar *et al.*, 2016).

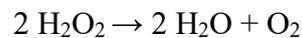
3.6 Attività lipolitica

I fenomeni idrolitici che coinvolgono la frazione lipidica della carne e che si verificano durante la maturazione dell'insaccato delineano e influenzano sensibilmente il profilo sensoriale e aromatico del prodotto finito. La lipolisi consiste essenzialmente nella scomposizione dei trigliceridi e dei fosfolipidi ad opera di enzimi di natura endogena o esogena. Seppur tale attività sia in realtà prevalentemente condotta dagli enzimi endogeni della carne, è stato dimostrato come anche le lipasi espresse dai cocchi coagulasi-negativi possano giocare un ruolo decisivo. Ad oggi, lipasi intracellulari ed extracellulari coinvolte direttamente nell'idrolisi della componente lipidica sono, infatti, state isolate sia da ceppi di micrococchi che di stafilococchi (Farris *et al.*, 2012).

Al termine dell'idrolisi enzimatica della frazione lipidica presente nel muscolo e nei tessuti sottocutanei, costituita principalmente da trigliceridi (circa 85%) e fosfolipidi (15%), gli acidi grassi rilasciati possono essere poi convertiti a seguito di un processo di β -ossidazione a carico dei singoli acidi grassi in metilchetoni come 2-pentanone, 2-esanone e 2-eptanone. Questi ultimi possono essere poi convertiti a loro volta in alcoli secondari ed etil esteri, contribuendo ulteriormente alla definizione del quadro aromatico del prodotto finale (Mainar *et al.*, 2016).

3.7 Attività catalasica

I processi ossidativi che possono verificarsi nei prodotti a base di carne come i salumi fermentati portano alla degradazione di lipidi e proteine, con conseguente deterioramento del colore, del sapore, della consistenza e del valore nutritivo del prodotto finale. Tali processi ossidativi si verificano principalmente a seguito dell'interazione tra le cosiddette specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), come l'ossido nitrico, il radicale ossidrilico e l'anione superossido con i fosfolipidi e le proteine contenuti all'interno dell'insaccato. In particolare, l'ossidazione lipidica porta alla formazione di composti indesiderati quali aldeidi, chetoni, e acidi carbossilici associati allo sviluppo di sapori rancidi. Poiché gli insaccati fermentati sono alimenti particolarmente ricchi di grassi, è fondamentale evitare l'irrancidimento dei lipidi, responsabile della comparsa di *off-flavours* che riducono irrimediabilmente la qualità del prodotto. In tal senso, i cocchi coagulasi-negativi apportano un contributo di fondamentale importanza, grazie alla azione dell'enzima catalasi (Mainar *et al.*, 2016). In corrispondenza della loro fase stazionaria di crescita, tali microrganismi producono catalasi, capace di demolire il perossido di idrogeno prodotto dai lattobacilli; in questo modo, essi impediscono fenomeni di irrancidimento a carico della componente lipidica. La catalasi è un enzima detossificante che, dal punto di vista strutturale, si presenta come una proteina composta da quattro subunità, ognuna delle quali contiene un gruppo eme; l'enzima è in grado di catalizzare la decomposizione del perossido di idrogeno (H₂O₂) in acqua (H₂O) e ossigeno molecolare (O₂), secondo la seguente reazione:



Questa reazione è fondamentale per proteggere le cellule dall'accumulo di perossido di idrogeno, un sottoprodotto di alcuni processi metabolici. La catalasi mitiga, quindi, la tossicità di questo composto scomponendolo in sostanze innocue, ed evitando così possibili fenomeni ossidativi a carico della frazione lipidica (Rasheed, 2024).

3.8 Produzione di batteriocine

Le batteriocine sono proteine o peptidi antibatterici sintetizzati a livello ribosomiale da alcuni batteri in grado di inibire o uccidere altri batteri, in modo particolare quelli strettamente correlati e filogeneticamente vicini, rispetto ai quali i batteri produttori presentano uno specifico meccanismo di immunità. Le batteriocine possono avere uno spettro d'azione più o meno ristretto, verso microrganismi alterativi o patogeni. La naturale capacità antimicrobica di questi peptidi può essere, quindi, ampiamente sfruttata per aumentare la sicurezza e la qualità dei prodotti alimentari (Leroy & De Vuyst, 2010). Attualmente non esiste una classificazione ufficiale delle batteriocine; tendenzialmente quella più utilizzata in ambito scientifico è quella proposta da Klaenhammer nel 1993. Secondo la letteratura scientifica, le batteriocine prodotte dagli stafilococchi sono attualmente 21. La maggior parte di esse sono classificate come batteriocine appartenenti alla classe I, ovvero quella dei cosiddetti lantibiotici; le rimanenti appartengono invece alle classi II (batteriocine peptidiche) e III (batteriocine proteiche).

Species	Class	Bacteriocin	Reference
<i>S. aureus</i>	II	Aureocin A70	Netz et al. (2001)
	II	Aureocin A53	Netz et al. (2002)
	I	Staphylococcin C55 α/β	Navaratna et al. (1998)
<i>S. capitis</i>	III	Ale-1	Sugai et al. (1997)
<i>S. cohnii</i>	I	Staphylococcin T	Furmanek et al. (1999)
<i>S. chromogenes</i>	II	Nukacin L217	Braem et al. (2014)
<i>S. epidermidis</i>	I	Pep5	Sahl & Brandis (1981)
	I	Epidermin	Allgaier et al. (1985)
	II	Epidermicin NI01	Sandiford & Upton (2012)
	I	Epicidin 280	Heidrich et al. (1998)
	I	Epilancin K7	Van De Kamp et al. (1995)
<i>S. equorum</i>	I	Micrococcin P1	Carnio et al. (2000)
<i>S. gallinarum</i>	I	Gallidermin	Kellner et al. (1988)
<i>S. hominis</i>	I	Nukacin KQU-131	Wilapun et al. (2008)
	I	Hominicin	Kim et al. (2010)
<i>S. hyicus</i>	I	Hyicin 3682	Fagundes et al. (2011)
<i>S. simulans</i>	III	Lysostaphin	Schindler & Schuhardt (1964)
	I	Nukacin 3299	Ceotto et al. (2010)
<i>S. warneri</i>	I	Nukacin ISK-1	Sashihara et al. (2000)
	I	Warnericin RB4	Minamikawa et al. (2005)
	I	Warnericin RK	Verdon et al. (2009)

Figura 2. 21 batteriocine prodotte dagli stafilococchi (Mainar *et al.*, 2016).

I lantibiotici sono dei peptidi di piccolissime dimensioni che contengono amminoacidi policiclici non codificati geneticamente, ma che vengono prodotti attraverso modifiche post-traduzionali come la lantionina e la 3-metil-lantionina. I

peptidi appartenenti alla classe II delle batteriocine sono anch'essi di piccole dimensioni ma contengono solamente amminoacidi non sottoposti a modifiche post-traduzionali. Per quanto concerne gli insaccati fermentati, le principali tecniche utilizzate allo scopo di aumentare la conservabilità e la qualità igienico-sanitaria del prodotto sfruttando l'attività antimicrobica delle batteriocine sono due, rispettivamente: (i) l'aggiunta di batteriocine purificate o (ii) la produzione di batteriocine direttamente *in situ*, mediante l'inoculo di colture di avviamento nell'impasto carneo. Nel primo caso la batteriocina viene utilizzata a tutti gli effetti come un additivo alimentare e, pertanto, il suo utilizzo è debitamente regolamentato. Fra le batteriocine quella più utilizzata in forma purificata nei salumi fermentati è sicuramente la nisina, il cui impiego è considerato sicuro da parte della *Food and Drug Administration* statunitense (FDA) e dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). È, tuttavia, opportuno sottolineare che, seppur efficace, la nisina presenta alcuni limiti di applicazione, quali ad esempio il basso grado di solubilità e la tendenza a aderire alle particelle di grasso; tali limiti si traducono, spesso, in una distribuzione disomogenea della batteriocina all'interno del prodotto.

Per quanto concerne, invece, la produzione *in situ* di batteriocine, la maggior parte degli studi ad oggi condotti sull'utilizzo di tale tecnica nei salumi fermentati si è focalizzata sull'inoculo di ceppi di batteri lattici produttori di batteriocine per ridurre il livello di *L. monocytogenes* nel prodotto finito. Molto meno esplorata risulta al contrario l'applicazione dei cocchi coagulasi-negativi produttori di batteriocine.

4.COCCHI COAGULASI-NEGATIVI: POTENZIALI RISCHI PER IL CONSUMATORE

4.1 Ammine biogene

Le ammine biogene sono composti azotati che si formano attraverso la decarbossilazione di specifici amminoacidi o mediante amminazione e transamminazione di aldeidi e chetoni. La struttura chimica delle ammine biogene può essere: alifatica (putrescina, cadaverina, spermina, spermidina), aromatica (tiramina, feniletilamina) o eterociclica (istamina, triptamina). Negli alimenti tali composti azotati possono essere generati dalla decarbossilazione microbica degli amminoacidi. In quasi tutti gli alimenti che contengono proteine o amminoacidi liberi e sono soggetti a condizioni che favoriscono l'attività microbica, è possibile ipotizzare la presenza di ammine biogene. Tuttavia, la quantità totale delle diverse ammine formate dipende fortemente dalla natura dell'alimento e dai microrganismi presenti al suo interno (Silla Santos, 1996). Negli insaccati fermentati, ad esempio, condizioni produttive non ottimali possono determinare livelli particolarmente elevati di ammine biogene (Cocolin *et al.*, 2022). Le elevate quantità di proteine presenti in questi prodotti e l'intensa attività proteolitica durante la fase di maturazione portano al rilascio di grandi quantità di amminoacidi liberi che, attraverso la decarbossilazione operata sia dalle colture starter che dalla microflora residente, fungono da precursori naturali delle ammine biogene (Suzzi e Gardini, 2003). Nei salumi fermentati, i rischi maggiori sono generalmente associati alla formazione di tiramina, prodotta dalla decarbossilazione della tirosina ad opera dei batteri lattici. Questi batteri possono anche produrre la più pericolosa tra le ammine biogene, l'istamina, sebbene sia stato ampiamente dimostrato che i principali produttori di questa ammina siano i batteri Gram-negativi appartenenti alla famiglia Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae. Tali batteri sono anche considerati i

maggiori produttori delle ammine alifatiche, come putrescina e cadaverina. Una caratteristica particolarmente pericolosa delle decarbossilasi è che questi enzimi mantengono la loro attività anche dopo la morte della cellula che li ha prodotti, poiché, in seguito alla lisi cellulare, vengono liberati nel substrato. È quindi di fondamentale importanza che la carne fresca utilizzata per la produzione di insaccati abbia una contaminazione limitata da batteri Gram-negativi, che dovrebbero essere eliminati durante il processo di fermentazione operato dai batteri lattici. Tuttavia, la presenza di ammine biogene nei salumi fermentati è praticamente inevitabile. In generale, livelli di ammine biogene inferiori a 100 mg/kg, e in particolare di istamina al di sotto di 20 mg/kg, sono caratteristici di prodotti di buona qualità (Cocolin *et al.*, 2022). I contenuti e i profili delle ammine biogene negli insaccati possono variare in base a fattori estrinseci e intrinseci, come il pH, la temperatura, gli additivi e le dimensioni del prodotto.

Il pH è un fattore cruciale, poiché le decarbossilasi batteriche mostrano generalmente un'attività ottimale in condizioni di pH acido. La formazione di ammine da parte dei batteri rappresenta un meccanismo fisiologico che, tra le altre funzioni, contribuisce ad aumentare la resistenza dei batteri stessi agli ambienti acidi. Questa osservazione ha suggerito una correlazione tra la produzione di ammine biogene e l'acidificazione indotta dall'attività dei batteri lattici. Tuttavia, è stato dimostrato che una rapida acidificazione dell'impasto carneo può inibire lo sviluppo dei microrganismi produttori di ammine, in particolare quelli appartenenti alla famiglia *Enterobacteriaceae*. Pertanto, è fondamentale che le colture starter selezionate e inoculate nell'impasto carneo siano in grado di condurre il processo di fermentazione in modo rapido ed efficiente.

Inoltre, è evidente che mantenere l'insaccato a una temperatura che favorisca l'azione dei batteri lattici durante la maturazione stimoli l'acidificazione dell'impasto, riducendo così il rischio di sopravvivenza di batteri produttori di ammine biogene. Per quanto riguarda il diametro del budello, è stato osservato che salumi con un diametro maggiore presentano una produzione più elevata di ammine biogene come tiramina e putrescina. Ciò è dovuto al fatto che tali insaccati sono generalmente caratterizzati da minori concentrazioni di sale e valori di a_w più elevati, condizioni che favoriscono una maggiore attività microbica.

Infine, riguardo agli additivi, è ampiamente riconosciuto che l'aggiunta di zuccheri all'impasto carneo stimola lo sviluppo della microflora lattica, contribuendo così a inibire la crescita di batteri con attività decarbossilasica. Infatti, è stata registrata una crescita significativamente inferiore di membri della famiglia *Enterobacteriaceae* nei salumi arricchiti con glucosio e lattosio (10^3 ufc/g), rispetto agli insaccati fermentati senza zuccheri aggiunti (10^5 ufc/g) (Suzzi e Gardini, 2003).

Poiché le attività di decarbossilazione degli amminoacidi sono spesso rilevabili anche nei batteri appartenenti al gruppo dei cocchi coagulasi-negativi, questi potrebbero produrre ammine biogene. Tale attività può risultare vantaggiosa per i batteri, poiché la generazione di una forza protonmotrice può fornire energia metabolica e resistenza allo stress acido. Tuttavia, questi composti esercitano effetti fisiologici negativi per la salute del consumatore e il loro livello deve pertanto essere tenuto sotto stretto controllo (Mainar *et al.*, 2016).

4.1.1 Ammine biogene prodotte da cocchi coagulasi-negativi nei salumi fermentati

Relativamente alle principali specie di cocchi coagulasi-negativi isolate dai salumi fermentati, quali *Sy. carnosus*, *S. equorum*, *S. succinus* e *S. xylosus*, ad oggi differenti ricerche sono state condotte con lo scopo di stabilire l'eventuale coinvolgimento di tali specie nella produzione di ammine biogene.

Diversi studi hanno dimostrato che *S. carnosus* non produce cadaverina, putrescina, triptamina, tiramina o istamina. Tuttavia, alcuni ceppi ascrivibili a tale specie sono in grado di produrre feniletillamina mediante decarbossilazione della fenilalanina, anche se generalmente le quantità di tale ammina biogena risultano inferiori alla concentrazione consentita di 100–200 µg/ml, riportata nel *Codex Alimentarius*. Per quanto concerne *S. equorum*, invece, uno studio condotto sui salumi fermentati prodotti in Basilicata ha evidenziato un'attività di decarbossilazione degli amminoacidi lisina e fenilalanina. Ciò nonostante, un'analisi comparativa eseguita a livello genomico su sei differenti ceppi ascritti a tale specie ha rivelato che, sebbene quest'ultimi presentino geni coinvolti nella produzione di cadaverina,

nessuno di essi è in realtà implicato nella produzione di istamina, putrescina o tiramina. Tali risultati confermano quindi come *S. equorum* possa essere fondamentalmente considerata una specie innocua. Nel caso di *S. succinus* il sequenziamento del genoma di diversi isolati ha evidenziato una totale assenza dei geni necessari per la produzione di istamina, putrescina e tiramina, sebbene sia stato identificato un gene che codifica per l'enzima lisina decarbossilasi, necessario per la produzione di cadaverina. Infine, relativamente a *S. xylosum*, le ammine biogene feniletilammina, putrescina, istamina e triptamina non sono state rilevate in alcuno degli insaccati fermentati prodotti utilizzando tale specie come starter. Infatti, circa l'80% dei ceppi ascritti a *S. xylosum* non presenta alcuna attività di decarbossilazione degli amminoacidi, essenziale per la produzione di ammine biogene (Heo *et al.*, 2020). Relativamente ai cocchi coagulasi-negativi, pertanto, la specie maggiormente associata alla produzione di ammine biogene e, in particolare di feniletilammina, è *S. carnosus* specie fra le più diffuse e isolate negli insaccati fermentati.

4.1.2 Meccanismo di produzione

Le ammine biogene sono composti azotati a basso peso molecolare che si formano attraverso la decarbossilazione di amminoacidi liberi. Tale reazione è catalizzata da decarbossilasi microbiche specifiche per ciascun amminoacido precursore; la decarbossilazione avviene all'interno del citoplasma della cellula microbica.

I microrganismi tendono a produrre ammine biogene, in quanto queste contribuiscono all'approvvigionamento di energia mediante la formazione di forza protonmotrice, se trasportate al di fuori della cellula mediante sistemi antiporto, o attraverso processi di fosforilazione a livello del substrato se prodotte utilizzando vie metaboliche che coinvolgono l'enzima carbammato chinasi. Le ammine biogene, inoltre, favoriscono la regolazione dello stress osmotico e ossidativo della cellula e la resistenza del microrganismo nei confronti dello stress acido (Benkerroum, 2016). Il processo di formazione di questi composti si basa sulla decarbossilazione del gruppo α -carbossilico dell'amminoacido precursore, con conseguente formazione dell'ammina biogena corrispondente (Gao *et al.*, 2023).

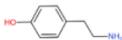
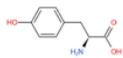
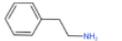
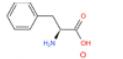
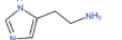
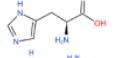
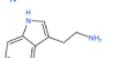
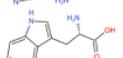
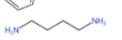
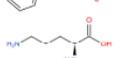
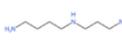
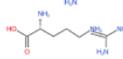
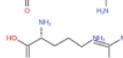
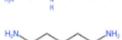
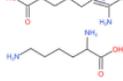
BAs	Molecular formula	Structural formula	Precursors	Molecular formula	Structural formula
Tyramine	C ₈ H ₁₁ NO		Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	
β-phenethylamine	C ₈ H ₁₁ N		Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	
Histamine	C ₅ H ₁₀ N ₃		Histidine	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	
Tryptamine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂		Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	
Putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂		Ornithine	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	
Spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃		Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	
Spermine	C ₁₀ H ₂₆ N ₄		Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	
Cadaverine	C ₅ H ₁₄ N ₂		Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	

Fig. 3. Ammine biogene: struttura chimica e loro amminoacidi precursori (Gao *et al.*, 2023).

Più nel dettaglio, l'enzima che opera la decarbossilazione del gruppo α -amminico è una decarbossilasi piridossalfosfato-dipendente. È stato dimostrato come una stessa decarbossilasi sia in grado di operare il distacco del gruppo carbonilico su diversi analoghi strutturali. La tirosina decarbossilasi posseduta da ceppi ascritti al genere *Staphylococcus*, ad esempio, è capace di decarbossilare sia fenilalanina che tirosina, producendo rispettivamente le ammine fenilettilammina e tiramina, ad eccezione della specie *S. carnosus* per la quale sono stati isolati diversi ceppi capaci di produrre solamente fenilettilammina e non tiramina, suggerendo la presenza di decarbossilasi altamente specifiche in grado di decarbossilare in via esclusiva la fenilalanina (Benkerroum., 2016).

4.1.3 Effetti tossicologici e legislazione

Le ammine biogene possono essere rinvenute in concentrazioni variabili negli insaccati fermentati. Alti livelli di ammine biogene possono ridurre la qualità del prodotto e causare vari sintomi nel consumatore, come nausea, difficoltà respiratorie, mal di testa, sudorazione, palpitazioni cardiache e iper- o ipotensione. L'istamina, la più pericolosa fra le ammine biogene, aumenta la permeabilità vascolare e la vasodilatazione, causando orticaria, arrossamento, ipotensione e cefalea. L'istamina provoca anche la contrazione della muscolatura liscia intestinale, causando crampi addominali, diarrea e vomito. Gli individui sani, tuttavia, presentano un meccanismo di detossificazione altamente funzionale legato

all'azione di amino ossidasi; pertanto, in tali individui, le ammine biogene non rappresentano una grave minaccia se presenti in basse concentrazioni. Negli esseri umani, ad esempio, l'istamina viene degradata dalla diammina ossidasi e dalla istamina-N-metiltransferasi in acido imidazolacetico, il quale viene poi espulso attraverso le urine (Feddern *et al.*, 2019). Tra le ammine biogene, attualmente è regolamentato solo il contenuto di istidina nei prodotti ittici derivanti dai membri delle famiglie Scombridae e Clupeidae. Questo poiché, sebbene sia noto che la presenza di amine biogene negli alimenti rappresenta un rischio significativo per i consumatori, l'assunzione con gli alimenti di una ammina biogena o di una combinazione di ammine in grado di scatenare sintomi clinici non è ancora stata definita con certezza. Tale condizione è legata al fatto che la sensibilità alle ammine biogene varia notevolmente tra gli individui, dipendendo non solo dalla quantità e dalla natura delle ammine, ma anche da altri fattori legati al consumatore finale, come età, genere ed efficacia dell'attività di detossificazione. Sulla base delle informazioni disponibili in letteratura da focolai documentati e report di casi, è possibile però appurare come l'ingestione di 100 mg di istamina da parte di individui sani è generalmente considerata sufficiente a causare sintomi quali arrossamento e cefalea. L'ingestione di oltre 1000 mg è in grado, al contrario, di provocare una grave intossicazione acuta definita come "intossicazione da istamina", simile a un'allergia alimentare (Benkerroum, 2016).

4.2 Antibiotico resistenza

Il termine "antibiotico" deriva dal greco ἀντί ("contro") e βίος ("vita"). Un antibiotico è definito come una "*sostanza prodotta da un microrganismo per attaccare e inibire la crescita di un altro microrganismo*" (Treccani, 2010). L'impiego di antibiotici specifici, ottenuti tramite emisintesi o sintesi chimica completa a partire da prodotti naturali, consente di inibire la crescita di batteri mirati, costituendo una vera e propria terapia antibatterica. Gli antibiotici sono farmaci essenziali nella medicina moderna, poiché grazie al loro uso sono state salvate milioni di vite, ridotta la mortalità infantile e registrato un significativo aumento dell'aspettativa di vita (Blair *et al.*, 2015).

L'antibiotico-resistenza viene definita come “*un fenomeno naturale biologico di adattamento di alcuni microrganismi, che acquisiscono la capacità di sopravvivere o di crescere in presenza di un agente antibatterico, in concentrazione generalmente sufficiente ad inibire o uccidere microrganismi della stessa specie*” (Ministero della Salute, 2020).

Il risultato diretto di questo meccanismo di resistenza è la crescente disponibilità di antibiotici sempre meno efficaci nel trattamento delle infezioni batteriche, che diventano progressivamente più difficili da gestire. L'uso eccessivo di antibiotici, sia negli esseri umani che negli animali, accelera in modo esponenziale questo processo naturale, favorendo la diffusione della resistenza microbica verso tali sostanze (Mancuso *et al.*, 2021). Gli antibiotici, infatti, vengono somministrati anche negli allevamenti animali, in particolare in quelli intensivi, tramite i mangimi. Gli stessi animali possono trasmettere le resistenze agli esseri umani, sia attraverso il consumo di carne, sia mediante l'ingestione di alimenti o acqua contaminata da feci (Reygaert, 2018). La resistenza batterica agli antibiotici era già nota verso la fine degli anni '50, quando la maggior parte degli isolati di *S. aureus* aveva sviluppato resistenza alla penicillina. Tuttavia, per molto tempo, la resistenza agli antibiotici non venne considerata una reale minaccia a livello mondiale. Questo poiché negli anni '60 vennero sviluppate nuove classi di farmaci, come la vancomicina e la meticillina, che sembravano suggerire che il problema della resistenza potesse essere facilmente risolto attraverso la sintesi di nuove molecole. Sfortunatamente, nei decenni successivi, i batteri mostrarono la capacità di sviluppare numerosi e diversi meccanismi di resistenza agli antibiotici, rendendo di fatto tale meccanismo un serio pericolo per la salute pubblica (Mancuso *et al.*, 2021).

È possibile distinguere due differenti tipologie di resistenza agli antibiotici: la resistenza naturale e la resistenza acquisita.

4.2.1 Resistenza naturale e resistenza acquisita

La resistenza naturale agli antibiotici può essere suddivisa a sua volta in resistenza intrinseca e resistenza indotta. La resistenza intrinseca può essere definita come una caratteristica di resistenza completamente naturale verso una determinata classe di antibiotici e universalmente condivisa all'interno di una determinata specie batterica. La peculiarità di tale meccanismo di resistenza è che questo risulta assolutamente indipendente da precedenti esposizioni agli antibiotici e non correlata al trasferimento genico orizzontale. La resistenza indotta, invece, viene così definita in quanto è appunto stimolata dall'attivazione di geni naturalmente presenti all'interno del batterio che vengono espressi solamente in seguito ad esposizione ad un determinato antibiotico (Mancuso *et al.*, 2021).

Organism	Intrinsic resistance
<i>Bacteroides</i> (anaerobes)	aminoglycosides, many β -lactams, quinolones
All gram positives	aztreonam
Enterococci	aminoglycosides, cephalosporins, lincosamides
<i>Listeria monocytogenes</i>	cephalosporins
All gram negatives	glycopeptides, lipopeptides
<i>Escherichia coli</i>	macrolides
<i>Klebsiella</i> spp.	ampicillin
<i>Serratia marcescens</i>	macrolides
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sulfonamides, ampicillin, 1 st and 2 nd generation cephalosporins, chloramphenicol, tetracycline
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	aminoglycosides, β -lactams, carbapenems, quinolones
<i>Acinetobacter</i> spp.	ampicillin, glycopeptides

Figura 4. Esempi di batteri con resistenza intrinseca (Reygaert., 2018).

La resistenza acquisita può, invece, manifestarsi secondo due differenti processi: attraverso trasferimento del DNA o mediante una mutazione che si verifica nel DNA della cellula durante la replicazione; in quest'ultimo caso i batteri sono in grado di trasferire la mutazione alla progenie attraverso trasferimento genico verticale. Il primo meccanismo è basato su un trasferimento genico di tipo orizzontale e racchiude tre differenti tipologie di meccanismo di trasferimento, ossia: trasformazione, trasduzione e coniugazione. Nella trasformazione il batterio ricevente incorpora DNA extracellulare derivante dal batterio donatore; nella trasduzione il DNA del batterio donatore, incapsulato all'interno di un batteriofago, infetta il batterio ricevente; nella coniugazione, il batterio donatore trasferisce DNA al batterio ricevente tramite contatto e trasferimento di plasmidi. Mediante ciascuno

dei tre meccanismi appena descritti i batteri sono in grado di trasferire orizzontalmente geni di resistenza agli antibiotici a batteri non naturalmente resistenti, che diventano così a loro volta resistenti nei confronti di tali farmaci (Mancuso *et al.*, 2021).

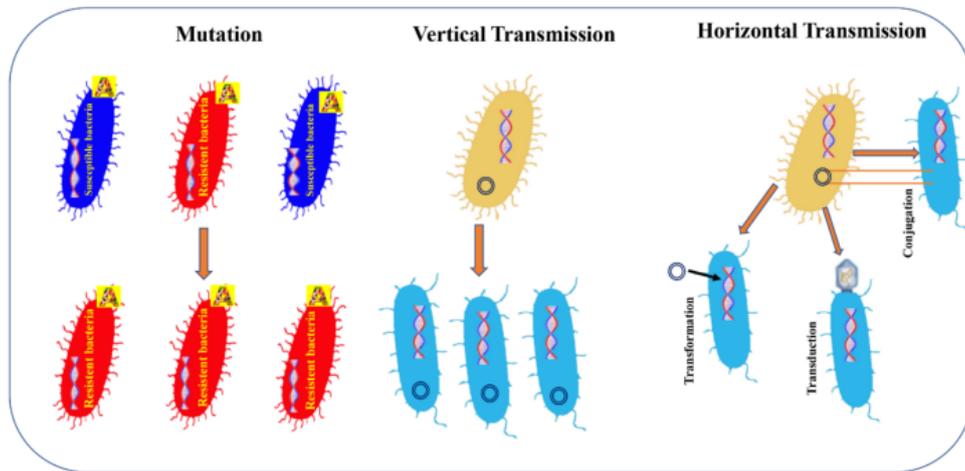


Figura 5. La resistenza batterica agli antibiotici può essere naturale, o acquisita mediante trasferimento genico verticale o orizzontale (Mancuso *et al.*, 2021).

4.2.2 Principali specie antibiotico-resistenti

Come accennato nel paragrafo precedente, i geni che codificano per la resistenza agli antibiotici possono essere localizzati su plasmidi trasferibili, rendendo la resistenza agli antibiotici il principale pericolo nei microrganismi coinvolti nella fermentazione degli alimenti. Anche i microrganismi appartenenti al gruppo dei cocchi coagulasi-negativi, in modo particolare quelli del genere *Staphylococcus* frequentemente isolati da carne fresca o prodotti a base di carne come gli insaccati fermentati, presentano geni di resistenza agli antibiotici, e possono pertanto agire come veicolo di trasferimento per trasmettere tale resistenza al microbiota umano. Gli stafilococchi coinvolti nella fermentazione degli alimenti mostrano frequentemente resistenza nei confronti di antibiotici quali penicillina, eritromicina, tetraciclina e lincomicina. Tra i cocchi coagulasi-negativi, *S. xylosus*, *S. equorum* e *S. carnosus* sono le specie maggiormente segnalate come antibiotico-resistenti; tale incidenza è di particolare interesse in quanto queste tre specie sono tra le più frequentemente isolate negli insaccati fermentati (Mainar *et al.*, 2016). Più nel

dettaglio, ceppi di *Staphylococcus xylosus* isolati da alimenti fermentati a base di carne, hanno mostrato alti livelli di resistenza ad ampicillina, penicillina G e tetraciclina, sebbene raramente sia stato identificato il gene *mecA* responsabile della resistenza alla meticillina. Per quanto riguarda *S. carnosus* invece, nel 2012 Marty dimostrò che, mentre tutti i 21 ceppi di *S. carnosus* provenienti da carni fermentate erano sensibili ad ampicillina, amoxicillina, clindamicina, cloxacillina, eritromicina, acido fusidico, meticillina, oxacillina, penicillina G e tetraciclina, il 14% degli stessi ceppi mostrava invece resistenza a streptomomicina e trimetoprim. Infine, per quanto concerne *Staphylococcus equorum*, uno studio condotto nel 2010 ha analizzato 31 ceppi ascrivibili a tale specie, evidenziando come circa il 20% di questi ultimi risultasse resistente al cloramfenicolo, all'eritromicina e alla tetraciclina. Allo stesso modo un secondo studio condotto nel 2012 su 17 ceppi isolati da carne fermentata, ha riscontrato evidenze simili, indicando una resistenza da parte del 20% di tali ceppi nei confronti di antibiotici quali eritromicina e tetraciclina. Pertanto, all'interno del gruppo dei cocchi coagulasi-negativi diffusi negli alimenti, in particolar modo quelli fermentati, la resistenza agli antibiotici di *S. equorum* sembra essere ineguagliata (Heo *et al.*, 2020). Come facilmente deducibile, la resistenza agli antibiotici è ceppo-dipendente e, a tal proposito, l'EFSA nel 2008 ha dichiarato che solamente i ceppi con resistenza intrinseca o resistenza naturale dovuta a una mutazione dei geni cromosomici, che presentano un basso rischio di trasmissione orizzontale, possono essere utilizzati per la produzione di alimenti (Mainar *et al.*, 2016).

5.CONCLUSIONE

Il presente lavoro di tesi si propone di offrire una visione completa riguardo all'utilizzo dei cocchi coagulasi-negativi nel processo di produzione degli insaccati fermentati, esaminando sia le attività tecnologiche benefiche che quelle che potrebbero avere un impatto negativo sulla salute del consumatore. Nonostante l'importanza primaria di questi microrganismi nella definizione del profilo sensoriale e nel raggiungimento di standard igienico-sanitari adeguati per l'insaccato, il gruppo dei coagulasi-negativi non ha ancora ottenuto lo status di presunta qualificazione di sicurezza (QPS). Tale condizione è principalmente dovuta alla possibilità che alcuni ceppi possiedano la capacità di produrre ammine biogene e di trasmettere orizzontalmente geni di resistenza agli antibiotici. Tuttavia, numerosi studi scientifici hanno dimostrato che le specie di cocchi coagulasi-negativi più frequentemente isolate dagli alimenti mostrano una bassa tendenza alla trasmissione orizzontale di antibiotico-resistenze e una scarsa predisposizione alla produzione di ammine biogene. La specie *S. carnosus*, l'unica in grado di produrre quantità significative di fenilettilammina, non comporta tuttavia rischi significativi per la salute, poiché la concentrazione di tale ammina negli alimenti è bassa e i meccanismi di detossificazione nei soggetti sani sono altamente efficaci.

Nonostante queste preoccupazioni, i cocchi coagulasi-negativi rivestono un ruolo fondamentale nella produzione degli insaccati fermentati. Il loro contributo nell'inibizione di *C. botulinum* (attraverso la naturale capacità di disproporzionamento dei nitriti) è particolarmente rilevante, non solo per motivi di sicurezza alimentare, ma anche per l'effetto favorevole sulla colorazione rosso vivo dell'insaccato, che ha un'importante valenza commerciale. Inoltre, la vasta gamma di attività biochimiche di questi microrganismi è essenziale per sviluppare le caratteristiche organolettiche desiderate negli insaccati.

In conclusione, valutando i rischi potenziali legati all'ingestione e confrontandoli con i benefici derivanti dalla loro capacità di inibire i clostridi e le altre attività tecnologiche vantaggiose, è evidente che, sebbene l'uso deliberato di questi microrganismi come colture di avviamento debba essere regolato per garantire la sicurezza, i cocchi coagulasi-negativi sono imprescindibili per la produzione di insaccati fermentati di alta qualità.

BIBLIOGRAFIA

- 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. *international food research journal*, 23, 429-445.
- Benkerroum N. (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(4), 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- Bintsis T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Chaudhry, R., & Varacallo, M. (2023). Biochemistry, Glycolysis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Cocolin L., Gobbetti M., & Neviani M. (2022). *Microbiologia alimentare applicata*. Casa Editrice Ambrosiana. Distribuzione esclusiva Zanichelli.
- Cruxen, C. E. D. S., Funck, G. D., Haubert, L., Da Silva Dannenberg, G., De Lima Marques, J., Chaves, F. C., Da Silva, W. P., & Fiorentini, Â. M. (2019).

Selection of native bacterial starter culture in the production of fermented meat sausages: Application potential, safety aspects, and emerging technologies. *Food Research International*, 122, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.018>

Farris G.A., Gobetti M., Neviani E. & Vincenzini M. (2012). *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Milano: Casa editrice Ambrosiana.

Feddern, V., Mazzuco, H., Fonseca, F. N., & De Lima, G. J. M. M. (2019). A review on biogenic amines in food and feed: toxicological aspects, impact on health and control measures. *Animal Production Science*, 59(4), 608. <https://doi.org/10.1071/an18076>

Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038>

Gao, X., Li, C., He, R., Zhang, Y., Wang, B., Zhang, Z., & Ho, C. (2023). Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods. *Food Chemistry*, 405, 134911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134911>

Giuffrè, D., & Giuffrè, A. M. (2024). Fermentation Technology and Functional Foods. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 16(1), 8. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1601008>

Hellmich, D., Wartenberg, K. E., Zierz, S., & Mueller, T. J. (2018). Foodborne botulism due to ingestion of home-canned green beans: two case reports. *Journal of medical case reports*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1523-9>

Henard, C. A., Freed, E. F., & Guarnieri, M. T. (2015). Phosphoketolase pathway engineering for carbon-efficient biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.018>

Heo, S., Lee, J., & Jeong, D. (2020). Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods. *Food Science and Biotechnology*, 29(8), 1023–1035. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00789-5>

- Holck, A., Axelsson, L., McLeod, A., Rode, T. M., & Heir, E. (2017). Health and safety considerations of fermented sausages. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2017/9753894>
- Hospital, X. F., Hierro, E., Stringer, S., & Fernández, M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 218, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.009>
- Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59(4), 547–554. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(97\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(97)00005-8)
- Kaveh, S., Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Amiri, M. J., & Conte, F. L. (2023). Bio-Preservation of meat and fermented meat products by lactic acid bacteria strains and their antibacterial metabolites. *Sustainability*, 15(13), 10154. <https://doi.org/10.3390/su151310154>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, V1, N3, pp. 1-13.
- 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>
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2010). Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65, 143-9.
- Leroy, F., Geyzen, A., Janssens, M., De Vuyst, L., & Scholliers, P. (2013). Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.008>
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International journal of food microbiology*, 106(3), 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027>
- Mainar, M. S., Stavropoulou, D. A., & Leroy, F. (2016). Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and

- safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021>
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
- Mani A. (2018). Food Preservation by Fermentation and Fermented food products. *Int. Journal of Academic Research & Dev., 1st special issue 2018*. 51-57.
- Meloni D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages. *Foods (Basel, Switzerland)*, 4(1), 34–50. <https://doi.org/10.3390/foods4010034>
- Mokoena M.P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8):1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Motarjemi Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International journal of food microbiology*, 75(3), 213–229. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00709-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00709-7)
- Nout, M.J. (2001). Fermented foods and their production. In Adams M.R., Nout M.J. *Fermentation and Food Safety*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen Publishers, Inc.
- Patra, K. C., & Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39(8), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.005>
- Ramos, G. L. de P. A., Vigoder, H. C., & Nascimento, J. dos S. (2021). *Kocuria* spp. in Foods: Biotechnological Uses and Risks for Food Safety . *Applied Food Biotechnology*, 8(2), 79–88. <https://doi.org/10.22037/afb.v8i2.30748>
- Rantsiou, K., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.013>
- Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichardt, J., Tóth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G., & Cocolin, L. (2005).

Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, 22(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.05.001>

Rasheed Z. (2024). Therapeutic potentials of catalase: Mechanisms, applications, and future perspectives. *International journal of health sciences*, 18(2), 1–6.

Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29(2–3), 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International journal of food microbiology*, 88(1), 41–54. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00080-1)

Tabanelli, G., Barbieri, F., Soglia, F., Magnani, R., Gardini, G., Petracci, M., Gardini, F., & Montanari, C. (2022). Safety and technological issues of dry fermented sausages produced without nitrate and nitrite. *Food Research International*, 160, 111685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111685>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Zain, M. E. (2010). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Zambonelli C., Tini V., Giudici P., & Grazia L. (2001). *Microbiologia Degli Alimenti Fermentati*. Bologna: Edagricole - Edizioni Agricole della Calderoni s.r.l., 1° edizione.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O’Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus

Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>