



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI
CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

IL MICROBIOTA DI SALAMI A BASE DI CARNE E FEGATO DI SUINO
THE MICROBIOTA OF FERMENTED SAUSAGES
CONTAINING SWINE LIVER AND MEAT

Tipo tesi: sperimentale

Studente:

CAMILLA SARACINO

Relatore:

Prof. ANDREA OSIMANI

Correlatore:

Dott. LUCA BELLEGGIA

Sessione autunnale (dicembre 2024)

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1. Storia ed evoluzione generale degli insaccati	6
1.2. Sviluppo del microbiota nelle carni fermentate attraverso le fasi del processo produttivo	7
1.3. Origine del microbiota degli insaccati fermentati nell'area mediterranea	9
1.4. Il processo produttivo del salame di fegato	11
1.5. Il processo produttivo della Cacholeira (salsiccia di fegato)	13
2. SCOPO DELLA TESI	15
3. MATERIALI E METODI	16
3.1. Campionamento	16
3.2. Analisi chimico-fisiche	16
3.3. Analisi microbiologiche	18
3.4. Terreni di coltura utilizzati	19
3.5. Analisi statistiche	22
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	23
4.1. Interpretazione dati analisi chimico-fisiche	23
4.2. Interpretazione dati analisi microbiologiche	24
5. CONCLUSIONI	27
6. BIBLIOGRAFIA	28

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Composizione del terreno di coltura MRS

Tabella 2. Composizione del terreno di coltura MSA

Tabella 3. Composizione del terreno di coltura SBA

Tabella 4. Composizione del terreno di coltura PAB

Tabella 5. Composizione del terreno di coltura VRBGA

Tabella 6. Composizione del terreno di coltura YPD

Tabella 7. Risultati chimico-fisici di campioni di Cacholeira e Salame di fegato.

Tabella 8. Risultati conte vitali di campioni di Cacholeira e Salame di fegato.

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Salami fermentati originari dell'area del Mediterraneo

Figura 2: Tipici salami di fegato marchigiani

Figura 3: Diagramma di flusso processo produttivo insaccati

Figura 4: Campione di Cacholeira

Figura 5: Etichetta campione Cacholeira C1

Figura 6: Etichetta campione Cacholeira C2

Figura 7: Terreni di coltura in piastre Petri

1. INTRODUZIONE

Per ‘salame’ si intende un insaccato fermentato ottenuto a partire da un impasto di carne e grasso triturati, sale e spezie, addizionato di nitrati e nitriti, facoltativamente aggiunto di ingredienti secondari, tra cui siero di latte e zuccheri, e inserito in budelli naturali o sintetici.

1.1. Storia ed evoluzione generale degli insaccati

La conservazione delle carni, attraverso operazioni quali la salatura, l'essiccamento e, in particolare, la fermentazione, il cui ruolo risulta molto importante nei processi di produzione di numerosi alimenti ai fini delle loro caratteristiche finali microbiologiche e organolettiche, risale all'epoca degli Egizi e dei Sumeri, interessando inoltre i popoli dell'antica Grecia e dell'Impero Romano.

Difatti, tra i reperti storici più celebri, ritroviamo dei resti di salame nella tomba del faraone Ramses III (Pearson & Tauber, 1984), riferimenti alle prelibatezze a base di carne di maiale e di altri insaccati composti da grasso e sangue da parte di Omero in un canto dell'Odissea, o ancora la descrizione di un metodo per la conservazione del prosciutto da parte di Catone Il Censore nel suo celebre testo “De Agricoltura” (Aquilanti et al., 2016).

Per quanto riguarda la tradizione italiana, si ipotizza che gli insaccati fermentati siano di origine etrusca, epoca da cui è poi partita una lunga tradizione che nei secoli successivi ha visto diffondersi nuove figure professionali, capaci di controllare, migliorare o mettere a punto tecniche o operazioni specifiche durante i processi di lavorazione, in modo tale da ottenere come prodotti finali, tipologie di carni fermentate con caratteristiche organolettiche e ricette non sperimentate in passato.

Nonostante quanto detto sui progressi avuti negli anni legati alla trasformazione delle carni, solo dopo il 1600 si registra un importante crescita del settore, per via dell'urbanizzazione e dell'espansione degli allevamenti nelle zone rurali. Infine, intorno al XX secolo, numerose realtà artigianali sono state convertite in vere e proprie industrie alimentari (Farris et al., 2012).

1.2. Sviluppo del microbiota nelle carni fermentate attraverso le fasi del processo produttivo

La carne fresca è un alimento contenente svariati macro- e micronutrienti, ed offre quindi un ambiente favorevole alla crescita di diversi gruppi di microrganismi. Questi ultimi, presenti fin dalle prime fasi di lavorazione della carne, derivano principalmente dalla pelle e dagli organi interni dell'animale, dagli operatori coinvolti nella manipolazione e dall'ambiente di lavorazione.

Il microbiota della carne è prevalentemente composto da microrganismi Gram-negativi, come *Pseudomonas* spp. ed Enterobacteriaceae, e Gram-positivi, includendo *Brochothrix thermosphacta*, micrococchi e stafilococchi. Inoltre, si rilevano spesso muffe, come *Penicillium* spp., e lieviti, come *Debaryomyces* spp. (Cardinali et al., 2018; Petruzzelli et al., 2014, 2016; Tremonte et al., 2005).

Nelle prime fasi della preparazione degli insaccati, come il taglio e la triturazione della carne, si verifica un significativo aumento della superficie esposta della materia prima. Questa condizione favorisce la crescita dei microrganismi presenti, soprattutto di quelli aerobi, anaerobi facoltativi o aerotolleranti.

Successivamente, l'aggiunta di sale riduce l'attività dell'acqua dell'impasto carneo, inibendo così una parte significativa dei batteri Gram-negativi, che comprendono vari microrganismi alterativi e/o patogeni.

L'utilizzo di nitrati e/o nitriti nella preparazione degli insaccati fermentati aiuta a prevenire la formazione di patogeni sporigeni anaerobi, in particolare *Clostridium* spp.

L'aggiunta di zuccheri fermentescibili favorisce lo sviluppo di batteri pro-tecnologici, inclusi i batteri lattici, nelle prime fasi di fermentazione.

La tecnologia di produzione degli insaccati fermentati contribuisce in modo significativo all'evoluzione del microbiota. Specificamente, durante l'insaccatura, si creano condizioni di parziale anaerobiosi che favoriscono lo sviluppo di batteri lattici e stafilococchi coagulasi negativi. Invece, durante la fase di maturazione, si verifica una variazione della popolazione microbica, influenzata da fattori intrinseci, come pH, attività dell'acqua, potenziale redox e presenza di sostanze inibenti, oltre che da fattori estrinseci, come temperatura e umidità. Questi elementi provocheranno la morte dei batteri Gram-negativi presenti inizialmente e favoriranno la proliferazione di gruppi microbici alotolleranti.

In generale, si può affermare che il microbiota degli insaccati fermentati si caratterizza per la presenza principalmente di batteri lattici, cocchi coagulasi negativi ed eumiceti (Belleggia et al., 2020):

- **Batteri lattici.** Tra le numerose funzioni esercitate dai batteri lattici, si evidenzia, in primis, la produzione di acido lattico, derivante dalla fermentazione anaerobica. L'acido lattico causa un abbassamento del pH, inibendo lo sviluppo di microorganismi alterativi e/o patogeni. In aggiunta, esso rallenta la degradazione delle proteine, favorendo l'ottenimento di una texture compatta ed elastica del prodotto finito. I batteri lattici influenzano radicalmente le caratteristiche sensoriali degli insaccati fermentati, grazie alla produzione di composti aromatici, ottenuti a partire dalla degradazione di lipidi e proteine: diacetile e acetaldeide aggiungono note burrose o fresche, i peptidi esaltano il sapore e gli acidi grassi volatili arricchiscono le note aromatiche. Infine, i batteri lattici esercitano una funzione antimicrobica, attraverso la potenziale formazione di batteriocine, polipeptidi in grado di inibire la crescita di batteri patogeni e prolungare la durata di conservazione del prodotto;
- **Cocchi coagulasi negativi.** I cocchi coagulasi negativi hanno un impatto determinante per quanto riguarda la "protezione" da batteri patogeni, quali *Clostridium botulinum*, grazie alla riduzione dei nitrati a nitriti. Le attività del nitrato e nitrito reductasi consentono, inoltre, lo sviluppo e la stabilizzazione del tipico colore rosso degli insaccati fermentati. Inoltre, tale gruppo microbico degrada lipidi e proteine, liberando acidi grassi a corta catena e aminoacidi, che contribuiscono allo sviluppo delle componenti aromatiche del prodotto finito. I cocchi coagulasi negativi prevengono l'ossidazione lipidica, favorendo la formazione di antiossidanti e limitando quella dei radicali liberi. Infine, è da evidenziare il loro impatto sulla texture degli insaccati fermentati, grazie alla moderata degradazione delle proteine, contribuendo alla morbidezza del prodotto finito.
- **Eumiceti.** Le muffe colonizzano principalmente la superficie del budello e, durante la maturazione, penetrano all'interno degli insaccati fermentati. Le loro funzioni principali possono essere così riassunte: i) inibizione di microorganismi indesiderati, ad esempio muffe in grado di produrre micotossine, attraverso la sintesi di composti antimicrobici; ii) affinamento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito, attraverso le forti attività proteolitiche e lipolitiche e la relativa liberazione di composti volatili; iii) regolazione della perdita di umidità, in quanto la colonizzazione del budello minimizza il tasso di essiccazione degli insaccati fermentati, evitando la formazione di indurimenti e incrostazioni in superficie; iv) azione antiossidante, grazie alla produzione di specifici enzimi in grado di "proteggere" i lipidi dalla degradazione ossidativa causata dalla luce. D'altro canto, i lieviti sono generalmente meno visibili in superficie, ma esercitano funzioni altrettanto importanti negli insaccati fermentati: i) miglioramento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito, per via della degradazione di lipidi e proteine, conferendo un leggero aroma fruttato; ii) definizione del colore del prodotto finito, attraverso la riduzione di nitriti residui e la stabilizzazione di pigmenti; iii) consumo di lattato, favorendo un innalzamento del pH al termine della stagionatura.

1.3. Il microbiota degli insaccati fermentati prodotti nel bacino del Mediterraneo

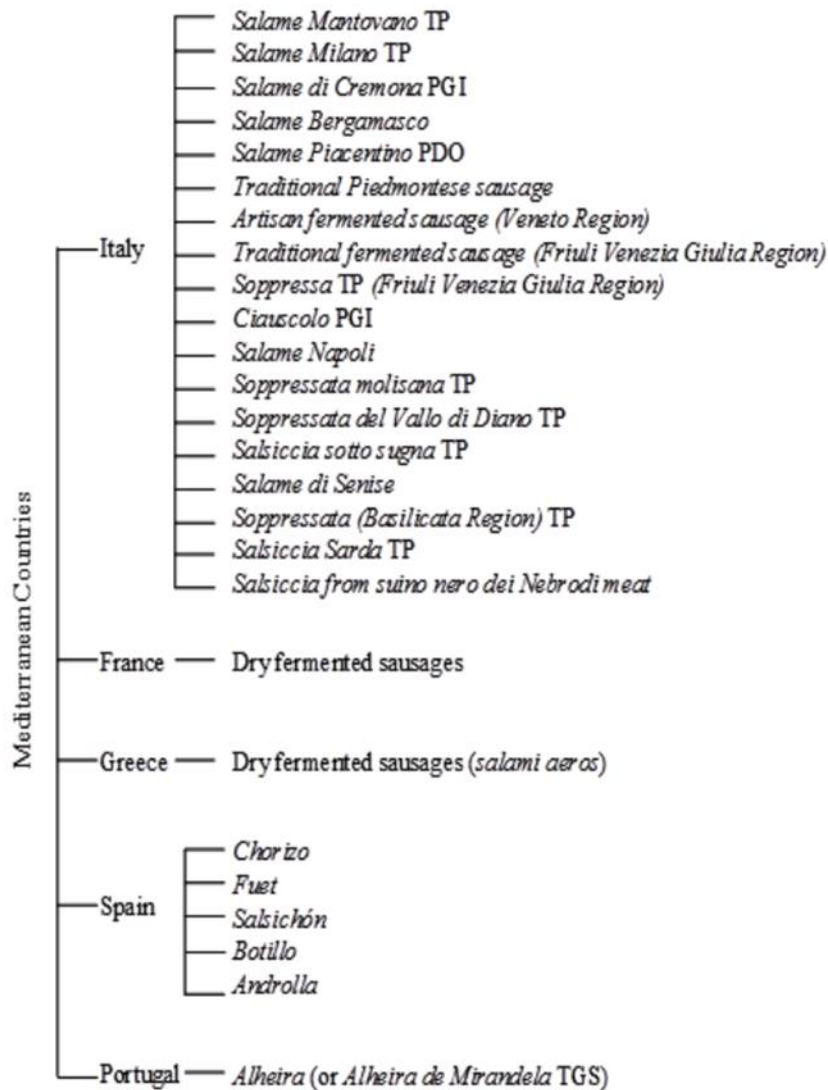


Figura 1: Principali tipologie di salami fermentati originari dell'area del Mediterraneo considerati dalla comunità scientifica.

Il bacino del Mediterraneo è caratterizzato da un clima temperato, favorendo l'instaurarsi di condizioni ideali per la maturazione degli insaccati fermentati e contribuendo quindi all'evoluzione di prelibati prodotti alimentari dalle inestimabili testimonianze storiche e gastronomiche (Leroy, Geyzen, Janssens, De Vuyst, & Scholliers, 2013).

L'Europa rappresenta il continente con la maggiore produzione di salsicce fermentate, che possono essere suddivise in diverse categorie, sulla base, ad esempio, dei valori di attività dell'acqua o di pH del prodotto finale, o delle condizioni di processo applicate.

Nel corso degli ultimi decenni, diverse ricerche si sono focalizzate sullo studio del microbiota degli insaccati fermentati prodotti nel bacino del Mediterraneo ed ottenuti senza l'aggiunta di colture starter, seguendo un processo fermentativo guidato dai microrganismi naturalmente presenti nella materia prima, nell'ambiente circostante o derivanti dalla manipolazione del prodotto.

In particolare, attraverso l'impiego di tecniche di identificazione fenotipiche e/o biomolecolari, sono state esaminate le principali comunità microbiche presenti negli insaccati fermentati provenienti da Italia, Spagna, Portogallo, Grecia e Francia (Aquilanti et al., 2016). I risultati hanno mostrato che i due principali gruppi microbici coinvolti nella fase di fermentazione e maturazione degli insaccati fermentati sono:

- i batteri lattici, in particolare i lattobacilli eterofermentanti facoltativi, con le specie *L. sakei* e *L. curvatus* riscontrate in quasi tutti i prodotti esaminati;
- i cocchi coagulasi negativi, tra i quali *Staphylococcus xylosus* è risultato generalmente predominante.

Inoltre, l'utilizzo di tecniche analitiche tradizionali microbiologiche, tra cui le conti vitali su piastra, per la caratterizzazione del microbiota di varie tipologie di insaccati fermentati prodotti nel bacino del Mediterraneo, ha evidenziato la predominanza di batteri lattici, che hanno raggiunto cariche sempre più elevate rispetto a tutti gli altri gruppi microbici, e di cocchi coagulasi negativi (Aquilanti et al., 2016).

Per confermare quanto appena affermato, può essere preso in considerazione, uno studio scientifico sul microbiota di salsicce essiccate fermentate provenienti dalla Spagna e dal Portogallo, focalizzato sulla caratterizzazione delle popolazioni microbiche presenti. Le specie predominanti identificate sono state *L. sakei*, *L. brevis* e *L. plantarum*, con una carica di circa 8,0 Log UFC/ g, seguite dai cocchi coagulasi negativi, i quali hanno raggiunto una carica di circa 7,0 Log UFC/ g, con *S. xylosus* predominante.

Per quanto riguarda carni fermentate prodotte in Italia, sono stati registrati valori simili: i batteri lattici hanno raggiunto una carica microbica media di 8,0 Log UFC/g, mentre i cocchi coagulasi negativi una carica microbica media di circa 6,0 Log UFC/g. Anche in questo caso, le specie prevalenti identificate sono state *L. sakei* e *L. curvatus* e *S. xylosus*.

Ad oggi, il bacino del Mediterraneo rappresenta l'area più rilevante per quanto concerne la produzione di insaccati fermentati e custodisce, quindi, svariati processi di produzione che caratterizzano la tradizione ed il folclore dei paesi presenti al suo interno.

1.4. Il processo produttivo del salame di fegato



Figura 2: Tipici salami di fegato marchigiani

Il processo produttivo dei salami di fegato richiede una serie di fasi specifiche, necessarie per ottenere insaccati stagionati di qualità.

In primo luogo, si effettua lo stoccaggio delle materie prime, che avviene in maniera differente a seconda della loro tipologia. Infatti, per quanto riguarda i prodotti deperibili, tra cui il fegato e la carne di suino a seguito del loro sezionamento, si utilizzano delle celle frigorifere mantenute ad una temperatura di 2 °C. Per quanto riguarda i prodotti non deperibili, come budelli e altri ingredienti secondari, essi vengono acquistati da specifiche aziende alimentari e successivamente vengono immessi in appositi depositi di alimenti o armadietti e scaffali adibiti a tale utilizzo. In

questa prima fase, risulta di particolare importanza il ruolo dell'operatore incaricato di verificare l'idoneità delle merci, che si occupa di controllare la sicurezza igienico-sanitaria, l'integrità e la quantità delle materie prime. Se la merce risulta idonea, viene accettata e in seguito stoccata; in caso contrario, vengono registrati gli eventuali dati di non conformità della merce non idonea, che viene scartata per le successive fasi di produzione.

La dissalazione consiste nel trattamento dei budelli con diversi lavaggi con acqua potabile, vino e aromi.

In seguito, vengono pesati tutti gli ingredienti (sale, aromi, spezie, additivi, etc.) che verranno uniti all'impasto carneo, proporzionalmente alla quantità di materia prima lavorata. Tale passaggio viene definito pesatura.

Il processo di produzione prevede successivamente le fasi della pezzatura e della macinatura: le quantità di carne suina e di fegato messe in lavorazione vengono prima "pezzate" manualmente negli appositi locali di lavorazione e, in seguito, vengono inserite e macinate nei tritacarne.

Al macinato ricavato, si aggiungeranno gli ingredienti precedentemente pesati e miscelati, ottenendo in tal modo un semilavorato che verrà poi inserito in un'impastatrice, con lo scopo di amalgamare ulteriormente il prodotto.

L'impasto risultante viene inserito in un'insacatrice e, tramite un imbuto collegato al macchinario, scorre all'interno del budello. In questa fase, gli operatori controllano la riuscita e la continuità del processo e, solo per alcune tipologie di insaccati fermentati, viene effettuata anche la legatura con uno spago per uso alimentare.

Gli insaccati così preparati vengono appesi su degli appositi carrelli e stoccati nella camera di asciugatura, in cui temperatura e umidità sono controllate artificialmente, per un determinato periodo di tempo (generalmente 4-5 giorni), che può variare in base al tipo di prodotto, al processo di produzione e alla temperatura esterna.

Al termine dell'asciugatura, si passa alla stagionatura, che avviene in un'ulteriore camera controllata, generalmente ad una temperatura di 15 °C e un'umidità relativa dell'87%.

A seguito della stagionatura, il responsabile di produzione effettua gli ultimi accertamenti per verificare la qualità del prodotto finale, programmando, se necessario, un'ulteriore fase di maturazione in ambienti con condizioni naturali o controllate di umidità e temperatura.

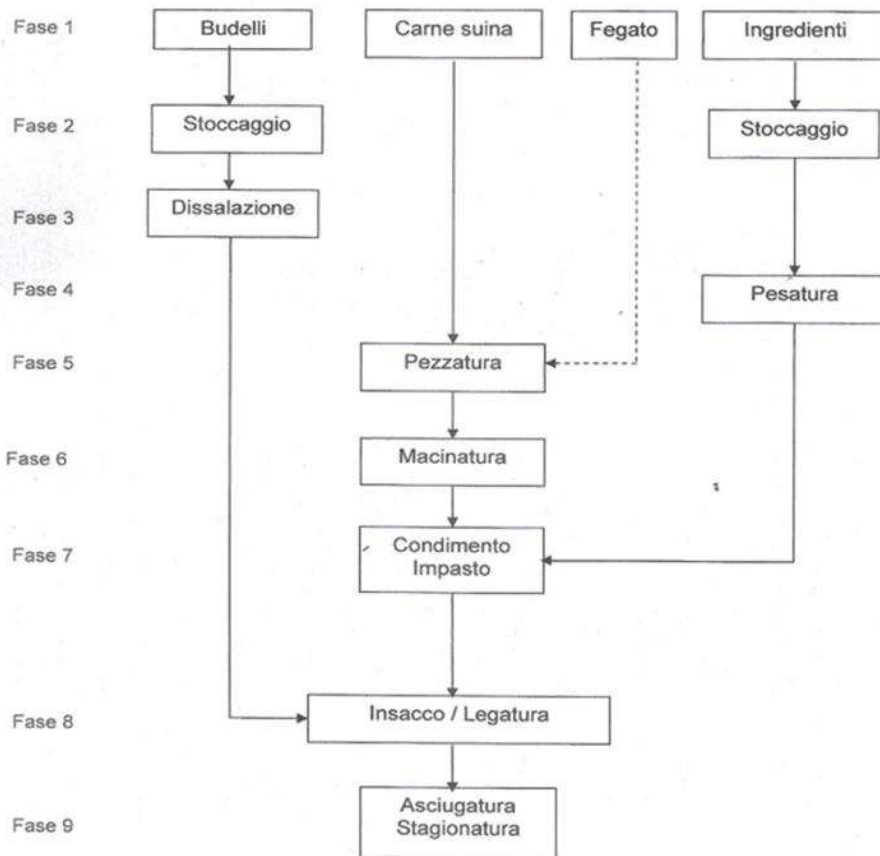


Figura 3: Diagramma di flusso processo produttivo insaccati

1.5. Il processo produttivo della Cacholeira (salsiccia di fegato)

Nonostante la Cacholeira rappresenti uno degli insaccati portoghesi più apprezzati del Portogallo, le informazioni riguardanti il processo di produzione sono piuttosto limitate. Perciò, di seguito saranno descritte sinteticamente le fasi di tale processo e le principali caratteristiche organolettiche del prodotto finale.



Figura 3: Campione di Cacholeira

La Cacholeira viene prodotta utilizzando diverse parti del maiale, nello specifico carne, fegato, grasso, budella e sangue. Questi elementi vengono miscelati, finemente macinati e successivamente conditi con l'aggiunta di ingredienti secondari, come aglio, sale, additivi, paprika e altre spezie. L'impasto risultante viene fatto riposare per circa 24 ore a 10 °C e, in seguito, viene insaccato in budelli naturali.

Successivamente, gli insaccati vengono scottati in acqua calda ad una temperatura di 85 °C, ed infine lasciati asciugare per un tempo che può arrivare fino a 15 giorni.

Il prodotto finale è caratterizzato da una consistenza semi-morbida, un colore scuro, di solito tendente al marrone, e un aspetto opaco o brillante, a seconda della ricetta del processo produttivo.

2. SCOPO DELLA TESI

La letteratura scientifica include svariati studi riguardanti la caratterizzazione microbiologica e fisico-chimica degli insaccati fermentati. Tuttavia, ad oggi sono presenti limitate ricerche riguardanti le caratteristiche e le dinamiche del microbiota di insaccati fermentati a base di fegato. Per questa ragione, risulterebbero necessarie nuove informazioni per chiarire se l'utilizzo di tale ingrediente possa modificare, e in che modo, la qualità del prodotto finale.

Il presente studio di tesi ha l'obiettivo di raccogliere informazioni riguardanti il microbiota di insaccati fermentati a base di fegato, nello specifico di un tipico salame portoghese, denominato Cacholeira, e di salami di fegato tipici della regione Marche. I dati raccolti saranno messi a confronto per indicare e discutere le eventuali differenze riscontrate tra le diverse tipologie di prodotti fermentati.

In dettaglio, sono stati raccolti ed analizzati 2 campioni di Cacholeira e 2 campioni di salami di fegato marchigiani reperibili in commercio.

Le analisi effettuate includono sia analisi chimico-fisiche che microbiologiche. Le analisi chimico-fisiche comprendono:

- misurazione del pH;
- misurazione dell'acidità totale titolabile (TTA);
- calcolo dell'attività dell'acqua (a_w);
- concentrazione di acido lattico;
- concentrazione di acido acetico.

Le analisi microbiologiche comprendono le conte vitali dei seguenti gruppi microbici:

- Enterobacteriaceae;
- Lattobacilli mesofili;
- Stafilococchi coagulasi negativi;
- Enterococchi;
- Pseudomonadaceae;
- Eumiceti.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento

Sono stati raccolti ed analizzati 2 campioni di Cacholeira, appartenenti a lotti differenti dello stesso produttore artigianale portoghese, situato a Portalegre, Alentejo (Portogallo). I campioni consistevano di circa 250 g di prodotto pronto al consumo, e sono stati denominati con C1 e C2.

Inoltre, sono raccolti ed analizzati 2 campioni di salame di fegato della regione Marche, appartenenti a differenti produttori artigianali. I campioni consistevano di circa 120 g di prodotto pronto al consumo, e sono stati denominati con SF1 e SF2.



Figura 4: Etichetta campione Cacholeira C1



Figura 5: Etichetta campione Cacholeira C2

3.2. Analisi chimico-fisiche

- pH

Il pH dei campioni di Cacholeira e di salame di fegato della regione Marche è stato rilevato attraverso un pHmetro dotato di un elettrodo solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italia), inserito nel cuore di ciascun campione.

- **TTA (Acidità Totale Titolabile)**

La TTA è stata determinata a partire da aliquote di 10 g per ogni campione, omogenati con 90 mL di acqua distillata attraverso lo Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milan, Italia) per 5 minuti a 260 rpm. I dati ottenuti sono stati espressi come il volume totale (mL) di una soluzione di NaOH 0,1 M aggiunta per ottenere un valore fisso di pH pari a 8,3.

- **A_w**

L' a_w è stata determinata secondo il metodo standard ISO 21807:2004 e attraverso l'utilizzo dell'apparecchio Aqualab 4TE (Meter Group, Pullman, USA).

- **Concentrazione acido lattico**

Per determinare la concentrazione di acido lattico dei campioni in esame, è stato utilizzato il kit di analisi D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) fornito dalla Megazyme (Bray, Irlanda). L'analisi è caratterizzata dalle seguenti fasi:

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

- **Concentrazione acido acetico**

Per determinare la concentrazione di acido lattico dei campioni in esame, è stato utilizzato il kit di analisi Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format) fornito dalla Megazyme (Bray). L'analisi è caratterizzata dalle seguenti fasi:

- diluizione del campione: la quantità di acido acetico presente nella cuvetta (cioè, negli 0,1 mL di campione analizzato) deve essere compresa tra 0,3-25 mg e quindi il campione deve essere diluito a sufficienza per ottenere una concentrazione di acido acetico tra i 0,03 e 0,25 g/L. Se il valore è inferiore al limite di determinazione, occorrerà utilizzare un maggior quantitativo di campione oppure, in alternativa, aumentare il volume da aggiungere alla cuvetta fino a 2 mL, accertandosi che la somma dei componenti del campione (con acqua distillata) sia di 2,1 mL;
- chiarificazione del campione (la procedura è identica a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico);
- determinazione del contenuto di acido acetico (la procedura è identica a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico).

3.3. Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state condotte in condizioni asettiche e a seguito della rimozione del budello degli insaccati fermentati.

Per ogni campione, 10 g sono stati miscelati con 90 mL di una soluzione di acqua peptonata sterile (1 g/L di peptone batteriologico, Oxoid, Milano, Italia), attraverso lo Stomacher 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia) per 3 min a 260 rpm. Sono state quindi allestite diluizioni seriali decimali per l'enumerazione dei seguenti microrganismi:

- batteri lattici su De Man, Rogosa e Sharpe agar (MRS agar) (De Man et al., 1960) con l'aggiunta di 250 mg/L di cicloesimide per prevenire l'eventuale crescita di eumiceti, attraverso l'incubazione a 37 °C per 48-72 ore;
- cocchi coagulasi negativi su Mannitol Salt Agar (MSA) (Chapman, 1945) attraverso l'incubazione a 37 °C per 24-48 ore;
- enterococchi su Slanetz Bartley Agar (SBA) attraverso l'incubazione a 37 °C per 48 ore;

- Pseudomonadaceae su Pseudomonas Agar Base (PAB) con l'aggiunta di supplemento selettivo Ceftrimide-Fucidin-Cephalosporin (CFC), attraverso l'incubazione a 30 °C per 24-48 h;
- Enterobacteriaceae su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) attraverso l'incubazione a 37 °C per 24 ore;
- Eumiceti (lieviti) su Yeast Extract–Peptone–Dextrose Broth (YPD) attraverso l'incubazione a 25 °C per 72 ore.

Per ogni campione le analisi sono state eseguite in triplicato tecnico per due replicati biologici e i risultati delle conte vitali sono espressi come media del Log delle unità formanti colonia (ufc) per grammo di campione \pm deviazione standard.

3.4. Terreni di coltura utilizzati

Per ogni gruppo microbico da rilevare, le conte vitali microbiologiche sono state effettuate attraverso l'uso dei terreni di coltura già citati, la cui composizione è riportata dettagliatamente di seguito.



Figura 6: Terreni di coltura utilizzati per le analisi in piastre Petri

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

- Composizione del terreno

Componente	Concentrazione (g/L)
Digerito enzimatico di caseina	10 g/L
Estratto di carne	10 g/L
Estratto di lievito	4 g/L
Glucosio	20g/L
Fosfato di dipotassio	2 g/L
Acetato di sodio	5 g/L
Triammonio citrato	2 g/L
Solfato di magnesio	0,2 g/L
Solfato di manganese	0,05 g/L
Tween 80	1,08 g/L
Agar	15 g/L

Tabella 1: Composizione del terreno di coltura MRS.

2) Mannitol Salt Agar (MSA) (WVR Chemicals) (Chapman, 1945)

- Composizione del terreno

Componente	Concentrazione (g/L)
Idrolisato peptico di tessuto animale	7 g/L
Idrolisato pancreatico di caseina	5 g/L
Estratto di carne	1 g/L
Cloruro di sodio	75 g/L
D-Mannitolo	10 g/L
Rosso fenolo	0,02 g/L
Agar	15 g/L

Tabella 2: Composizione del terreno di coltura MSA.

3) Slanetz Bartley Agar (SBA) (WVR Chemicals) (Slanetz & Bartley, 1957)

- Composizione del terreno

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

Tabella 3: Composizione del terreno di coltura SBA.

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

- Composizione del terreno

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

Tabella 4: Composizione del terreno di coltura PAB.

5) Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (WVR Chemicals)

(Garofalo et al., 2017)

- Composizione del terreno

Componente	Concentrazione (g/L)
Digerito enzimatico di tessuti animali	7 g/L
Estratto di lievito	3 g/L

Glucosio	10 g/L
Cloruro di sodio	5 g/L
Sali biliari n. 3	1,5 g/L
Rosso neutro	0,03 g/L
Cristal violetto	0,002 g/L

Tabella 5: Composizione del terreno di coltura VRBGA.

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

- Composizione del terreno

Componente	Concentrazione (g/L)
Peptone micologico	5 g/L
Potassio fosfato bibasico	1 g/L
Magnesio solfato	0.5 g/L
Glucosio	10 g/L
Rosa bengala	0.05 g/L
Agar	15 g/L
Cloramfenicolo	0.1 g/L

Tabella 6: Composizione del terreno di coltura RB.

3.5. Analisi statistiche

Il Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test (livello di significatività 0,05) è stato usato per valutare le differenze statistiche tra i campioni di insaccati fermentati, attraverso l'analisi della varianza a una via (ANOVA). Per eseguire i test statistici è stato usato il software JMP Version 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Analisi chimico-fisiche

I risultati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche, quali pH, a_w , TTA, concentrazione di acido lattico e di acido acetico sono presenti nella Tabella 7.

Campione	Attività dell'acqua (a_w)	pH	Acidità totale titolabile (mL NaOH 0,1 M)	Acido lattico (g/100 g)	Acido acetico (g/100 g)
SF1	0,912 ± 0,001 ^a	5,84 ± 0,01 ^a	16,4 ± 0,5 ^a	0,908 ± 0,123 ^a	0,037 ± 0,003 ^a
SF2	0,772 ± 0,003 ^b	5,58 ± 0,01 ^b	15,8 ± 0,4 ^a	0,570 ± 0,227 ^b	0,003 ± 0,002 ^b
Media salami di fegato	0,842 ± 0,081^A	5,71 ± 0,15^A	16,1 ± 0,5^A	0,739 ± 0,246^A	0,020 ± 0,020^A
C1	0,820 ± 0,001 ^b	5,11 ± 0,02 ^a	16,6 ± 0,9 ^a	1,152 ± 0,007 ^a	0,028 ± 0,008 ^a
C2	0,916 ± 0,001 ^a	5,07 ± 0,03 ^a	15,3 ± 1,7 ^a	0,908 ± 0,072 ^b	0,031 ± 0,018 ^a
Media Cacholeira	0,868 ± 0,055^A	5,09 ± 0,03^B	15,9 ± 1,3^A	1,030 ± 0,147^A	0,030 ± 0,012^A

Tabella 7: Risultati delle analisi chimico-fisiche dei campioni di Cacholeira e salame di fegato. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. Per ogni campione di Cacholeira (C1, C2) e di salame di fegato (SF1, SF2), e per ogni tipologia di prodotto (Cacholeira, salame di fegato), le medie seguite da lettere differenti sono statisticamente differenti ($P < 0.05$). Le lettere in maiuscolo indicano le differenze statistiche tra le tipologie di prodotto; le lettere in minuscolo indicano le differenze statistiche tra i campioni di ogni tipologia di prodotto.

Per quanto riguarda l' a_w , non sono state rilevate differenze statistiche significate tra la media dei campioni di Cacholeira ($0,868 \pm 0,055$) e quella dei campioni di salame di fegato ($0,842 \pm 0,081$). Tali valori si discostano da quelli registrati nello studio di Gonzales-Barron et al. (2015), in cui la media di a_w di diverse salsicce fermentate prodotte in Europa si attesta a $0,923 \pm 0,003$. D'altra parte, sia tra i campioni di Cacholeira appartenenti a due lotti diversi che tra i campioni di salami di fegato appartenenti a due produttori diversi, sono state evidenziate differenze statistiche significative. Queste discrepanze possono derivare da differenti condizioni ambientali o durata delle varie fasi che caratterizzavano il loro processo produttivo, nello specifico quella della maturazione degli insaccati, durante la quale, solitamente, si registra una maggiore perdita d'acqua nell'impasto.

Relativamente al pH, i valori medi dei campioni di salame di fegato e Cacholeira sono in linea con quelli di altre tipologie di salsicce di fegato portoghesi, come il Paio Petro e Chouriço Preto, i cui

valori si attestano tra 5,2 e 5,4 (Laranjo et al., 2017), mentre si differenziano da quelli rilevati in Sanganel, i cui valori si attestano a circa 7 (Iacumin et al., 2017).

Per quanto concerne l'acido lattico, si riscontrano differenze statistiche significative sia tra i campioni di Cacholeira, appartenenti a differenti lotti dello stesso produttore, che tra i campioni di salame di fegato, derivanti da due diversi produttori. In aggiunta, la media di acido lattico dei campioni di Cacholeira ($1,030 \pm 0,147$ g/100 g) risulta statisticamente superiore alla media dei campioni di salame di fegato ($0,739 \pm 0,246$ g/100 g). Rispetto all'acido acetico, non si registrano differenze statistiche significative tra la media dei campioni di Cacholeira ($0,030 \pm 0,012$ g/100 g) e la media dei campioni di salame di fegato ($0,020 \pm 0,020$ g/100 g). Da notare, i valori di acido acetico del campione SF1 risultano statisticamente superiori ai valori del campione SF2. In generale, le quantità di acido lattico e di acido acetico sono strettamente correlate alla fermentazione e alla frollatura dell'impasto carneo, ed avranno un impatto rilevante sui tratti sensoriali del prodotto finito, migliorandone sapori o aromi, e incidendo sulla tenerezza della carne.

4.2. Analisi microbiologiche

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche sono presenti nella Tabella 8.

Campione	Lattobacilli mesofili presunti	Stafilococchi coagulasi negativi	Enterococchi	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae	Eumiceti
SF1	$8,28 \pm 0,19$	$7,57 \pm 0,00$	$3,86 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,28$	< 1,00	$7,18 \pm 0,18$
SF2	$7,66 \pm 0,02$	$7,40 \pm 0,08$	$5,38 \pm 0,04$	< 1,00	< 1,00	$4,75 \pm 0,05$
Media salami di fegato	$7,97 \pm 0,37$	$7,49 \pm 0,11$	$4,62 \pm 0,88$	$0,75 \pm 0,88$	$0,00 \pm 0,00$	$5,96 \pm 1,41$
C1	$4,88 \pm 0,04$	$3,26 \pm 0,00$	$4,15 \pm 0,00$	< 1,00	< 1,00	$0,50 \pm 0,71$
C2	$7,03 \pm 0,10$	$3,09 \pm 0,20$	$4,03 \pm 0,11$	< 1,00	< 1,00	$6,48 \pm 0,09$
Media Cacholeira	$5,95 \pm 1,24$	$3,17 \pm 0,15$	$4,09 \pm 0,09$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$3,49 \pm 3,48$

Tabella 8: Risultati conte vitali di campioni di Cacholeira e salame di fegato. I valori sono espressi come media del Log UFC/g di prodotto \pm deviazione standard. Per ogni campione di Cacholeira (C1, C2) e di salame di fegato (SF1, SF2), e per ogni tipologia di prodotto (Cacholeira, salame di fegato), le medie seguite da lettere differenti sono statisticamente differenti ($P < 0.05$). Le lettere in maiuscolo indicano le differenze statistiche tra le tipologie di prodotto; le lettere in minuscolo indicano le differenze statistiche tra i campioni di ogni tipologia di prodotto.

Osservando i risultati delle conte vitali, è emersa nel complesso una comunità microbica attiva composta principalmente da batteri lattici, cocchi coagulasi negativi, enterococchi ed eumiceti, sia per quanto riguarda i campioni di Cacholeira che di quelli di salame di fegato.

Per quanto concerne i lattobacilli, la media dei campioni di Cacholeira ($5,95 \pm 1,24$ Log UFC/g) risulta statisticamente inferiore rispetto alla media dei campioni di salame di fegato ($7,97 \pm 0,37$ Log UFC/g). Inoltre, la media dei lattobacilli degli stessi campioni di Cacholeira si discosta dai valori di due altre tipologie di salsicce di maiale portoghesi tradizionali, precisamente Paio Preto e Chouriço Preto, caratterizzate da una carica compresa tra 6,7 e 8,2 Log UFC/g (Laranjo et al., 2017). La media dei lattobacilli dei campioni di salame di fegato analizzati nel presente studio di tesi risulta comparabile con quella riportata da Iacumin et al. (2017) per il Sanganel TGS (8,5 Log UFC/g), altro sanguinaccio dal gusto deciso e di colore scuro, di origine italiana, precisamente del Friuli-Venezia-Giulia.

Da notare, nella penisola iberica, il sangue ottenuto dalla macellazione suina è comunemente utilizzato dall'industria alimentare per il suo valore nutrizionale e le proprietà funzionali (Dàvila, Saguer, Toldrà, Carretero, & Parés, 2006). Il sangue suino, ricco di ferro eme e proteine ad alto valore biologico (Fontes, Gomide, Fontes, Ramos, & Ramos, 2010), può costituire un substrato di crescita per microrganismi alterativi e persino patogeni alimentari. Dàvila et al. (2006) hanno riportato che, in condizioni di refrigerazione, i batteri lattici sono in grado di proteggere il sangue dai comuni fenomeni di alterazione. Inoltre, Parés, Zamora, Saguer, & Carretero (2004) hanno riportato che l'aggiunta di glucosio può potenziare l'attività antagonista dei batteri lattici nei confronti dei patogeni. Pertanto, è probabile che la combinazione di sangue e zucchero nei campioni di Cacholeira analizzati, abbia aumentato la competitività dei batteri lattici, che hanno raggiunto una carica microbica più elevata rispetto agli altri gruppi microbici presi in considerazione nel presente studio di tesi.

Per quanto riguarda i cocchi coagulasi negativi, non si riscontrano differenze statistiche significative tra i due lotti di Cacholeira, la cui media ($3,17 \pm 0,15$ Log UFC/g) appare in linea con i valori riportati per Paio Preto (3,3 Log UFC/g) e Chouriço Preto (4,0 Log UFC/g) (Laranjo et al., 2017). La media dei cocchi coagulasi negativi dei campioni di salame di fegato ($7,49 \pm 0,11$ Log UFC/g) non si discosta significativamente da quella registrata per il Sanganel TGS (6,0 Log UFC/g) (Iacumin et al., 2017). Tuttavia, risulta evidente la discrepanza di valori tra le tipologie di prodotti analizzati nel presente studio di tesi, quindi tra la media dei cocchi coagulasi negativi dei campioni di Cacholeira e quella dei campioni di salame di fegato. Tale differenza può derivare da differenti condizioni o tempi delle fasi di fermentazione o essiccamento del loro processo produttivo.

Tra i dati registrati nel presente studio di tesi, le cariche microbiche degli enterococchi non hanno evidenziato differenze statistiche significative né tra le diverse tipologie di prodotto né tra i campioni della stessa tipologia di prodotto. In particolare, le medie dei campioni di Cacholeira ($4,09 \pm 0,09$ Log UFC/g) e di salame di fegato ($4,62 \pm 0,88$ Log UFC/g) appaiono in linea con i valori riportati da Iacumin et al. (2017) per il Sanganel TGS, mentre si discostano da quelli riportati da Laranjo et al. (2017) per Paio Preto e Chouriço Preto.

Relativamente ai gruppi microbici delle Pseudomonadaceae e delle Enterobacteriaceae, entro le quali si colloca la maggior parte di microrganismi deterioranti e indicatori di scarsa igiene, le medie delle conte vitali di entrambe le tipologie di prodotti analizzati nel presente studio di tesi risultano inferiori a 1 Log UFC/g.

Infine, per quanto riguarda gli eumiceti, sia tra i campioni di Cacholeira che tra i campioni di salame di fegato sono emerse differenze statistiche significative. Il microbiota superficiale dei salumi fermentati, compresi i lieviti, può essere influenzato dalle condizioni ambientali di maturazione (Moretti et al., 2004) e soprattutto dai parametri fisico-chimici dell'aria, come temperatura e umidità relativa (Baldini et al., 2000). Infatti, le condizioni termoigrometriche possono influenzare considerevolmente la velocità di evaporazione e diffusione dell'acqua contenuta nei salumi, portando così a differenze significative nel rapporto NaCl/H₂O, noto per influenzare la moltiplicazione dei microrganismi (Baldini et al., 2000). Quindi, le differenze statistiche evidenziate per gli eumiceti sia tra i campioni di Cacholeira che tra i campioni di salame di fegato possono essere correlate alle diverse condizioni ambientali che caratterizzavano il loro processo di produzione. Da notare, la media dei campioni di Cacholeira si discosta dalle conte vitali degli eumiceti riportate da Laranjo et al. (2017) per Paio preto (5,1 Log UFC/g) e Chouriço Preto (4,6 Log UFC/g); d'altra parte, la media dei campioni di salame di fegato risulta in linea con le conte vitali degli eumiceti riportate da Iacumin et al. (2017) per Sanganel TGS (5,0 Log UFC/g).

5. CONCLUSIONI

Gli alimenti fermentati a base di carne analizzati nel presente studio di tesi sono prodotti peculiari che, generalmente, vengono realizzati in piccole quantità e con ingredienti di alta qualità secondo le tradizioni locali, che, di solito, sono profondamente radicate nei territori d'origine. Questi alimenti rappresentano una fonte di biodiversità, legata sia all'artigianalità del processo produttivo che all'impiego di materie prime uniche. Pertanto, lo studio del loro microbiota risulta necessario al fine di ottenere una comprensione più approfondita delle interazioni tra microorganismi e substrati a base di carne, e migliorare la qualità complessiva del loro processo produttivo.

Il presente studio di tesi offre un primo sguardo alle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche della salsiccia fermentata portoghese Cacholeira e dei salami di fegato della regione Marche.

Il ruolo chiave dei batteri lattici e dei cocchi coagulasi negativi durante la fermentazione dei salumi viene confermato: entrambi i gruppi microbici esplicano una duplice azione, in quanto influiscono positivamente sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finito e competono con i gruppi microbici alterativi e patogeni, garantendo la qualità igienico-sanitaria dello stesso.

Seppur di minore impatto, la presenza di enterococchi ed eumiceti conferma il loro adattamento alle matrici carnee fermentate: tali gruppi microbici sono generalmente correlati ad attività proteolitiche e lipolitiche, attraverso cui modificano le caratteristiche sensoriali del prodotto finito.

Da notare, le famiglie Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae sono risultate pressoché assenti, evidenziando l'uso di pratiche igieniche adeguate durante l'intero processo produttivo.

Complessivamente, i risultati raccolti fungono da base per futuri studi riguardanti l'identificazione e la caratterizzazione delle specie microbiche che guidano il processo fermentativo della salsiccia fermentata portoghese Cacholeira e dei salami di fegato della regione Marche. Inoltre, risultano necessarie ulteriori ricerche su un numero più ampio di lotti da parte di svariati produttori locali, in modo tale da comprendere al meglio le dinamiche microbiche durante la manifattura e la maturazione di entrambi i prodotti in questione.

6. 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.
- Baldini, P., Cantoni, E., Colla, F., Diaferia, C., Gabba, L., Spotti, E., Marchelli, R., Dossena, A., Virgili, E., Sforza, S., Tenca, P., Mangia, A., Jordano, R., Lopez, M. C., Medina, L., Coudurier, S., Oddou, S., & Solignat, G. (2000). Dry sausages ripening: influence of thermohygrometric conditions on microbiological, chemical and physico-chemical characteristics. *Food Research International*, 33, 161–170.
- Belleggia, L., Milanović, V., Ferrocino, I., Cocolin, L., Haouet, M. N., Scuota, S., Osimani, A. (2020). Is there any still undisclosed biodiversity in Ciauscolo salami? A new glance into the microbiota of an artisan production as revealed by high-throughput sequencing. *Meat Science*, 165, 108-128.
- Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Aquilanti, L., Taccari, M., Garofalo, C., Polverigiani, S., Clementi, F., Franciosi, E., Tuohy, K., Mercuri, M. L., Altissimi, M. S., & Haouet, M. N. (2018). Microbial dynamics of model Fabriano-like fermented sausages as affected by starter cultures, nitrates and nitrites. *International Journal of Food Microbiology*, 278, 61–72.
- Chapman, G. H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 50, 201–203.
- Dàvila, E., Saguer, E., Toldrà, M., Carretero, C., & Parés, D. (2006). Preservation of porcine blood quality by means of lactic acid bacteria. *Meat Science*, 73, 386–393.

- De Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 23, 130-135.
- Farris, G. A., 2012. I salumi. In: Gobbetti, M., Vincenzini, M. a cura di *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Milano: Casa editrice Ambrosiana, pp. 437-452.
- Flores, M., Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., & Belloch, C. (2015). Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 16–24.
- Fontes, P. R., Gomide, L. A. M., Fontes, E. A. F., Ramos, E. M., & Ramos, A. L. S. (2010). Composition and color stability of carbon monoxide treated dried porcine blood. *Meat Science*, 85, 472–480.
- U. Gonzales-Barron a, V. Cadavez a, A.P. Pereira a, A. Gomes a, J.P. Araújo a,b, M.J. Saavedra c, L. Estevinho a, F. Butler d, P. Pires e, T. Dias a Relating physicochemical and microbiological safety indicators during processing of linguíça, a Portuguese traditional dry-fermented sausage *Food Research International* (2015)
- Garofalo, C., Bancalari, E., Milanović, E., Cardinali, F., Osimani, A., Savo Sardaro, M., L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., Gatti, M., 2017.
- Iacumin, L., Manzano, M., Stella, S., & Comi, G. (2017). Fate of the microbial population and the physico-chemical parameters of “Sanganel” a typical blood sausage of the Friuli, a north-east region of Italy. *Food Microbiology*, 63, 84–91.
- Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A. C., Potes, M. E., João Cabrita, M., Garcia, R., Rocha, J. M., Roseiro, L. C., Fernandes, M. J., João Fraqueza, M., & Elias, M. (2017). Impact of salt reduction on biogenic amines, fatty acids, microbiota, texture and sensory profile in traditional blood dry-cured sausages. *Food Chemistry*, 218, 129-136.

- 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.
- Lücke, F. K., (2000). Utilization of microbes to process and preserve meats. *Meat Science*, 56, 105-115.
- Magistà, D., Susca, A., Ferrara, M., Logrieco, A. F., & Perrone, G. (2017). *Penicillium* species: crossroad between quality and safety of cured meat production. *Current Opinion in Food Science*, 17, 36–40.
- Moretti, V. M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A., Panseri, S., Pirone, G., & Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, 66(4), 845–854.
- Parés, D., Zamora, L., Saguer, E., & Carretero, C. (2004). Acid lactic bacteria as biopreservative cultures in porcine blood for human consumption. *FoodInfo Online Features*.
- Petruzzelli, A., Foglini, M., Vetrano, V., Paolini, F., Oraziotti, N., Ambrosini, B., Osimani, A., Clementi, F., Tavoletti, S., & Tonucci, F. (2014). The occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in raw meat intended for public catering. *Public Health*, 128, 388–390.
- Petruzzelli, A., Osimani, A., Pasquini, M., Clementi, F., Vetrano, V., Paolini, F., Foglini, M., Micci, E., Paoloni, A., & Tonucci, F. (2016). Trends in the microbial contamination of bovine, ovine and swine carcasses in three small-scale abattoirs in Central Italy: a four-year monitoring. *Meat Science*, 111, 53–59.
- Tremonte, P., Sorrentino, E., Succi, E., Reale, A., Maiorano, G., & Coppola, R. (2005). Shelf Life of Fresh Sausages Stored under Modified Atmospheres. *Journal of Food Protection*, 68, 2686–2692.