



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

## **CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DI SALAMI PORTOGHESI TRADIZIONALI**

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF TRADITIONAL  
PORTUGUESE SALAMI**

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

ILARIA SERAFINI

Relatore:

PROF. ANDREA OSIMANI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

The world I love,  
the tears i drop,  
to be part of the wave.  
-RHCP-

# INDICE

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE.....	5
CAPITOLO 1	
1. Introduzione.....	6
1.1. Cenni storici.....	6
1.2. Tecnica conserviera: la fermentazione.....	7
1.3. Gli insaccati fermentati.....	8
1.3.1. Principali ingredienti.....	9
1.3.2. Principali gruppi microbici.....	11
1.4. Tecniche di produzione.....	15
1.5. Insaccati fermentati portoghesi: origine e tradizione.....	18
1.5.1. Cacholeira de Assar.....	19
1.5.2. Painho de Porco Ibérico.....	20
CAPITOLO 2	
2. Scopo del lavoro .....	22
CAPITOLO 3	
3. Materiali e metodi.....	23
3.1. Campionamento.....	23
3.2. Analisi chimico-fisiche.....	24
3.2.1. Determinazione di pH.....	24
3.2.2. Determinazione dell'acidità totale titolabile.....	24
3.2.3. Attività dell'acqua.....	24
3.2.4. Determinazione dell'acido lattico e acido acetico.....	24
3.3. Analisi microbiologiche.....	26
3.3.1. Conte vitali.....	26
CAPITOLO 4	
4. Risultati e discussione.....	30
4.1. Analisi microbiologiche .....	30
4.2. Analisi chimico-fisiche.....	33
CAPITOLO 5	
5. Conclusioni.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Ingredienti Painho de Porco Ibérico.....	24
Tabella 2. Ingredienti Cacholeira de Assar.....	24
Tabella 3. Composizione del terreno di coltura MRS.....	26
Tabella 4. Composizione del terreno di coltura VRBGA.....	27
Tabella 5. Composizione del terreno di coltura MSA.....	28
Tabella 6. Composizione del terreno di coltura SBA.....	28
Tabella 7. Composizione del terreno di coltura YPD.....	29
Tabella 8. Composizione del terreno di coltura PAB.....	29
Tabella 9. Determinazione della carica microbica.....	30
Tabella 10. Parametri fisico-chimici di Painho de Porco Ibérico e Cacholeira de Assar.....	33

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Etichetta Painho de Porco Ibérico.....	23
Figura 2. Etichetta Cacholeira de Assar.....	23

# CAPITOLO 1

## 1.Introduzione

### 1.1 Cenni Storici

Secondo il Decreto Ministeriale del 21.09.2005, e successive modifiche, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale, “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”.

In generale, i salumi possono essere definiti come preparazioni a base di carne, di grasso, di frattaglie e di sangue, in pezzi singoli o sotto forma di miscuglio più o meno finemente triturato, alle quali possono essere incorporati altri ingredienti come sale, spezie, additivi e colture selezionate di microrganismi, allo scopo di aumentarne la conservazione e di ottenere caratteristiche organolettiche peculiari. Esistono notevoli varietà di salumi, che si distinguono per scelta di materie prime, aromi e spezie utilizzate, nonché per i processi di preparazione e i metodi di conservazione associati.

I salumi possono essere classificati in:

- **insaccati**, che si distinguono a loro volta in insaccati *freschi* (salsicce), *stagionati* (salami) e *cotti* (mortadelle, wurstel);
- **non insaccati**, che includono salumi *freschi e stagionati* (prosciutto, pancetta, bresaola) e *cotti* (prosciutto).

Per quanto concerne i salumi non insaccati, si tratta di una serie di prodotti ottenuti attraverso la salagione, l'aggiunta di spezie e l'eventuale affumicatura di parti anatomiche intere, con osso o disossate. In termini di importanza e diffusione, il prosciutto crudo rappresenta uno dei principali prodotti non insaccati, anche se ne esistono numerose tipologie.

Nello specifico, invece, per quanto riguarda i salumi insaccati, questi sono costituiti da un involucro tenace e aderente che può essere di origine naturale (budella, altre membrane dei visceri di suino e bovino) o artificiale (tela, film plastico, ecc.), e da un contenuto, o

impasto, composto da un trito di carne suina pura o comprendente carni di diversa origine, e da grasso in percentuale variabile.

## **1.2 Tecnica conserviera: la fermentazione**

La fermentazione, in combinazione con la salagione, l'essiccamento e, talvolta, l'affumicatura, è uno dei processi più utilizzati sin dai tempi più antichi con il fine di preservare e conservare più a lungo gli alimenti.

Scavi archeologici effettuati nella tomba di Ramses III, sita nella Valle dei Re, in Egitto, hanno riportato alla luce un perfetto esempio di prodotto fermentato, molto simile al nostro odierno salame, a testimonianza di come la fermentazione, già nel 1166 a.C., fosse una tecnica largamente usata per il trattamento di carne e prodotti carnei derivati.

Il metodo della fermentazione potrebbe aver avuto origine nelle regioni che affacciano sul Mediterraneo, ove i diversi fattori ambientali, come le temperature miti e il clima temperato, richiedevano una tecnica efficace che prevenisse il deperimento della carne stessa (Aquilanti *et al.*, 2016).

In dettaglio, la fermentazione è un processo biochimico a carico di un substrato zuccherino che avviene in condizioni anaerobiche, ad opera di microrganismi naturalmente presenti nelle materie prime o eventualmente aggiunti come colture starter selezionate.

Le tipologie di fermentazioni maggiormente rappresentate in campo alimentare sono la fermentazione lattica e la fermentazione alcolica, ad opera, rispettivamente, di batteri lattici (LAB) e lieviti. La conseguenza principale della fermentazione lattica è l'aumento dell'acidità, a cui segue un abbassamento del pH, grazie alla diretta produzione di acidi organici che rendono l'ambiente sfavorevole allo sviluppo e alla proliferazione di microrganismi indesiderabili, come quelli alterativi e patogeni. In secondo luogo, la fermentazione contribuisce alla maturazione del prodotto e alla formazione di quei composti aromatici che ne caratterizzano gli aspetti organolettici e nutrizionali.

Il processo viene definito "spontaneo" quando è innescato da popolazioni microbiche eterogenee autoctone, associate alle diverse produzioni e selezionate per effetto di pressione selettiva, anche in base alle tecnologie di produzione e alle condizioni ambientali.

Tuttavia, i processi fermentativi attuati da microrganismi autoctoni forniscono prodotti altamente eterogenei, sia per gli aspetti qualitativi che quantitativi. Con lo sviluppo industriale per la produzione di alimenti, l'incostanza e l'imprevedibilità dei risultati di

fermentazione spontanea sono risultati in contrasto con le esigenze delle aziende produttrici. Quindi, la necessità di pilotare i processi produttivi con lo scopo di avere risultati costanti, riproducibili, standardizzati e, soprattutto, igienicamente sicuri, ha portato all'impiego controllato di colture di avviamento, dette "starter" (Zambonelli *et al.*, 1992).

I vantaggi dell'utilizzo delle colture starter selezionate sono molteplici:

- maggiore controllo e riduzione dei tempi di processo;
- qualità del prodotto standardizzata e quindi riproducibile;
- maggiore controllo delle condizioni igieniche di prodotto e di processo.

Tuttavia, all'utilizzo di colture starter selezionate seguono anche diversi inconvenienti, soprattutto a discapito della popolazione microbica autoctona e della qualità del prodotto da un punto di vista sensoriale, a cui si è cercato di rimediare tramite la scelta di colture microbiche "naturali", cioè originarie della matrice di partenza e del territorio di produzione, al fine di favorire una maggiore "tipicità" del prodotto finale.

### **1.3. Gli insaccati fermentati**

I salumi fermentati costituiscono una categoria di alimenti che comprende molteplici varianti, che si basano generalmente su determinate caratteristiche di seguito raggruppate ed elencate:

- origine della carne, che può essere di origine suina, bovina ecc.;
- composizione della ricetta e del rapporto dei vari ingredienti scelti;
- la modalità di preparazione (triturazione) della parte magra e della parte grassa;
- il tipo di budello impiegato ed il relativo tipo di legatura;
- lo sviluppo di muffe sul budello;
- le condizioni adottate durante la fase di stagionatura.

La maggior parte delle produzioni, attualmente, segue ancora un processo tradizionale in cui fermentazione e stagionatura dipendono dalle attività di microorganismi autoctoni appartenenti a comunità estremamente eterogenee che derivano sia dalla materia prima che dall'ambiente di produzione. (Chevallier *et al.*, 2006) A seconda delle diverse tradizioni e preferenze dei consumatori, esistono differenze considerevoli, da paese a paese, sia per gli ingredienti utilizzati che per le tecniche manifatturiere adoperate.

### **1.3.1. Principali ingredienti**

#### **La Carne**

La carne rappresenta la “fase magra” del prodotto. Viene impiegata in prevalenza carne di suino e, in minor parte, quella di bovino ed equino. Dopo la selezione, segue il taglio della carne in piccoli pezzi e successivamente si procede con la triturazione della stessa, che può essere più o meno spinta a seconda della grana dell’impasto finale che si vuole ottenere (Farris *et al.*, 2012). La carne ha una composizione tale da consentire lo sviluppo di un grande numero di microrganismi: è costituita prevalentemente da proteine e da peptidi ed è molto ricca di aminoacidi e di vitamine. Inoltre, contiene carboidrati, rappresentati generalmente da glicogeno (che dopo frollatura e idrolisi libera glucosio) e da glucosio (Laurie *et al.*, 1983). La qualità tecnologica della carne dipende da fattori di natura zootecnica (razza, tipo di alimentazione, stato di nutrizione, età, ecc.), dagli eventuali stress subiti dagli animali, dal contenuto di acqua e dalla capacità di ritenzione idrica, dal pH finale, dalla durezza, dal colore e dalla capacità di assorbimento del sale. Le carni idonee per la produzione di salumi devono essere caratterizzate da una buona capacità di ritenzione idrica, un pH compreso tra 5,5 e 5,8, pigmenti presenti nello stato di mioglobina e ossimioglobina, e una buona capacità di assorbimento del sale (Galli Volonterio *et al.*, 2014).

#### **Il Lardo**

Il lardo rappresenta la “fase grassa” del prodotto. Si predilige l’utilizzo di lardo suino, poiché, grazie al sapore gradevole, alla consistenza pastosa e morbida, e alla composizione in acidi grassi, risulta dotato di caratteristiche tecnologiche ed organolettiche superiori rispetto a quello di altre specie animali (Cappelli *et al.*, 2016; Farris *et al.*, 2012). A seconda della regione dell’animale da cui viene prelevato, il lardo viene trattato in diversi modi: se proveniente dalla gola dell’animale, viene sottoposto a triturazione; al contrario, se proveniente dallo strato di grasso sottocutaneo, viene eseguita la cubettatura dello stesso (Farris *et al.*, 2012).

#### **Il Sale**

Il sale viene utilizzato principalmente come conservante, ma conferisce anche sapidità all’alimento. La salagione viene eseguita tramite l’aggiunta e il miscelamento di cloruro di sodio a grana fine all’impasto, in quantità comprese fra il 2,5 e il 4%, in funzione del

tipo di prodotto e affinché il valore di attività dell'acqua ( $a_w$ ) sia compreso tra 0,95 e 0,97, in modo tale da limitare la crescita di determinati gruppi microbici potenzialmente alterativi e/o patogeni. Per effetto della perdita di umidità durante la fase di maturazione, la concentrazione di NaCl si alza tra il 3,5 e il 6%. (Cappelli *et al.*, 2016). Il sale, nello specifico, esplica un'azione inibitoria contro la maggior parte dei batteri dannosi grazie a:

- aumento della pressione osmotica;
- perdita d'acqua del prodotto, con conseguente riduzione dell' $a_w$  della matrice alimentare;
- liberazione di ioni cloro;
- riduzione della solubilità dell'ossigeno (Galli Volonterio *et al.*, 2014).

### **Nitriti e nitrati**

I nitrati, ed eventualmente i nitriti, sono aggiunti sotto forma di  $KNO_3$ ,  $NaNO_2$  oppure  $KNO_2$ , in quantità stabilite per legge e che variano a seconda del Paese produttore. In Italia, ad esempio, sono consentiti in quantità massime di 250 ppm/kg per i nitrati e di 150ppm/kg per i nitriti (Reg. CE 1333/2008). I nitrati, per effetto di reazioni enzimatiche, sono ridotti a nitriti durante le prime fasi del processo produttivo, per poi svolgere la vera e propria azione antimicrobica lungo il corso della maturazione (Zambonelli *et al.*, 1992).

L'uso dei nitriti comporta evidenti vantaggi:

- promuovono la stabilizzazione del colore rosso dei tessuti, che nelle carni salate è dovuto alla conversione della mioglobina in nitrosomioglobina;
- influenzano positivamente l'aroma dei prodotti;
- svolgono azione antiossidante sui lipidi, in combinazione con il cloruro di sodio;
- esercitano azione antimicrobica verso i clostridi e altri microorganismi, soprattutto patogeni.

La combinazione di nitriti e di sale espletterà quindi un'importante azione inibitoria contro i batteri anaerobi sporigeni e, allo stesso tempo, di selezione sui microorganismi protecnologici autoctoni (Galli Volonterio *et al.*, 2014).

### **Le spezie**

Le spezie hanno la funzione principale di conferire al prodotto finito gusti e aromi particolari. Se presenti in dosi massicce, hanno una certa azione inibente nei confronti di stafilococchi e microflora putrefattiva, grazie alla presenza di composti antisettici (oli

essenziali). Le spezie più comunemente utilizzate, a seconda della tipologia di salame e delle tradizioni locali, sono: pepe nero in grani o in polvere, aglio, semi di finocchio, noce moscata, zafferano, salvia, rosmarino, peperone, ecc. (Zambonelli *et al.*, 1992; Galli Volonterio *et al.*, 2014).

### **Gli zuccheri**

Aggiunti all'impasto o naturalmente presenti, gli zuccheri sono rappresentati generalmente da glucosio, saccarosio e/o lattosio. Le quantità variano da 0,1 a 1% per saccarosio e glucosio, e da 0,5 a 2% per lattosio, che viene eventualmente aggiunto come latte o siero di latte in polvere. Gli zuccheri sono fermentati repentinamente dai microorganismi con produzione di acido lattico e conseguente riduzione del pH, che esercita un'azione selettiva sulla flora microbica.

#### **1.3.2. Principali gruppi microbici**

Le caratteristiche fisiche e biochimiche della carne fanno sì che essa rappresenti un ottimo ambiente per la proliferazione di svariati gruppi microbici. I microorganismi che caratterizzano tale materia prima già dalle prime fasi di lavorazione provengono solitamente dalla pelle e dalla carne stessa, dagli operatori addetti alla sua manipolazione e dall'ambiente di lavorazione. La popolazione microbica più comunemente presente nelle carni triturate e destinate alla preparazione di insaccati fermentati è rappresentata generalmente da microorganismi Gram-negativi, tra cui *Pseudomonas* spp. ed Enterobacteriaceae, e Gram-positivi, tra cui *Brochothrix thermosphacta*, batteri lattici, micrococchi e stafilococchi. Sono frequenti inoltre muffe, tra cui *Penicillium* spp., e lieviti, tra cui *Debaryomyces* spp. (Farris *et al.*, 2012).

Le condizioni che si vengono a creare nell'impasto dopo l'insaccamento, perlopiù influenzate dalla presenza di NaCl, di nitrati e nitriti e zuccheri, dalla temperatura di esposizione e dallo stato di anaerobiosi, sono tali da inibire lo sviluppo della maggior parte dei microorganismi alterativi e/o patogeni. (Zambonelli *et al.*, 1992).

Come accennato in precedenza, l'impiego di sale provoca l'abbassamento dell'attività dell'acqua dell'impasto a valori inferiori a 0,97, in modo tale da garantire l'inibizione di una buona parte dei batteri Gram-negativi, che comprendono svariati microorganismi alterativi e/o patogeni (Farris *et al.*, 2012). L'utilizzo di nitrati e/o nitriti permette di contrastare l'insorgenza di patogeni sporigeni anaerobi, in particolare di *Clostridium perfringens* e *C. botulinum*. Per quanto riguarda invece l'aggiunta di zuccheri

fermentescibili, essi promuovono lo sviluppo di batteri pro-tecnologici, tra cui i batteri lattici, nella prime fasi di fermentazione. Anche la tecnologia di produzione va ad impattare notevolmente sull'evoluzione del microbiota dell'impasto. In particolare, durante l'insaccatura vengono instaurate condizioni di parziale anaerobiosi, che favorisce lo sviluppo di batteri lattici e stafilococchi coagulasi negativi. (Farris *et al.*, 2012)

In definitiva, i gruppi microbici che riescono a sopravvivere e a proliferare nell'impasto degli insaccati carnei sono pochi: si tratta dei micrococchi, diversi stafilococchi, dei lattobacilli mesofili omo ed eterofermentanti, degli enterococchi, di *Leuconostoc* e di *Pediococcus*, di alcune muffe, prevalentemente dei generi *Penicillium* ed *Aspergillus*, nonché di diversi lieviti, fra cui *Debaryomyces hansenii* (Zambonelli *et al.* 1992).

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

### **I batteri lattici**

I batteri lattici presenti nei salumi fermentati e in generale nei prodotti carnei sono caratterizzati da attività metaboliche in cui gli zuccheri vengono utilizzati per la produzione di energia, con la conseguente sintesi di acido lattico e di altri composti secondari, tra cui acido acetico, acido formico, acido propionico, acido butirrico, alcool etilico e CO<sub>2</sub> (Urso *et al.*, 2006). La loro tolleranza alla scarsa presenza di ossigeno (microaerobiosi), al sale (cloruro di sodio), ai nitriti e a bassi valori di pH, consente loro rapidi sviluppi all'interno degli impasti dei salami. I batteri lattici, oltre a possedere una forte attività acidificante, contribuiscono alla formazione di sostanze antimicrobiche, come batteriocine (polipeptidi) ed etanolo. Inoltre, grazie ad un elaborato sistema proteolitico, scaturito da differenti tipi di enzimi, come proteinasi e peptidasi, essi sono in grado di degradare l'elevato contenuto di proteine della materia prima in aminoacidi, fondamentali per la crescita di tali microrganismi (Farris *et al.*, 2012).

All'interno degli insaccati fermentati, tra i batteri lattici isolati con maggiore frequenza è possibile annoverare *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*, eterofermentanti facoltativi.

Come conseguenza del loro rapido sviluppo, i lattobacilli, esaurendo gli zuccheri fermentescibili presenti con produzione di acido lattico, riducono il pH dell'insaccato, passando da valori iniziali di 5,8-6 a valori finali lievemente più acidi di 5-5,3. Questa azione acidificante, che avviene entro i primi giorni di maturazione, incide notevolmente

sulla qualità del prodotto finale, poiché: (i) determina la coagulazione proteica, che causa la graduale disidratazione del prodotto fermentato e quindi l'acquisizione di una texture compatta ed elastica; (ii) contribuisce alla stabilizzazione del colore rosso all'interno dell'insaccato attraverso l'ossidazione dei nitriti; (iii) aumenta la stabilità del prodotto dal punto di vista microbiologico (Zambonelli *et al.*, 1992).

Più in dettaglio, il sapore e l'aroma dell'insaccato sono attribuibili maggiormente alla combinazione di due attività metaboliche proprie dei batteri lattici durante il processo di fermentazione, quali:

1. attività acidificante: la produzione di acido lattico, derivante dalla degradazione degli zuccheri fermentescibili, causa l'abbassamento di pH (pH finale  $\leq 5,3$ ). Come conseguenza si assiste anche ad una riduzione della capacità di ritenzione idrica, dovuta alla minore ionizzazione in vicinanza del punto isoelettrico delle proteine (5,2-5,4), che favorisce una migliore ed uniforme asciugatura del prodotto (Cattaneo *et al.*, 2003; Zambonelli *et al.*, 1992).
2. attività proteolitica: l'aroma del prodotto finale deriva in gran parte dalla scissione delle proteine, provocata principalmente da enzimi della parete cellulare ed endocellulari dei batteri lattici, con il conseguente rilascio di piccoli peptidi e amminoacidi liberi.

### **I cocchi coagulasi negativi**

Precedentemente all'insorgenza del gruppo microbico dei cocchi coagulasi negativi, alla famiglia delle *Micrococcaceae* viene attribuita una partecipazione molto importante nella prima fase dei processi fermentativi dei salami. Infatti, i rappresentanti del genere *Micrococcus*, essendo aerobi obbligati, sviluppano inizialmente, subito dopo l'insaccamento, quando nell'impasto rimane una certa quantità di aria residua. Con la formazione di un ambiente anaerobio, il loro sviluppo si arresta, e vengono sostituiti dagli stafilococchi. Le specie di stafilococchi più frequentemente isolate all'interno degli insaccati fermentati sono *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus simulans* (Cocolin *et al.*, 2001), coagulasi negativi e non patogeni, che possiedono una buona attività proteolitica ma una scarsa attività acidificante. Tramite la proteolisi, tali microrganismi liberano peptidi ed amminoacidi, causando così l'aumento del pH che caratterizza gli ultimi stadi della maturazione.

Oltretutto, i cocchi coagulasi negativi sintetizzano lipasi, la cui azione determina il rilascio di varie sostanze aromatiche ed acidi organici, che conferiscono al prodotto finale un gusto piacevole e un buon odore (Cocolin *et al.*, 2001). Possiedono, inoltre, attività di riduzione

di nitrati e nitriti, rendendoli così attivi contro microrganismi patogeni, con la conseguente produzione di NO<sub>2</sub>, HNO<sub>2</sub> e NO. Il monossido di azoto (NO) risulta indispensabile per la nitrosazione della mioglobina, che influisce sul colore dell'insaccato fermentato.

### **Gli eumiceti**

Le muffe colonizzano in modo più o meno uniforme la parte esterna dell'insaccato, precisamente la superficie del budello. Tuttavia, la loro colonizzazione non si arresta sulla parete esterna, ma le ife penetrano in profondità nel corso della fase di maturazione. Questo 'passaggio' provoca un'uniforme disidratazione del prodotto, evitando indurimenti e incrostazioni dati da un'eccessiva asciugatura dell'involucro. In particolare, la penetrazione delle muffe all'interno avviene quando la fermentazione lattica giunge al termine e si registrano quindi i minimi valori di pH. Oltre al conferimento di un gradevole aspetto esteriore del prodotto, le muffe svolgono diverse funzioni durante le prime fasi della maturazione: esplicano un'azione disacidificante attraverso il consumo di acido lattico presente nell'impasto carneo, e permettono una più uniforme e lenta asciugatura dei prodotti grazie alla formazione del feltro fungino che ricopre il budello, comportando un miglioramento della qualità del prodotto finale e una minore riduzione di peso. Inoltre, l'azione delle muffe sulle qualità sensoriali dei prodotti riveste una primaria importanza: infatti, tali microrganismi sono implicati anche nella proteolisi e nella lipolisi, che risultano rilevanti per la definizione del sapore del prodotto finale e nella protezione delle molecole lipidiche dall'irrancidimento (Zambonelli *et al.*, 1992). I ceppi fungini osservati maggiormente sulla superficie degli insaccati sottoposti a maturazione spontanea appartengono principalmente ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Citromyces* e *Cladosporium*.

Allo stesso modo, anche i lieviti colonizzano la superficie del salume, contribuendo alla definizione del sapore finale, grazie alla loro attività proteolitica e lipolitica. La specie *Debaryomyces hansenii* è quella maggiormente presente nei salumi (Zambonelli *et al.*, 1992).

### **1.4. Tecniche di produzione**

Per produrre salumi di qualità, i fattori che entrano in gioco lungo la filiera produttiva sono molteplici: dal corretto sistema di lavorazione delle carni alla scelta dei metodi di cottura (se previsti), dal processo di salagione alla scelta delle spezie da utilizzare, dal corretto svolgimento della fase di stagionatura ai metodi di stoccaggio e confezionamento.

## **Refrigerazione**

Prima di essere tritata ed impastata, la carne viene mantenuta a una temperatura di refrigerazione (Galli Volonterio *et al.*, 2014). Infatti, a seguito della selezione, i tagli sia magri che grassi sono raffreddati il più rapidamente possibile e portati a una temperatura compresa tra 0 e 2 °C. La refrigerazione risulta fondamentale per i tagli destinati alla produzione di salami, poiché la presenza eccessiva di microbi all'interno di un materiale destinato alla fermentazione può compromettere il buon andamento della stessa. Inoltre, particolare attenzione alla refrigerazione va riservata nei mesi più caldi, durante i quali può facilmente verificarsi la proliferazione di alcune specie alterative e/o patogene, quali *Brochothrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio costicola*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*.

## **Triturazione e preparazione degli impasti**

Per la preparazione degli impasti, le materie prime, i tagli magri e i tagli grassi vengono tritati e in seguito miscelati con altri ingredienti, come sale, nitrati, nitriti e spezie, fino alla formazione di un composto omogeneo. La triturazione viene eseguita in modo differente in funzione della grana dell'impasto: per i salami a grana media o grossa la triturazione è generalmente eseguita col tritacarne, munito di uno o più coltelli. Il prodotto tritato, previa miscelazione con altri ingredienti è poi omogeneizzato in apposite impastatrici.

## **Insaccatura**

A seguito della formazione dell'impasto, il prodotto viene insaccato in budelli naturali o artificiali. Questa operazione, nei salumifici industriali, viene eseguita meccanicamente con attrezzature denominate "insacatrici".

I budelli naturali sono costituiti da parti dell'intestino (crasso o tenue) di animali suini, bovini, equini od ovini con diametro differente, che varia da 4 a 15 cm. Diverse sezioni di budello sono impiegate per l'insacco di differenti tipi di salame. Gli intestini, dopo lo svuotamento, sono lavati, sgrassati, raschiati e conservati per la salagione a secco. Prima dell'uso, i budelli sono di nuovo accuratamente lavati, quindi lasciati in acqua a 35-48 °C e infine in soluzione di acido acetico o in aceto per 24 ore.

Attualmente sono molto impiegati gli involucri sintetici o artificiali che possono derivare da fibre animali o da fibre vegetali. I budelli artificiali presentano diversi vantaggi, tra cui

la costanza del calibro, la mancanza di flora microbica, l'assenza di grassi e odori, e la facile rimozione.

### **La stagionatura**

Una volta insaccati, i salami sono sottoposti alla stagionatura, durante la quale assumono le caratteristiche proprie del prodotto finale. I salami vengono così appesi su appositi supporti e collocati in camere condizionate e ventilate, dove subiscono un complesso di trasformazioni di natura fisica, biochimica e microbiologica che nel loro insieme portano il prodotto alla maturazione. La stagionatura consiste in 3 fasi distinte, che si differenziano per le condizioni di temperatura (generalmente più alte per quelli a rapida maturazione e più basse per quelli a lenta maturazione) e umidità relativa (UR), nonché per la loro durata che varia complessivamente da 15 a 90 giorni:

#### 1. *Stufatura.*

Durante la stufatura si verifica un'evoluzione significativa del microbiota della matrice: i batteri pro-tecnologici prendono il sopravvento, con l'inizio della fermentazione lattica, a discapito di quelli alterativi e/o patogeni, che vengono inibiti a seguito dell'aumento dell'acidità.

Durante tale fase di lavorazione, la temperatura viene mantenuta fra 18 °C (prodotti a lunga maturazione) e 26 °C (prodotti a rapida maturazione), con un'umidità relativa compresa tra l'84 e il 90% per un tempo che varia da 1 a 4 giorni. In funzione dei parametri di stufatura, si verifica il primo significativo abbassamento di pH. Inoltre, si registra una diminuzione dell' $a_w$ , a partire da 0,95-0,97 dell'impasto fresco fino a raggiungere 0,93-0,95 al termine di questa fase.

#### 2. *Asciugatura.*

Durante l'asciugatura, che può durare dai 5 ai 10 giorni, la temperatura viene ridotta fino a livelli di 16-22 °C e l'UR viene mantenuta tra l'80 e il 90%.

Tale fase è caratterizzata da: (i) termine della fermentazione lattica a carico degli zuccheri con il conseguente abbassamento di pH fino a valori di 5,3-4,9; (ii) perdita ulteriore di umidità, con valori di  $a_w$  di ca. 0,93; (iii) sviluppo di muffe sul budello. La fase dell'asciugatura risulta particolarmente delicata: la perdita di umidità deve essere il più omogenea possibile, in quanto il non corretto condizionamento potrebbe causare una disidratazione eccessiva del budello e

delle parti superficiali, con la conseguente formazione di incrostazioni e indurimenti dello stesso e degli spessori sottostanti.

### 3. *Stagionatura in sensu strictu.*

La stagionatura in *sensu strictu* è la più estesa, durante la quale non si registra più lo sviluppo di batteri e avvengono le reazioni biochimiche che sono alla base della maturazione. La sua durata varia in base al tipo di prodotto ed è generalmente compresa tra 4 e 8 settimane, o più.

Durante tale fase, la temperatura è mantenuta a livelli di 10-15 °C con un'UR compresa tra il 65 e l'80%. Sul budello si osserva il pieno sviluppo di muffe, le quali, oltre alla regolazione di scambi idrici tra le differenti parti del prodotto, provocano anche un aumento del pH, con un conseguente “addolcimento” del prodotto finale. Un'asciugatura uniforme può essere ottenuta attraverso una scelta accurata dei valori di UR dell'ambiente di stagionatura, tenendo conto dello sviluppo e quindi dell'azione delle muffe a partire dal budello.

Durante quest'ultima fase, quindi, si verificano delle trasformazioni fisiche, chimiche e microbiologiche all'interno dell'impasto che andranno a caratterizzare definitivamente il prodotto finale. L'umidità del prodotto diminuisce a partire da valori iniziali compresi tra il 50 e il 70% a valori finali compresi tra il 27 e il 45%. Di conseguenza, si registra una diminuzione dell' $a_w$ , un aumento di concentrazione di NaCl e quindi una maggiore azione inibente e selettiva sulla microflora batterica presente.

Per quanto riguarda il pH, dopo un abbassamento iniziale dovuto allo sviluppo di batteri lattici che producono acidi organici dal metabolismo degli zuccheri, si ha un leggero innalzamento passando da 5,3 a 6, per effetto dello sviluppo di muffe sul budello, che modificano inoltre l'aspetto esteriore del prodotto in modo sostanziale. (Cappelli et al, 2016).

Si osserva, inoltre, una progressiva idrolisi delle proteine per effetto dell'attività di enzimi microbici e tissutali con conseguente rilascio di peptidi ed aminoacidi, responsabili delle caratteristiche organolettiche del prodotto. Anche i grassi subiscono una idrolisi parziale (lipolisi) con la conseguente liberazione di acidi grassi e glicerolo, catalizzata dagli enzimi presenti nella carne o sintetizzati dai cocchi coagulasi negativi.

Durante la maturazione, possono svilupparsi microorganismi indesiderati, cosiddetti alterativi e/o patogeni, che potrebbero rendere il prodotto non commestibile, tra cui *Staphylococcus aureus* e determinate specie di muffe, che possono produrre, rispettivamente, enterotossine stafilococciche e micotossine. Nei salami si possono riscontrare inoltre le amine biogene, come l'istamina, ossia composti potenzialmente tossici se ingeriti ad alte concentrazioni che, nella maggior parte dei casi, non modificano gli aspetti organolettici del prodotto.

Per questi motivi, risulta fondamentale la conoscenza degli aspetti microbiologici riguardanti sia i processi di produzione che le fasi di maturazione del prodotto, al fine di caratterizzarne al meglio le qualità organolettiche e assicurarne il rispetto delle caratteristiche igienico-sanitarie.

### **1.5. Insaccati fermentati portoghesi: Origine e tradizione**

Gli insaccati prodotti nell'area del Mediterraneo possono essere classificati come prodotti carnei disidratati e fermentati, preparati soprattutto con carne suina e sottoposti a lunghi periodi di maturazione (fino a diversi mesi) spesso senza una netta separazione tra fermentazione ed essiccamento. Tali preparazioni possono essere considerate "prodotti carnei a bassa acidità" (pH > 5), la cui *shelf-life* è garantita essenzialmente dal processo di disidratazione e dalla bassa attività dell'acqua.

Tra le diverse categorie di prodotto, gli insaccati crudi fermentati sono definiti come prodotti a base di carne selezionata, tagliata e tritata, e grasso, con o senza l'aggiunta spezie, condimenti e additivi autorizzati, sottoposti a maturazione, essiccamento e a volte affumicatura. Tali processi risultano altamente variabili per via delle tradizioni regionali, delle variazioni ambientali, etc.

Nel caso specifico dei paesi dell'Europa meridionale, incluso il Portogallo, gli insaccati speziati ed essiccati all'aria, con periodi di maturazione relativamente lunghi, rappresentano la tipologia maggiormente diffusa. Al contrario, nei Paesi del centro e del nord Europa, il processo di fermentazione è spesso accompagnato ad un processo di affumicatura e/o di essiccamento più o meno intensi. In entrambi i casi, lo sviluppo industriale ha permesso la diffusione dell'utilizzo di colture starter al fine di standardizzare e controllare i processi produttivi. Sebbene l'utilizzo di colture starter selezionate consenta di pilotare al meglio le fermentazioni e le varie fasi produttive, in Portogallo, molti dei salami fermentati che caratterizzano la tradizione culinaria, come *alheira*, *chouriça*, *chouriço de carne*, *chourço mouro*, *morcela*, *linguiça*, *farinheira*, *salpicão*, *cacholeira* e

*painho*, vengono prodotti senza l'aggiunta di alcun tipo di microorganismo starter. Tali prodotti, siano essi affumicati, fermentati e/o essiccati, sono prodotti carnei che costituiscono parte della tradizionale dieta giornaliera del Portogallo rurale. Essi sono prodotti principalmente da piccole aziende o manifattori locali che seguono o si ispirano al processo produttivo tradizionale del luogo. Proprio per questo motivo, sono presenti innumerevoli varietà di prodotti che differiscono per gli ingredienti utilizzati e per le tecniche produttive, molti dei quali hanno ottenuto un riconoscimento ufficiale per le loro caratteristiche uniche (38 prodotti certificati) (Marcos *et al.*, 2016).

Sebbene non si abbiano molte informazioni disponibili dalla letteratura scientifica circa gli insaccati fermentati prodotti in Portogallo, sono stati effettuati diversi studi per la caratterizzazione microbiologica di questi prodotti.

### **1.5.2. Painho de Porco Ibérico**

Il *Painho de Porco Ibérico* è, fondamentalmente, un *chouriço de carne*, come descritto dalla *normativa portoghese N. P. 589 (1987), Allegato I*. In dettaglio, esso è un prodotto di macelleria affumicato, di forma cilindrica, caratterizzato da un colore rosso scuro e brillante e consistenza semi-dura legato con un filo di cotone alle due estremità tramite nodo semplice o doppio, e dalla lunghezza massima di 30 cm e un diametro compreso tra i 20 e 40 mm. Esso è prodotto a partire da carne e lardo freschi derivanti da maiale di razza *Alentejana DOP*, tagliati in frammenti di dimensioni superiori ai 2 cm, addizionati di sale, aglio secco schiacciato non germogliato, pasta di peperone rosso dolce e pepe nero. L'involucro è costituito da budello di maiale essiccato.

Il *Painho de Porco Ibérico* deve la sua notorietà alle caratteristiche organolettiche, strettamente legate alla regione di produzione (*Alentejo*), il cui microclima (inverni freddi e secchi) crea condizioni specifiche per la produzione di insaccati. Data l'abbondante offerta di carni suine, gli abitanti di tale regione hanno elaborato tecniche peculiari di conservazione della carne, valorizzandone il gusto sia attraverso un condimento piuttosto semplice, costituito da prodotti locali, sia attraverso un'affumicatura a legna, anch'essa proveniente dalla regione. Il *Painho de Porco Ibérico* presenta pertanto caratteristiche organolettiche degne di nota, con aspetto, gusto e aroma che lo associano inequivocabilmente alla regione d'origine e che giustificano la sua reputazione presso i consumatori abituali.

L'origine del *Painho de Porco Ibérico*, tuttavia, risulta imprecisa e, malgrado la sua antica tradizione, sono presenti studi analitici sul prodotto piuttosto limitati. Le modificazioni chimico-fisiche e microbiologiche che intervengono durante la sua preparazione sono

strettamente correlate ai metodi di trasformazione scelti, che sono generalmente realizzati con mezzi naturali, sulla base degli usi e dei costumi locali. Le sole variazioni effettuate ai metodi di trasformazione già esistenti sono state imposte dalla necessità di conformarsi alla normativa in materia di igiene e sicurezza dei prodotti alimentari.

La trasformazione del *Painho de Porco Ibérico* comprende le seguenti fasi:

1. *Preparazione delle materie prime*: viene effettuata la triturazione della carne e del grasso, che vengono aggiunti in percentuali fisse al fine di ottenere un impasto omogeneo.
2. *Aggiunta dei condimenti*: a seguito della preparazione dell'impasto di carne e grasso, vengono addizionati condimenti e acqua, per poi omogenizzare i vari ingredienti. Successivamente, l'impasto viene lasciato riposare per 2-3 giorni in un luogo fresco e asciutto.
3. *Insaccatura*: l'insaccatura viene effettuata abitualmente a mano, utilizzando esclusivamente budelli di maiale essiccati e conservati in salamoia. Durante tale procedura, al fine di evitare la minima formazione di bolle d'aria nell'impasto, il budello viene bucherellato con un ago tradizionale di materiale e spessore adeguati.
4. *Affumicatura*: quest'ultima fase avviene in camere apposite, utilizzando esclusivamente legno di quercia e/o sughero di quercia secco, per una durata minima di 10 giorni fino ad un massimo di 30 (Comunità Europea, Official Journal L 265, 1997).

#### **1.5.1. Cacholeira de Assar**

La *Cacholeira de Assar* è un salume di origine portoghese sottoposto a scottatura, costituito essenzialmente da sangue, fegato e altri organi interni (milza, cuore e pancreas), e da grasso molle di maiale di razza *Alentejana*, con aggiunta di sale e, in alcuni casi, aglio secco non germinato e cumino. L'involucro è costituito da budello naturale secco, ottenuto esclusivamente dall'intestino tenue e crasso del maiale. Una volta insaccato, il prodotto viene scottato in acqua calda a 85 °C e/o affumicato per una durata di 15 giorni (Belleggia *et al.*, 2020). Ha la tipica forma di ferro di cavallo cilindrico, chiuso mediante torsione e/o legato, con una lunghezza massima di 50 cm e un diametro compreso tra i 30 e i 45 mm. Il colore appare marrone scuro tendente al grigio brillante, la consistenza risulta semi-molle, e l'involucro si presenta integro e ben aderente al contenuto. Al taglio presenta un impasto omogeneo, perfettamente legato, di aspetto marmorizzato e di colore grigio-bruno

caratterizzato da diverse tonalità. Ha un sapore gradevole, dolce o delicato, poco salato, *sui generis*, che si caratterizza anche per il grasso scelto, che risulta brillante e di colore bianco perlato. La consistenza del prodotto finito varia a seconda dell'alimentazione, in particolare della percentuale di ghiande ingerite, del maiale alentejano.

La *Cacholeira de Assar*, prodotta nella Regione dell'Alentejo, compresi i distretti di *Evora, Beja e Portalegre*, viene generalmente consumata per piccoli pasti o usata per arricchire svariati piatti tradizionali alentejani.

## CAPITOLO 2

### 2. Scopo del lavoro

La stretta correlazione tra tradizione e territorio è visibile sin dai tempi più antichi, e raggiunge, tra i vari ambiti, anche quello delle produzioni alimentari. Nello specifico, per quanto riguarda gli alimenti fermentati, tale correlazione viene confermata dal costante sviluppo di tecniche efficaci sia per la conservazione che per la produzione di prodotti con caratteristiche organolettiche e nutrizionali peculiari, legate profondamente all'aspetto microbiologico dell'ecosistema da cui provengono. Per questo motivo, risulta essenziale uno studio approfondito della composizione e delle dinamiche del microbiota degli alimenti, al fine di valutare le qualità sensoriali, nutrizionali ed igienico-sanitarie di questi ultimi.

*Il Painho de Porco Ibérico e la Cacholeira de Assar* sono entrambi prodotti tradizionali portoghesi, originari della zona dell'Alentejo, consumati abitualmente sia per pasti rapidi che per accompagnare numerose pietanze della tradizione alentejana.

Lo scopo del presente studio di tesi è quello di definire gli aspetti chimico-fisici e microbiologici di campioni di *Painho de Porco Ibérico e Cacholeira de Assar*, focalizzando l'attenzione sulle differenze riscontrate tra gli stessi, soprattutto per quanto riguarda la loro composizione a livello di ingredienti utilizzati, e la microflora batterica ed eumicetica che li caratterizza.

Le analisi condotte, effettuate su due campioni di *Painho de Porco Ibérico* e due campioni di *Cacholeira de Assar* provenienti rispettivamente da un unico lotto, comprendono:

- analisi microbiologiche: analisi coltura-dipendenti per l'enumerazione di batteri lattici, cocchi coagulasi negativi (CNC), enterocchi, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae ed eumiceti;
- analisi chimico-fisiche: determinazione del pH, acidità totale titolabile (TTA), attività dell'acqua ( $a_w$ ) e concentrazione di acidi organici, quali acido lattico ed acetico.

## CAPITOLO 3

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Campionamento

Sono stati sottoposti ad analisi 2 campioni di *Painho de Porco Ibérico* e 2 campioni di *Cacholeira de Assar* acquistati da differenti produttori portoghesi. In dettaglio, per ogni tipologia di prodotto, i due campioni appartenevano a due lotti differenti dello stesso produttore. (FIG. 1-2 Etichetta di *Painho de Porco Ibérico* e di *Cacholeira de Assar*). Ogni campione consisteva di 200g di prodotto finito confezionato sottovuoto. I campioni sono stati trasportati nei loro imballaggi originali e conservati a temperatura di refrigerazione sino all'inizio delle analisi prima della data di scadenza.

Al fine delle analisi, i campioni sono stati codificati come segue: per i campioni di *Painho de Porco Ibérico*, P1-P2, ottenuti dal produttore A; per i campioni di *Cacholeira de Assar*, C1-C2, ottenuti dal produttore B.



FIG.1 Etichetta *Painho de Porco Ibérico*



FIG.2 Etichetta *Cacholeira de Assar*

Nelle tabelle seguenti è riportata la lista degli ingredienti di *Painho de Porco Ibérico* e di *Cacholeira de Assar*.

**Tabella 1. Ingredienti Painho de Porco Ibérico.****Tabella 2. Ingredienti cacholeira de Assar.**

Ingredienti Painho de Porco Ibérico	Ingredienti Cacholeira de Assar
Carne di maiale razza Ibérica (91,3%), Sale, Aglio, Pasta di peperoncino, Peperone dolce, Destrosio, Destrina, Pepe, Olio di Capsicum. Antiossidanti: Acido ascorbico e ascorbato di sodio (E300 e E301). Conservanti: Nitrato di potassio e nitrito di sodio (E252 e E250).	Carne e grasso di maiale, Sale, Aglio, Pasta di peperoncino, Sangue, Spezie, Zucchero, Amido modificato, Proteine della soia e del latte. Emulsionanti: difosfato tetrasodico e tetrapotassico. Affumicato a legna.

### 3.2. Analisi Chimico-fisiche

#### 3.2.1. Determinazione del pH

Per la determinazione del pH dei campioni di *Painho de Porco Ibérico* e di *Cacholeira de Assar* è stato utilizzato un pH-metro dotato di elettrodo HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italy). L'analisi è stata condotta effettuando la misurazione al cuore di ciascun campione. I risultati sono stati espressi come media del valore di pH registrato  $\pm$  deviazione standard.

#### 3.2.2. Determinazione dell'acidità totale titolabile

Per la determinazione dell'acidità totale titolabile (TTA), sono stati prelevati 10g di campione, aggiunti di 90mL di acqua demineralizzata e posti all'interno di un sacchetto apposito, per essere poi miscelati nell'omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milan, Italy) per 5 minuti a 260 rpm.

L'omogenato è stato quindi posto su un agitatore magnetico e titolato con NaOH 0.1 N fino al raggiungimento di un valore di pH di 8,3.

I valori di acidità titolabile totale sono espressi come il volume totale (mL) di NaOH 0.1 N usato per raggiungere tale valore di pH  $\pm$  deviazione standard.

#### 3.2.3. Attività dell'acqua

L'attività dell'acqua ( $a_w$ ) è stata misurata secondo il metodo standard ISO 21807:2004 attraverso l'apparecchio Aqualab 4TE (Meter Group, Pullman, USA). I risultati sono stati espressi come media del valore di  $a_w$  registrato  $\pm$  deviazione standard.

#### 3.2.4. Determinazione del contenuto di acido lattico ed acido acetico

La concentrazione di acido lattico ed acido acetico è stata misurata con il D/L-Lactic Acid

(D-/L-Lactate) (Rapid) test kit e con l'Acetic Acid (Acetate Kinase Manuala Format) test kit, entrambi della compagnia Megazyme (Bray, Ireland).

La procedura per la determinazione del contenuto di acido lattico prevede:

- diluizione del campione: 0,1 mL di campione analizzato deve essere diluito a sufficienza in modo tale da 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 una maggiore quantità di campione oppure 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: si utilizzano le seguenti soluzioni: i) soluzione di Carrez 1, ottenuta solubilizzando 3,60 g di esacianoferrato di potassio in 100 mL di acqua distillata; ii) soluzione di Carrez 2, ottenuta solubilizzando 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 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 accuratamente. Si porta, quindi, a volume con acqua distillata per poi filtrare il tutto con carta da filtro;
- determinazione del contenuto di acido lattico: la soluzione filtrata viene pipettata nelle cuvette da analizzare, dopo aver inserito le soluzioni fornite dal kit. Viene eseguita la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 340 nm.

La procedura per la determinazione del contenuto di acido acetico prevede:

- diluizione del campione: 0,1 mL di campione analizzato deve essere diluito a sufficienza in modo tale da ottenere una concentrazione di acido acetico tra i 0,03 e 0,25 g/L. Nel caso in cui il valore risulti inferiore, occorrerà utilizzare una quantità maggiore di campione oppure 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: procedura analoga a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico;
- determinazione del contenuto di acido acetico: procedura analoga a quella indicata per la determinazione del contenuto di acido lattico.

Per ogni campione le misurazioni sono state effettuate in doppio e i risultati sono espressi come media di g di acido lattico o acetico per 100 g di prodotto  $\pm$  deviazione standard.

### 3.3. Analisi microbiologiche

#### 3.3.1. Conte vitali

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra, aliquote di 10 g di ciascun campione sono state addizionate a 90 mL di soluzione acquosa peptonata sterile (0,1% peptone p/v) e poste in un sacchetto Stomacher in condizioni asettiche. La sospensione è stata poi omogeneizzata con il dispositivo Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI) per 5 minuti a 260 rpm.

Sono state quindi effettuate diluizioni seriali decimali, da cui sono stati prelevati 1 mL per l'allestimento della semina per inclusione e 0,1 mL per l'allestimento della semina per spandimento, su terreni di coltura specifici:

i) **De Man Rogosa e Sharpe agar (MRS agar)**, addizionato di 250 mg/L di cicloesimide per prevenire la crescita di eumiceti: terreno di coltura parzialmente selettivo usato per promuovere la crescita dei lattobacilli.

Tutte le analisi sono state effettuate in duplicato tramite piastramento per inclusione. Le piastre sono state poi incubate a 37 °C per 48-72 ore.

Composizione del terreno MRS:

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

**Tabella 3.** Composizione del terreno di coltura MRS.

ii) **Violet Red Blue Glucose Agar (VRBGA)**: è un terreno selettivo differenziale, impiegato per enumerare ed isolare coliformi totali ed *Escherichia coli*. I sali biliari e il cristal violetto inibiscono la crescita dei Gram positivi, mentre il rosso neutro consente di distinguere i microrganismi fermentanti il lattosio da quelli che non fermentano questo disaccaride, grazie al viraggio dell'indicatore verso il rosso-viola e la precipitazione dei sali biliari come conseguenza dell'acidificazione del mezzo, dovuta alla fermentazione lattica operata dai microrganismi. L'identificazione delle due diverse categorie può essere effettuata grazie alla diversa morfologia delle colonie prodotte: i microrganismi fermentanti il lattosio producono colonie circolari di diametro inferiore a 0,5-2 mm, di colore rosso porpora; i microrganismi non fermentanti il lattosio formano, invece, colonie chiare che possono essere circondate da aloni verdastri dopo incubazione delle piastre a 37°C per 24 ore in aerobiosi.

Composizione del terreno VRBGA:

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

**Tabella 4.** Composizione del terreno di coltura VRBGA.

iii) **Mannitol Salt Agar (MSA)**: è un terreno di coltura selettivo e differenziale, utilizzato per l'enumerazione e l'isolamento di cocchi coagulasi negativi. Il terreno contiene un'elevata concentrazione di cloruro di sodio che inibisce la crescita di gran parte dei microrganismi, ad eccezione degli stafilococchi.

La fermentazione del mannitolo, con conseguente acidificazione del mezzo, provoca un viraggio dell'indicatore, ovvero il rosso fenolo, da rosso a giallo. I cocchi patogeni coagulasi-positivi crescono in maniera ottimale su questo terreno dando origine a colonie di colore giallo con alone dello stesso colore, mentre i cocchi coagulasi-negativi, non patogeni, capaci di emoagglutinazione, crescono in modo più limitato producendo piccole colonie con aloni porpora-rossastro a seguito di incubazione a 37°C per 24-48 ore in

aerobiosi.

Composizione del terreno MSA:

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

**Tabella 5.** Composizione del terreno di coltura MSA.

iv) **Slanetz and Bartley Agar (SBA):** formulato da Slanetz e Bartley nel 1957, utilizzato per l'enumerazione e l'isolamento degli enterococchi, le cui colonie appaiono di colore rosso, rosa o marrone. La sua composizione di ingredienti lo rende un terreno ricco in vitamine, sali minerali e aminoacidi essenziali per la crescita. Grazie alla presenza di sodio azide viene inibita la crescita di batteri Gram negativi. Le piastre vengono incubate per 24-48 ore a 37°C in aerobiosi.

Composizione del terreno SBA:

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

**Tabella 6.** Composizione del terreno di coltura SBA.

v) **Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar (YPD)** con aggiunta di 250 g/L di cloramfenicolo: è un terreno di coltura utilizzato per la crescita di vari tipi di lievito. Si tratta di un terreno ricco in nutrienti come gli aminoacidi. L'estratto di lievito è ottenuto dall'idrolisi di cellule di lievito ed è fonte di precursori di nucleotidi e vitamine, il peptone è una fonte di aminoacidi e il D-glucosio è la fonte di carbonio. Le piastre vengono

incubate a 25 °C per 24-48 ore.

Composizione del terreno YPD:

Componente	Concentrazione (g/l)
Estratto di lievito	10g/l
Peptone	20g/l
Glucosio	20g/l
Agar	18g/l

**Tabella 7.** Composizione terreno di coltura YPD

vi) **Pseudomonas Agar Base (PAB)** con aggiunta di CFC Supplement: è il terreno selettivo utilizzato per l'isolamento della specie patogena *Pseudomonas* spp. Il CFC Supplement è costituito da una miscela liofilizzata di centrimide, acido fusidico e cefaloridina, e viene impiegato per l'arricchimento selettivo del terreno.

Le piastre vengono incubate alla temperatura di 30 °C per 24-48 ore.

Composizione del terreno PAB:

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

**Tabella 8.** Composizione terreno di coltura PAB.

Le piastre contenenti un numero compreso tra 30 e 300 colonie a seguito del periodo di incubazione sono state utilizzate per la determinazione delle Unità Formanti Colonia (UFC) di tutti i generi microbici analizzati. La carica microbica è espressa come media dei logaritmi delle UFC  $\pm$  deviazione standard.

### 3.4. Analisi statistica

Il Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test (livello di significatività 0,05) è stato usato per valutare le differenze tra i campioni di insaccati fermentati portoghesi, 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).

## CAPITOLO 4

### 4. Risultati e discussione

#### 4.1. Analisi microbiologiche

I risultati delle conte vitali in piastra sui campioni di insaccati fermentati portoghesi sono riportati nella Tabella 9.

Campione	Lattobacilli	Stafilococchi	Enterococchi	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae	Eumiceti
	mesofili presunti	coagulasi negativi				
P1	7,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,78 ± 0,43 <sup>a</sup>	< 1,00	< 1,00	5,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
P2	5,62 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,94 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,89 ± 0,16 <sup>a</sup>	< 1,00	< 1,00	6,00 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Media Painho</b>	<b>6,42 ± 0,93<sup>a</sup></b>	<b>5,50 ± 0,65<sup>a</sup></b>	<b>1,83 ± 0,27<sup>b</sup></b>	<b>0,00 ± 0,00<sup>a</sup></b>	<b>0,00 ± 0,00<sup>a</sup></b>	<b>5,57 ± 0,50<sup>a</sup></b>
C1	6,07 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,04 <sup>a</sup>	< 1,00	< 1,00	< 1,00
C2	6,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,63 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,07 <sup>b</sup>	< 1,00	< 1,00	6,18 ± 0,31
<b>Media Cacholeira</b>	<b>6,13 ± 0,08<sup>a</sup></b>	<b>3,40 ± 0,28<sup>b</sup></b>	<b>4,28 ± 0,79<sup>a</sup></b>	<b>0,00 ± 0,00<sup>a</sup></b>	<b>0,00 ± 0,00<sup>a</sup></b>	<b>3,09 ± 3,57<sup>a</sup></b>

**Tabella 9. Determinazione della carica microbica.** Risultati delle conte vitali in piastra dei campioni di insaccati fermentati portoghesi. I valori sono espressi come media log UFC g<sup>-1</sup> ± deviazione standard. Per ogni campione dello stesso prodotto (P1-P2, C1-C2) e per ogni prodotto (*Painho de Porco Ibérico*, *Cacholeira de Assar*), le medie seguite da lettere diverse sono significativamente differenti (P < 0,05).

Le analisi microbiologiche mostrano una certa variabilità statistica tra i due prodotti, dovuta presumibilmente sia alla differenza di materie prime ed altri ingredienti utilizzati sia al diverso processo di trasformazione a cui sono sottoposti, oltretutto all'impianto in cui vengono trasformati.

Essendo, questi salami, prodotti attraverso metodi tradizionali e trasformati principalmente grazie alle attività metaboliche di specie microbiche autoctone, la qualità e la sicurezza del prodotto finito possono essere variabili. Inoltre, ci sono sostanziali variazioni al livello del processo produttivo, come l'utilizzo di materie prime, l'affumicatura, la maturazione, e i parametri di tempo e temperature scelti (Elias Fraqueza & Barreto, 2006).

Ciò rende fondamentale l'impiego di sostanze che favoriscono la conservazione del prodotto finale, e sostanze in grado di inibire l'eventuale microflora alterativa e patogena. Tali composti includono il cloruro di sodio (sale), nitriti, nitrati e polifosfati, figuranti

nell'elenco degli ingredienti degli insaccati del presente studio di tesi, e ancora, pasta di peperone rosso e aglio, condimenti usati tradizionalmente. Questi ultimi, risultano particolarmente importanti per l'acquisizione di caratteristiche organolettiche che contribuiscono a garantire la tipicità del prodotto. Inoltre, studi scientifici dimostrano come questi ingredienti siano in grado di svolgere un ruolo importante nell'inibizione di microrganismi patogeni ed alterativi. Perlopiù, sembra che tali condimenti favoriscano la crescita dei batteri lattici, promuovendo la fermentazione lattica (Marcos *et al.*, 2016).

In entrambi i prodotti è stata rilevata una comunità microbica attiva, composta prevalentemente da batteri lattici mesofili, cocchi coagulasi negativi, enterococchi ed eumiceti.

L'enumerazione di lattobacilli mesofili presunti nel *Painho de Porco Ibérico* ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due campioni: nel campione P1 è stato riscontrato un valore di  $7,21 \pm 0,04$  Log UFC g<sup>-1</sup>, mentre nel campione P2 il valore è stato di  $5,62 \pm 0,21$ . Tale differenza potrebbe essere dovuta alla modalità di prelievo del campione. In tal caso, si può ipotizzare che il campione P2 sia stato prelevato nel punto più aderente al budello, dove generalmente si ne trova una concentrazione minore di batteri lattici.

I valori del presente studio di tesi, comunque, risultano inferiori a quanto pubblicato da Fernandez-Lopez *et al.* (2008), Capita *et al.* (2005), e Ferreira-Barbosa *et al.* (2006), negli studi relativi agli insaccati fermentati tradizionali di origine spagnola e portoghese, dove le conte di batteri lattici raggiungono valori superiori a 8 log UFC g<sup>-1</sup>.

L'enumerazione di lattobacilli mesofili presunti nei due campioni di *Cacholeira de Assar*, C1 e C2, non ha mostrato particolari differenze statisticamente significative. I valori riportati si attestano infatti a  $6,07 \pm 0,07$  per il campione C1 e  $6,18 \pm 0,05$  Log UFC g<sup>-1</sup> per il campione C2. Le conte ottenute sono risultate leggermente inferiori a quelle riportate per *Paio Preto* e *Chourico Preto* (salami fermentati portoghesi di carne suina, caratterizzati dall'aggiunta di sangue tra gli ingredienti), comprese tra 6,7 e 8,2 Log UFC g<sup>-1</sup> (Laranjo *et al.*, 2017).

I cocchi coagulasi negativi rappresentano il secondo gruppo batterico dominante, dopo i batteri lattici. Tale gruppo microbico risulta necessario alla riduzione di nitrati a nitriti (presenti nel *Painho de Porco Ibérico*), favoriscono una maggiore stabilità del colore e prevengono l'irrancidimento degli acidi grassi liberi ad opera dell'ossigeno. Inoltre, grazie alla loro intensa attività sia lipolitica che proteolitica, rilasciano vari composti aromatici con un conseguente impatto positivo sull'aroma e sulle caratteristiche organolettiche del

prodotto (Lisazo *et al.*, 1999; Metaxopoulos *et al.*, 2001).

Le conte vitali dei cocchi coagulasi negativi del *Painho de Porco Ibérico* oscillano tra  $6,07 \pm 0,01$  (campione P1) e  $4,94 \pm 0,02$  (campione P2). Tale differenza statisticamente significativa potrebbe essere riconducibile all'ambiente maggiormente acido del campione P2, dato che tale gruppo microbico risulta lievemente acido-tollerante (Papamanoli *et al.*, 2002). Quanto appena descritto potrebbe essere confermato dai diversi valori di acidità totale titolabile. Infatti, il campione P1 ha fatto registrare livelli minori di acidità ( $9,8 \pm 1,1$  mL NaOH 0,1 M), mentre il campione P2 presenta un'acidità maggiore ( $12,04 \pm 0,9$  mL NaOH 0,1 M).

Per quanto riguarda l'enumerazione dei cocchi coagulasi negativi nei campioni di *Cacholeira de Assar*, dai valori ottenuti non sono emerse differenze statisticamente significative. Le conte vitali registrate sono state di  $3,18 \pm 0,14$  per il campione C1 e di  $3,63 \pm 0,07$  per il campione C2.

I risultati ottenuti dalla conta vitale dei cocchi coagulasi negativi sono simili a quelli riportati per il *Paio Preto* ( $3,3$  Log UFC g<sup>-1</sup>) e *Chourico Preto* ( $4,0$  Log UFC g<sup>-1</sup>) nello studio di Laranjo *et al.* (2017), relativo alla caratterizzazione di insaccati fermentati tradizionali portoghesi a base di sangue.

Sia nei campioni di *Painho de Porco Ibérico* che di *Cacholeira de Assar*, le conte di Enterobacteriaceae e di Pseudomonadaceae sono risultate sempre sotto i limiti di rilevazione ( $<1,0$  Log UFC g<sup>-1</sup>). I vari metaboliti, in particolar modo l'acido lattico, rilasciati dai LAB e la conseguente decrescita del pH, determinano generalmente la riduzione e l'inibizione di tali gruppi microbici nei prodotti carnei fermentati. Inoltre, le condizioni di anaerobiosi e salinità che si instaurano negli insaccati durante il processo di asciugatura contribuiscono alla loro inibizione (Lisazo *et al.*, 1999; Moretti *et al.*, 2004). L'assenza di Enterobacteriaceae e di Pseudomonadaceae, evidenziata dalle conte vitali, determina una certa sicurezza del prodotto dal punto di vista igienico-sanitario. In particolare, la presenza di microorganismi ascritti alla famiglia delle Enterobacteriaceae rappresenta un parametro di scarsa igiene e un pericolo per la salute del consumatore, in quanto tale famiglia include i generi potenzialmente patogeni di *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ed *Escherichia* (Capita *et al.*, 2006; Lisazo *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda il gruppo degli enterococchi, i campioni di *Painho de Porco Ibérico* hanno mostrato valori di  $1,78 \pm 0,43$  (campione P1) e  $1,89 \pm 0,16$  Log UFC g<sup>-1</sup> (campione P2), mentre i campioni di *Cacholeira de Assar* hanno mostrato valori più elevati di  $4,97 \pm 0,04$  (campione C1) e  $3,60 \pm 0,79$  (campione C2) Log UFC g<sup>-1</sup>. Il maggior numero di

enterococchi rilevati nel campione C1 può essere riconducibile alle diverse condizioni operative del processo produttivo che potrebbero aver favorito la proliferazione di tali microrganismi, i quali potrebbero aver contribuito all'elevato valore di acidità totale titolabile in seguito ad un'intensa attività metabolica.

Gli enterococchi, ascritti al gruppo microbico dei batteri lattici, sono microrganismi ubiquitari presenti nel suolo, nelle acque, nei vegetali e, in modo particolare, nel tratto digerente di animali a sangue caldo.

Esistono opinioni discordanti circa il loro ruolo nella produzione di insaccati fermentati. In dettaglio, la presenza di tale gruppo microbico può contribuire positivamente alle caratteristiche sensoriali dei prodotti finiti grazie alla loro attività proteolitica e lipolitica, ma può anche comprometterne la sicurezza in caso di proliferazione di ceppi patogeni opportunisti (Holley *et al.*, 1988). Inoltre, negli insaccati fermentati, gli enterococchi possono portare alla produzione di amine biogene, come cadaverina e putrescina, attraverso la decarbossilazione di aminoacidi (Martin *et al.*, 2006; Belleggia *et al.*, 2020). I risultati sull'enumerazione degli eumiceti nel *Painho de Porco Ibérico* hanno raggiunto la media di  $5,57 \pm 0,50$  Log UFC g<sup>-1</sup>.

Per quanto riguarda l'enumerazione degli eumiceti nella *Cacholeira de Assar*, si è evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due campioni: solo in uno dei due campioni, ovvero il campione C2, è stata riscontrata la presenza di eumiceti, con  $6,18 \pm 0,31$  Log UFC g<sup>-1</sup>. Ciò potrebbe essere attribuito a differenze che possono interessare i microrganismi naturalmente presenti nella materia prima, e le condizioni ambientali e di manipolazione del prodotto durante le varie fasi del processo produttivo. Oltre che come fattore causale del più basso valore di  $a_w$ , si può ipotizzare che la totale assenza di eumiceti nel campione C1 di *Cacholeira de Assar* possa essere causa dell'elevato valore di TTA ( $21,2 \pm 1,8$  mL NaOH 0.1 M), e, in particolar modo, del valore di acido lattico ( $1,080 \pm 0,023$  g 100 g<sup>-1</sup>), in quanto quest'ultimo viene generalmente metabolizzato dagli eumiceti in fase di maturazione.

## 4.2. Analisi chimico-fisiche

I risultati sui parametri chimico-fisici dei campioni di insaccati fermentati portoghesi sono riportati nella Tabella 10.

Campione	Attività dell'acqua ( $a_w$ )	pH	Acidità totale titolabile (mL NaOH 0,1 M)	Acido lattico (g 100g <sup>-1</sup> )	Acido acetico (g 100g <sup>-1</sup> )
P1	0,866 ± 0,001 <sup>a</sup>	5,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	9,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,952 ± 0,427 <sup>a</sup>	0,019 ± 0,004 <sup>a</sup>
P2	0,853 ± 0,001 <sup>b</sup>	5,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	12,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,188 ± 0,068 <sup>a</sup>	0,018 ± 0,002 <sup>a</sup>
<b>Media Painho</b>	<b>0,859 ± 0,001<sup>a</sup></b>	<b>5,16 ± 0,01<sup>a</sup></b>	<b>11,1 ± 1,7<sup>a</sup></b>	<b>1,070 ± 0,284<sup>a</sup></b>	<b>0,018 ± 0,003<sup>a</sup></b>
C1	0,808 ± 0,003 <sup>b</sup>	5,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	21,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	1,080 ± 0,023 <sup>a</sup>	0,025 ± 0,004 <sup>a</sup>
C2	0,918 ± 0,001 <sup>a</sup>	5,07 ± 0,03 <sup>b</sup>	12,9 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,894 ± 0,332 <sup>a</sup>	0,003 ± 0,001 <sup>b</sup>
<b>Media Cacholeira</b>	<b>0,863 ± 0,063<sup>a</sup></b>	<b>5,15 ± 0,10<sup>a</sup></b>	<b>17,0 ± 4,9<sup>a</sup></b>	<b>0,987 ± 0,220<sup>a</sup></b>	<b>0,014 ± 0,013<sup>a</sup></b>

**Tabella 10. Parametri fisico-chimici di Painho de Porco Ibérico e Cacholeira de Assar.**

I valori sono espressi come media ± deviazione standard. Per ogni campione dello stesso prodotto (P1-P2, C1-C2) e per ogni prodotto (*Painho de Porco Ibérico*, *Cacholeira de Assar*), le medie seguite da lettere diverse sono significativamente differenti ( $P < 0,05$ ).

Le condizioni di fermentazione e di maturazione degli insaccati fermentati possono variare ampiamente in termini di temperatura, durata e umidità relativa. Quest'ultimo fattore, in particolare, influenza il contenuto di acqua presente nel prodotto finale.

Per quanto riguarda l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) dei due prodotti portoghesi analizzati nel presente studio di tesi, la media dei valori ottenuti è stata di  $0,859 \pm 0,001$  e  $0,863 \pm 0,063$ , rispettivamente, per i campioni di *Painho de Porco Ibérico* e di *Cacholeira de Assar*. I risultati sono in perfetta linea con i valori di  $a_w$  medi registrati per gli insaccati tradizionali in Francia, Spagna e Portogallo dello studio di Talon *et al.* (2007), compresi tra 0,83 e 0,93.

Per quanto riguarda i valori di  $a_w$  dei campioni di *Cacholeira de Assar*, i risultati hanno mostrato una netta discrepanza, con  $0,808 \pm 0,003$  per il campione C1 e  $0,918 \pm 0,063$  per il campione C2. Tale variazione potrebbe essere causata da una diversa distribuzione della microflora superficiale sviluppata in fase di maturazione che potrebbe aver provocato una più rapida perdita di acqua nel punto di prelievo del campione C1. Il campione C2, al contrario presenta un valore maggiore di  $a_w$ . Ciò potrebbe essere dovuto all'effetto combinato di eventuali eumiceti presenti sul budello, in grado di limitare il disseccamento del prodotto, e dell'uso di polifosfati nella formulazione, in grado di aumentare la capacità

di legare acqua nelle carni fermentate (Pearson & Gillet, 1996; Gonzales-Barron *et al.*, 2015).

Per quanto riguarda il pH, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i campioni esaminati di entrambi i prodotti, che hanno raggiunto una media complessiva di  $5,16 \pm 0,01$  per i campioni di *Painho de Porco Ibérico*, e di  $5,15 \pm 0,10$  per i campioni di *Cacholeira de Assar*.

I valori di pH di entrambi i prodotti portoghesi sono in linea con quanto ottenuto da altri insaccati fermentati dell'area mediterranea, che presentano un pH che si attesta tra 5,3 e 6,2 (Talon *et al.*, 2007), e a  $5,22 \pm 0,07$  (Ferdandez-Lopez *et al.*, 2008).

I valori di acidità totale titolabile (TTA) dei campioni di *Painho de Porco Ibérico* hanno raggiunto  $9,8 \pm 1,1$  (campione P1) e  $12,4 \pm 0,9$  (campione P2) mL di NaOH 0,1 M.

Per quanto riguarda i campioni di *Cacholeira de Assar*, i risultati ottenuti sono discordanti, infatti hanno raggiunto  $21,2 \pm 1,8$  (campione C1) e  $12,9 \pm 0,8$  (campione C2) mL di NaOH 0,1 M.

La determinazione degli acidi organici nei campioni di insaccati fermentati portoghesi ha mostrato una netta differenza tra le concentrazioni di acido lattico e quella di acido acetico. I batteri lattici, durante l'intero processo fermentativo, producono discrete quantità di acidi organici, in particolare acido lattico, che riducono il pH e favoriscono di conseguenza la sicurezza igienico-sanitaria e la stabilità dei prodotti finali.

La media dei valori registrati di acido lattico è stata  $1,070 \pm 0,284$  g e  $0,987 \pm 0,220$  g/100 g, contro  $0,018 \pm 0,003$  g e  $0,014 \pm 0,013$ g/100 g di acido acetico, rispettivamente, per i campioni di *Painho de Porco Ibérico* e di *Cacholeira de Assar*. È noto che, negli insaccati fermentati, sia l'acido lattico che acetico sono responsabili della definizione delle caratteristiche sensoriali del prodotto finale (Belleggia *et al.*, 2020), con il primo presente generalmente in maggiore concentrazione poiché rappresenta il prodotto principale del metabolismo dei batteri lattici (Milićević, *et al.*, 2019).

La differenza dei valori ottenuti nella determinazione dell'acidità titolabile, per i campioni C1 e C2 di *Cacholeira de Assar*, viene confermata dai valori di acido lattico degli stessi, che si attestano a  $1,080 \pm 0,023$ , per il campione C1, e a  $0,894 \pm 0,332$  g/100 g, per il campione C2. I risultati ottenuti potrebbero essere dovuti alla differente microflora sviluppatasi in fase di maturazione, probabilmente riconducibile alle diverse condizioni del processo produttivo.

## CAPITOLO 5

### 5. Conclusioni

La produzione di salami fermentati tradizionali fa affidamento sulla naturale contaminazione della microflora ambientale, che potrebbe insorgere durante la macellazione e aumenta durante i processi di manipolazione e trasformazione. Il presente studio di Tesi si incentra sulla caratterizzazione del microbiota del prodotto finale di insaccati fermentati portoghesi, e non sull'origine della microflora riscontrata, offrendo un primo sguardo sulla composizione dei diversi gruppi microbici presenti e sulla determinazione di fattori chimico-fisici di base.

Attraverso le analisi condotte, si è dimostrato che il microbiota degli insaccati portoghesi tradizionali fermentati considerati è caratterizzato principalmente da lattobacilli mesofili, cocchi coagulasi negativi, eumiceti ed enterococchi.

I batteri lattici e i cocchi coagulasi negativi si confermano quindi le popolazioni microbiche maggiormente rappresentate negli insaccati fermentati. La loro duplice funzione, relativa alla trasformazione del profilo organolettico-sensoriale e al miglioramento della qualità igienico-sanitaria, risulta fondamentale per l'ottenimento dei prodotti finali.

A seguito dell'analisi dei dati ottenuti, si può assumere inoltre che il ruolo di enterococchi ed eumiceti all'interno degli insaccati fermentati portoghesi risulti più marginale, soprattutto nella produzione di *Painho de Porco Ibérico*. Tuttavia, tali gruppi microbici potrebbero influire sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finale, grazie alle loro attività di proteolisi e/o lipolisi.

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

In conclusione, vista la scarsità di riferimenti scientifici ad hoc riguardanti i prodotti tradizionali portoghesi del presente studio di Tesi, è auspicabile la conduzione di ulteriori ricerche, al fine di caratterizzare in modo più approfondito e dettagliato i diversi profili chimico-fisici e microbiologici dei prodotti finali, così come la loro evoluzione durante i processi produttivi.

## BIBLIOGRAFIA

Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T., Teixeira, P. 2008. Characterization of microbial population of 'Alheira' (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. *Journal Applied Microbiology* 105(6):2187-94.

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(2):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., and Solignat, G. 2000. Dry sausages ripening: influence of thermohygro-metric conditions on microbiological, chemical and physicochemical characteristics. *Food Research International* 33:161–170.

Belleggia, L., Ferrocino, I., Reale, A., Boscaino, F., Di Renzo, T., Corvaglia, M.R., Cocolin, L., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Clementi, F., Aquilanti, L., Osimani, A. 2020. Portuguese cacholeira blood sausage: A first taste of its microbiota and volatile organic compounds. *Food Research International* 136.

Capita R., Llorente-Marigomez S., Prieto M., Alonso-Calleja C., “Microbiological profiles, pH, and titratable acidity of chorizo and salchichon (two Spanish dry fermented sausages) manufactured with ostrich, deer, or pork meat”, *Journal of Food Protection*, 69, 1183-1189 (2006).

Cappelli, P., Vannucchi, V. 3a Ed., 2016. *Chimica degli alimenti, conservazione e trasformazione*. Zanichelli editore.

Cattaneo, P., Stella, S., Cozzi, M. (2003). Variazioni nella capacità di ritenzione idrica della carne bovina in relazione alla provenienza. *Large Animals Review*, Anno 9, 6.

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

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the 16S rRNA Gene V1 Region To Monitor Dynamic Changes in the Bacterial Population during Fermentation of Italian Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11).

Coloretti, F., Grazia, L., Zambonelli, C. 2007. Salami's microorganisms and their control. *Industrie Alimentari* 46(475):1242-1250+1253.

Comi, G., Citterio, B., Manzano, M., Cantoni, C., Debertoldi, M. (1992). Evaluation and

characterization of micrococcaceae strains in italian dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft*, 72 (12), 1679-1683.

Drosinos, E. H., M. Mataragas, N. Xiraphi, G. Moschonas, F. Gaitis, and J. Metaxopoulos. 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69:307–317.

Elias M, Fraqueza MJ and Barreto A. 2006. Typology of the traditional sausage production from Alentejo. *Rev Port Zootec*

Esteves, A., Judas, I., Patarata, L., Silva, J.A., Martins, C. 2008. A comparison of the physicochemical and sensory characteristics of alheira samples from different-sized producers. *Meat Science* 79(1):131-138

Farris, G. A. I salumi. In: Gobbetti, M., Vincenzini, M. a cura di *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Milano: Casa editrice Ambrosiana, (2012).

Fraqueza, M.J., Laranjo, M., Alves, S., Fernandes, M.H., Agulheiro-Santos, A.C., Fernandes, M.J., Potes, M.E., Elias, M. 2006. Typology of the traditional sausage production from Alentejo.

Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. and Pérez-Alvarez, J.A. 2008. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science* 80(2):410-417.

Ferreira, B., J. Barboza, S. Vendeiro, A. Mota, J. Silva, M. Monteiro, T. Hogg, P. Gibbs, and P. Teixeira. 2006. Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors related to food safety. *Meat Science* 73: 570 – 575.

Galli Volonterio, A. *Microbiologia degli alimenti*. 2005. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.

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

Holley, R. A., A. M. Lammerding, and F. Tittiger. 1988. Occurrence and significance of streptococci in fermented Italian type dry sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 7:63–72.

Laranjo, M., Gomes, A., Agulheiro-Santos, A.C., Potes, M.E., Cabrita, M.J., Garcia, R., Rocha, J.M., Roseiro, L.C., Fernandes, M.J., Fraqueza, M.J., 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.

Larrouture, C., Ardaiillon, V., Pépin, M., & Montel, M. C (2000). Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an

HPLC method. *Food Microbiology*, 17, 563-570.

Lawrie R. A., "Scienza della carne", Edizione Italiana a cura di Ghizzolini R., EDAGRICOLE, Bologna (1983).

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

Lizaso, G., J. Chasco, and M. J. Beriain. 1999. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiol.* 16:219–228.

Marcos, C., Viegas, C., de Almeida, A.M., Guerra, M.M. 2016. Portuguese traditional sausages: different types, nutritional composition and novel trends. *Journal of Ethnic Foods* 3(1):51-60.

Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., & Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2):148–158.

Metaxopoulos, L., L. Samelis, and M. Papadelli. 2001. Technical and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Ital. Journal Food Science* 13:3–18.

Milićević, B., Danilović, B., Džinić, N., & Savić, D. (2019). Changes in the organic acids content during the production of the petrovac sausage. *Advanced technologies*, 7(2), 41–45.

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.

Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki, E. 2002. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology* 19(5):441-449.

Pearson, A.M., Gillet, T.A. 1996. *Processed Meats*. Springer US.

Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barbera, E., Gago-Gago, M.A., Jesus Pagan, M., Rodriguez-Lopez, A., Ballester, A., Aranda-Catala, V. 1992. Colour study of Spanish "Salchichon" during fermentation and ripening. 479-482.

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

Roseiro, L.C., Santos, C., Sol, M., Borges, M.J., Anjos, M., Gonçalves, H., Carvalho, A.S. 2008. Proteolysis in Painho de Portalege dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science* 79(4):784-794.

Santos, C., Roseiro, Silva, Elias. 2005. Changes on biogenic amine profiles in “Painho de Portalegre” fry fermented sausage from starter culture addition. 51st International Congress of Meat Science and Technology, Baltimore, Maryland (USA):1046-1050.

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

Urso, R., Comi, G. and Cocolin, L. 2006. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 29(8): 671-680.

Zambonelli, C., Papa, F., Romano, P., Suzzi, G., & Grazia, L. (1992). *Microbiologia dei salumi*. Bologna - Ed agricole.