

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Effetti sul microbiota intestinale della sostituzione dei nitriti con
antiossidanti naturali in salami sperimentali

Relazione finale in

MICROBIOLOGIA ALIMENTARE (c.i. MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI)

Marzo 2022

Relatore

Prof. Gianotti Andrea

Presentata da

Beatrice Siboni

Matricola n°. 927500

Correlatori

Dott. Lorenzo Nissen

Dott. Flavia Casciano

Sommario

1. Introduzione	4
1.1 Pregi e difetti del consumo di carni rosse e trasformate	4
1.2 Rischi associati al consumo di carni rosse e trasformati	5
1.3 Riformulazione di prodotti a base di carne processata	7
1.3.1 Arricchimento di prodotti carnei con fibra alimentare	9
1.3.2 Riformulazione di prodotti carnei fermentati con probiotici	12
1.3.3 Arricchimento di prodotti carnei con derivati vegetali e vitamine	14
1.3.4 Arricchimento dei prodotti carnei con calcio	16
1.4 Effetti della carne sul microbiota intestinale	18
1.4.1 Effetti del consumo di carne sul Rapporto <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	20
1.4.2 Effetti della carne processata sul microbiota intestinale – studi <i>in vivo</i>	21
1.4.3 Effetti della carne processata sul microbiota intestinale – studi <i>in vitro</i>	22
1.5 Effetti della carne relativamente agli indicatori metabolici	22
1.5.1 Effetti della carne processata sulla produzione di metaboliti microbici benefici	23
1.5.2 Effetti della carne processata sulla produzione di indicatori metabolici microbici negativi	26
1.6 Il progetto Mime4Health	30
1.7 MICODE	31
2. Obiettivo e scopo	32
3. Materiali e metodi	32
3.1 Donatori di campione fecale	32
3.2 Materiali	33
3.3 Campioni analizzati	33
3.4 Digestione gastrica e duodenale in vitro	34
3.5 Fermentazione colonica in coltura batch e raccolta campioni	34
3.6 Estrazione di DNA genomico	36
3.7 Quantificazione del DNA estratto	37
3.8 PCR	37
3.9 Costruzione degli standard genici	39
3.10 Real Time quantitativa dei campioni estratti	40
3.11 Pipeline dell'attività sperimentale	41
3.12 Analisi del volatiloma	42
3.13 Analisi statistica	43
4 Risultati	43
4.1 Analisi molecole benefiche	43
4.2 Molecole negative	45
4.3 Analisi del microbiota	47

4.3.1 Core microbiota.....	47
4.3.2 Rapporto <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	48
4.3.3 Batteri benefici.....	49
4.3.4 Batteri opportunisti	52
4.3.5 Competizione opportunisti/probiotici	53
5 Conclusioni.....	54
6 Bibliografia.....	55
7. Sitografia.....	75

1. Introduzione

La carne è ricca di importanti sostanze nutritive (Williams, 2007) ed è stata tradizionalmente considerata parte della tipica dieta occidentale. Le prove testimoniano che il consumo di carne abbia svolto un ruolo importante nell'evoluzione umana (Leroy, 2019). Tuttavia, recentemente il consumo di carne ha attirato l'attenzione per motivi sanitari, ambientali ed etici, pertanto, da quanto emerso in numerosi studi, risulta più raccomandabile ridurre il consumo (Leroy, 2019; Willett et al., 2019). Siamo quindi di fronte a un momento storico in cui è sempre più urgente considerare formulazioni di prodotti a base di carne più salutari e sostenibili, assicurando strategie che garantiscano l'inclusione della carne in una dieta sana e nutriente.

Il salame è una salsiccia ottenuta con fermentazione secca costituita da impasti di carni magre e tessuti adiposi combinati con sali, nitrato (indurente), zuccheri, spezie e altri ingredienti non a base di carne inseriti in involucri naturali o sintetici. I salami acquisiscono le loro proprietà (sapore, consistenza, colore, ecc.) attraverso un processo di fermentazione, in cui sono coinvolti principalmente batteri lattici e stafilococchi coagulasi-negativi (FAO, 2017). Il salame è generalmente considerato all'interno di una dieta come un alimento che apporta uno squilibrio nutritivo dovuto all'alto contenuto di grassi e sale e alla mancanza di molecole bioattive, come composti fenolici e altri fitochimici (Martínez et al., 2014), ma resta comunque un prodotto tradizionalmente consumato in tutto il mondo (Blaiotta et al., 2018). Pertanto, vi è un interesse significativo per migliorare le proprietà nutrizionali del salame, ad esempio, utilizzando batteri probiotici come a starter per la fermentazione (Giello et al., 2018), o aggiungendo diversi tipi di composti bioattivi alla formulazione dell'insaccato (dos Santos et al., 2012).

1.1 Pregi e difetti del consumo di carni rosse e trasformate

La carne rossa e i suoi trasformati, forniscono importanti micro e macronutrienti come parte della dieta dell'uomo. Sono preziose fonti di proteine altamente digeribili e forniscono tutti gli aminoacidi essenziali, vitamina B12, vitamina B6 e niacina, oltre a minerali, tra cui zinco, selenio e ferro altamente biodisponibile legato all'eme (Williams, 2007). Infatti, la biodisponibilità del ferro legato all'eme è circa 5 volte superiore al ferro non eme da fonti vegetali (Czerwonka & Tokarz, 2017). Tuttavia, l'impatto del consumo della carne e dei suoi trasformati sulla salute umana ha attirato l'attenzione della comunità scientifica, in quanto si sospetta che un'assunzione elevata di questi prodotti aumenti il rischio di sviluppo di alcuni tipi di cancro (Gonzalez et al., 2006; Vieira et al., 2017). In particolare, il cancro colon-rettale (CRC) riceve attenzione come una malattia

potenzialmente provocata dal consumo di carni rosse e lavorate (Chan et al., 2011; Vieira et al., 2017; Zhao et al., 2017). L'Agenzia Internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), organo di ricerca dell'organizzazione mondiale della sanità (OMS), ha valutato la cancerogenicità di carni rosse e dei trasformati, classificando le prime come “probabilmente cancerogene per l'uomo”, e le seconde come “cancerogene per l'uomo” (Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), 2015). Tuttavia, un certo numero di studi trova solo associazioni settimanali, riportando un'elevata eterogeneità e una possibile influenza di fattori fuorvianti (Alexander et al., 2011, 2015). Inoltre, una recente ampia meta-analisi ha concluso che la riduzione del rischio di mortalità per cancro, quando si riduce l'assunzione di carne rossa di 3 porzioni per settimana, sia minore (Han et al., 2019). Alla luce di quanto emerso fino ad ora, da un lato carne rossa o lavorata possono contribuire a fornire micro e macronutrienti vitali, ma un apporto elevato può dar luogo ad un aumento del rischio di malattie. Inoltre, gli studi hanno indicato che i mangiatori di carne tendono a non essere disposti a cambiare i loro comportamenti legati al loro consumo di carne (Valli et al., 2019). Pertanto, la riformulazione dei prodotti a base di carne potrebbe essere un approccio concepibile per produrre prodotti a base di carne più sani (Bis-Souza et al., 2019), mitigando così i potenziali effetti dannosi indotti dalla carne sull'omeostasi del colon.

1.2 Rischi associati al consumo di carni rosse e trasformati

Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare il possibile legame tra un elevato apporto di carni rosse e lavorate e un aumento del rischio CRC. In particolare, la formazione endogena di composti N-nitroso cancerogeni (NOC) così come la perossidazione lipidica sono state oggetto di studio (Corpet, 2011; Demeyer et al., 2015) (Fig. 1).

La carne rossa contiene alte quantità di eme (Schwartz & Ellefson, 1985), e questo composto è stato suggerito svolga un ruolo cruciale nella stimolazione della formazione di NOC e perossidazione lipidica (Bastide et al., 2015; Cross et al., 2003). È stato riscontrato che il consumo di carne rossa aumenta, in modo dose-dipendente, la concentrazione di NOC nelle feci (Bingham et al., 2002; Hughes et al., 2001). Sono varie le vie che possono dar luogo a composti nitrosi formati per via endogena. Queste includono la formazione catalizzata da acido, in particolare nell'ambiente acido dello stomaco, vie batteriche catalizzate e pathways mediati a livello cellulare (Hughes et al., 2000; Mirvish, 1995).

Il termine composti N-nitroso apparenti totali (ATNC) è spesso usato per descrivere la formazione di composti nitrosi a causa di una mancanza di specificità del metodo di determinazione comunemente usato. Tuttavia, ora i nitrosotioili e i composti del ferro nitrosilico possono essere determinati

indirettamente ed è stato scoperto che questi composti contribuiscono in modo significativo alla formazione indotta dalla dieta di composti nitrosi (Kuhnle et al., 2007). Durante le fasi di lavorazione delle carni o di trattamento termico, possono anche formarsi NOC che coinvolgono la polimerizzazione dei nitriti e quindi essere contenuti all'interno dei prodotti finali (Demeyer et al., 2015). I NOC sono in grado di alchilare il DNA, che porta alla formazione di addotti di DNA pro-mutageni. Questo potrebbe indurre mutazioni del tipo G:C → A:T, aumentando il rischio di carcinogenesi (Gottschalg et al., 2007; Mirvish, 1995). È stato scoperto in precedenza che la formazione dell'addotto DNA pro-mutageno, O6-metil-2-deossiguanosina, aumenta nei topi e nell'uomo dopo il consumo di una dieta ricca di carne rossa (Le Leu et al., 2015; Winter et al., 2011). Gli studi sugli animali hanno anche mostrato un aumento dei marcatori di ossidazione dei lipidi in seguito al consumo di una dieta ricca di carni rosse (Pierre et al., 2004; Toden et al., 2010; Van Hecke et al., 2016). Alcuni prodotti finali della perossidazione lipidica come la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossinonenale (4-HNE) possono indurre la formazione di addotti del DNA e il 4-HNE ha la capacità di indurre effetti citotossici (Bastide et al., 2011; Nair et al., 2007). La perossidazione lipidica indotta dalla carne, è stata associata alla formazione di foci impoverite di mucina (MDF) e “aberrant crypt foci”(ACF) in ratti in cui è stata indotta la carcinogenesi (Pierre et al., 2004, 2008). MDF e ACF sono presunte lesioni precancerose utilizzate come biomarcatori di cancerogenesi del colon in modelli che impiegano animali in cui è indotta la carcinogenesi (Caderni et al., 2003).

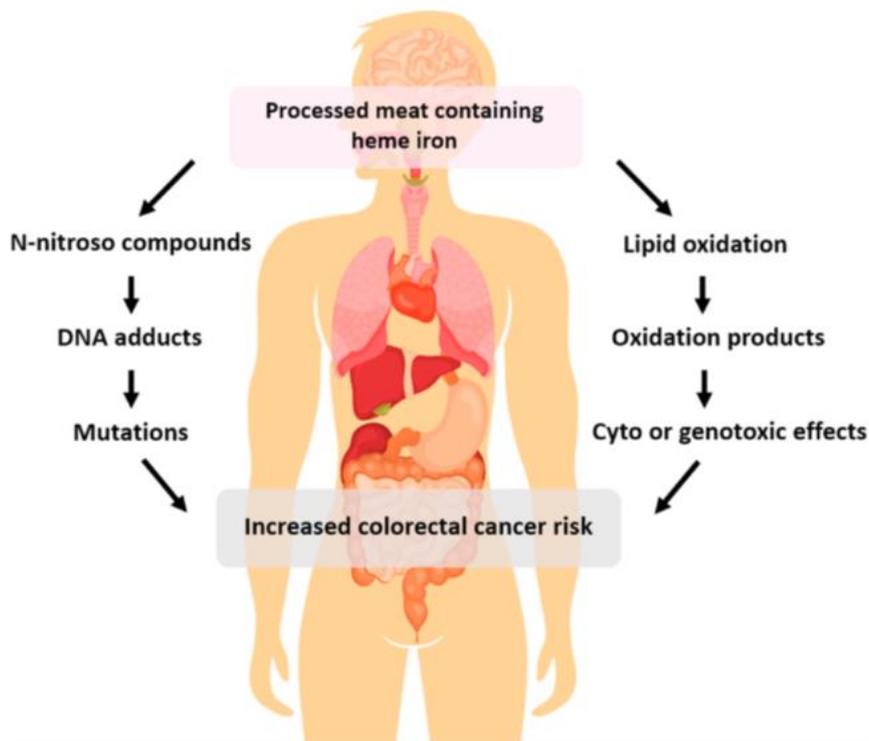


Fig. 1. Meccanismi suggeriti che spiegano la possibile associazione tra consumo di carne rossa e lavorata e cancro del colon-retto (fonte dell'illustrazione: Colourbox.dk).

1.3 Riformulazione di prodotti a base di carne processata

Nel corso degli anni, numerosi studi hanno investigato la riformulazione di prodotti a base di carne e l'incorporazione di ingredienti funzionali, nel tentativo di sviluppare prodotti a base di carne più sani. La maggior parte di questi studi si è concentrata sulla valutazione di attributi fisico-chimici e sensoriali del prodotto (Beriain et al., 2011; de Carvalho et al., 2020, do Amaral et al., 2015; Hjelm et al., 2019; Sayas-Barber'a et al., 2012; Vargas-Ramella, Munekata, et al., 2020; Vargas-Ramella, Pateiro, et al., 2020).

Studi che valutano direttamente gli esiti relativi alla salute a seguito del consumo di prodotti di carne riformulata sono più scarsi e si sono concentrati prevalentemente sulla riformulazione di prodotti a base di carne con l'obiettivo di migliorare il profilo degli acidi grassi (De Smet & Vossen, 2016). Tuttavia, di recente, stanno emergendo indagini su prodotti riformulati a base di carne, con ridotti potenziali effetti nocivi sul colon. Da quanto emerso in numerosi studi, l'incorporazione degli ingredienti e composti alimentari suggeriti con effetti benefici sulla salute del colon in prodotti a base di carne trasformata, potenzialmente controbilanciano i possibili effetti nocivi indotti dalla carne nel tratto gastrointestinale (Tabella 1).

Tabella 1 Studi degli effetti della carne rossa trasformata arricchita sulle risposte nel tratto gastrointestinale. ATNC, composti N-nitroso totali apparenti; DHN-MA, acido 1,4-diidrossinonano mercapturico; FW, acqua fecale; GPX, glutazione perossidasi; MDF, foci impoveriti di mucina; SCFA, acidi grassi a catena corta; TBARS, sostanza reattiva all'acido tiobarbiturico.

Prodotto carneo	Studio	Principali risultati	Riferimenti
<i>Arricchimento con fibra alimentare</i>			
Salsicce fermentate a secco addizionate di <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e fibra di agrumi + estratti vegetali, arabinogalattani o inulina (fibre aggiunte per il 2% p/p)	Digestione gastrointestinale <i>in vitro</i> , seguita da fermentazione intestinale umana <i>in vitro</i>	-Incremento produzione di SCFA per aggiunta di fibra, -Aumento della capacità antiossidante media del 30%, grazie all'aggiunta di fibra, -L'aggiunta di fibra modifica la struttura del microbiota intestinale.	Pérez-Burillo et al. (2019)
Salsicce fermentate a secco addizionate di <i>Lactobacillus rhamnosus HN001</i> e fibra di agrumi 1,5% p/p	Studio d'intervento umano di 4 settimane	Salsicce riformulate -Incremento del plasma GPX e dell'attività catalasica, riduzione Ox-LDL e TNF- α .	Pérez-Burillo et al. (2019)
Salsiccia di suino addizionata approx. Del 6% di inulina	Studio d'intervento su ratti (ratti sani) di 4 settimane	Arricchimento di inulina -Incremento concentrazione SCFA nelle feci e nel plasma, -Modificazione della composizione del microbiota intestinale (incluso l'aumento dell'abbondanza relativa di Bifidobatteri). -Riduzione della concentrazione fecale di composti nitrosi, -Non ha influenzato i prodotti di ossidazione.	Thogersen et al., 2018, Thogersen et al., 2018, 2020
<i>Riformulazione prodotti carnei fermentati con probiotici</i>			
<i>Lactobacillus paracasei</i> in salsicce fermentate	Studio d'intervento umano di 5 settimane.	-Induzione della risposta immunologica (anticorpi contro LDL ossidati e linfociti CD4 (T-helper)).	Jahreis et al., 2002
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> in salsicce fermentate somministrate 25 g/die	Studio d'intervento sull'uomo di 21 giorni.	-Modificazione con successo della composizione della flora fecale nei soggetti umani -Il ceppo probiotico è stato rilevato fino a 3 giorni dopo l'interruzione del consumo di probiotici	Rubio et al., 2014
<i>Arricchimento con calcio e alimenti ricchi di calcio</i>			
Salsicce suine addizionate del 6% di inulina o 3% di latte ricco in minerali	Studio di intervento su ratti sani di 4 settimane	-L'inulina aumenta la concentrazione di SCFA, -Latte ricco in minerali aumenta la concentrazione fecale di acetato, -Latte ricco in minerali, ma non latte minerale + inulina, riduce i composti nitrosi nelle feci e nel piccolo intestino, -Effetti d'impatto nella composizione del microbiota intestinale.	Thogersen et al. (2020)

<i>Arricchimento con derivati delle piante o vitamine</i>			
<p>Aggiunta di α-tocoferoli, uva bianca, acido carnosico, rosmarino, vino rosso, melograno o tè verde a carne di suino stagionata</p>	<p>Studio di 14 giorni su ratti, Studio di 100 giorni su ratti azoximetano- indotti</p>	<p>Studio di 14 giorni: -Melograno, vino rosso e uva bianca hanno ridotto FW TBARS mentre acido carnosico lo ha aumentato, -Rosmarino ha ridotto DHA-MA urinario, -Uva bianca, acido carnosico, vino rosso, melograno e tè verde hanno ridotto FW eme.</p> <p>Studio di 100 giorni: -Vino rosso, melograno e α-tocoferolo riducono MDF/colon, associato a una riduzione del ferro nitrosile fecale, -Tutti i composti hanno ridotto FW eme, -Tutti i composti, eccetto acido carnosico, hanno ridotto FW TBARS, Acido carnosico, vino rosso e melograno riducono DHN-MA urinario, -Acido carnosico incrementa la FW citotossicità.</p>	<p>Bastide et al. (2017)</p>
<p>Aggiunta di α-tocoferolo, rutina o carnosolo a carne suina stagionata</p>	<p>Studio su ratti di 14 giorni, Studio di 100 giorni su ratti (1,2-dimetilidrazina-indotti), Studio in singolo cecco randomizzato su umani, studio crossover controllato (4g/diete).</p>	<p>Studio 14 giorni ratti: -Rutina, α-tocoferolo e carnosolo hanno ridotto FW TBARS e DHN-MA urinaria, -α-tocoferolo e rutina incrementano la sopravvivenza di cellule Apc^{+/+} comparata a Apc^{Min/+} e hanno ridotto la citotossicità contro CMT93. Studio di 100 giorni su ratti: -α-tocoferolo riduce MDF/colon, ATCN fecale, FW eme e DHN-MA urinaria. Studi sull'uomo: -α-tocoferolo riduce FW TBARS.</p>	<p>Pierre et al. (2013)</p>

1.3.1 Arricchimento di prodotti carnei con fibra alimentare

Studi epidemiologici hanno indicato un effetto protettivo del consumo della fibra alimentare contro l'insorgenza di CRC e inoltre è stata documentata un'associazione inversa tra il consumo di fibre alimentari e il rischio di CRC (Aune et al., 2011; Dahm et al., 2010). Pertanto, l'inclusione di fibre alimentari in prodotti a base di carne trasformata può essere una strategia per combattere i potenziali effetti nocivi indotti dalla carne nel tratto gastrointestinale. I meccanismi proposti spiegano l'associazione inversa tra l'assunzione di fibra alimentare e il rischio di CRC coinvolgendo vari processi, tra cui l'aumento della massa fecale, la riduzione del tempo di transito intestinale e la

formazione di acidi grassi a corta catena (SCFA) attraverso la fermentazione nel colon come risposta al consumo di fibra alimentare (Bingham, 1990).

Gli SCFA sono considerati utili alla normale funzione del colon, e in particolare il butirrato è associato a effetti fisiologici benefici. Il butirrato è la principale fonte di energia dei colonociti (Scheppach, 1994) e alcuni studi hanno indicato una capacità del butirrato di diminuire la proliferazione delle cellule tumorali in vitro e aumentare l'apoptosi dei colonociti con DNA danneggiato in ratti trattati con agenti cancerogeni (Clarke et al., 2012; Comalada et al., 2006). Pertanto, aumentare la formazione di SCFA può essere un approccio utile al fine di mantenere l'omeostasi del colon. Studi su roditori e umani hanno indicato una potenziale modifica delle risposte endogene nel tratto gastrointestinale a seguito del consumo di carne rossa (Conlon et al., 2012; Le Leu et al., 2015, 2016; Lewin et al., 2006; Nielsen et al., 2019; O'Callaghan et al., 2012; Paturi, Nyanhanda, et al., 2012; Toden et al., 2006; Winter et al., 2011). È stato scoperto che combinando una dieta ricca di carne rossa con il consumo di fibra alimentare, aumenti la formazione endogena di SCFA (Le Leu et al., 2015; Nielsen et al., 2019; Toden et al., 2006, 2007; Williams et al., 2016; Inverno et al., 2011). In una serie di studi, l'aumento della formazione di SCFA è stato riscontrato essere in concomitanza a una riduzione di prodotti di fermentazione proteica potenzialmente dannosi, come fenolo, p-cresolo e indolo (Le Leu et al., 2015; Nielsen et al., 2019; Toden et al., 2007; Williams et al., 2016; Winter et al., 2011), indicando che l'inclusione di fibre alimentari in una dieta ricca di carne rossa potrebbe indurre uno spostamento dalla fermentazione proteica verso un modello di fermentazione saccarolitica più favorevole. Inoltre, in una serie di studi, combinando una dieta ricca di carne rossa con il consumo di fibre alimentari si è scoperta un'opposizione alla formazione di frammenti di DNA e rotture di filamenti di DNA a seguito del consumo di carne rossa. Questo effetto è stato trovato in concomitanza con una maggiore formazione di SCFA (Le Leu et al., 2015; Toden et al., 2006, 2007; Inverno et al., 2011). Pertanto, è stato suggerito che gli SCFA e il butirrato in particolare svolgano un ruolo chiave nella protezione contro rotture dei filamenti di DNA indotte dalla carne (Le Leu et al., 2015).

Sebbene diversi studi abbiano studiato la combinazione di una dieta ad alto apporto di carne rossa con il consumo di fibre alimentari, per il momento studi che lavorino sull'incorporazione diretta delle fibre alimentari in prodotti trasformati a base di carne sono scarsi, ma le prospettive per la salute di tali strategie di riformulazione sono state recentemente riportate. Perez-Burillo et al., 2019 hanno studiato la digestione gastrointestinale in vitro seguita da fermentazione microbica intestinale umana in vitro di salsicce fermentate a secco con aggiunta di *Lactobacillus rhamnosus* come coltura starter e uno dei seguenti: fibra di agrumi, fibra di agrumi + estratto di erbe, arabinogalattano o inulina (tutte le fibre in 2% p/p) (Perez-Burillo et al., 2019). I salami analizzati erano fatti con carne di maiale e, in

aggiunta ai tessuti adiposi, i seguenti ingredienti: sale, nitrato, zuccheri, erbe estratto e pepe nero. In un salame è stato aggiunto anche il 2% p/p di amido e in più sono stati impiegati come controllo, ceppi batterici di acido lattico non probiotici e Streptococchi catalasi negativi. Tutte le salsicce con aggiunta di fibre hanno aumentato la formazione di SCFA, acetato, butirrato e propionato, dopo la fermentazione rispetto ad una salsiccia di controllo senza fibra alimentare.

Alterazioni nella composizione microbica sono state osservate anche dopo fermentazione in vitro. L'aggiunta di inulina ha comportato una maggiore abbondanza di *Bacteroides* e *Parasutterella* e ha dato comunità microbiche complessive nettamente diverso dai restanti campioni. Fibra di agrumi e arabinogalattano, d'altra parte, farebbe crescere l'abbondanza di *Dorea* e Cluster di *Clostridium XIVb* e diminuzione del genere *Escherichia/Shigella*.

Inoltre, l'aggiunta di fibre ha aumentato la capacità antiossidante dopo digestione gastrointestinale e fermentazione in vitro (Perez-Burillo et al., 2019). In un recente studio d'intervento umano, (Perez-Burillo et al., 2020), è stato investigato l'effetto dell'aggiunta dell'1,5% p/p di fibra di agrumi e *Lactobacillus rhamnosus* HN001 come coltura starter per fermentare salami (Perez-Burillo et al., 2020). I soggetti dello studio hanno consumato 30 g/giorno di salsicce riformulate o di controllo durante un periodo di intervento di 4 settimane. Per il gruppo d'analisi, è stato riscontrato che i marcatori antiossidanti nel plasma migliorano dopo 4 settimane di studio. Quindi, le attività di glutatione perossidasi (GPX) e della catalasi sono rispettivamente aumentate, mentre le attività di Ox-LDL e malondialdeide (MDA) erano diminuite. Inoltre, nel gruppo che ha ricevuto i salami riformulati, è stato osservato dopo il periodo di intervento, una diminuzione della proteina C-reattiva (CRP) e dell'attore alfa responsabile della necrosi tumorale (TNF- α), indicando uno stato infiammatorio migliorato. Il consumo delle salsicce riformulate ha provocato una maggiore formazione di butirrato, probabilmente come a causa del contenuto di fibre alimentari degli insaccati, anche se il cambiamento della comunità microbica intestinale non ha raggiunto la significatività. Thogersen et al., 2018 hanno utilizzato un modello di ratto per studiare l'effetto ottenuto sulle risposte endogene e di derivazione microbica intestinale dopo l'ingestione, incorporando circa il 6% (p/p) della fibra alimentare, inulina, in salsicce di maiale (Thogersen et al., 2018). Le salsicce sono state fatte da carne di suino e lardo di suino e aggiunta di sale nitrito, spezie, girasole olio oltre a un mix vitaminico, mix minerale e colina bitartrato, per garantire il fabbisogno nutrizionale dei ratti. Il mix di salsicce era riempito in involucri e trattato termicamente in un armadio per fumatori. I dati di NMR metabolomica hanno rivelato che il consumo di salsicce arricchite con inulina hanno aumentato la concentrazione degli SCFA acetato e butirrato nei campioni di feci e la concentrazione di acetato nei campioni di plasma rispetto alle salsicce di controllo senza arricchimento. Inoltre, arricchimento di inulina ha fortemente influenzato la composizione microbica intestinale, compreso un aumento

abbondanza relativa di *Bifidobacterium* (Thogersen et al., 2018). Bifidobatteri sono generalmente considerati benefici per la salute. Ciò include una capacità di inibire la crescita di agenti patogeni e protezioni contro infezioni dell'ospite (Fukuda et al., 2011; Gibson & Wang, 1994). Inoltre, studi hanno trovato una riduzione dei marcatori di cancerogenesi del colon in ratti indotti da azossimetano quando colture liofilizzate di *Bifidobacterium longum* sono stati consumati attraverso la dieta (Kulkarni & Reddy, 1994; Singh et al., 1997). L'arricchimento dei bifidobatteri dopo il consumo di inulina è stato dimostrato sia nei roditori che nell'uomo (Baxter et al., 2019; Gibson et al., 1995; Paturi et al., 2012a, 2017) ed è ora ben consolidato. Pertanto, i risultati di Thogersen et al., 2018 hanno dimostrato che l'effetto di incorporare l'inulina in un prodotto a base di carne assomigliava all'effetto generale visto sul consumo di fibre alimentari rispetto alla formazione di SCFA e all'effetto bifidogeno osservato (Thogersen et al., 2018). Curiosamente, nello stesso studio, si è scoperto che il prodotto di salsiccia di maiale arricchito con inulina, riduce la concentrazione fecale di composti N-nitroso totali apparenti (ATNC), che potrebbero essere principalmente attribuita a una riduzione dei composti di ferro nitrosile (Thogersen et al., 2020). Questi composti possono essere in grado di agire come agenti nitrosanti e possono potenzialmente promuovere la formazione di addotti del DNA (Bonnett et al., 1975; Kuhnle et al., 2007).

1.3.2 Riformulazione di prodotti carnei fermentati con probiotici

Migliorare la qualità e la conservazione degli alimenti mediante fermentazione microbica è un'antica strategia che si è evoluta per produrre moderni prodotti alimentari fermentati funzionali (Behera & Panda, 2020). Tradizionalmente, gli alimenti fermentati sono stati prodotti utilizzando pratiche basate sull'esposizione e sulla conseguente crescita di microrganismi autoctoni/endogeni che modificano la composizione degli alimenti (Kumar et al., 2017). Nel caso dei prodotti a base di carne, la crescita microbica influenza gradualmente le proprietà fisico-chimiche, materiche, sensoriali e funzionali della massa di carne, il che porta a prodotti con colore, sapore e aroma apprezzati che possono essere conservati per lunghi periodi (Halagarda & Wójciak, 2021; Kumar et al., 2017).

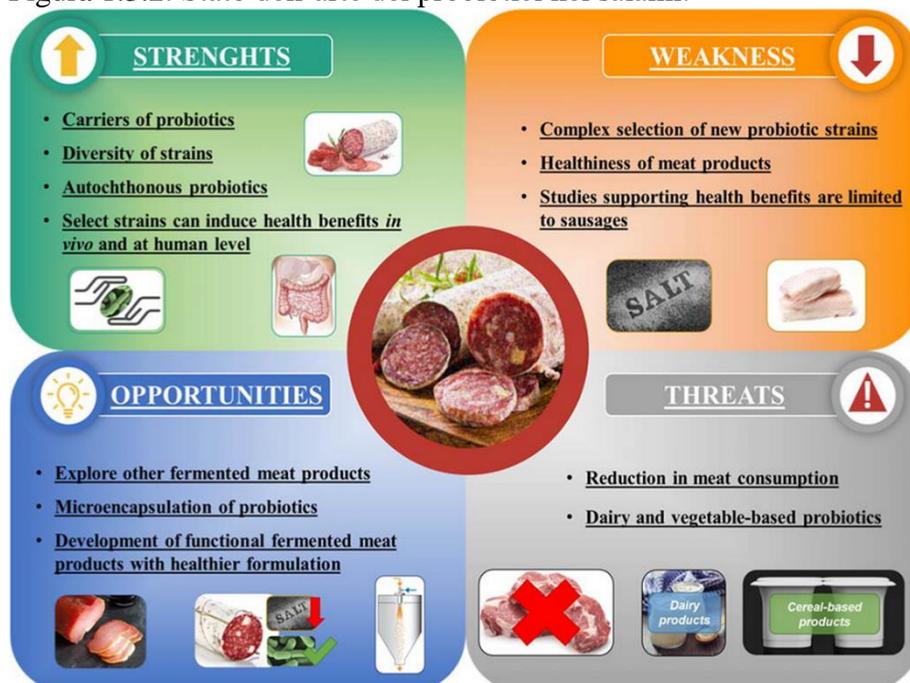
A causa della modernizzazione dell'industria alimentare e della crescente conoscenza dei prodotti a base di carne fermentata, l'uso di colture starter è diventato una strategia rilevante per migliorare il controllo della lavorazione e della qualità (Laranjo et al., 2017, 2019). Tra le numerose opzioni attuali di colture starter per prodotti a base di carne fermentata, la scelta di microrganismi con benefici per la salute aggiuntivi sta guadagnando maggiore attenzione tra i ricercatori a causa dei potenziali effetti positivi per la salute associati a questi microrganismi (Bis-Souza et al., 2019; Sirini et al. al., 2021). Particolare attenzione è stata data al consumo di probiotici: microrganismi viventi che possono

esercitare benefici per la salute se consumati in quantità adeguate e modificare il microbiota intestinale (Binda et al., 2020; FAO/OMS, 2002).

L'utilizzo di prodotti a base di carne come vettori di probiotici è un'opzione interessante per produrre alimenti fermentati funzionali (Bis-Souza et al., 2019). L'evidenza scientifica che mostra l'uso di salsicce fermentate come vettori di probiotici è supportata da studi effettuati sull'uomo. Ad esempio, il consumo di una salsiccia fermentata contenente *Lactocaseibacillus paracasei* (ex *Lactobacillus paracasei*) LTH 2579 ha portato colonizzazione dell'ambiente intestinale dopo 3 giorni di consumo in soggetti sani (Bunte et al., 2000). Un ulteriore esperimento con questo ceppo in una salsiccia probiotica ha riportato una leggera induzione della risposta immunologica (anticorpi contro LDL ossidati e linfociti CD4 (T-helper)) in 20 soggetti durante 5 settimane (Jahreis et al., 2002).

Allo stesso modo, un esperimento con *Lactiplantibacillus plantarum* (ex *Lactobacillus plantarum*) MF1298 ha indicato che l'inoculazione in una salsiccia ha aumentato il numero di individui portatori di questo microrganismo rispetto agli individui che hanno consumato il probiotico in capsule (Klingberg & Budde, 2006). Un esperimento simile ha indicato che il consumo di 25 g/die di salsiccia fermentata con *Lactocaseibacillus rhamnosus* (ex *Lactobacillus rhamnosus*) CTC1679 per 21 giorni ha modificato con successo la composizione della flora fecale nei soggetti umani (Rubio et al., 2014). Inoltre, lo studio ha anche rivelato che il ceppo probiotico è stato rilevato fino a 3 giorni dopo l'interruzione del consumo di probiotici. Non sono stati segnalati effetti avversi per il consumo di salsicce fermentate funzionali negli studi già menzionati.

Figura 1.3.2. Stato dell'arte dei probiotici nei salami.



1.3.3 Arricchimento di prodotti carnei con derivati vegetali e vitamine

Numerosi studi hanno studiato l'aggiunta di antiossidanti naturali ed estratti vegetali a carni tal quali e prodotti a base di carne per estendere la durata di conservazione, ad es. ritardando potenziali processi di ossidazione intrinseca e migliorando la stabilità del colore e sono stati precedentemente rivisti (Hygreeva et al., 2014). Collettivamente, questi studi indicano un potenziale miglioramento qualitativo del prodotto mediante aggiunta di derivati vegetali (Hygreeva et al., 2014), tuttavia, le indagini sull'effetto sulle risposte endogene nel tratto gastrointestinale dopo il consumo sono scarsi. Pierre et al. (2008) hanno studiato l'aggiunta di una miscela antiossidante composta da idrossianisolo butilato, rutina (0,05% ciascuno) e di olio extravergine d'oliva (5%) a una dieta contenente il 60% di carne di manzo liofilizzata somministrata a ratti indotti da 1,2-dimetilidrazina durante un intervento di 100 giorni. La miscela antiossidante e l'olio d'oliva hanno attenuato il numero di MDF per colon rispetto alla sola dieta di manzo, ma non a un livello così basso come valori di controllo senza carne. Tuttavia, la miscela antiossidante e l'aggiunta di olio d'oliva non ha influenzato significativamente il numero di ACF per colon, di acqua fecale TBARS o di citotossicità rispetto alla sola dieta di manzo, ma l'aggiunta di antiossidanti ha ridotto l'escrezione urinaria di DHN-MA (Pierre et al., 2008). È stata studiata una serie di additivi aggiunti ai salumi durante uno studio a breve termine di 14 giorni sui ratti per testare il loro potenziale di soppressione degli effetti indotti dalla carne (Pierre et al., 2013). Tra questi, lo 0,1% di rutina, lo 0,07% di carnosolo estratto dal rosmarino o lo 0,05% di α -tocoferolo erano incorporati separatamente nella carne durante il processo di stagionatura. Tutti questi composti testati hanno ridotto la concentrazioni di DHN-MA nell'acqua fecale TBARS e urinaria rispetto al solo salume, indicando a ridotta perossidazione lipidica. Dall'aggiunta di α -tocoferolo e rutina è risultata un aumento della sopravvivenza delle cellule $Apc^{+/+}$ normali rispetto alle cellule premaligne $Apc^{Min/+}$. Inoltre, è risultato che l'aggiunta di α -tocoferolo e rutina riduca la citotossicità contro CMT93. Aggiunta di α -tocoferolo a una dieta a base di carne è stata scelta per uno studio di intervento di 100 giorni su ratti e uno studio di 4 giorni sull'intervento umano, tuttavia, l'aggiunta di α -tocoferolo non ha influenzato la citotossicità dell'acqua fecale in questi studi. Nello studio d'intervento di 100 giorni su ratti indotti da 1,2-dimetilidrazina, l'aggiunta di α -tocoferolo ha ridotto il numero di MDF per colon, la concentrazione di ATNC fecale, la concentrazione di eme nell'acqua fecale e DHN-MA urinario, ma non ha influenzato l'ACF per colon, le dimensioni degli MDF e l'acqua fecale TBARS nei ratti rispetto al solo salume. Nello studio sull'intervento umano, i volontari hanno consumato 180 g/giorno durante un periodo di 4 giorni di salume con lo 0,05% (wt:wt) di α -tocoferolo aggiunto durante il processo di stagionatura.

L'aggiunta di α -tocoferolo ha ridotto l'acqua fecale TBARS rispetto al consumo di salume senza aggiunta, per un periodo di 4 giorni, ma non influenza le concentrazioni fecali di ATNC e DHN-MA urinario (Pierre et al., 2013). È stato ipotizzato che i polifenoli potessero sopprimere la perossidazione lipidica nell'intestino, prevenendo così la cancerogenesi del colon promossa dalle carni lavorate (Bastide et al., 2017). Pertanto, hanno condotto uno studio a breve termine di 14 giorni sui ratti per testare l'effetto di un certo numero di estratti vegetali, tra cui estratto di uva bianca, estratto di acido carnosico da foglie di rosmarino, estratto di rosmarino, concentrato di vino rosso, estratto di melograno, estratto di tè verde e α -tocoferolo, aggiunti all'impasto di carne di maiale. Oltre alla carne di maiale stagionata, i topi hanno ricevuto una quantità di dieta in polvere a basso contenuto di calcio corrispondente a circa metà della loro assunzione di mangime. Estratti di melograno, vino rosso e uva bianca, hanno ridotto l'acqua fecale TBARS, mentre l'acido carnosico ha aumentato l'acqua fecale TBARS rispetto al solo salume. La sola aggiunta di rosmarino ha ridotto in modo significativo l'escrezione urinaria di DHN-MA. Uva bianca, acido carnosico, vino rosso, melograno e tè verde hanno ridotto le concentrazioni di eme nell'acqua fecale, ma nessuno degli estratti vegetali testati ha influito sulla citotossicità dell'acqua fecale. In uno studio di 100 giorni sui ratti, la carne è stata ulteriormente analizzata con l'aggiunta di uva bianca, l'aggiunta di melograno, vino rosso, acido carnosico e α -tocoferolo in un modello utilizzando ratti indotti da azossimetano. L'aggiunta di tutti i composti studiati, ha ridotto le concentrazioni di acqua eme fecale, eccetto l'acido carnosico, che ha ridotto TBARS dell'acqua fecale. Acido carnosico, vino rosso e melograno hanno anche ridotto DHN-MA urinario e acido carnosico ha aumentato la citotossicità dell'acqua fecale, mentre nessuno degli altri composti aggiunti ha influenzato questo parametro. Vino rosso, melograno e α -tocoferolo hanno diminuito in modo significativo il numero di MDF per colon, mentre l'aggiunta di uva bianca e l'acido carnosico no. Allo stesso tempo, l'aggiunta di estratti vegetali ai salumi ha ridotto le concentrazioni di ATNC fecali, sebbene potrebbero essere effettuate analisi non statistiche su questi dati. α -tocoferolo ha completamente soppresso le concentrazioni fecali di ATNC e il melograno e del vino rosso hanno ridotto le concentrazioni di ATNC inclusa una riduzione completa dei composti di ferro nitrosilico nelle feci. Quindi è stata osservata un'associazione tra una riduzione della concentrazione di ferro nitrosile nelle feci e una riduzione del numero di MDF per colon, indicando che la formazione di composti di ferro nitrosile può essere coinvolta nella cancerogenesi. Tuttavia, nessuna relazione dose-risposta tra i composti di ferro nitrosile e la formazione di MDF è stata osservata (Bastide et al., 2017).

1.3.4 Arricchimento dei prodotti carnei con calcio

Studi epidemiologici hanno indicato un possibile effetto protettivo contro il rischio di CRC dell'introduzione di calcio presente negli alimenti o come supplemento tal quale. Così, sono state osservate associazioni inverse fra l'assunzione di calcio (come componente nutrizionale o come supplemento) e il rischio di CRC (Cho et al., 2004; Huncharek et al., 2009; Meng et al., 2019). Il Fondo mondiale per la ricerca sul cancro/Istituto americano per la ricerca sul cancro (WCRF/AICR) ha collocato prodotti lattiero-caseari e integratori a base di calcio, nella categoria degli alimenti probabilmente protettivi contro il cancro del colon-retto nel loro Continuous Update Project Expert Report 2018 (WCRF/AICR, 2018). È stato suggerito che il calcio naturalmente presente negli alimenti inibisca la citotossicità luminale e la proliferazione epiteliale del colon, facendo precipitare tensioattivi citotossici come acidi biliari e acidi grassi (Van der Meer et al., 1997). È stato scoperto inoltre che anche il fosfato di calcio sia in grado di legarsi all'eme, componente della carne rossa si sospetta contribuisca nell'aumento del rischio di cancro del colon-retto (Bastide et al., 2015; Cross et al., 2003) e farlo precipitare inibendone la citotossicità in vitro (Sesink et al., 2001). Inoltre, il fosfato di calcio ha ridotto la citotossicità dell'acqua fecale e l'iperproliferazione epiteliale del colon in ratti alimentati con una dieta ricca di eme (Sesink et al., 2001, Van der Meer-Van Kraaij et al., 2005). È stato osservato un possibile effetto protettivo del fosfato di calcio aggiunto a diete contenenti il 60% di carne bovina liofilizzata somministrata a ratti indotti 1,2-dimetilidrazina. L'aggiunta di fosfato di calcio ha impedito un aumento indotto dalla carne del numero di ACF e MDF per colon, ma non ha ridotto il numero di crypts per lesione (Pierre et al. 2008). Inoltre, il fosfato di calcio ha normalizzato la citotossicità dell'acqua fecale indotta dalla carne e le sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico (TBARS), ma non hanno ridotto l'escrezione urinaria dell'acido 1,4-diidrossinonano mercapturico (DHN-MA), un biomarcatore di perossidazione lipidica endogena (Pierre et al., 2008). Successivamente, è stato studiato l'effetto di una dieta, rispettivamente somministrata a ratti o volontari umani, aggiunta di calcio alimentare o di integratori di calcio a una dieta contenente carne di maiale stagionata con aggiunta di nitriti (Pierre et al., 2013). In precedenza è stato scoperto che la poliposi adenomatosa coli (*Apc*) ha mutato le cellule, tale mutazione è associata alla cancerogenesi del colon-retto, resiste fortemente la citotossicità associata alla lipoperossido indotta dall'eme in contrasto con cellule *Apc*^{+/+} non mutate. Questo dà un vantaggio di sopravvivenza delle cellule premaligne e potrebbe svolgere un ruolo nella carcinogenesi del colon indotta dall'eme (Pierre et al., 2007). Pertanto, è stata determinata la citotossicità dell'acqua fecale nei confronti di cellule *Apc*^{+/+} non mutate e le cellule pre-maligne *Apc*^{Min/+} così come contro la linea cancerosa delle cellule epiteliali nel colon del topo, CMT93. In uno studio di intervento di 14 giorni su ratti, l'aggiunta di

carbonato di calcio a una dieta sperimentale a base di salumi, ha aumentato la sopravvivenza delle cellule *Apc^{+/+}* rispetto alle cellule *Apc^{Min/+}* e ridotto la citotossicità dell'acqua fecale contro le cellule CMT93. L'aggiunta di carbonato di calcio alla carne di maiale stagionata con nitriti è stata ulteriormente studiata in uno studio di intervento su ratto di 100 giorni utilizzando ratti indotti con 1,2-dimetilidrazina. Qui, l'aggiunta di carbonato di calcio ha ridotto il numero di MDF per colon rispetto ai ratti alimentati con salumi senza carbonato di calcio, mentre il numero di ACF per due punti e il numero di cripte per MDF non è stato influenzato in modo significativo. Inoltre, l'aggiunta di carbonato di calcio ha ridotto la citotossicità fecale dell'acqua contro le cellule CMT93, la concentrazione di acqua fecale TBARS e di eme, le concentrazioni fecali ATNC ed escrezione urinaria di DHN-MA. In uno studio umano in singolo cieco randomizzato, capsule di carbonato di calcio consumate durante un periodo di intervento di quattro giorni con consumo di 180 g di salume al giorno hanno ridotto le concentrazioni di ATNC e TBARS di acqua fecale, mentre l'escrezione urinaria di DHN-MA e la citotossicità dell'acqua fecale non sono state influenzate (Pierre et al., 2013). Questi studi indicano un potenziale di riduzione degli effetti nocivi indotti dalla carne nel tratto gastrointestinale grazie all'inclusione di calcio nella dieta. Pertanto, la fortificazione con calcio di carne lavorata può essere una strategia per produrre prodotti a base di carne più sani. Recentemente, sono stati studiati su modelli di ratti, l'aggiunta di latte ricco in minerali di calcio in un salume di maiale con o senza incorporazione combinata con fibra alimentare (Thøgersen et al., 2020). Pertanto, circa il 3% di minerali di latte ricchi di calcio e/o il 6% dell'inulina veniva incorporata in un prodotto di salsiccia di maiale e somministrata a ratti sani durante un periodo di intervento di quattro settimane. Il prodotto a base di salsiccia era composto da carne di maiale, lardo di maiale e acqua e aggiunto sale nitrito, olio di semi di girasole, nonché vitamine, minerali e colina bitartrato, per soddisfare le esigenze nutrizionali dei ratti. Inoltre, poiché il latte minerale come prodotto contiene lattosio, a salsicce senza latte minerale sono state aggiunte corrispondenti quantità di lattosio. L'analisi metabolomica basata su NMR, ha rivelato che l'arricchimento minerale del latte aumenti le concentrazioni di acetato fecale e l'arricchimento di inulina aumenti le concentrazioni fecali di acetato, butirrato e propionato. La combinazione di inulina e arricchimento minerale del latte, tuttavia, non è risultata negli effetti additivi sulle concentrazioni fecali di SCFA. Le concentrazioni di composti nitrosi sono state determinate in campioni fecali, nello stomaco e nell'intestino tenue. Degno di nota, è stato riscontrato che l'arricchimento con latte minerale riduca fortemente e significativamente la concentrazione di ATNC, nitrosotoli (RSNO) e composti di ferro nitrosilico (FeNO) nell'intestino tenue e di ATNC e RSNO nei campioni di feci rispetto alle salsicce di controllo senza arricchimento. Nessuno dei trattamenti ha influenzato significativamente le concentrazioni di composti nitrosi nello

stomaco. È interessante osservare l'arricchimento combinato del latte minerale e l'inulina, che sembra opporsi alla riduzione della formazione dei composti nitrosi (Thøgersen et al., 2020). In contrasto con il precedente studio di Thøgersen et al. (2018), solo arricchimento con inulina non ha ridotto le concentrazioni di composto nitrosi fecali. Questa scoperta potrebbe essere causata dalle differenze complessive nella composizione microbica intestinale, probabilmente a causa dell'aggiunta di lattosio al prodotto di salsiccia di maiale nell'ultimo studio, poiché è probabile che i composti nitrosi si formino attraverso percorsi che coinvolgono i batteri intestinali (Hughes et al., 2000). Infatti, l'arricchimento minerale del latte ha modulato la composizione microbica intestinale, determinata utilizzando la tecnica del sequenziamento dell'amplicone del gene rRNA. L'arricchimento minerale del latte ha aumentato l'abbondanza relativa di *Firmicutes* mentre diminuisce l'abbondanza di *Bacteroidetes* a livello di phylum. Non è stato osservato nessun effetto del solo arricchimento minerale del latte sull'abbondanza relativa di bifidobatteri, ma la combinazione di inulina e di latte minerale ha comportato un aumento significativo dell'abbondanza relativa di bifidobatteri. L'arricchimento con il latte minerale e l'inulina combinati ha aumentato significativamente l'abbondanza relativa di *Blautia* e un genere *Erysipelotrichaceae* (CCMM). Quindi, questi i risultati hanno indicato un possibile effetto positivo sinergico della combinazione di latte e inulina su questi batteri (Thøgersen et al., 2020). Questa serie di studi di arricchimento che analizzano l'aggiunta di calcio a prodotti a base di carne, indicano un promettente potenziale di modificazione benefica delle risposte endogene dopo l'ingestione.

1.4 Effetti della carne sul microbiota intestinale

I batteri presenti a livello del colon possiedono un notevole potere proteolitico. L'attività metabolica della comunità microbica intestinale è forse più efficace anche di quella che si verifica nell'intestino tenue sotto il controllo enzimatico dell'ospite (Nicholson et al., 2012, Gibson et al., 1989). Nel tratto gastroenterico, le proteine vengono prima idrolizzate nello stomaco dalle peptidasi a polipeptidi e successivamente a sequenze di amminoacidi: tripeptidi, dipeptidi e singoli amminoacidi. Le proteasi batteriche possono generare peptidi di ridotte dimensioni e singoli amminoacidi da cui possono derivare SCFA a seguito di fermentazione, tra questi sono inclusi acetato, propionato e n-butirrato, nonché derivati di amminoacidi a catena ramificata, acidi grassi a catena ramificata, che comprendono isobutirrato, isovalerato e 2-metilbutirrato (Macfarlane et al., 1986, Smith et al., 1997). Gli amminoacidi Arg, Asp, Gly, Phe, Pro, Ser, Thr e Trp vanno maggiormente incontro a digestione batterica piuttosto che a digestione da parte dell'ospite (Rowan et al., 1994). Sebbene la digestione e l'assorbimento delle proteine alimentari siano efficienti negli esseri umani sani, circa il 10% di esse

arriva intatta all'intestino crasso ed è disponibile per la fermentazione batterica (Chacko et al., 1988, Gibson et al., 1976). Le prime tecniche di microbiologia basate su colture fecali umane hanno identificato *Bacteroides* e *Propionibacterium* come i due principali generi proteolitici (Macfarlane et al., 1986). Altri generi importanti proposti sono *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Streptococcus* (Macfarlane et al., 1986, Van der Meulen et al. 2008). Molti fattori possono influenzare la percentuale di proteine alimentari che raggiungono l'intestino crasso e che qui vengono digerite dai batteri. Tuttavia, le modificazioni che le proteine subiscono durante la cottura, così come le interazioni che possono avere con altri nutrienti presenti nella matrice alimentare, possono alterare la loro biodisponibilità (Tuohy et al., 2006). Inoltre, gli enzimi microbici utilizzano siti di scissione diversi da quelli degli enzimi digestivi e quindi i peptidi che vengono prodotti sono diversi e hanno differente attività biologica (Yamamoto, 1997). È interessante notare come studi recenti affermino che la presenza di batteri nel tratto digestivo umano e animale e il loro metabolismo può mediare la produzione di composti tossici derivanti dalle proteine, come la trimetilammina dalla L-carnitina (Koeth et al., 2013). Pertanto, le interazioni tra microflora del colon e proteine alimentari hanno suscitato un forte interesse per quanto riguarda i loro effetti sulla salute umana nell'insorgenza di patologie non trasmissibili, poiché il profilo del microbiota intestinale è altamente influenzato dalla dieta dell'individuo e l'attività degli enzimi microbici influisce sulla produzione di peptidi bioattivi derivati dalle proteine. Gli effetti della carne bovina sui modelli di topo e di ratto sono apparsi concordanti per quanto riguarda il livello di phylum batterico, con aumenti nella quantità relativa di *Proteobacteria* (Zhu et al., 2015, Zhang et al., 2019) e *Firmicutes* (Zhu et al., 2015, Zhang et al., 2019, Zhu et al., 2016) e diminuzioni di *Bacteroidetes* (Zhu et al., 2015, Zhang et al., 2019). Il genere capace di produrre acido lattico, *Lactobacillus*, aumentava quando veniva somministrato come alimento soltanto nell'estratto di carne bovina (Zhu et al., 2015, Zhu et al., 2016). La ricerca effettuata in letteratura ha indicato anche che la somministrazione di carne bovina fa aumentare i *Proteobacteria*, sia nei modelli murini che suini (Schutkowski et al., 2019). Il consumo di carne bovina ha avuto un effetto misto su alcuni dei generi batterici produttori di SCFA. Ad esempio, la carne bovina ha fatto aumentare la presenza dei generi *Clostridium* (Zhang et al., 2019, Bedani et al., 2010) e *Blautia* (Zhu et al., 2016, Ijaz et al., 2018), mentre sono diminuiti *Bifidobacterium* (Le Leu et al., 2013) e *Akkermansia* (Ijaz et al., 2018, Le Leu et al., 2013).

1.4.1 Effetti del consumo di carne sul Rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*

Attualmente, si ritiene che i cambiamenti nella composizione microbica intestinale siano un importante fattore determinante nell'insorgenza dell'obesità (Sonnenburg e Bäckhed, 2016). Le popolazioni microbiche più comuni nel microbiota intestinale umano sono i phyla *Firmicutes* (gram-positivi) e *Bacteroidetes* (gram-negativi), senza escludere però altri phylum di rilevanza come *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*, presenti a livelli sottodominanti (Eckburg *et al.*, 2006). I dati ottenuti da modelli animali (cavie) hanno rivelato differenze consistenti nei due principali phyla batterici con aumento significativo dei *Firmicutes* e diminuzione dei livelli di *Bacteroidetes* in topi in stato di obesità rispetto ai topi selvatici, nonostante una somiglianza nei loro livelli di dieta e attività (Ley *et al.*, 2005). Numerosi studi sul microbiota intestinale umano, effettuati in maniera analoga agli studi su cavie, hanno costantemente dimostrato che il rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* (*F/B*) aumenta nelle persone obese rispetto alle persone normopeso e tende a diminuire proporzionalmente con la riduzione di peso (Sweeney e Morton, 2013; Barlow *et al.*, 2015). Diversi studi, tuttavia, hanno prodotto risultati contrastanti. Alcune ricerche non sono riuscite a trovare differenze significative nel rapporto *F/B* tra umani normopeso e obesi sia a livello basale che dopo la perdita di peso (Ismail *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2012). I batteri Gram-negativi (come i *Bacteroidetes*) producono LPS (Weiss *et al.*, 2003, Lindberg *et al.*, 1990), un'endotossina che promuove l'infiammazione sistemica e l'endotossinemia metabolica, poiché può favorire la sovraespressione delle citochine proinfiammatorie una volta che, dall'intestino, raggiunge la circolazione sistemica (Zweigner *et al.*, 2006, Cani *et al.*, 2008). Pochi studi condotti sugli animali hanno riportato una diminuzione della quantità relativa di *Bacteroidetes* in risposta ad una dieta con carne rossa se paragonata ad una dieta non purificata (Zhang *et al.*, 2019) o ad una dieta a base di caseina (Zhu *et al.*, 2015, Zhu *et al.*, 2016). Inoltre, la proteina legante il LPS, un indicatore di danno della barriera intestinale, era più alta nel gruppo delle caseine rispetto ad altri gruppi con una dieta a basso contenuto di grassi (Ijaz *et al.*, 2018). Pertanto, le diete ad elevato contenuto di grassi potrebbero essere fonte di maggiore preoccupazione rispetto a quelle contenenti fonti di proteine alimentari nell'aver un impatto negativo sul profilo microbico intestinale. Negli studi condotti sugli animali, una dieta contenente carne bovina ha aumentato la quantità relativa di *Firmicutes* (Zhu *et al.*, 2015, 2016, Schutkowski *et al.*, 2019), mentre ha fatto diminuire i *Bacteroidetes* (Ijaz *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2019). In altre parole, la carne rossa può incrementare il rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*, che spesso viene associato all'aumento del BMI negli esseri umani (Koliada *et al.*, 2017, Tseng & Wu 2019). Nei pochi studi condotti sull'uomo che abbiamo individuato durante la nostra ricerca in letteratura i risultati apparivano variabili, con modificazioni contraddittorie nella quantità relativa di

Firmicutes riportata (Krebs et al., 2013; Moreno-Perez et al., 2018). Inoltre, negli esseri umani, colture batteriche effettuate dopo diete ad elevato contenuto di carne bovina (380 g/d) hanno evidenziato aumenti significativi di *Bacteroides* (Hentges et al., 1977), un genere del phylum *Bacteroidetes*.

1.4.2 Effetti della carne processata sul microbiota intestinale – studi *in vivo*

Una recente indagine clinica ha riportato che gli alimenti ultraprocesati favoriscono l'aumento di peso indipendentemente dall'assunzione energetica (Hall et al., 2019), evidenziando la necessità di comprendere meglio l'associazione tra il consumo di carne rossa, trasformata e non, e il rischio di sviluppare malattie croniche (Klurfeld 2015; Binnie et al., 2014), specialmente per quanto riguarda il ruolo che gioca il microbiota intestinale e i metaboliti correlati, nel mediare gli effetti del consumo di carne o prodotti carnei lavorati. Come conseguenza degli alti livelli di sale nella dieta (circa 3-4%), studi recenti sui roditori hanno riportato una minore produzione di butirrato intestinale, una maggiore abbondanza intestinale di *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, un basso contenuto di *Lactobacillus* ed esacerbazione della colite nei roditori (Wang et al., 2017; Miranda et al., 2018). In accordo con questo, i ratti che seguivano le diete a base di carne stagionata (1,6% NaCl) rispetto a quelle a base di carne fresca (0,3% NaCl) avevano concentrazioni di butirrato cecale inferiori e abbondanze relative di *Ruminococcaceae* più elevate a livello del colon. I membri della famiglia delle *Ruminococcaceae* possono sviluppare sia come conseguenza di un'elevata disponibilità per la fermentazione di proteine (Amaretti et al., 2019) sia di carboidrati complessi (Chatellard, Trably e Carrere, 2016), o potenzialmente avere una maggiore resistenza ad ambienti ad alto contenuto salino. Inoltre, i ratti che consumavano le diete a base di carne con aggiunta di sale avevano livelli di propionato cecale più elevati, in precedenza erano stati segnalati come inalterati da una dieta ricca di sale (Miranda et al., 2018) o aumentati (Bier et al., 2018). I livelli di sale dietetici relativamente più bassi nelle diete a base di carne rispetto alle diete ad alto contenuto di sale (3-4%) altri studi possono spiegare perché il *Lactobacillus* non è stato influenzato in modo significativo nello studio, nonostante abbondanze di *Lactobacillus* coliche inferiori non significative nei ratti sul dieta a base di carne bovina ($13,8 \pm 9,4\%$) rispetto ad altri trattamenti dietetici (collettivamente $23,4 \pm 10,8\%$). In precedenza, era stata segnalata una grande escrescenza del colon di *Desulfovibrionaceae* nei ratti con una dieta di manzo e saccarosio (Van Hecke et al., 2019a). I batteri che riducono i solfati possono formare H₂S che, a concentrazioni più elevate, può ridurre i legami disolfuro del muco portando alla denaturazione del muco e all'esposizione dei colonociti sottostanti ai metaboliti tossici intestinali, portando all'infiammazione (Ijssennagger et al., 2016). Nel presente studio non sono state osservate escrescenze di

Desulfovibrionaceae, né segni di infiammazione (CRP, TNF- α , IL-6), probabilmente correlati ai livelli di olio di cartamo nella dieta di 4 volte inferiori e accompagnati da un livello lipidico da 3 a 7 volte inferiore livelli di ossidazione nei ratti nutriti con carne di manzo, rispetto allo studio precedente (Van Hecke et al., 2019a). Tuttavia, il consumo sia di carne di manzo che di sale di nitrito ha aumentato indipendentemente i livelli fecali di CS2 con un aumento di 4 volte nei ratti nelle diete di manzo stagionato rispetto alle diete di pollo fresco.

1.4.3 Effetti della carne processata sul microbiota intestinale – studi *in vitro*

La struttura della comunità del microbiota è stata determinata dopo la fermentazione di campioni di salame digerito per 24 ore. Nel complesso, la composizione della comunità varia tra i diversi campioni, come determinato dall'analisi di ordinazione PCoA. Campioni di salame fermentato contenenti fibra di agrumi (la pectina è il principale polisaccaride digeribile composto da acido galatturonico e altri zuccheri) o fibra di acacia (composta principalmente da polisaccaride arabinogalattano) raggruppati insieme, indicando che questi prebiotici promuovono una struttura della comunità microbica simile. L'inulina, un polimero di fruttosio e glucosio, ha dato origine a una comunità notevolmente diversa e tutti questi campioni hanno prodotto un'organizzazione della comunità del microbiota diversa dal controllo del fluido di fermentazione e dal salame non integrato. Tuttavia, la diversità complessiva della comunità non differisce significativamente tra i campioni (dati non mostrati). Nella maggior parte dei campioni, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Dorea* ed *Escherichia/Shigella* sono i generi più abbondanti. Rispetto al controllo del fluido di fermentazione, tutti i campioni di salame hanno una maggiore prevalenza di *Bacteroides*, che è un efficiente degradatore proteico (Macfarlane, Cummings e Allison, 1986). La fermentazione dell'inulina ha promosso *Bacteroides* e *Parasutterella*, coerentemente con i risultati precedenti (Sonnenburg et al., 2016; Zhang et al., 2018), mentre altre fibre hanno supportato l'espansione dei membri di *Clostridia* come *Dorea* e *Clostridium* cluster XIVb. L'aggiunta di queste fibre al salame ha anche ridotto la prevalenza del genere *Escherichia/Shigella* (che è noto per avere molti patogeni intestinali umani) nelle comunità microbiche.

1.5 Effetti della carne relativamente agli indicatori metabolici

La lavorazione, la preparazione e la conservazione degli alimenti influenzano le proprietà nutrizionali, funzionali, biologiche delle proteine e la loro digeribilità. Studi *in vitro* su colture di campioni fecali umani indicano che la tipologia di carne e il metodo di cottura hanno entrambi un

impatto sul profilo microbico (Shen Q. et al., 2010). Inoltre, i risultati negativi associati ad un eccessivo consumo di carne rossa includono quelli direttamente correlati alla cottura ad elevate temperature, che può causare la produzione di idrocarburi policiclici aromatici e di ammine eterocicliche (Abdi Z. et al., 2014), composti N-nitrosi generati come sottoprodotti microbici, o la presenza dell'acido sialico non umano N-glicolilneuraminico (Samraj AN et al., 2015).

1.5.1 Effetti della carne processata sulla produzione di metaboliti microbici benefici

Gli SCFA svolgono un ruolo importante nella salute dell'ospite oltre al recupero di energia dal cibo non digerito. Il butirrato svolge un ruolo importante nell'orchestrare l'integrità dell'intestino crasso e della barriera dell'intestino tenue e nel fornire energia alle cellule epiteliali nell'intestino crasso (Mathewson et al., 2016). Lavori recenti hanno anche dimostrato un ruolo del butirrato nella regolazione della risposta immunitaria attraverso l'espansione delle popolazioni di cellule Treg (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013) aggiungendosi a un corpus di lavori precedenti sul ruolo degli SCFA nel migliorare la risposta pro-infiammatoria delle cellule immunitarie allo stimolo antigenico (recensito in Sun et al., 2017). Il propionato passa in gran parte attraverso il lume intestinale, anche se uno studio recente suggerisce un ruolo del propionato nella gluconeogenesi intestinale (De Vadder et al., 2014), dove è quasi quantitativamente sequestrato nel fegato dove può agire come substrato gluconeogenico o essere ossidato (Wilson et al., 2017). Parte dell'acetato viene convertito in butirrato dai batteri lumenali; tuttavia, l'acetato sfugge in gran parte all'estrazione splancnica ed è disponibile per i tessuti periferici dove può essere utilizzato per la lipogenesi nel tessuto adiposo o ossidato a livello muscolare (den Besten et al., 2013). Studi recenti stanno iniziando a fornire informazioni sul ruolo di SCFA. L'acetato svolge un ruolo nella regolazione centrale dell'appetito (Frost et al., 2014) e l'aumento della produzione nel colon distale può essere più efficace del colon prossimale, promuovendo l'ossidazione dei grassi, il miglioramento dell'omeostasi del glucosio e lo stato infiammatorio (van der Beek et al., 2016). Il ruolo dell'acetato nell'omeostasi energetica e nel metabolismo del substrato è stato recentemente esaminato altrove (Canfora & Blaak, 2017). Un recente lavoro sull'utilizzo di un estere propionato di inulina per indirizzare all'intestino crasso ha dimostrato in studi umani controllati che il propionato attenua direttamente l'appetito e l'assunzione di cibo (Chambers et al., 2014), influenza la scelta del cibo (Byrne et al., 2016), migliora la funzione pancreatico (Pingitore et al., 2017) e modula l'accrescimento lipidico epatico (Chambers et al., 2018). È stato anche dimostrato che il propionato orale aumenta l'ossidazione dei grassi negli esseri umani (Chambers et al., 2018). È stato dimostrato che il butirrato orale, ma non endovenoso, riduce l'assunzione di cibo e migliora i profili di glucosio e lipidi attraverso un circuito neurale

intestino-cervello negli animali (Li et al., 2018). Negli uomini in sovrappeso/obesi, le infusioni coliche di SCFA sembrano aumentare l'ossidazione dei grassi, il dispendio energetico e il rilascio di PYY e diminuire la lipolisi del tessuto adiposo (Canfora et al., 2017). L'inulina, un frutto-oligosaccaride prebiotico NDC che viene prontamente fermentato producendo SCFA, ha dimostrato effetti benefici sull'adiposità (Nicolucci et al., 2017) sul metabolismo del substrato (van der Beek et al., 2018), sulla sensibilità all'insulina (Weitkunat et al., 2017) e sulla regolazione dell'appetito (Singh et al., 2018; Hume et al., 2017) sebbene gli effetti osservati negli esseri umani siano incoerenti e possono essere correlati ai livelli di assunzione di inulina (Guess et al., 2016). Una recente meta-analisi ha provvisoriamente concluso che i fruttani di tipo inulina provocano un effetto benefico sui profili lipidici e sul metabolismo del glucosio (Liu et al., 2017).

Numerosi studi epidemiologici recenti hanno evidenziato l'associazione inversa tra assunzione di fibre alimentari e fattori di rischio CVD (Hartley et al., 2016; McRae, 2017). I carboidrati non digeribili (NDC) sono una frazione importante della fibra alimentare e gli SCFA sono i principali prodotti della fermentazione saccarolitica dell'NDC nell'intestino crasso. Acetato, propionato e butirato sono i principali prodotti SCFA e in condizioni di eubiosi sono prodotti nel rapporto molare approssimativo di 60:20:20 raggiungendo una concentrazione combinata di oltre 100 mM nel lume intestinale, sebbene le concentrazioni circolanti siano molto più basse per propionato e butirato in particolare (Boets et al., 2017). L'equilibrio tra fermentazione saccarolitica e fermentazione proteolitica è principalmente correlato all'assunzione con la dieta e alla disponibilità di NDC al microbiota. Esperimenti di cambio di dieta hanno dimostrato rapide modificazioni nell'attività metabolica microbica e nella diversità correlata al contenuto di proteine, lipidi e NDC (fibra alimentare) della dieta (David et al., 2014; O'Keefe et al., 2015). Pertanto, il microbioma è diventato un bersaglio attraente per la facilità della sua modulazione attraverso la dieta, con l'obiettivo di alterare la risposta dell'ospite.

Un'altra classe di composti lipidici sono i trigliceridi a catena media, contenuti principalmente in oli di cocco e palmisti, sono esteri di acidi grassi a catena media del glicerolo. (Traul et al., 2000, Craig et al., 1997, Gracey et al., 1970). I gruppi di acidi grassi degli MCT includono acidi dodecanoico (C12:0), ottanoico (C8:0), esanoico (C6:0) e decanoico (C10:0), questi oli sono semplici, economici e il loro consumo è mediamente accettato (Dayrit, 2015). L'acido laurico (C12:0) è un acido grasso saturo a catena media, da 6 a 12 atomi di carbonio ed è presente in quantità elevate nell'olio di cocco e nell'olio di palmisti, circa 45 g/100 g di porzione commestibile. È stato associato ad alcuni benefici per la salute dell'assunzione di olio di cocco (COCONUT OIL, 2021, Eyres et al., 2016). L'acido laurico è contenuto anche negli oli vegetali, nei frutti, nei semi e nel latte materno (Silva et al., 2015, TSilberstein et al., 2013). L'acido caprilico è anche chiamato acido ottanoico, è un acido grasso saturo.

Si trovano naturalmente nel latte di vari mammiferi e come costituente minore dell'olio di cocco e dell'olio di palmisti. Altri due acidi prendono il nome dall'acido caprilico: acido caproico (C6) e acido caprico (C10). Insieme, questi tre acidi grassi costituiscono il 15% degli acidi grassi nel grasso del latte di capra.

Gli MCFA vengono assorbiti più rapidamente dall'intestino e vanno direttamente al fegato attraverso la vena porta, rispetto agli acidi grassi a catena lunga che vengono assorbiti principalmente attraverso il dotto linfatico e nella circolazione periferica (Bach et al., 1996). Gli MCFA possono essere trasportati direttamente nello spazio inter-membrana mitocondriale senza la navetta della carnitina (Miyagawa et al., 2018). Pochissimo acetyl-CoA entra nel ciclo dell'acido citrico nel fegato poiché gli intermedi, ossalacetato e malato, vengono consumati per la produzione di glucosio. L'elevata quantità di NADH inibisce allostericamente anche il ciclo dell'acido citrico. Di conseguenza, il metabolismo degli acidi grassi a catena media promuove la generazione di chetoni (Flanagan et al., 2010). Sia il rapido assorbimento che la β -ossidazione degli MCFA suggeriscono che questi acidi grassi hanno una funzione fisiologicamente importante (Ebert et al., 2003). Inoltre, i dati sugli animali suggeriscono che gli acidi grassi a catena media possono facilmente attraversare la barriera ematoencefalica (BBB) ed essere ossidati dal cervello (Evangelista et al., 2014). Gli effetti associati alla produzione di SCFA e MCFA nel tratto gastrointestinale e i relativi studi sono elencati in tabella 1.5.1.

Tabella 1.5.1. Effetti di MCFA e SCFA sulla gestione antimicrobica e intestinale.

Trattamento	Modello sistema	Risultati principali	Autore
Acetato		-Svolge un ruolo nella regolazione centrale dell'appetito -L'aumento della produzione nel colon distale, promuove l'ossidazione dei grassi, il miglioramento dell'omeostasi del glucosio e dello stato infiammatorio	Frost et al., 2014, van der Beek et al., 2016
Propionato	Studi d'intervento sull'uomo	Attenuazione diretta dell'appetito e l'assunzione di cibo, influenza la scelta del cibo. -Miglioramento della funzione pancreatica e modulazione accrescimento lipidico epatico.	Chambers et al., 2014, Byrne et al., 2016, Pingitore et al., 2017, Chambers et al., 2018
Butirrato	Studi d'intervento umano	Il butirrato orale riduce l'assunzione di cibo e migliora i profili di glucosio e lipidi attraverso un circuito neurale intestino-cervello negli animali	Li et al., 2018
Acido caprilico (C8:0), acido caprico (C10:0)	Maialini	Promozione <i>Clostridium</i> gruppo I e IV, <i>Lactobacillus johnsonii</i> e <i>Lactobacillus amylovorus</i>	Zentek et al., 2012
MCT (grassi saturi, triotanoini 8:0) o stessa dose per olio di mais (grassi polinsaturi)	Ratti	Incremento integrità intestinale; modulazione risposta immunitaria a LPS; incremento secrezione intestinale di IgA.	Kono et al., 2004
Acidi caprilico e caprico	Maialini	Riduzione pH intestinale, in sinergia con OA; diversi taxa microbici intestinali modulati, potenziale prevenzione fenomeni diarroici dopo svezzamento.	Zentek et al., 2013
Acido laurico (C12:0)	Ratti	Decremento <i>Proteobacteria</i> , <i>Prevotella</i> e <i>phyla Bacteroidetes</i>	Haghikia et al., 2016

1.5.2 Effetti della carne processata sulla produzione di indicatori metabolici microbici negativi

Indolo e scatolo (1H-Indolo, 3-metil) sono due composti del catabolismo del triptofano (trp), derivati dalla degradazione della porzione proteica del cibo. Oltre al metabolismo del triptofano da parte dell'ospite, questo aminoacido può essere direttamente utilizzato dal microbiota residente (Agus et al., 2018). Diversi batteri commensali utilizzano la triptofanasi catabolizzando il triptofano in indoli dando origine a diversi derivati (Hendrixx e Schanbl, 2019). Considerando che l'indolo è anche noto per avere effetti benefici come la riduzione degli indicatori di infiammazione (Bansal et al., 2010.), la sua produzione batterica (*Clostridium spp.* e *Escherichia spp.*) e il conseguente accumulo è tossico

per l'ospite, poiché altera la permeabilità e l'omeostasi della mucosa (Roager and Licht, 2018) e una volta metabolizzato in indossolfato nel fegato, può portare a malattie renali croniche e vascolari (Wang et al., 2020; Hendrixx e Schanbl, 2019). La decarbossilazione batterica (*Bacteroides* spp. e *Clostridium* spp.) di triptofano produce scatolo che è anch'esso un composto dannoso, perché porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie (Roager and Licht, 2018).

Oltre a indolo e scatolo, gli amminoacidi aromatici, come tirosina, fenilalanina e triptofano, possono essere degradati dai batteri del colon producendo fenolo, p-cresolo e altri metaboliti aromatici. È stato dimostrato che il fenolo e il p-cresolo danneggiano la funzione di barriera epiteliale in vitro e possono essere potenzialmente cancerogeni (Wang, Gibson, Sailer, Theis & Rastall, 2020). Il p-cresolo, ad esempio verrebbe trasformato in p-cresolo solfato che dopo la coniugazione si accumula nel fegato portando a complicazioni e patologie. Alti livelli di p-cresolo solfato nel sangue sono correlati alla progressione di alcune malattie renali croniche e a disfunzione vascolare.

Fra i composti solforati, tipicamente presenti nelle formulazioni dei prodotti a base di carne e che hanno un impatto negativo sull'ospite, gli indicatori comuni della loro trasformazione colonica sono il dimetil solfato e il benzotiazolo. Queste molecole sono maggiormente prodotte in presenza di nitrati e hanno un effetto negativo sia sull'ospite, che sull'alimento. Infatti, la loro produzione da parte del microbiota colonico (batteri produttori di solfato, e.g. *Desulfovibrionaceae*) può ridurre i ponti disolfuro della mucina, generando alterazione dello strato mucoso colonico e l'esposizione degli stessi composti verso i colonociti con conseguente risposta infiammatoria (Ijssennagger et al., 2016). Inoltre, i nitrati aumentano la formazione di ponti disolfuro nelle proteine della carne, generando polimerizzazione proteica (Feng et al., 2016).

Un'altra molecola d'interesse per le sue proprietà negative è l'anilina, derivante dalla degradazione del colorante Sudan III e di composti analoghi da parte dei batteri *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum* (Chen et al., 2009). Quest'ultima sostanza è correlata a tossicità perché, induce perossidazione lipidica e ossidazione proteica nella milza. In uno studio di Pan et al. (2012), i coloranti Sudan I, II, III e IV sono stati forniti a diversi microrganismi noti per far parte del microbiota intestinale ed è stato osservato che questi batteri hanno la capacità di degradare i coloranti alimentari con la produzione di ammine genotossiche. Questa osservazione è stata confermata anche da uno studio di Hu et al. (2010). In questo lavoro, infatti, si è visto che le sospensioni fecali umane possono metabolizzare il Sudan I e II e il Para Red con la conseguente produzione di anilina, 2,4-dimetilanilina, o-toluidina e 4-nitroanilina. Questi metaboliti batteri-dipendenti sono classificati come cancerogeni (o-toluidina) o potenzialmente cancerogeni (anilina) per l'uomo. A fronte della loro cancerogenicità e genotossicità, i coloranti Sudan (I, II, III, e IV) sono stati banditi in modo assoluto dagli alimenti in tutti i paesi dell'Unione europea con la Decisione 2004/92/CE successivamente

integrata ed abrogata dalla Decisione della Commissione 2005/402/CE del 23.05.2005. La presenza di questi coloranti negli alimenti è dovuta all'adulterazione del peperoncino rosso in polvere e frantumato, importato dall'Oriente, utilizzato in moltissime preparazioni alimentari: miscele di spezie per condimenti, paprika, curry, paste secche speciali, oli aromatizzati al peperoncino e altro.

Un altro metabolita è la benzaldeide, composto aromatico con funzioni antimicrobiche e antiossidanti e il suo livello più basso nell'intestino può riflettere un'alterazione dello stress ossidativo intestinale. Lo studio di Wang et al. (2019) ha mostrato che i livelli più bassi di benzaldeide siano fortemente associati a una maggiore abbondanza di *Eggerthella lenta* e *Clostridium botulinum* potenzialmente dannosi.

Tabella 1.5.2. Molecole negative prodotte dal metabolismo degli aminoacidi nella carne processata.

Molecola	Pathway	Principali effetti	Autore
Indolo, scatolo	- metabolismo del Trp utilizzato dal microbiota intestinale con triptofanasi, produce indolo. - decarbossilazione batterica di Trp produce scatolo.	- alterazione della permeabilità e l'omeostasi della mucosa intestinale. - malattie renali croniche e vascolari. - produzione di citochine pro-infiammatorie.	Hendrixx e Schanbl, 2019
Fenolo, p-cresolo	- degradazione di tirosina, fenilalanina e triptofano dai batteri del colon. - p-cresolo viene trasformato in p-cresolo solfato, coniugato si accumula nel fegato.	- danno alla funzione di barriera epiteliale in vitro. - potenzialmente cancerogeni. - alti livelli di p-cresolo solfato nel sangue sono correlati alla progressione di alcune malattie renali croniche e disfunzione vascolare.	Wang, Gibson, Sailer, Theis & Rastall, 2020

<p>Dimetil sulfato, benzotiazolo</p>	<p>- prodotte in presenza di nitrati da parte del microbiota colonico (batteri produttori di sulfato, e.g. <i>Desulfovibrionaceae</i>)</p> <p>- i nitrati aumentano la formazione di ponti disolfuro nelle proteine della carne, generando polimerizzazione proteica.</p>	<p>- effetto negative sia sull'ospite, che sull'alimento</p> <p>- riduzione dei ponti disolfuro della mucina, alterazione dello strato mucoso colonico, esposizione dei colonociti e conseguente risposta infiammatoria.</p>	<p>Ijssennagger et al., 2016; Feng et al., 2016</p>
<p>Anilina</p>	<p>- degradazione del colorante Sudan III e di composti analoghi da parte dei batteri <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i>.</p> <p>- coloranti Sudan I, II, III e IV, forniti a diversi microrganismi parte del microbiota intestinale hanno la capacità di degradarli.</p>	<p>- tossicità, perossidazione lipidica e ossidazione proteica nella milza.</p> <p>- produzione di ammine genotossiche.</p>	<p>Chen et al., 2009; Pan et al., 2012</p>

1.6 Il progetto Mime4Health

MiMe4Health – Innovative Milk and Meat products for Consumer's Health è un progetto ha avuto lo scopo di ampliare la gamma dei prodotti di salumeria e lattiero-caseari della filiera del Parmigiano Reggiano, mettendo a punto nuove produzioni in grado di rispondere alle aspettative nutrizionali e salutistiche del consumatore moderno. Il progetto ha coinvolto tre centri interdipartimentali dell'Università di Parma (SITEIA.PARMA e COMT) e dell'Università di Bologna (CIRI AGRO), una Fondazione di Ricerca (SSICA) e un laboratorio di ricerca (CRPA LAB di CRPA spa) della Regione Emilia-Romagna, mettendo in campo tutte le competenze, le risorse e le capacità disponibili in modo coerente, complementare e sinergico, consentendo la realizzazione e lo sviluppo di soluzioni idonee a soddisfare i bisogni e le richieste di innovazione da parte della filiera agroalimentare, in particolare per il settore della salumeria e lattiero-caseario.

Si tratta di un progetto multidisciplinare, considerando due delle principali filiere produttive della regione Emilia-Romagna e comprendendo sia realtà con specifiche *expertise* nei due settori (dal punto di vista della ricerca, del trasferimento tecnologico e della produzione), imprese locali con competenze quali la produzione e lo studio di additivi, ingredienti e tecnologie tradizionali e innovative, nonché un'azienda di ingredienti e additivi (Chr. Hansen spa) e una per la produzione e la formulazione di alimenti liofilizzati (Lyo Italia srl). Questa partecipazione intersettoriale si è concretizzata fin dalle prime fasi del progetto in un confronto e una collaborazione continui per lo sviluppo delle soluzioni tecnologiche più idonee alla realizzazione dell'obiettivo comune, garantendo l'individuazione delle strategie per la formulazione di prototipi di prodotti innovativi.

I prodotti che hanno passato i test di tipo tecnologico, qualitativo e di sicurezza alimentare sono stati sottoposti a focus group sul gradimento dei consumatori. Solo per quelli che hanno superato anche questo step sono stati realizzati linee guida e protocolli tecnologici da trasferire su scala industriale. Alla fine del progetto, i prototipi validati sono pronti per i test di produzione industriale per una loro futura commercializzazione.

1.7 MICODE

I modelli di fermentazione intestinale *in vitro* sono stati introdotti nella ricerca sulla nutrizione e sulla microbiologia applicata più di venti anni fa. Questi modelli prevedono l'uso di sistemi assemblati semplici o più complessi (bioreattori), per rappresentare i comparti del tratto gastro-intestinale, e di inoculi fecali, per rappresentare il microbiota colonico. Nel tempo sono stati migliorati e diversificati, cercando un compromesso tra riproducibilità, praticità e somiglianza con la condizione *in vivo*. In genere, i modelli *in vitro* si dividono in due classi, quelli che lavorano in continuo per periodi di alcune settimane, adatti per lo studio sulle diete, e quelli che lavorano in "batch" o in "fed- batch" per periodi di 24 - 48 ore, adatti per lo studio di substrati, probiotici, o di composti chimici. In particolare, questi ultimi modelli rappresentano uno strumento rapido per comprendere ad esempio l'impatto di una fibra prebiotica sul microbiota intestinale, paragonando differenti casi tra di loro. Lo studio si basa sulla comprensione dei cambiamenti nella composizione del microbiota intestinale (e.g. FISH, qPCR, 16S MiSeq) e dei loro profili metabolici (e.g. SPME-GCMS, NMR). Si prendono in considerazione la diversità, la ricchezza e l'abbondanza della comunità microbica nel tempo e si seguono alcuni taxa microbici chiave nella digestione degli alimenti. Inoltre, è possibile studiare come viene digerito un composto, quali vie metaboliche vengono innescate, il tipo e la quantità di metaboliti microbici prodotti. Ulteriori prospettive riguardano gli studi di competizione con patogeni intestinali (*Clostridioides difficile*) e quelli relativi all'ecologia delle sindromi intestinali (Met-S, celiachia, intolleranza al lattosio, ecc.).

MICODE (Multi-Unit *in vitro* colon model) è un nuovo modello intestinale molto versatile in servizio presso il DiSTAL (Università di Bologna), che simula il tratto dell'intestino crasso umano (o animale), accoppiato eventualmente a una digestione gastro-duodenale. Con MICODE è possibile coltivare fino a 500 OTUs microbiche differenti, incluse specie rare e fastidiose (*Archea*, *Lachnospira*) e, grazie ad un sistema di filtri e condensatori, è possibile intrappolare anche quelle molecole aromatiche più volatili, come alcuni indicatori fondamentali della fermentazione colonica (indoli). MICODE si può impostare per simulare differenti condizioni *in vivo*, applicando settaggi in continuo o in batch.

2. Obiettivo e scopo

L'obiettivo di questa tesi è quello di valutare *in vitro* gli effetti sul microbiota intestinale umano di salami riformulati sostituendo i nitriti con acido ascorbico e antiossidanti vegetali. A questo scopo è stato utilizzato il modello intestinale *in vitro* MICODE, nella versione che include la digestione gastro-duodenale seguita dalla fermentazione colonica. Gli effetti sul microbiota intestinale sono stati valutati in base agli shift delle popolazioni microbiche e la produzione di VOCs in seguito alla fermentazione.

3. Materiali e metodi

3.1 Donatori di campione fecale

I campioni sono stati ottenuti ed elaborati seguendo protocolli precedentemente definiti (Connolly, Tuohy & Lovegrove, 2012; Koutsos et al., 2017; Oba et al., 2020; Nissen, Valerii, Spisni, Casciano & Gianotti, 2021; Arnal et al., 2021). Le donazioni fecali sono state ottenute da tre soggetti sani, due femmine e un maschio di età compresa tra i 30 e 45 anni. Per almeno 3 mesi prima della raccolta delle feci, i donatori non sono stati sottoposti a trattamento antibiotico, non hanno consumato intenzionalmente integratori pre- o probiotici e non presentavano precedenti di disturbi intestinali. Inoltre, i donatori erano tutti soggetti normopeso, non fumatori, non consumavano abitualmente droghe e bevande alcoliche. I campioni fecali sono stati donati due volte (con un intervallo di sette giorni) per le due repliche biologiche. Per raccogliere le feci, a ciascun donatore è stato fornito un kit, che include un contenitore di raccolta (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germania) e una giara anaerobica con un catalizzatore di O₂ (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, STATI UNITI D'AMERICA). I campioni fecali sono stati quindi mantenuti a 4°C ed utilizzati entro 1 h. La sospensione fecale è stata preparata omogeneizzando 6 g di feci (2 g di ciascuna donazione) in 54 mL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) preridotta. I tre donatori sani sono stati informati degli obiettivi e delle procedure dello studio e hanno dato il loro consenso verbale all'utilizzo della loro materia fecale per gli esperimenti, in accordo con le procedure etiche richieste dall'Università di Bologna.

3.2 Materiali

Sostanze chimiche, solventi ed enzimi per la fermentazione in coltura in batch erano del più alto grado analitico e sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germania) e Carlo Erba Reagents (CEDEX, Val de Reuil, FR), salvo diversa indicazione. I reagenti per la biologia molecolare e i kit per l'estrazione o la purificazione del DNA sono stati acquistati da Thermo Fisher Scientific (USA).

3.3 Campioni analizzati

I salami sono stati prodotti in impianto pilota SSICA (Ottobre 2020). A fine stagionatura i campioni delle quattro formulazioni sono stati tagliati a metà e messi in sotto vuoto dopo aver rimosso il budello. I campioni sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

I campioni sono stati identificati con la formulazione e una numerazione progressiva da 1 a 3 (Tabella 3.3). Prima di effettuare il campionamento è stata posta maggiore attenzione nel togliere la porzione finale del 'culetto' (almeno 1 cm) (Figura 3.3).

Figura 3.3. Porzionamento prodotto carneo trasformato.

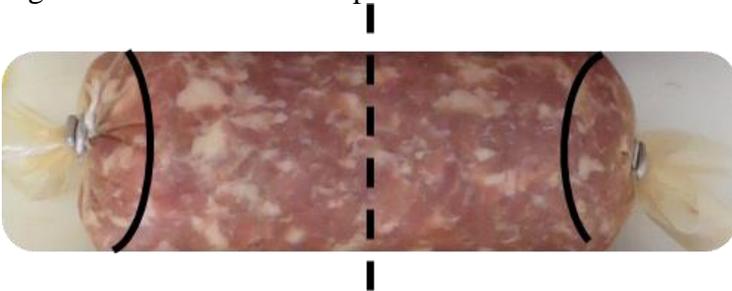


Tabella 3.3. Descrizione dei campioni selezionati nello studio

	SIGLA	SALE E AROMI	NO ₂	STARTER	ASCORBATO	MIX DI ESTRATTI	N.
CONTROLLO-NO ₂	C-NO ₂	+	+	+	-	-	3
CONTROLLO-0	C-0	+	-	-	-	-	3
STARTER-ASCORBATO	SA	+	-	+	+	-	3
STARTER-MIX Antioss-ASCORBATO	SMA	+	-	+	+	+	3

3.4 Digestione gastrica e duodenale *in vitro*

I salami sperimentali sono stati sottoposti a digestione *in vitro*. In breve, il processo di digestione è stato eseguito su 5 g di salame per 245 min (2 min di digestione orale, 120 min di gastrica e 120 min di intestinale) a 37°C, secondo il protocollo standardizzato INFOGEST (Minekus et al., 2014). Durante la digestione *in vitro*, sono stati effettuati diversi trattamenti enzimatici consecutivi mediante l'aggiunta di saliva simulata (contenente 75 U/mL di α -amilasi), succo gastrico simulato (contenente 2000 U/mL di pepsina) a pH acido e succo pancreatico simulato (contenente 10 mM bile e 100 U/mL di pancreatina) a pH neutro. Dopo la digestione, le soluzioni risultanti sono state congelate a -20°C fino all'ulteriore fermentazione colonica *in vitro*.

3.5 Fermentazione colonica in coltura batch e raccolta campioni

Le fermentazioni coloniche sono state condotte per 24 ore in vessel indipendenti con 1 % (p/v) di SA (starter e ascorbato), 1 % (p/v) di SMA (starter, mix di ascorbato e antiossidanti), 1 % (p/v), 1% CNO₂ (controllo con nitriti) e 1% di CO (controllo senza nitriti) utilizzando un modello intestinale *in vitro*, MICODE (Multi-Unit *in vitro* Colon Model), ottenuto dall'assemblaggio di Minibio Reactor (Applikon Biotechnology BV, Delft, NL) e controllato dal software Lucillus PIMS (Applikon Biotechnology BV, NL) (Nissen, Casciano, Di Nunzio, Chiarello, Bordoni & Gianotti, 2020; Nissen, Valerii, Spisni, Casciano & Gianotti, 2021). La preparazione degli esperimenti è stata effettuata secondo procedure pubblicate (Connolly, Tuohy & Lovegrove, 2012; Koutsos et al., 2017; Wang, Gibson, Sailer, Theis & Rastall, 2020; Nissen, Casciano, Di Nunzio, Chiarello, Bordoni & Gianotti, 2020; Nissen, Valerii, Spisni, Casciano & Gianotti, 2021). In dettaglio, i bioreattori sono stati sterilizzati in autoclave a 121 ° C e 100 KPa per 15 minuti e una volta raffreddati sono stati riempiti con 90 mL di terreno nutritivo basale pre-sterilizzato. Il terreno nutritivo basale (BM) era così

composto (per litro): 2 g di peptone, 2 g di estratto di lievito, 0,1 g di NaCl, 0,04 g di K₂HPO₄, 0,04 g di KH₂PO₄, 0,01 g di MgSO₄·7H₂O, 0,01 g di CaCl₂·6H₂O, 2 g di NaHCO₃, 2 mL Tween 80, 0,05 g di emina sciolto in 1 ml di NaOH 4M, 10 ml di vitamina K, 0,5 g di L-cisteina HCl e 0,5 g di sali biliari (glicocolato di sodio e taurocolato di sodio). Il mezzo è stato regolato a pH 7,0 prima della sterilizzazione in autoclave e successivamente sono stati aggiunti 2 mL di soluzione di resazurina allo 0,025% (p/v). I vessel sono stati riempiti in modo asettico con 90 mL di BM e sono stati montati sulle testate di ciascun bioreattore i sensori di pH e dO₂ (ossigeno disciolto). La condizione anaerobica (0,0 – 0,1% p/v di DO₂) in ciascun bioreattore è stata ottenuta in circa 30 minuti lavando con N₂ filtrato privo di O₂ attraverso lo sparger montato nei reattori Minibio (Applikon Biotechnology BV, NL) ed è stata mantenuta costante durante l'esperimento. La temperatura è stata fissata a 37 °C e l'agitazione a 300 rpm, mentre il pH è stato regolato a 6,75 e mantenuto per tutto l'esperimento con l'aggiunta automatica di NaOH o HCl (0,5 M) filtrati per imitare le condizioni situate nella regione distale del colon. Una volta raggiunte le impostazioni ambientali esatte, i vessel sono stati inoculati in modo asettico con 10 ml di sospensione fecale (10% p/v di feci umane a una concentrazione finale dell'1%, p/v) e poi tre di essi sono stati inoculati in modo indipendente con 1 g di SA, SMA o CNO₂ (ad una concentrazione finale dell'1%, p/v), mentre il quarto vessel è stato impostato come controllo in bianco (BC) solo terreno nutritivo basale e 1% di sospensione fecale. Le fermentazioni sono state eseguite in queste condizioni controllate per un periodo di 26,55 ore durante le quali i campioni sono stati raccolti in 3 punti temporali (baseline, 18 e 24 ore). La linea di base (BL) è stata definita sulle prime variazioni di pH rilevate da Lucillus (1 lettura/10 s) tramite i sensori di pH di MICODE. Per questo lavoro, la BL è stata impostata dopo 2,55 ± 0,11 h. Il campionamento è stato eseguito con un sistema di filtraggio a doppia siringa (Applikon Biotechnology BV, NL) collegato a un galleggiante che attinge dal fondo dei vasi senza perturbare o interagire con l'ecosistema del bioreattore. Per garantire uno stretto controllo, monitoraggio e registrazione dei parametri di fermentazione è stato utilizzato il software Lucillus 3.1 (PIMS, Applikon Biotechnology BV, NL). Ciò ha anche permesso di mantenere la stabilità di tutte le impostazioni durante l'esperimento. Le fermentazioni sono state condotte in esperimenti duplicati indipendenti, utilizzando per ciascuno un nuovo pool di feci degli stessi tre donatori sani.

3.6 Estrazione di DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata con Pure Link Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). La procedura di estrazione è stata effettuata interamente a temperatura ambiente (20-25°C). Nella prima fase, che consiste nella preparazione del lisato batterico, vengono inseriti in una provetta con microsfere, il campione biologico e 600 µL di Lysis buffer e la miscela è stata vortexata, assicurandosi che il campione sia adeguatamente disperso nel liquido. Si aggiungono 100 µL di Lysis Enhancer, una volta chiusa la provetta, si vortexa brevemente. La miscela viene incubata a 65 °C per 10 minuti, dopodiché, si omogeneizza per 10 minuti alla massima velocità con il vortex poi si impiega l'agitatore orizzontale. Si centrifuga a 14000 x g per 5 minuti e si trasferiscono fino a 400 µL di surnatante in una eppendorf pulita, facendo attenzione a non trasferire, insieme al surnatante, eventuali detriti presenti sulle microsfere. Si aggiungono 250 µL di Cleanup Buffer e si vortexa subito, in modo da assicurare anche la dispersione del Cleanup Buffer e un'uniforme precipitazione di inibitori. Si centrifuga a 14000 g per 2 minuti e si trasferisce fino a 500 µL di surnatante per ripulire le eppendorf, evitando il trasferimento di microsfere e detriti. Nella seconda fase di estrazione, in cui il DNA viene legato ad una colonnina porosa per purificazione (Clean-up Column), si procede aggiungendo 900 µL di Binding Buffer e si vortexa brevemente, si caricano 700 µL della miscela, contenente il campione, in una provetta assemblata ad una Clean-up Column e si centrifuga a 14000 g per 1 minuto. Si scarta il liquido percolato attraverso la colonnina e si ripete la fase di aggiunta di 700 µL della stessa miscela con campione e si centrifuga nuovamente nelle medesime condizioni. È importante assicurarsi che l'intera miscela di campione sia passata alla provetta di raccolta, ispezionando la colonnina, se del campione dovesse essere rimasto aderente ad essa, si centrifuga a 14000 g per un altro minuto. La terza fase di estrazione consiste nel lavaggio ed eluizione del DNA e si procede con l'introduzione della Clean-up Column in una provetta di raccolta pulita, si aggiungono 500 µL di Wash Buffer e si centrifugano Clean-up Column e provetta assemblate a 14000 g per 1 minuto. Una volta che il liquido percolato è stato scartato, si centrifuga nuovamente la colonnina assemblata alla provetta di raccolta a 14000 per 30 secondi. Lo scopo della seconda centrifuga è quello di ottimizzare la rimozione del Wash Buffer, il quale potrebbe interferire con le successive operazioni di downstream. Nell'ultima fase si inserisce la Clean-up Column in una eppendorf e si aggiungono 100 µL di Elution Buffer, dopodiché si lascia ad incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Si centrifuga a 14000 per 1 minuto e si scarta la Clean-up Column. Ciò che si ottiene è il DNA batterico purificato all'interno dell'eppendorf.

3.7 Quantificazione del DNA estratto

Una volta estratto, il DNA batterico è stato sottoposto a quantificazione utilizzando spettrofotometro BioDrop μ LITE (BioDrop Biotechnology, UK), che misura volumi fino a 2 μ L. Il cammino ottico è di $\pm 5 \mu\text{m}$ e sono stati posti 1,5 μ L di campione nel centro della cella e misurati. Il software impiegato è Life Science PC e il programma è quello di quantificazione del DNA genomico. Oltre alla quantificazione sono stati valutati i due rapporti di assorbanza λ 260/230 nm e λ 260/280 nm. λ 260/230 nm è l'indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi), il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi; λ 260/280 è invece l'indice di contaminazione da proteine, per DNA il rapporto deve essere 1.6-1.8, rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine. È importante, per le nostre analisi molecolari a valle, lavorare con campioni ad elevato grado di purezza. I campioni analizzati in questo studio presentavano una purezza media di λ 260/230 = 1,7 e λ 260/280 = 1,8.

3.8 PCR

I protocolli di PCR sono stati effettuati in modo specifico per ogni target, basandosi su primer ottenuti dalla letteratura (tabella 3.8.a) e aggiustando le reazioni in base alle nostre esigenze. Le PCR svolte avevano il compito di identificare la presenza nel DNA estratto dal campione fecale del target da quantificare ed in modo da poter ottenere il materiale genetico per la costruzione degli standard da utilizzare nei protocolli di quantificazione in Real-Time. Sono stati utilizzati due differenti Polimerasi a seconda della disponibilità genetica del prodotto da amplificare; Platinum Taq per *Bacteroidetes*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* ed *E. coli*, mentre la più sensibile Super-fi Platinum Taq per *Firmicutes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* spp. e *B. longum*. I protocolli delle reazioni di PCR sono riportati per i Gram negativi (tabella 3.8.b.) e per Gram positivi (tabella 3.8.c). I risultati delle reazioni di PCR sono stati visualizzati con gel d'agarosio con concentrazione variabile dal 1,5 al 2% in TAE 1x (Tris-acetato EDTA) a seconda dell'amplicone ottenuto. Il TAE 1x è stato ottenuto da una soluzione 50x così preparata: 242 g Tris base (2-ammino-2-idrossimetil-propan-1,3-diolo) (= 2 moli), 57,1 mL acido acetico glaciale (= 100% acido acetico) (57,19 mL = 1 mole), 100 mL 0,5 M Na₂ EDTA (pH 8.0). Le bande di DNA sono state visualizzate con 4 μ l /100 ml di GelRed® (Biotinum, USA) con l'utilizzo di un trans illuminatore ad UV. Il gel d'agarosio è stato fatto correre in TAE 0,5x a 110 W e 2,5 mA per 45 minuti, utilizzando come ladder Promega Benchtop 1Kb (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabella 3.8.a. Descrizione dei primer utilizzati e bibliografia.

Nome	Target	Sequenza 3'-5'	Bp	Bibliografia
<i>Eubacteria</i>	V3-V4	Eub518-R: ATTACCGCGGCTGCTGG	147	Lane <i>et al</i> , 1992
	16 S	Eub338-R: ACTCCTACGGGAGGCAG		
<i>Bacteroidetes</i>	V3-V4 16	Bact934F: GGARCATGTGGTTTAATT	250	Guo <i>et al</i> , 2008
	S	Bact1060R: AGCTGACGACAACCATG		
<i>Firmicutes</i>	V3-V4 16	Firm934F: GGAGYATGTGGTTTAATT	300	Guo <i>et al</i> , 2008
	S	Eub338R: ACTCCTACGGGAGGCAG		
<i>Enterobacteriaceae</i>	V3-V4 16	Enterobac-f: TGCCGTAACCTCGGGAG	450	Bartosh <i>et al</i> , 2004
	S	Enterobac-r: TCAAGGACCAGTGTTTCAG		
<i>Lactobacillales</i>	V3-V4 16	F-Lac: GCAGCAGTAGGGAATCT	340	Walter <i>et al</i> , 2001
	S	R-Lac: GCATTYCACCGCTACACA		
<i>Bifidobacteriaceae</i>	RecA	RecAf: CGTYTCBCAGCCGGAYA	220	Masco <i>et al</i> ., 2006
		RecAr: CCARVGCRCGGTCATC		
<i>Akkermansia muciniphila</i>	V3-V4 16	AkM1: CAGCACGTGAAGGTGGG	327	Guo <i>et al</i> , 2016
	S	AkM2: CCTTGCGGTTGGCTTCA		
<i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas (BPP)</i>	V3-V4 16	BPP-f: GAGAGGAAGGTCCCCCA	140	Pachikian <i>et al</i> , 2011
	S	BPP-r: CGCKACTTGGCTGGTTCA		
<i>E. coli</i>	FtsZ	EcFtsZf: GGTATCCTGACCGTTGCT	250	Zhou e Helmstetter, 1994
		EcFtszr: ATACCTCGGCCCAGAACT		
<i>B. longum</i>	V3-V4 16	Blon-f: GATTCTGGCTCAGGATGA	220	Chen <i>et al</i> , 2007
	S	Blon-r: CTGATAGGACGCGACCC		
<i>Clostridium</i> gruppo I	V3-V4 16	ClosI-F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC	148	Bartosh <i>et al</i> , 2004
	S	ClosI-R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT		
<i>Clostridium</i> gruppo IV	V3-V4 16	ClosIV-f: TTAACACAATAAGTWATC	400	Goldberg <i>et al</i> , 2013
	S	ClosIV-r: ACCTTCCTCCGTTTTGTC		

Tabella 3.8.b. Descrizione delle impostazioni di PCR tradizionale generica per Gram negativi.

Target	PCR Reazione (25 µL volume)		Condizioni PCR		
	Reagent	Volume	Temp.	Time	Cycles
<i>Reazione generica</i>	DNTPs [10 µM]	1.5 µL	94°C	30 sec	1
	Buffer 10X	2.5 µL	96°C	30 sec	
	MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL	60°C	30 sec	35
	Primer F [25 µM]	0.5 µL	72°C	30 sec	
	Primer R [25 µM]	0.5 µL	10°C	hold	
	Platinum Taq DNA Polymerase [50 ng]	0.25 µL			
	DNA	1 µL			
	Nuclease-Free water	17.25 µL			

Tabella 3.8.c. Descrizione delle impostazioni di PCR tradizionale generica per Gram positivi.

Target	PCR Reazione (25 µL volume)		Condizioni PCR		
	Reagent	Volume	Temp.	Time	Cycles
<i>Reazione generica</i>	DNTPs [10 µM]	1.5 µL	96°C	120 sec	1
	Buffer 10X	2.5 µL	96°C	30 sec	
	MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL	60°C	60 sec	35
	Primer F [25 µM]	0.5 µL	72°C	30 sec	
	Primer R [25 µM]	0.5 µL	10°C	hold	
	Platinum Taq DNA Polymerase [50 ng]	0.25 µL			
	DNA	1 µL			
	Nuclease-Free water	17.25 µL			

3.9 Costruzione degli standard genici

L'estrazione è stata fatta con kit di purificazione GeneJET Gel Extraction and DNA cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Il protocollo adottato per questo tipo di purificazione è il PCR Cleanup Dimers Removal. Si procede con l'aggiustamento del volume del DNA di partenza (19 µL) con 181 µL di acqua ultrapura, per ottenere un volume totale di 200 µL. Si aggiungono 100 µL di Binding Buffer e 300 µL di etanolo al 96%. 600 µL di miscela vengono trasferiti in una Clean-up Coloumn e si centrifuga a 14000 g per 1 minuto. Si scarta la provetta di raccolta e si sostituisce con una nuova. Si aggiungono 200 µL di Prewash Buffer e si centrifuga a 14000 g per 1 minuto. Si scarta la provetta con il liquido percolato e si trasferisce la Clean-up Coloumn in una nuova provetta. Si aggiungono 700 µL di Wash Buffer e si centrifuga a 14000 per 1 minuto, scartando il liquido percolato. L'ultimo passaggio è l'eluizione del DNA che è legato alla resina della Clean-up Coloumn. Si posiziona la Clean-up Coloumn all'interno di una nuova Eppendorf, vi si inseriscono 10 µL di Eluition Buffer, segue una centrifuga di 1 minuto a 14000 g. Ciò che si ottiene è l'amplicone di DNA

purificato all'interno dell'ependorf. Sono stati selezionati gli ampliconi, uno per ciascun target microbico, che al trans illuminatore a UV presentavano una banda più evidente e ne è stata effettuata una quantificazione utilizzando spettrofotometro BioDrop μ LITE (BioDrop Biotechnology, UK). Il cammino ottico è di $\pm 5 \mu\text{m}$ e sono stati posti 1,5 μL di DNA estratto nel centro della cella e misurati. Il software impiegato è Life Science PC e il programma è quello di quantificazione degli oligonucleotidi. Oltre alla quantificazione sono stati valutati i due rapporti di assorbanza λ 260/230 nm e λ 260/280 nm. Gli ampliconi analizzati hanno presentato una purezza media di λ 260/230 = 2,0 e λ 260/280 = 1,6. Dopo aver determinato la concentrazione in ng degli ampliconi purificati, è stato calcolato il numero di copie geniche (GCN) usando il dsDNA CALCULATOR (URI Genomics & Sequencing Centre, USA) e la formula: numero di copie geniche = (quantità * $6,022 \times 10^{23}$) / (lunghezza * 1×10^9 * 650), nel calcolo viene inserita la concentrazione dell'amplicone e attraverso il numero di copie geniche è stato svolto il calcolo delle diluizioni seriali di DNA, partendo da 10^{10} GCN, fino ad arrivare a 10^2 GCN. Nel corso delle analisi di Real Time sono state usate solo cinque diluizioni standard per reazione.

3.10 Real Time quantitativa dei campioni estratti

La Real Time PCR, o qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare un'analisi quantitativa della quantità di DNA stampo iniziale, nel nostro caso del DNA target. Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione della reazione di PCR. Le informazioni che si ottengono con questa tecnica sono quindi maggiori rispetto a quelle di una classica PCR. Uno dei fluorofori più utilizzati è il SYBR Green, una molecola fluorescente che durante le reazioni di PCR si intercala nel doppio filamento del DNA. Nella reazione di qPCR svolta in questo studio è stato utilizzato il PowerUp SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), che contiene enzima brevettato Dual-Lock™ Taq DNA Polymerase. Questo particolare enzima consente una quantificazione del DNA altamente sensibile per consentire il rilevamento di numeri di copie basse. Tutti gli strumenti di real-time PCR combinano un termociclatore, che riesce a realizzare automaticamente le variazioni cicliche di temperatura richieste dai diversi protocolli, e un sistema ottico, uniti a un computer e a un software specializzato per l'elaborazione dei dati. Le corse di Real-Time PCR sono state effettuate con apparecchio RotorGene 6000 (Qiagen, De) con rotore a 72 pozzetti, lavorando in triplicato ed includendo in ogni reazione cinque punti standard in triplicato, un controllo negativo, uno positivo ed un controllo dei soli reagenti di reazione. Ogni

pozzetto è stato caricato con un volume di reazione di 11 μL . Le specifiche di ogni reazione sono riportate in tabella 3.10.

Tabella 3.10. Caratteristiche delle reazioni di Real-Time qPCR generica.

Target	PCR Reazione (10,0 μL volume + 20% off)	PCR Condizioni			
<i>Reazione generica</i>	Reagent	Volume	Temp.	Time	Cycles
	Power up SYBR Green Master Mix	6.33 μL	96°C	60 sec	1
	Primer F [25 μM]	0.80 μL	95°C	7 sec	42
	Primer R [25 μM]	0.80 μL	60°C	20 sec	42
	DNA [10 ng]	1.2 μL			
	Nuclease-free water	0.9 μL			

3.11 Pipeline dell'attività sperimentale

Le fermentazioni sono state eseguite per 24 ore, dopo l'adattamento dell'inoculo fecale, definito come baseline (BL), per i vessel paralleli e indipendenti per CNO₂, C0, SA e SMA. L'intero esperimento consisteva in 32 casi (n = 32), di cui 4 tesi (CNO₂, C0, SA e SMA) e 4 punti temporali (BL, 6 h, 18 h e 24 h) in duplicato. Campioni dei diversi punti temporali sono stati utilizzati per le analisi qPCR e SPME GC-MS. Dopo il campionamento in condizioni di sterilità di 5 mL di contenuto del bioreattore, i campioni sono stati centrifugati a 16000 \times g per 7 minuti per separare il pellet e il surnatante, che sono stati utilizzati rispettivamente per l'estrazione del DNA batterico e l'analisi SPME-GC-MS. Nello specifico, l'estrazione del DNA microbico è stata condotta subito dopo il campionamento per non ridurre il contenuto di *Firmicutes*. Il DNA estratto ed i campioni per l'analisi SPME GC MS sono stati quindi conservati a -80°C. Le repliche tecniche delle analisi sono state condotte in duplicato per SPME GC-MS (n = 64) e in triplicato per qPCR (n = 96), entrambi da due esperimenti indipendenti.

3.12 Analisi del volatiloma

La valutazione dei composti organici volatili (VOC) è stata effettuata su un gascromatografo Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa Agilent Technologies 5975 operante in modalità impatto elettronico (tensione di ionizzazione di 70 eV) dotato di una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB (lunghezza 50 m, ID 0,32 mm) (Chrompack, Middelburg, Paesi Bassi). Il protocollo GC-MS per microestrazione in fase solida (SPME) e l'identificazione dei composti volatili sono stati eseguiti secondo i rapporti precedenti, con lievi modifiche (Guerzoni, Vernocchi, Ndagijimana, Gianotti, & Lanciotti, 2007; Di Cagno et al., 2011 ; Nissen, Casciano, Di Nunzio, Chiarello, Bordoni & Gianotti, 2020; Casciano, Nissen & Gianotti, 2021). In breve, 3 mL di campione sono stati posti in vials di vetro da 10 mL e sono stati aggiunti 10 μ L di standard interno (4-metil-2-pentanololo) fino a una concentrazione finale di 4 mg/L. I campioni sono stati quindi equilibrati per 10 minuti a 45°C. La fibra SPME, rivestita con carboxen-polidimetilsilossano (85 μ m), è stata esposta a ciascun campione per 40 minuti. Le fasi di preconditionamento, assorbimento e desorbimento dell'analisi SPME-GC e tutte le procedure di elaborazione dei dati sono state eseguite secondo pubblicazioni precedenti (Di Cagno et al., 2011; Nissen, Casciano, Di Nunzio, Chiarello, Bordoni & Gianotti, 2020; Casciano, Nissen & Gianotti, 2021). In breve, prima di ogni campionamento dello spazio di testa, la fibra è stata esposta all'ingresso del GC per 10 minuti per il desorbimento termico a 250 °C in un campione bianco. I campioni sono stati quindi equilibrati per 10 minuti a 40°C. La fibra SPME è stata esposta a ciascun campione per 40 minuti e infine inserita nella porta di iniezione del GC per un desorbimento del campione di 10 minuti. Il programma di temperatura era: 50 °C per 1 min, quindi programmato da 1,5 °C/min a 65 °C e infine da 3,5 °C/min a 220 °C, che è stato mantenuto per 25 min. Le temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente di 250, 250 e 230 °C. Le iniezioni sono state eseguite in modalità split-less ed è stato utilizzato elio (3 ml/min) come gas di trasporto. L'identificazione delle molecole è stata effettuata ricercando gli spettri di massa nei database disponibili (libreria NIST 11 MSMS e il programma NIST MS Search 2.0 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Ciascun VOC è stato relativamente quantificato in percentuale (LOD = 0,001 mg/kg) (Bonfrate et al., 2020). Inoltre, nei campioni prima della fermentazione colonica *in vitro* (baseline) (Tabella S3) sono stati quantificati in modo assoluto anche i principali metaboliti microbici correlati all'attività prebiotica in mg/Kg (LOQ = 0,03 mg/kg e LOD = 0,01 mg/kg) (Di Cagno et al., 2011; Nissen, Casciano, Di Nunzio, Chiarello, Bordoni & Gianotti, 2020; Casciano, Nissen & Gianotti, 2021). Per questi ultimi composti, campioni all'endpoint (24 h) sono stati confrontati con la linea di

base e i valori sono stati espressi come spostamenti. Tutti i risultati sono stati espressi come valori medi normalizzati ottenuti da duplicati in due esperimenti indipendenti.

3.13 Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata effettuata con le funzioni di statistica di Excel (Windows) e con il programma Statistica (Tibco Palo Alto, CA, USA). È stata effettuata pulizia dei dati e rimozione degli outliers, le quantificazioni assolute dei gruppi microbici sono state fatte in GCN/g (numero di copie geniche su grammo) a partire da valori di Ct ottenuti da triplicati dei campioni. La normalizzazione dello SHIFT microbico è stata effettuata con la formula “min” “max” per valori negativi secondo la seguente formula: $2 * (\text{data training} - \text{val.min}) / (\text{val.max} - \text{val.min}) - 1$.

Per la statistica relativa alle molecole analizzate con Gas cromatografia, è stata impiegata ANOVA, per la significatività all'interno del data set e analisi post-hoc HSD Tukey test, per la comparazione fra campioni.

4 Risultati

4.1 Analisi molecole benefiche

La fermentazione di ogni tipo di salame produce acidi organici a corta e media catena. Questi acidi rappresentano molecole positive per l'ospite per gli effetti benefici che possono avere nel colon, soprattutto se prodotti in un rapporto Acetico/Propanoico/Butanoico 60/20/20. Nella tabella 4.1 se ne valuta l'incremento rispetto all'inizio della fermentazione (baseline), al primo tempo di raccolta del fermentato dopo 18 ore (T1) e al termine dell'esperimento a 24 ore (EP).

Tabella 4.1. Quantificazione degli acidi organici all'inizio della fermentazione colonica (baseline)

VOCs	Baseline (mg/kg)		
Acido acetico	0.223	±	0.025
Acido propanoico	0.161	±	0.010
Acido butanoico	0.500	±	0.229
Acido pentanoico	0.352	±	0.250
Acido esanoico	0.000	±	0.000

Il grafico in Figura 4.1 mostra gli incrementi degli acidi organici dopo la fermentazione colonica dei salami rispetto al tempo iniziale di adattamento del microbiota alle condizioni *in vitro* (baseline).

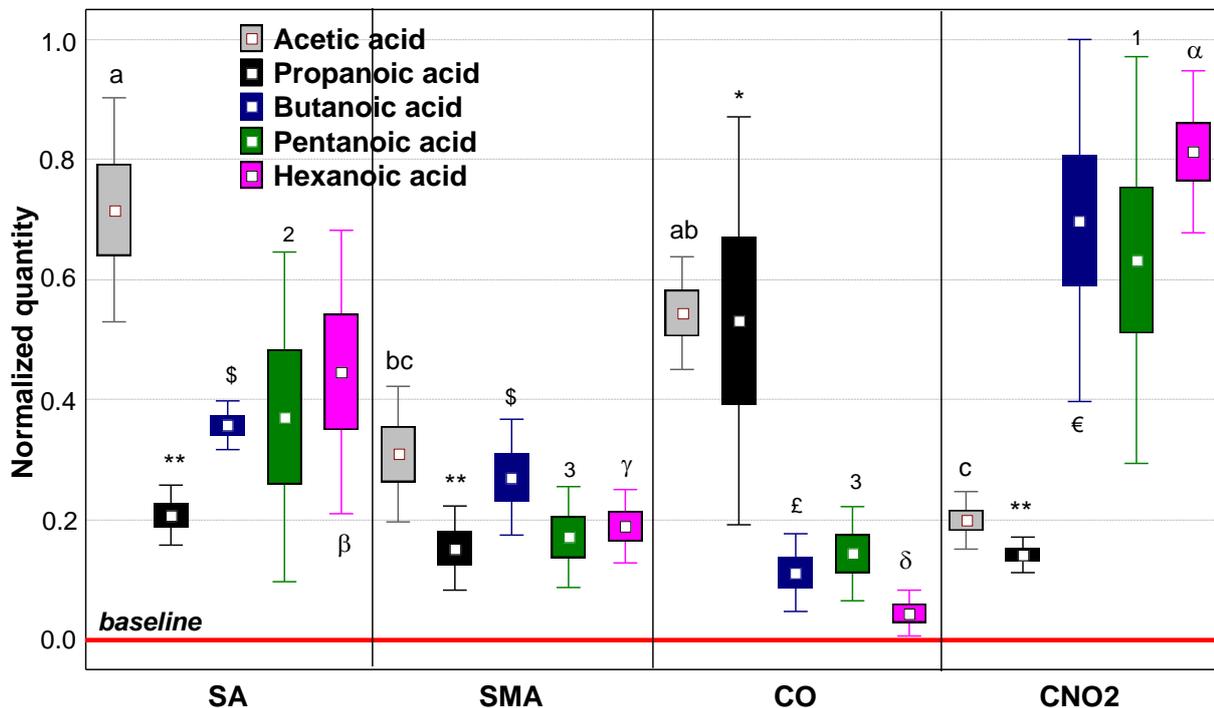


Figura 4.1. Shift delle produzioni di acidi organici

Durante la fermentazione SA produce circa 7 volte acido acetico, e circa 4 volte pentanoico ed esanoico. In base a questo risultato, si può evincere che la fermentazione del prodotto con formulazione SA sia la migliore. SMA produce ridotte quantità di ognuno dei composti. CO produce il massimo di propionico, mentre CNO₂ produce il massimo di butanoico, pentanoico ed esanoico. La produzione di acidi organici post biotici nei diversi campioni ha avuto questa tendenza: CNO₂ > SA > SMA > CO. Sebbene il campione contenente nitriti (CNO₂) abbia mostrato la maggiore produzione di acidi organici, la migliore alternativa all'utilizzo dei nitriti risulta essere la formulazione con acido ascorbico (SA), mentre l'ulteriore aggiunta del mix di antiossidanti (SMA) determina una riduzione complessiva nella produzione di molecole benefiche per l'ospite

4.2 Molecole negative

La fermentazione di ogni tipo di salame produce normalmente VOCs potenzialmente tossici per l'ospite, derivanti dalle reazioni di ossidazione di lipidi e aminoacidi. Come si nota dai valori in tabella 4.2, il salame che rappresenta il controllo CO, senza alcun additivo, ha prodotto la quantità massima di queste molecole negative.

Tabella 4.2. Quantificazione delle molecole dannose all'inizio della fermentazione colonica (baseline)

VOCs	Baseline + CO 24h (mg/kg)		
Anilina	2.541	±	1.519
Benzaldeide	2.229	±	1.360
Benzotiazolo	9.464	±	7.013
Fenolo	3.377	±	3.556
p-Cresolo	4.973	±	0.514

Il grafico in figura 4.2 mostra la capacità delle altre formulazioni di salame (SA, SMA e CNO₂) di produrre meno sostanze potenzialmente tossiche rispetto al salame di controllo CO dopo 24 h di fermentazione.

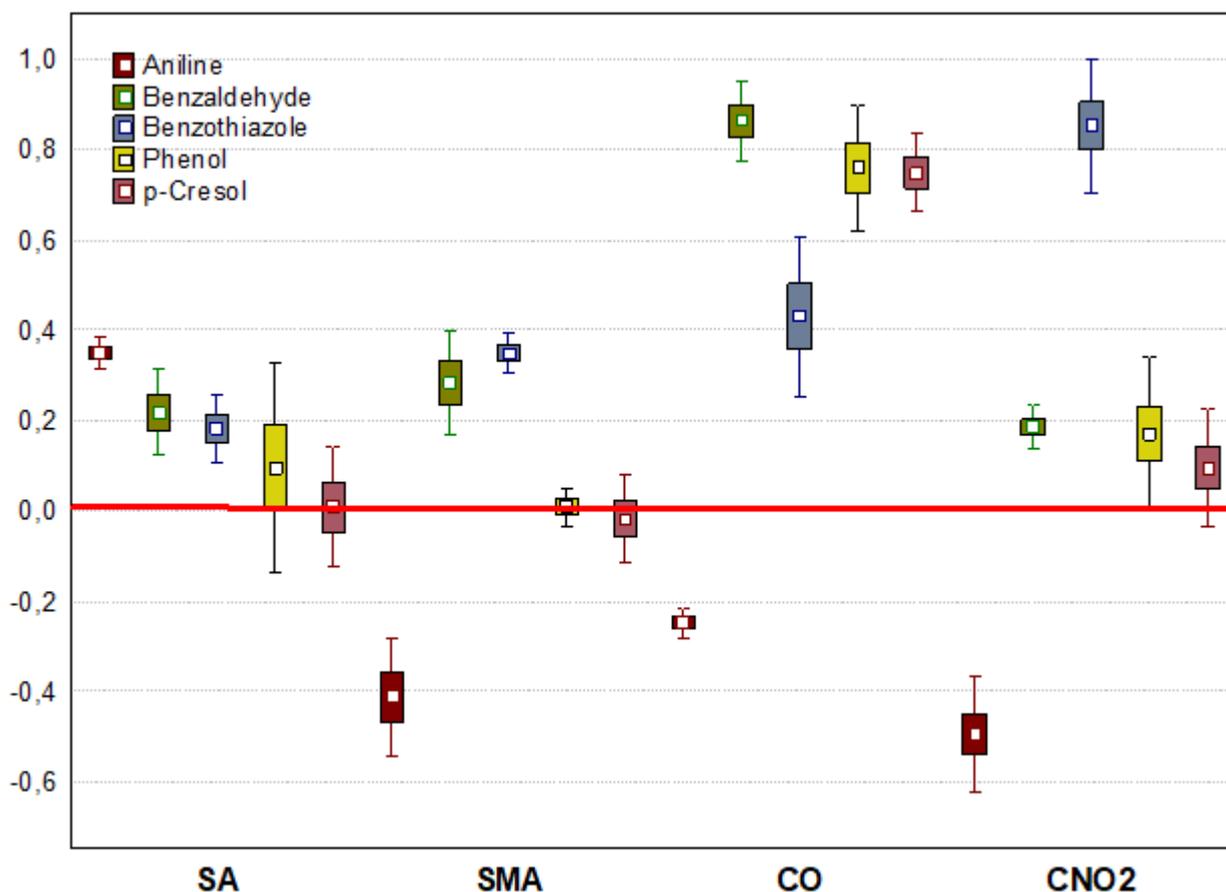


Figura 4.2. Shift delle produzioni di molecole dannose

Le formulazioni SMA e CNO₂ producono in modo simile ($p > 0.05$), circa 6 volte meno queste sostanze potenzialmente tossiche rispetto al controllo CO ($p < 0.05$). Solo il benzotiazolo è maggiormente presente nel controllo CNO₂ rispetto al controllo CO, forse a causa della presenza dei nitriti, che nel colon stimolano lo sviluppo dei batteri sulfato produttori, i quali producono dimetil disulfato e contribuiscono alla formazione di composti tossici, come il benzotiazolo. La tendenza di minor produzione di VOCs potenzialmente tossici nei vari campioni è la seguente: CNO₂ > SMA > SA. In particolare, la formulazione del campione SMA è stata in grado di ridurre la produzione di molecole dannose ad un livello comparabile a quello osservato con l'utilizzo dei nitriti (CNO₂).

4.3 Analisi del microbiota

Le quantificazioni assolute effettuate tramite qPCR sono state mirate a 14 diversi taxa batterici (Tabella S1) correlati al microbiota principale, inclusi gli Eubatteri totali e i due phyla principali che colonizzano il colon sano umano, ovvero *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Se ne valuta l'incremento rispetto all'inizio della fermentazione (baseline), al primo tempo di raccolta del fermentato dopo 18 ore (T1) e al termine dell'esperimento a 24 ore (EP).

4.3.1 Core microbiota

Considerando gli Eubatteri totali rispetto alle abbondanze alla baseline (BL) e senza considerare i valori del controllo in bianco (BC), i formulati innovativi SA, e SMA all'end point (EP) hanno ottenuto un significativo incremento dell'abbondanza rispettivamente di 1,63 e 1,38 volte in più ($p < 0,05$). Il campione di controllo CO, indipendentemente dai punti temporali, ha avuto lievi incrementi non significativi ($p > 0,05$). Questi risultati evidenti indicano che CO, ovvero la formulazione senza antiossidanti e nitriti, ha limitato la crescita degli eubatteri totali del colon.

Le quantificazioni del phylum di *Bacteroidetes* hanno mostrato cambiamenti significativi principalmente all'EP, dove tutti i valori erano significativi rispetto al BL ($p < 0,05$), eccetto per il formulato SA. In particolare, per CO e CNO₂ c'è stata una riduzione della quantità di *Bacteroidetes*, rispetto alla BL ($p < 0,05$). Inoltre, SMA è stato l'unico che ha aumentato significativamente il contenuto di *Bacteroidetes* a T1 ($p < 0,05$). I carichi più elevati di *Bacteroidetes* dopo la fermentazione di SMA, ovvero di $1.383 \log_2(F/C)$ ($p < 0,05$) potrebbero indicare un substrato preferibile descritto da un contenuto di prodotti vegetali e antiossidanti, e quindi siti più specifici per *Bacteroidetes*.

Considerando *Firmicutes*, sono stati osservati cambiamenti significativi per ciascun campione all'EP eccetto che per SMA ($p < 0,05$). Questi risultati potrebbero indicare scenari opposti a seconda del gruppo di *Firmicutes* più favorito.

Tabella 4.3.1. Quantificazione *Eubacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* rispetto all'inizio della fermentazione colonica (baseline)

qPCR Target	Cells/mL	Log ₂ (F/C)		ANOVA
		T1	EP	
Eubacteria				
	BL			
CO	2.77E+10 ± 8.47E+09	0.02	0.58 ^{AB}	0.810581
SA	2.77E+10 ± 8.47E+09 ^b	0.75 ^{ab}	1.63 ^{aA}	0.023662
SMA	2.77E+10 ± 8.47E+09 ^b	0.87 ^{ab}	1.38 ^{aA}	0.009666
CNO ₂	2.77E+10 ± 8.47E+09 ^b	0.94 ^a	1.44 ^{aA}	0.019003
BC	2.77E+10 ± 8.47E+09 ^a	-0.15 ^a	-1.74 ^{bB}	0.015644
		0.107124	0.000950	P valore
Firmicutes				
	BL			
CO	2.46E+09 ± 2.08E+08 ^b	1.43 ^{aA}	1.44 ^{aA}	0.000003
SA	2.46E+09 ± 2.08E+08	-0.02 ^B	0.49 ^B	0.064013
SMA	2.46E+09 ± 2.08E+08	0.50 ^{AB}	0.71 ^{AB}	0.098002
CNO ₂	2.46E+09 ± 2.08E+08 ^b	-0.39 ^{bB}	1.42 ^{aA}	0.000457
BC	2.46E+09 ± 2.08E+08 ^b	0.91 ^{abAB}	1.28 ^{aA}	0.000134
		0.000012	0.002652	P valore
Bacteroidetes				
	BL			
CO	4.80E+09 ± 1.84E+09 ^a	-0.22 ^{ab}	-1.16 ^{bB}	0.049707
SA	4.80E+09 ± 1.84E+09	0.15	0.59 ^A	0.070006
SMA	4.80E+09 ± 1.84E+09 ^b	0.11 ^b	1.383 ^{aA}	0.005644
CNO ₂	4.80E+09 ± 1.84E+09 ^a	-0.11 ^{ab}	-0.62 ^{bB}	0.000008
BC	4.80E+09 ± 1.84E+09 ^a	0.11 ^a	-2.62 ^{bC}	0.006603
		0.080616	0.000444	P valore

4.3.2 Rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*

Firmicutes e *Bacteroidetes* sono i due principali phyla batterici che popolano il microbiota del colon umano. Il rapporto delle loro abbondanze è indice delle condizioni di salute del microbiota colonico umano.

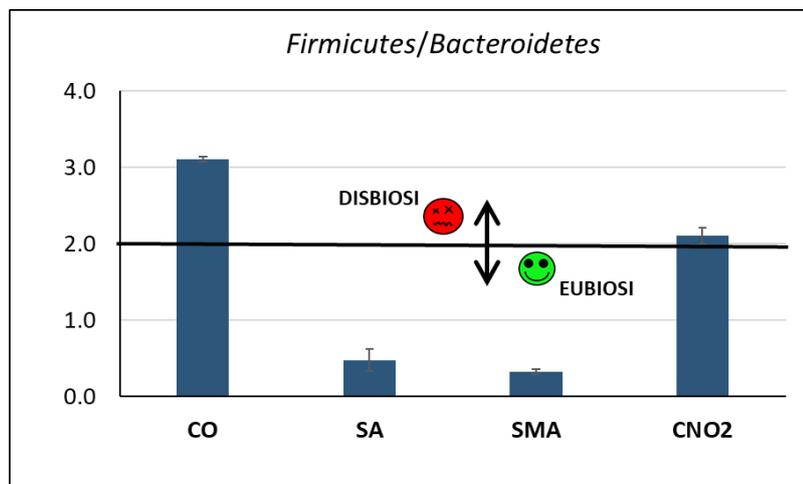


Figura 4.3.2. Rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*

Come parametro generale per l'eubiosi del microbiota abbiamo scelto il famoso rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes* (*F/B*) e abbiamo discusso del suo spostamento nel tempo (figura 4.3.2). All'interno di questo rapporto un valore superiore a due è solitamente legato alla disbiosi del microbiota (Koliada et al., 2017; Zhou, Wang, Jacoby, Jiang, Zhang & Yu, 2017). Come riportato in tabella 4.3.2, i campioni fecali dei soggetti che hanno consumato i diversi salami riformulati e il controllo negativo, hanno manifestato un rapporto *F/B* differente. Si evince che dopo la fermentazione il rapporto *F/B* raggiunge un valore sopra a 3.0 nel CO senza alcun additivo stabilizzante, analogo è il discorso per il campione CNO₂, il quale ha riportato un rapporto al di sopra di 2.0. Da questi valori si evince che per questi due campioni vi sia innescata una condizione di disbiosi.

Tabella 4.3.2. Rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*

F/B	BL	T1	EP	ANOVA
CO	0.51 ± 0.22 ^c	1.61 ± 0.36 ^{bA}	3.10 ± 0.61 ^{aB}	0.000003
SA	0.51 ± 0.22	0.46 ± 0.10 ^B	0.48 ± 0.18 ^C	0.160113
SMA	0.51 ± 0.22	0.67 ± 0.14 ^B	0.32 ± 0.10 ^C	0.076002
CNO ₂	0.51 ± 0.22 ^b	0.42 ± 0.17 ^{bB}	2.10 ± 0.67 ^{aB}	0.000457
BC	0.51 ± 0.22 ^b	0.95 ± 0.29 ^{bA}	7.64 ± 0.86 ^{aA}	0.000134
		0.000011	0.002652	P value

Dopo la fermentazione i *Firmicutes* aumentano in CO e in CNO₂ e generano disbiosi. Le formulazioni innovative rispetto ai controlli, mantengono fino all'endpoint il livello di eubiosi, ne consegue un mantenimento dell'equilibrio del microbiota più stabile e duraturo nel tempo, anche se, come riportato in tabella 4.3.2 la significatività del rapporto *F/B* nel formulato SA la significatività non risulta rilevante. La capacità di mantenere eubiosi tra i diversi campioni di salame segue questa tendenza: SMA > SA > CNO₂ > CO.

4.3.3 Batteri benefici

Un primo gruppo di taxa era correlato a microrganismi benefici per l'ospite, come *Lactobacillales*, *Bifidobacteriaceae*, gruppo *Clostridium* IV, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium longum* e gruppo BBP (tabella 4.3.3).

Lactobacillales e *Bifidobacteriaceae* sono quei taxa che costituiscono la maggior parte delle specie benefiche tra i batteri del colon, poiché è noto che entrambi i taxa, con l'eccezione di poche specie, sono legati al benessere dell'ospite, nonché all'eubiosi del microbiota del colon (Macfarlane et al., 1986, Van der Meulen et al. 2008).

Durante gli esperimenti effettuati in questa tesi, *Lactobacillales* e *Bifidobacteriaceae* hanno avuto un andamento diverso durante la fermentazione. I primi taxa a T1 hanno segnato un aumento significativo dell'abbondanza solo per il formulato SMA, mentre non è stata rilevata alcuna riduzione significativa, ad eccezione del bianco. All'EP, soltanto il formulato SA ha manifestato un incremento significativo dell'abbondanza di *Lactobacillales* rispetto alla baseline. Per quanto riguarda le *Bifidobacteriaceae*, tutti i formulati presentano un incremento significativo rispetto alla baseline ($p < 0,05$), eccetto che per CNO₂ che mostra una riduzione significativa di questa taxa microbica benefica. Il *Clostridium* gruppo IV subisce una significativa riduzione in quasi tutti i formulati ad eccezione del formulato SMA ($p < 0,05$). *Bifidobacterium longum* presenta un incremento significativo per entrambi i formulati innovativi SA e SMA ($p < 0,05$).

Akkermansia muciniphila subisce una riduzione significativa per entrambe le formulazioni innovative. Tra i formulati innovativi si ha un incremento del BBP gruppo soltanto in SMA ($p < 0,05$). Tra questi taxa microbici benefici per l'ospite, si evince un generico incremento significativo per i formulati innovativi SA e SMA, ad eccezione del gruppo *Clostridium* IV.

Per quanto riguarda i formulati tradizionali con nitriti CNO₂ e senza conservanti CO, è stata rilevata una riduzione di queste popolazioni microbiche benefiche, associando questa condizione ad uno probabile stato di disbiosi del microbiota dell'ospite.

Tabella 4.3.3. Quantificazione phyla benefici rispetto all'inizio della fermentazione colonica (baseline)

qPCR Target	Cells/mL	Log ₂ (F/C)		ANOVA
<i>Lactobacillales</i>	BL	T1	EP	
CO	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.56	0.82 ^{AB}	0.681632
SA	4.80E+06 ± 3.64E+05 ^b	0.72 ^{ab}	2.13 ^{aA}	0.001842
SMA	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.94	1.74 ^A	0.165766
CNO ₂	4.80E+06 ± 3.64E+05	0.72	1.10 ^{AB}	0.418668
BC	4.80E+06 ± 3.64E+05 ^a	0.44 ^{ab}	-1.34 ^{BB}	0.048217
		0.932608	0.043956	P value
<i>Bifidobacteriaceae</i>	BL	T1	EP	
CO	4.10E+08 ± 4.77E+07	-0.11 ^B	0.48 ^{AB}	0.056606
SA	4.10E+08 ± 4.77E+07 ^b	0.08 ^{abAB}	1.04 ^{aA}	0.003197
SMA	4.10E+08 ± 4.77E+07 ^c	1.01 ^{bA}	2.04 ^{aA}	0.013858
CNO ₂	4.10E+08 ± 4.77E+07	-0.52 ^B	-0.83 ^B	0.058814
BC	4.10E+08 ± 4.77E+07 ^a	-0.32 ^B	-2.43 ^C	0.046692
		0.0003459	0.000315	P value
<i>Clostridium Group IV</i>	BL	T1	EP	
CO	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	-1.44 ^{BB}	-1.38 ^{BB}	0.000121
SA	1.36E+08 ± 1.83E+07	0.11 ^A	-0.46 ^{bAB}	0.054040
SMA	1.36E+08 ± 1.83E+07	0.02 ^A	-0.02 ^A	0.902609
CNO ₂	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	-0.64 ^{bAB}	-1.19 ^{BB}	0.000436
BC	1.36E+08 ± 1.83E+07 ^a	0.28 ^{aA}	-1.81 ^{BB}	0.000024
		0.000021	0.000011	P value
<i>B. longum</i>	BL	T1	EP	
CO	1.08E+08 ± 1.52E+07 ^a	-1.70 ^{BB}	-1.41 ^{BB}	0.043768
SA	1.08E+08 ± 1.52E+07	0.03 ^A	0.96 ^A	0.023466
SMA	1.08E+08 ± 1.52E+07 ^b	0.44 ^{bA}	1.37 ^{aA}	0.000166
CNO ₂	1.08E+08 ± 1.52E+07	-3.63 ^C	-3.86 ^C	0.000001
BC	1.08E+08 ± 1.52E+07	-2.02 ^{bBC}	-3.38 ^{cC}	0.000003
		0.000429	0.000001	P value
<i>A. muciniphila</i>	BL	T1	EP	
CO	4.03E+05 ± 7.74E+04	-0.15	-0.07 ^A	0.063285
SA	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-1.19 ^b	-1.52 ^{BB}	0.000062
SMA	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-0.91 ^{ab}	-1.08 ^{bAB}	0.000034
CNO ₂	4.03E+05 ± 7.74E+04	-0.27	-0.79 ^{AB}	0.055117
BC	4.03E+05 ± 7.74E+04 ^a	-0.51 ^a	-3.06 ^{BC}	0.000004
		0.1051502	0.000001	P value
<i>F. prausnitzii</i>	BL	T1	EP	
CO	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	-0.66 ^b	-1.41 ^{bA}	0.001359
SA	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	0.42 ^a	-0.77 ^{bAB}	0.061564
SMA	1.26E+04 ± 3.18E+03	0.05	-0.41 ^A	0.191359
CNO ₂	1.26E+04 ± 3.18E+03	-0.15	-0.83 ^{AB}	0.072828
BC	1.26E+04 ± 3.18E+03 ^a	0.28 ^a	-1.82 ^{BB}	0.001090
		0.090691	0.023811	P value
BPP group	BL	T1	EP	
CO	6.82E+09 ± 3.05E+08	-0.27	-0.29 ^A	0.918863
SA	6.82E+09 ± 3.05E+08	-0.13	-0.47 ^B	0.512972
SMA	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^b	0.03 ^b	1.16 ^{aA}	0.005472
CNO ₂	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^a	-0.68 ^a	-2.23 ^b	0.025051
BC	6.82E+09 ± 3.05E+08 ^a	-1.70 ^b	-2.54 ^{BC}	0.009275
		0.244794	0.000006	P value

4.3.4 Batteri opportunisti

Considerando i taxa batterici opportunistici di questa indagine, sono stati presi in considerazione la famiglia delle *Enterobacteriaceae*, il gruppo *Clostridium* I, il gruppo *Atopobium* - *Collinsella* - *Eggerthella* (ATOP) ed *Escherichia coli* (tabella 4.3.4). Le *Enterobacteriaceae* all'EP sono aumentate dopo la fermentazione di tutti i campioni, compreso il BC. Sebbene questo incremento non fosse significativo per SA ($p < 0,05$). In particolare, all'EP si rileva una riduzione significativa dell'incremento nei formulati innovativi di tutte le popolazioni microbiche opportuniste considerate, come ad esempio per *Entrobacteriaceae* l'incremento è di solo $0,21 \log_2(F/C)$ per SA e di $0,40 \log_2(F/C)$ per SMA. Rispetto ai formulati CO e CNO₂ presentano un incremento ridotto di circa la metà ($p < 0,05$).

Tabella 4.3.4. Quantificazione phyla opportunisti rispetto all'inizio della fermentazione colonica (baseline)

qPCR Target	Cells/mL	Log ₂ (F/C)		ANOVA
<i>Enterobacteriaceae</i>	BL	T1	EP	
CO	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	0.84 ^{abB}	2.56 ^{aA}	0.049707
SA	7.85E+07 ± 4.58E+05	0.56 ^B	0.70 ^B	0.052006
SMA	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	0.94 ^{abB}	1.21 ^{aB}	0.005644
CNO ₂	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^b	1.09 ^{aB}	1.86 ^{aB}	0.000008
BC	7.85E+07 ± 4.58E+05 ^c	2.32 ^{bA}	3.93 ^{aA}	0.006603
		0.000616	0.000444	P value
Gruppo ATOP	BL	T1	EP	
CO	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.16 ^b	1.21 ^{aA}	0.024434
SA	5.29E+05 ± 1.09E+05	0.08	0.21 ^B	0.880294
SMA	5.29E+05 ± 1.09E+05	0.27	0.40 ^{AB}	0.574153
CNO ₂	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.72 ^{ab}	1.07 ^{aAB}	0.049402
BC	5.29E+05 ± 1.09E+05 ^b	0.28 ^b	1.91 ^{aA}	0.042082
		0.852626	0.026102	P value
<i>Clostridium</i> gruppo I	BL	T1	EP	
CO	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.68 ^a	2.49 ^{aAB}	0.000208
SA	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.24 ^a	2.48 ^{aAB}	0.000308
SMA	1.54E+04 ± 3.06E+03	0.93	1.27 ^B	0.245233
CNO ₂	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.80 ^a	2.03 ^{aAB}	0.022968
BC	1.54E+04 ± 3.06E+03 ^b	1.67 ^a	3.05 ^{aA}	0.000087
		0.453844	0.018590	P value
<i>E. coli</i> (FtsZ)	BL	T1	EP	
CO	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	0.62 ^b	2.28 ^{aA}	0.031012
SA	5.04E+05 ± 2.08E+04	0.52	0.69 ^B	0.072121
SMA	5.04E+05 ± 2.08E+04	0.74	1.03 ^B	0.080023
CNO ₂	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	0.89 ^a	1.36 ^{aB}	0.034346
BC	5.04E+05 ± 2.08E+04 ^b	1.89 ^a	3.79 ^{aA}	0.000019
		0.082102	0.035284	P value

4.3.5 Competizione opportunisti/probiotici

La competizione ecologica fra enterobatteri e bifidobatteri è un indicatore delle capacità prebiotiche del substrato (figura 4.3.5). Dopo la fermentazione gli enterobatteri superano i bifidobatteri solo nei formulati CO e CNO₂. Le formulazioni innovative sostengono la crescita dei bifidobatteri. L'attività bifidogenica ha avuto quindi la seguente scala di potenza: SMA > SA > CNO₂ > CO.

Da questo si può evincere che le formulazioni innovative rappresentano un substrato migliore per lo sviluppo di microrganismi benefici, come i bifidobatteri, rispetto ai microrganismi opportunisti, come gli enterobatteri, i quali invece hanno una tendenza a svilupparsi nel campione tradizionale contenente nitriti CNO₂ o nel campione senza conservanti CO.

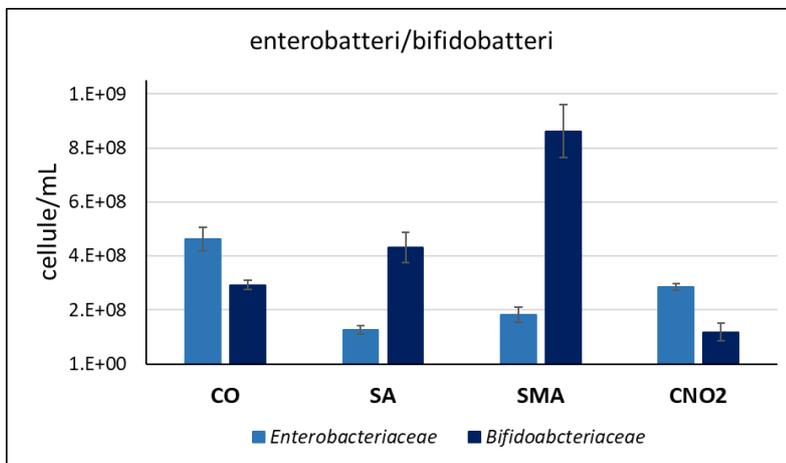


Figura 4.3.5. Competizione fra enterobatteri e bifidobatteri.

5 Conclusioni

L'insorgenza di patologie nel tratto gastrointestinale dovuta all'eccessivo consumo di carne rossa ha recentemente spinto le industrie alimentari a ricercare strategie alternative. In particolare, l'industria delle carni trasformate sta studiando formulazioni alternative nella produzione dei salami. Una delle principali strategie è quella volta alla sostituzione dei nitriti, che nell'ospite possono portare alla formazione di composti tossici (e.g. nitrosammine).

Nel seguente studio sono state valutate formulazioni innovative nelle quali i nitriti sono stati sostituiti da acido ascorbico e/o mix di antiossidanti vegetali.

Dai risultati ottenuti si evince che le formulazioni innovative promuovono una generale eubiosi del microbiota intestinale, a fronte di quegli indici preselezionati tra cui rapporto *F/B* favorevole, proliferazione di taxa microbici benefici tra cui *Lactobacillales*, *Bifidobacteriaceae* e riduzione di popolazioni microbiche negative, tra cui *Enterobacteriaceae* e gruppo ATOP. Inoltre, l'analisi del volatiloma evidenzia una spiccata produzione di molecole benefiche, tra cui acidi grassi a corta catena come acetato, propionato e butirato, e una riduzione delle molecole negative per l'ospite come fenolo e p-cresolo, derivanti dalla fermentazione delle proteine. Sebbene le formulazioni innovative non abbiano dato benefici nettamente superiori a quelli del controllo e del prodotto con nitriti, i risultati ottenuti sono promettenti, in quanto gli antiossidanti utilizzati in sostituzione hanno dato risultati comparabili a quelli ottenuti con il formulato tradizionale.

Questi risultati possono rappresentare per l'industria delle carni trasformate un incoraggiante punto di partenza per lo sviluppo di formulazioni innovative volte a ridurre l'impatto negativo di questi prodotti sulla salute del consumatore.

6 Bibliografia

2004/92/CE: Decisione della Commissione, del 21 gennaio 2004. Misure di emergenza relative al peperoncino e ai prodotti derivati.

Abid Z., Cross A.J., Sinha R. (2014). Meat, dairy, and cancer. *Am J Clin Nutr*;100 (Suppl 1):386S.

Agus, A.; Planchais, J.; Sokol, H. (2018). Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe*, 23, 716–724.

Alexander, D. D., Weed, D. L., Cushing, C. A., & Lowe, K. A. (2011). Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 293–307.

Alexander, D. D., Weed, D. L., Miller, P. E., & Mohamed, M. A. (2015). Red meat and colorectal cancer: A quantitative update on the state of the epidemiologic science. *Journal of the American College of Nutrition*, 34(6), 521–543.

Arnal, M. E., Denis, S., Uriot, O., Lambert, C., Holowacz, S., Paul, F., ... & Blanquet-Diot, S. (2021). Impact of oral galenic formulations of *Lactobacillus salivarius* on probiotic survival and interactions with microbiota in human in vitro gut models. *Beneficial microbes*, 12(4), 381-396.

Arpaia N, Campbell C, Fan XY, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480):451.

Aune, D., Chan, D. S. M., Lau, R., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., et al. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ British Medical Journal*, 343, 20.

Bach, A. C., Ingenbleek, Y., & Frey, A. (1996). The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: Fact or fancy? *Journal of Lipid Research*, 37(4), 708–726.

Bansal, T.; Alaniz, R.C.; Wood, T.K.; Jayaraman, A. (2010). The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 228–233.

Bartosch, S. et al. (2004). Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3575–3581.

- Bastide, N. M., Chenni, F., Audebert, M., Santarelli, R. L., Tache, S., Naud, N., et al. (2015). A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Research*, 75(5), 870–879.
- Bastide, N. M., Naud, N., Nassy, G., Vendevre, J. L., Tache, S., Gueraud, F., et al. (2017). Red wine and pomegranate extracts suppress cured meat promotion of colonic mucin-depleted foci in carcinogen-induced rats. *Nutrition and Cancer*, 69(2), 289–298.
- Bastide, N. M., Pierre, F. H. F., & Corpet, D. E. (2011). Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prevention Research*, 4(2), 177–184.
- Baxter, N. T., Schmidt, A. W., Venkataraman, A., Kim, K. S., Waldron, C., & Schmidt, T. M. (2019). Dynamics of human gut microbiota and short-chain fatty acids in response to dietary interventions with three fermentable fibers. *mBio*, 10(1).
- Bedani R, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, de Valdez GF, Rossi EA. (2010). Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. *J Sci Food Agric*, 90(2):233–8.
- Behera, S.S. & Panda, S.K. (2020). Ethnic and industrial probiotic foods and beverages: efficacy and acceptance. *Current Opinion in Food Science*, 32, 29– 36.
- Beriain, M. J., Gomez, I., Petri, E., Insausti, K., & Sarries, M. V. (2011). The effects of olive oil emulsified alginate on the physico-chemical, sensory, microbial, and fatty acid profiles of low-salt, inulin-enriched sausages. *Meat Science*, 88(1), 189–197.
- Bier, A., Braun, T., Khasbab, R., Di Segni, A., Grossman, E., Haberman, Y., & Leibowitz, A. (2018). A high salt diet modulates the gut microbiota and short chain fatty acids production in a salt-sensitive hypertension rat model. *Nutrients*, 10, 1154.
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M.E. et al. (2020). Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1662.
- Bingham, S. A. (1990). Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 49(2), 153–171.

- Bingham, S. A., Hughes, R., & Cross, A. J. (2002). Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *Journal of Nutrition*, 132(11 Suppl), 3522s–3525s.
- Binnie MA, Barlow K, Johnson V, Harrison C. (2014). Redmeats: time for a paradigm shift in dietary advice. *Meat Sci*, 98(3):445–51.
- Bis-Souza, C. V., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Penna, A. L. B., & Barretto, A. C. S. (2019). New strategies for the development of innovative fermented meat products: A review regarding the incorporation of probiotics and dietary fibers. *Food Reviews International*, 35(5), 467–484.
- Blaiotta, G., Murru, N., Cerbo, A. D., Romano, R., & Aponte, M. (2018). Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2285–2294.
- Boets E, Gomand SV, Deroover L, Preston T, Vermeulen K, De Preter V, et al. (2017). Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *J Physiol*, 595(2):541–555.
- Bonnett, R., Charalambides, A. A., Martin, R. A., Sales, K. D., & Fitzsimmons, B. W. (1975). Reactions of nitrous acid and nitric oxide with porphyrins and haems. Nitrosylhaems as nitrosating agents. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (21), 884–885.
- Bunte, C., Hertel, C. & Hammes, W.P. (2000). Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 260–266.
- Byrne CS, Chambers ES, Alhabeeb H, Chhina N, Morrison DJ, Preston T, Tedford C, Fitzpatrick J, Irani C, Busza A, Garcia-Perez I, Fountana S, Holmes E, Goldstone AP, Frost GS. (2016). Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods. *Am J Clin Nutr*, 104(1):5–14.
- Caderni, G., Femia, A. P., Giannini, A., Favuzza, A., Luceri, C., Salvadori, M., et al. (2003). Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: Correlation with carcinogenesis. *Cancer Research*, 63 (10), 2388–2392.
- Canfora EE, Blaak EE. (2017). Acetate: a diet-derived key metabolite in energy metabolism: good or bad in context of obesity and glucose homeostasis? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 20(6):477–483.

- Canfora EE, van der Beek CM, Jocken JWE, Goossens GH, Holst JJ, Olde Damink SWM, Lenaerts K, Dejong CHC, Blaak EE. (2017). Colonic infusions of short-chain fatty acid mixtures promote energy metabolism in overweight/obese men: a randomized crossover trial. *Sci Rep*, 7(1):2360.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*;57(6):1470–81.
- Casciano, F., Nissen, L., & Gianotti, A. (2021). Effect of formulations and fermentation processes on volatile organic compounds and prebiotic potential of gluten-free bread fortified by spirulina (*Arthrospira platensis*). *Food & Function*, 12(20), 10226-10238.
- Chacko A, Cummings JH. (1988). Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut*, 29(6):809–15.
- Chambers ES, Byrne CS, Aspey K, Chen Y, Khan S, Morrison DJ, Frost G. (2018). Acute oral sodium propionate supplementation raises resting energy expenditure and lipid oxidation in fasted humans. *Diabetes Obes Metab*, 20(4):1034–1039.
- Chambers ES, Byrne CS, Ruyendo A, Morrison DJ, Preston T, Tedford MC, et al. (2018). The effects of dietary supplementation with inulin and inulin-propionate ester on hepatic steatosis in adults with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab*.
- Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. (2014). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, 64:1744–1754.
- Chan, D. S., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., et al. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PloS One*, 6(6), Article e20456.
- Chatellard, L., Trably, E., & Carr`ere, H. (2016). The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresource Technology*, 221, 541–549.
- Chen, H., Xu, H., Heinze, T.M., Cerniglia, C.E. (2009). Decolorization of water and oil- soluble azo dyes by lactobacillus acidophilus and lactobacillus fermentum. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 36, 1459–1466.

Cho, E., Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., Beeson, W. L., van den Brandt, P. A., Colditz, G. A., et al. (2004). Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: A pooled analysis of 10 cohort studies. *Journal of National Cancer Institute*, *96*(13), 1015–1022.

Clarke, J. M., Young, G. P., Topping, D. L., Bird, A. R., Cobiac, L., Scherer, B. L., et al. (2012). Butyrate delivered by butyrylated starch increases distal colonic epithelial apoptosis in carcinogen-treated rats. *Carcinogenesis*, *33*(1), 197–202.

COCONUT OIL - A REVIEW OF POTENTIAL APPLICATIONS | Semantic Scholar. (n.d.). Retrieved 16 August 2021, from <https://www.semanticscholar.org/paper/COCONUT-OIL-A-REVIEW-OF-POTENTIAL-APPLICATIONS-Shirwaikar-Shirwaikar/2381516b1b02e99fd171f8e2d2c72792157dc17b>.

Comalada, M., Bailon, E., de Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A., et al. (2006). The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *132*(8), 487–497.

Conlon, M. A., Kerr, C. A., McSweeney, C. S., Dunne, R. A., Shaw, J. M., Kang, S., et al. (2012). Resistant starches protect against colonic DNA damage and alter microbiota and gene expression in rats fed a Western diet. *Journal of Nutrition*, *142*(5), 832–840.

Connolly, M. L., Lovegrove, J. A., & Tuohy, K. M. (2012). In vitro fermentation characteristics of whole grain wheat flakes and the effect of toasting on prebiotic potential. *Journal of medicinal food*, *15*(1), 33–43.

Corpet, D. E. (2011). Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*, *89*(3), 310–316.

Craig, C. B., Darnell, B. E., Weinsier, R. L., Saag, M. S., Epps, L., Mullins, L., Lapidus, W. I., Ennis, D. M., Akrabawi, S. S., Cornwell, P. E., & Sauberlich, H. E. (1997). Decreased fat and nitrogen losses in patients with AIDS receiving medium-chain-triglyceride-enriched formula vs those receiving long-chain-triglyceride-containing formula. *Journal of the American Dietetic Association*, *97*(6), 605–611.

Cross, A. J., Pollock, J. R., & Bingham, S. A. (2003). Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Research*, *63*(10), 2358–2360.

Czerwonka, M., & Tokarz, A. (2017). Iron in red meat—friend or foe. *Meat Science*, *123*, 157–165.

- D., Haller, R. G., & Walton, M. E. (2003). Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5928–5935.
- Dahm, C. C., Keogh, R. H., Spencer, E. A., Greenwood, D. C., Key, T. J., Fentiman, I. S., et al. (2010). Dietary fiber and colorectal cancer risk: A nested case-control study using food diaries. *Journal of National Cancer Institute*, 102(9), 614–626.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014;505(7484):559–563.
- Dayrit, F. M. (2015). The Properties of Lauric Acid and Their Significance in Coconut Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(1), 1–15.
- de Carvalho, F. A. L., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Campagnol, P. C. B., Domínguez, R., Trindade, M. A., et al. (2020). Effect of replacing backfat with vegetable oils during the shelf-life of cooked lamb sausages. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 122, 109052.
- De Smet, S., & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145–156.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. 2014;156(1–2):84–96.
- DECISIONE DELLA COMMISSIONE del 23 maggio 2005. Misure di emergenza relative al peperoncino, ai prodotti derivati dal peperoncino, alla curcuma e all'olio di palma.
- Demeyer, D., Mertens, B., De Smet, S., & Ulens, M. (2015). Mechanisms linking colorectal cancer to the consumption of (processed) red meat: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2747–2766.
- den Besten G, Lange K, Havinga R, van Dijk TH, Gerding A, van Eunen K, Müller M, Groen AK, Hooiveld GJ, Bakker BM, Reijngoud DJ. (2013). Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305(12):G900–G910.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., De Pasquale, I., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Ricciuti, P., ... & Francavilla, R. (2011). Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC microbiology*, 11(1), 1-21.

- do Amaral, D. S., Cardelle-Cobas, A., do Nascimento, B. M., Monteiro, M. J., Madruga, M. S., & Pintado, M. M. (2015). Development of a low fat fresh pork sausage based on chitosan with health claims: Impact on the quality, functionality and shelf-life. *Food & function*, 6(8), 2768–2778.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. (2006). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308:1635–1638.
- Evangelista, M. T. P., Abad-Casintahan, F., & Lopez-Villafuerte, L. (2014). The effect of topical virgin coconut oil on SCORAD index, transepidermal water loss, and skin capacitance in mild to moderate pediatric atopic dermatitis: A randomized, double-blind, clinical trial. *International Journal of Dermatology*, 53(1), 100–108.
- Eyres, L., Eyres, M. F., Chisholm, A., & Brown, R. C. (2016). Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutrition Reviews*, 74(4), 267–280.
- FAO (2017). Food and Agricultural Organization of the United Nations. Accessed on December 17th. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Feng, X., Li, C., Jia, X., Guo, Y., Lei, N., Hackman, R. M., ... & Zhou, G. (2016). Influence of sodium nitrite on protein oxidation and nitrosation of sausages subjected to processing and storage. *Meat Science*, 116, 260-267.
- Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, Anastasovska J, Ghourab S, Hankir M, Zhang S, Carling D, Swann JR, Gibson G, Viardot A, Morrison D, Louise Thomas E, Bell JD. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 5:3611.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., et al. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), 543–U791.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480):446–450.
- Gibson J.A., Sladen GE, Dawson AM. Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *Br J Nutr*, 1976;35(1):61–5.

- Gibson S.A., McFarlan C, Hay S, MacFarlane GT. (1989). Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Appl Environ Microbiol*; 55(3):679–83.
- Gibson, G. R., & Wang, X. (1994). Regulatory effects of Bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(4), 412–420.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., & Cummings, J. H. (1995). Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 108 (4), 975–982.
- Giello, M., La Storia, A., De Filippis, F., Ercolini, D., & Villani, F. (2018). Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. *Food Microbiology*, 72, 1-15.
- Gonzalez, C. A., Jakszyn, P., Pera, G., Agudo, A., Bingham, S., Palli, D., et al. (2006). Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Journal of National Cancer Institute*, 98(5), 345–354.
- Gottschalg, E., Scott, G. B., Burns, P. A., & Shuker, D. E. (2007). Potassium diazoacetate-induced p53 mutations in vitro in relation to formation of O6-carboxymethyl- and O6-methyl-2' deoxyguanosine DNA adducts: Relevance for gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*, 28(2), 356–362.
- Gracey, M., Burke, V., & Anderson, C. M. (1970). Medium Chain Triglycerides in Paediatric Practice. *Archives of Disease in Childhood*, 45(242), 445.
- Guerzoni, M. E., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Gianotti, A., & Lanciotti, R. (2007). Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli–yeasts interactions. *Food microbiology*, 24(2), 139-148.
- Guess ND, Dornhorst A, Oliver N, Frost GS. (2016). A randomised crossover trial: the effect of inulin on glucose homeostasis in subtypes of prediabetes. *Ann Nutr Metab*, 68(1):26–34. doi: 10.1159/000441626.
- Guo, X.; Xia, X.; Tang, R.; Zhou, J.; Zhao, H.; Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol*, 47(5), 367-73.
- Halagarda, M. & Wójciak, K.M. (2021). Health and safety aspects of traditional European meat products. A review. *Meat Science*, 108623. In press.

Hall KD, Ayuketah A, Brychta R, Cai H, Cassimatis T, Chen KY, Chung ST, Costa E, Courville A, Darcey V, et al. (2019). Ultra-processed diets cause excess calorie intake and weight gain: an inpatient randomized controlled trial of ad libitum food intake. *Cell Metab*, 30(1):67–77.e3.

Han, M. A., Zeraatkar, D., Guyatt, G. H., Vernooij, R. W. M., El Dib, R., Zhang, Y., et al. (2019). Reduction of red and processed meat intake and cancer mortality and incidence: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Internal Medicine*, 171(10), 711–720.

Hartley L, May MD, Loveman E, Colquitt JL, Rees K. (2016). Dietary fibre for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):Cd011472.

Hendriks, T.; Schnabl, B. (2019). Indoles: Metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation. *J. Intern. Med*, 286, 32–40.

Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. (1977). Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res*, 37(2):568–71.

Hjelm, L., Mielby, L. A., Gregersen, S., Eggert, N., & Bertram, H. C. (2019). Partial substitution of fat with rye bran fibre in Frankfurter sausages – bridging technological and sensory attributes through inclusion of collagenous protein. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 101, 607–617.

Hughes, R., Cross, A. J., Pollock, J. R. A., & Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 22(1), 199–202.

Hughes, R., Magee, E. A., & Bingham, S. (2000). Protein degradation in the large intestine: Relevance to colorectal cancer. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1 (2), 51–58.

Hume MP, Nicolucci AC, Reimer RA. (2017). Prebiotic supplementation improves appetite control in children with overweight and obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 105(4):790–799.

Huncharek, M., Muscat, J., & Kupelnick, B. (2009). Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: A meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutrition and Cancer*, 61(1), 47–69.

Hygreeva, D., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2014). Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98(1), 47–57.

- Ijaz MU, Ahmed MI, Zou X, Hussain M, Zhang M, Zhao F, Xu X, Zhou G, Li C. (2018). Beef, casein, and soy proteins differentially affect lipid metabolism, triglycerides accumulation and gut microbiota of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Front Microbiol*, 9:2200.
- Ijssennagger, N., van der Meer, R., & van Mil, S. W. C. (2016). Sulfide as a Mucus Barrier-Breaker in Inflammatory Bowel Disease? *Trends in Molecular Medicine*, 22(3), 190–199.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2015). *Red meat and processed meat/IARC working group on the evaluation of carcinogenic risk to humans (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 114)*. Lyon, France. Available from: <https://monographs.iarc.fr/>.
- Ismail NA, Ragab SH, ElBaky AA, Shoeib ARS, Alhosary Y, Fekry D. (2011). Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Arch Med Sci*. 7:501–507.
- Jahreis, G., Vogelsang, H., Kiessling, G., Schubert, R., Bunte, C. & Hammes, W.P. (2002). Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Research International*, 35, 133–138.
- Karlsson CL, Onnerfält J, Xu J, Molin G, Ahrné S, Thorngren-Jerneck K. (2012). The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)*, 20:257–261.
- Klingberg, T.D. & Budde, B.B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 157–159.
- Klurfeld DM. Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Sci* 2015; 109:86–95.
- Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, et al. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*, 19(5):576–85.
- Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, Gavalko Y, Dorofeyev A, Romanenko M, Tkach S, et al. (2017). Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol*, 17(1):120.

- Koutsos, A., Lima, M., Conterno, L., Gasperotti, M., Bianchi, M., Fava, F., ... & Tuohy, K. M. (2017). Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an in vitro colonic model. *Nutrients*, 9(6), 533.
- Krebs NF, Sherlock LG, Westcott J, Culbertson D, Hambidge KM, Feazel LM, Robertson CE, Frank DN. (2013). Effects of different complementary feeding regimens on iron status and enteric microbiota in breastfed infants. *J Pediatr*, 163(2):416–23.
- Kuhnle, G. G., Story, G. W., Reda, T., Mani, A. R., Moore, K. P., Lunn, J. C., et al. (2007). Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(7), 1040–1047.
- Kulkarni, N., & Reddy, B. S. (1994). Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial beta-glucuronidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*, 207(3), 278–283.
- Kumar, P., Chatli, M.K., Verma, A.K., Mehta, N., Malay, O.P., Kumar, D. et al. (2017). Quality, functionality, and shelf life of fermented meat and meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2844–2856.
- Lane, D.J. *et al.* (1992). Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* 174, 269–278.
- Laranjo, M., Elias, M. & Fraqueza, M.J. (2017). The use of starter cultures in traditional meat products. *Journal of Food Quality*, 9546026.
- Laranjo, M., Potes, M.E. & Elias, M. (2019). Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. *Frontiers in Microbiology*, 10, 853.
- Le Leu RK, Young GP, Hu Y, Winter J, Conlon MA. (2013). Dietary red meat aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice whereas resistant starch attenuates inflammation. *Dig Dis Sci*, 58(12):3475–82.
- Le Leu, R. K., Scherer, B. L., Mano, M. T., Winter, J. M., Lannagan, T., Head, R. J., et al. (2016). Dietary butyrylated high-amylose starch reduces azoxymethane-induced colonic O6-methylguanine adducts in rats as measured by immunohistochemistry and high-pressure liquid chromatography. *Nutrition Research*, 36(9), 982–988.

- Le Leu, R. K., Winter, J. M., Christophersen, C. T., Young, G. P., Humphreys, K. J., Hu, Y., et al. (2015). Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2- deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: A randomised clinical trial. *British Journal of Nutrition*, *114*(2), 220–230.
- Leroy, F. (2019). Chapter eight - meat as a pharmakon: An exploration of the biosocial complexities of meat consumption. In F. Toldr'a (Ed.), *Advances in food and nutrition research* (Vol. 87, pp. 409–446). Academic Press.
- Lewin, M. H., Bailey, N., Bandaletova, T., Bowman, R., Cross, A. J., Pollock, J., et al. (2006). Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6- carboxymethyl guanine: Implications for colorectal cancer risk. *Cancer Research*, *66* (3), 1859–1865.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:11070–11075.
- Li Z, Yi CX, Katiraei S, Kooijman S, Zhou E, Chung CK, Gao Y, van den Heuvel JK, Meijer OC, Berbée JFP, Heijink M, Giera M, Willems van Dijk K, Groen AK, Rensen PCN, Wang Y. (2018). Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. *Gut*, *67*(7):1269–1279.
- Lindberg AA, Weintraub A, Zahringer U, Rietschel ET. (1990). Structureactivity relationships in lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*. *Rev Infect Dis*, *12*(Suppl 2): S133–41.
- Liu F, Prabhakar M, Ju J, Long H, Zhou HW. (2017). Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr*, *71*(1):9–20.
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. (1986). Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol*, *132*(6): 1647–56.
- Martinez, J., Nieto, G., & Ros, G. (2014). Total antioxidant capacity of meat and meat products consumed in a reference “Spanish standard diet. *International Journal of Food Science and Technology*”, *49*(12), 2610–2618.
- Masco, L. et al. (2004). Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: Reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis subsp. animalis subsp. nov. and*

Bifidobacterium lactis as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1137–1143.

Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigskecht M, Hanash A, Toubai T, Oravec-Wilson K, Wu SR, Sun Y, Rossi C, Fujiwara H, Byun J, Shono Y, Lindemans C, Calafiore M, Schmidt TM, Honda K, Young VB, Pennathur S, van den Brink M, Reddy P. (2016). Gut microbiome derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nat Immunol*, 17(5):505–513.

McRae MP. (2017). Dietary fiber is beneficial for the prevention of cardiovascular disease: an umbrella review of meta-analyses. *J Chiropr Med*, 16(4):289–299.

Meng, Y., Sun, J. T., Yu, J., Wang, C. H., & Su, J. M. (2019). Dietary intakes of calcium, iron, magnesium, and potassium elements and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis. *Biological Trace Element Research*, 189(2), 325–335.

Minekus, M., Alvinger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.

Miranda, P. M., De Palma, G., Serkis, V., Lu, J., Louis-Auguste, M. P., McCarville, J. L., Verdu, E. F., Collins, S. M., & Bercik, P. (2018). High salt diet exacerbates colitis in mice by decreasing *Lactobacillus* levels and butyrate production. *Microbiome*, 6(1).

Mirvish, S. S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters*, 93(1), 17–48.

Miyagawa, Y., Mori, T., Goto, K., Kawahara, I., Fujiwara-Tani, R., Kishi, S., Sasaki, T., Fujii, K., Ohmori, H., & Kuniyasu, H. (2018). Intake of medium-chain fatty acids induces myocardial oxidative stress and atrophy. *Lipids in Health and Disease*, 17(1).

Moreno-Perez D, Bressa C, Bailen M, Hamed-Bousdar S, Naclerio F, CarmonaM, Perez M, Gonzalez-Soltero R, Montalvo-LomincharMG, Carabana C, et al. (2018). Effect of a protein supplement on the gut microbiota of endurance athletes: a randomized, controlled, double-blind pilot study. *Nutrients*, 10(3):337.

Munekata, P. E., Pateiro, M., Tomasevic, I., Domínguez, R., da Silva Barretto, A. C., Santos, E. M., & Lorenzo, J. M. (2021). Functional fermented meat products with probiotics—A review. *Journal of Applied Microbiology*.

- Nair, U., Bartsch, H., & Nair, J. (2007). Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(8), 1109–1120.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*,336(6086):1262–7.
- Nicolucci AC, Hume MP, Martinez I, Mayengbam S, Walter J, Reimer RA. (2017). Prebiotics reduce body fat and Alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology*, 153(3):711–722.
- Nielsen, T. S., Bendiks, Z., Thomsen, B., Wright, M. E., Theil, P. K., Scherer, B. L., et al. (2019). High-Amylose maize, potato, and butyrylated starch modulate large intestinal fermentation, microbial composition, and oncogenic miRNA expression in rats fed A high-protein meat diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2137.
- Nissen, L., Casciano, F., Chiarello, E., Di Nunzio, M., Bordoni, A., & Gianotti, A. (2021). Colonic in vitro model assessment of the prebiotic potential of bread fortified with polyphenols rich olive fiber. *Nutrients*, 13(3), 787.
- Nissen, L., Valerii, M. C., Spisni, E., Casciano, F., & Gianotti, A. (2021). Multiunit In Vitro Colon Model for the Evaluation of Prebiotic Potential of a Fiber Plus D-Limonene Food Supplement. *Foods*, 10(10), 2371.
- O’Callaghan, N. J., Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., Fenech, M., & Conlon, M. A. (2012). Colonocyte telomere shortening is greater with dietary red meat than white meat and is attenuated by resistant starch. *Clinical Nutrition*, 31(1), 60–64.
- O’Keefe SJ, Li JV, Lahti L, Ou J, Carbonero F, Mohammed K, et al. (2015). Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun*, 6:6342.
- P.G. Roopashree, Shilpa S.Shetty, N.Suchetha Kumari. (2021). Effect of medium chain fatty acid in human health and disease. *Journal of functional food*, 87, 104724.
- Pachikian, B.D., Neyrinck, A.M., Portois, L. *et al.* Involvement of gut microbial fermentation in the metabolic alterations occurring in n-3 polyunsaturated fatty acids-depleted mice. *Nutr Metab (Lond)* 8, 44 (2011).
- Pan, H., Feng, J., He, G.X., Cerniglia, C.E., Chen, H., 2012. Evaluation of impact of exposure of sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria. *Anaerobe* 18, 445–453.

- Paturi, G., Butts, C. A., Stoklosinski, H., & Ansell, J. (2012). Effects of early dietary intervention with a fermentable fibre on colonic microbiota activity and mucin gene expression in newly weaned rats. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 520–530.
- Paturi, G., Butts, C. A., Stoklosinski, H., Herath, T. D., & Monro, J. A. (2017). Short-term feeding of fermentable dietary fibres influences the gut microbiota composition and metabolic activity in rats. *International Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 2572–2581.
- Paturi, G., Nyanhanda, T., Butts, C. A., Herath, T. D., Monro, J. A., & Ansell, J. (2012). Effects of potato fiber and potato-resistant starch on biomarkers of colonic health in rats fed diets containing red meat. *Journal of Food Science*, 77(10), H216–H223.
- Perez-Burillo, S., Mehta, T., Pastoriza, S., Kramer, D. L., Paliy, O., & Rufián-Henares, J. A. (2019). Potential probiotic salami with dietary fiber modulates antioxidant capacity, short chain fatty acid production and gut microbiota community structure. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 105, 355–362.
- Perez-Burillo, S., Pastoriza, S., Gironés, A., Avellaneda, A., Pilar Francino, M., & Rufián-Henares, J. A. (2020). Potential probiotic salami with dietary fiber modulates metabolism and gut microbiota in a human intervention study. *Journal of Functional Foods*, 66, 103790.
- Pierre, F. H., Martin, O. C., Santarelli, R. L., Tache, S., Naud, N., Gueraud, F., et al. (2013). Calcium and alpha-tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(5), 1255–1262.
- Pierre, F., Freeman, A., Tache, S., Van der Meer, R., & Corpet, D. E. (2004). Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *Journal of Nutrition*, 134(10), 2711–2716.
- Pierre, F., Santarelli, R., Tache, S., Gueraud, F., & Corpet, D. E. (2008). Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *British Journal of Nutrition*, 99(5), 1000–1006.
- Pierre, F., Tache, S., Gueraud, F., Rerole, A. L., Jourdan, M. L., & Petit, C. (2007). Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats. *Carcinogenesis*, 28(2), 321–327.
- Pingitore A, Chambers ES, Hill T, Maldonado IR, Liu B, Bewick G, Morrison DJ, Preston T, Wallis GA, Tedford C, Castañera González R, Huang GC, Choudhary P, Frost G, Persaud SJ.

- (2017). The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro. *Diabetes Obes Metab*, 19(2):257–265.
- Roager, H.M.; Licht, T.R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun*, 9, 3294.
- Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. (1994). Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr*, 71(1):29–42.
- Rubio, R., Martín, B., Aymerich, T. & Garriga, M. (2014). The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 186, 55–60.
- Samraj AN, Pearce OMT, Läubli H, Crittenden AN, Bergfeld AK, Banda K, Gregg CJ, Bingman AE, Secrest P, Diaz SL, et al. (2015). A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2):542–7.
- Sayas-Barbería, E., Viuda-Martos, M., Fernández-López, F., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2012). Combined use of a probiotic culture and citrus fiber in a traditional sausage ‘Longaniza de Pascua’. *Food Control*, 27(2), 343–350.
- Scheppach, W. (1994). Effects of short-chain fatty-acids on gut morphology and function. *Gut*, 35(1), S35–S38.
- Schutkowski A, König B, Kluge H, Hirche F, Henze A, Schwerdtle T, Lorkowski S, Dawczynski C, Gabel A, Große I, et al. (2019). Metabolic footprint, and intestinal microbial changes in response to dietary proteins in a pig model. *J Nutr Biochem*, 67:149–60.
- Schwartz, S., & Ellefson, M. (1985). Quantitative fecal recovery of ingested hemoglobin-heme in blood: Comparisons by HemoQuant assay with ingested meat and fish. *Gastroenterology*, 89(1), 19–26.
- Sesink, A. L., Termont, D. S., Kleibeuker, J. H., & Van der Meer, R. (2001). Red meat and colon cancer: Dietary haem-induced colonic cytotoxicity and epithelial hyperproliferation are inhibited by calcium. *Carcinogenesis*, 22(10), 1653–1659.
- Shen Q, Chen YA, Tuohy KM. (2010). A comparative in vitro investigation into the effects of cooked meats on the human faecal microbiota. *Anaerobe*, 16(6):572–7.

- Silva, R. B., Silva-Júnior, E. V., Rodrigues, Laís. C., Andrade, L. H. C., Silva, S. I. D., Harand, W., & Oliveira, A. F. M. (2015). A comparative study of nutritional composition and potential use of some underutilized tropical fruits of Areaceae. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 87(3), 1701–1709.
- Singh A, Zapata RC, Pezeshki A, Reidelberger RD, Chelikani PK. (2018). Inulin fiber dose-dependently modulates energy balance, glucose tolerance, gut microbiota, hormones and diet preference in high-fat-fed male rats. *J Nutr Biochem*, 59:142–152.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., & Reddy, B. S. (1997). *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 18(4), 833–841.
- Sirini, N., Frizzo, L.S., Aleu, G., Soto, L.P. & Rosmini, M.R. (2021). Use of probiotic microorganisms in the formulation of healthy meat products. *Current Opinion in Food Sciences*, 38, 141–146.
- Smith EA, Macfarlane GT. (1997). Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe*, 3(5):327–37.
- Sonnenburg JL, Bäckhed F. (2016). Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 535:56–64.
- Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529(7585), 212.
- Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. (2017). Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*, 52(1):1–8.
- Sweeney TE, Morton JM. (2013). The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg*. 148:563–569.
- Thogersen, R., Castro-Mejia, J. L., Sundekilde, U. K., Hansen, L. H., Hansen, A. K., Nielsen, D. S., et al. (2018). Ingestion of an inulin-enriched pork sausage product positively modulates the gut microbiome and metabolome of healthy rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(19), Article e1800608.

- Thogersen, R., Gray, N., Kuhnle, G., Van Hecke, T., De Smet, S., Young, J. F., et al. (2020). Inulin-fortification of a processed meat product attenuates formation of nitroso compounds in the gut of healthy rats. *Food Chemistry*, 302, 125339.
- Toden, S., Belobrajdic, D. P., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2010). Effects of dietary beef and chicken with and without high amylose maize starch on blood malondialdehyde, interleukins, IGF-I, insulin, leptin, MMP-2, and TIMP-2 concentrations in rats. *Nutrition and Cancer*, 62(4), 454–465.
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2006). Resistant starch prevents colonic DNA damage induced by high dietary cooked red meat or casein in rats. *Cancer Biology & Therapy*, 5(3), 267–272.
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2007). High red meat diets induce greater numbers of colonic DNA double-strand breaks than white meat in rats: Attenuation by high-amylose maize starch. *Carcinogenesis*, 28(11), 2355–2362.
- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., & Nakhasi, D. (2000). Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 38(1), 79–98.
- Tseng C-H, Wu C-Y. (2019). The gut microbiome in obesity. *J Formos Med Assoc*, 118: S3–9.
- TSilberstein, T., Burg, A., Blumenfeld, J., Sheizaf, B., Tzur, T., & Saphier, O. (2013). Saturated fatty acid composition of human milk in Israel: A comparison between jewish and bedouin women. *Israel Medical Association Journal*, 15(4), 156–159.
- Tuohy KM, Hinton DJ, Davies SJ, Crabbe MJ, Gibson GR, Ames JM. (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota—implications for health. *Mol Nutr Food Res*, 50(9):847–57.
- Valli, C., Rabassa, M., Johnston, B., Kuijpers, R., Prokop-Dorner, A., Zajac, J., et al. (2019). Health-related values and preferences regarding meat consumption: A mixed-methods systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 171(10), 742–755.
- van der Beek CM, Canfora EE, Kip AM, Gorissen SHM, Olde Damink SWM, van Eijk HM, Holst JJ, Blaak EE, Dejong CHC, Lenaerts K. (2018). The prebiotic inulin improves substrate metabolism and promotes short-chain fatty acid production in overweight to obese men. *Metabolism*, 87:25–35.

- van der Beek CM, Canfora EE, Lenaerts K, Troost FJ, Olde Damink SWM, Holst JJ, et al. (2016). Distal, not proximal, colonic acetate infusions promote fat oxidation and improve metabolic markers in overweight/obese men. *Clin Sci (Lond)*, 130(22):2073–2082.
- Van der Meer, R., Lapre, J. A., Govers, M., & Kleibeuker, J. H. (1997). Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Letters*, 114(1–2), 75–83.
- Van der Meer-Van Kraaij, C., Kramer, E., Jonker-Termont, D., Katan, M. B., Van der Meer, R., & Keijer, J. (2005). Differential gene expression in rat colon by dietary heme and calcium. *Carcinogenesis*, 26(1), 73–79.
- Van der Meulen R, Camu N, Van Vooren T, Heymans C, De Vuyst L. (2008). In vitro kinetic analysis of carbohydrate and aromatic amino acid metabolism of different members of the human colon. *Int J Food Microbiol*, 124(1):27–33.
- Van Hecke, T., De Vrieze, J, Boon, N., De Vos, W. H., Vossen, E., & De Smet, S. (2019a). Combined Consumption of Beef-Based Cooked Mince and Sucrose Stimulates Oxidative Stress, Cardiac Hypertrophy, and Colonic Outgrowth of Desulfovibrionaceae in Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(2), 1800962.
- Van Hecke, T., Jakobsen, L. M., Vossen, E., Gueraud, F., De Vos, F., Pierre, F., et al. (2016). Short-term beef consumption promotes systemic oxidative stress, TMAO formation and inflammation in rats, and dietary fat content modulates these effects. *Food & function*, 7(9), 3760–3771.
- Vargas-Ramella, M., Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Franco, D., Campagnol, P. C. B., Tomasevic, I., et al. (2020). Physicochemical composition and nutritional properties of deer burger enhanced with healthier oils. *Foods*, 9(5), 17.
- Vargas-Ramella, M., Pateiro, M., Barba, F. J., Franco, D., Campagnol, P. C. B., Munekata, P. E. S., et al. (2020). Microencapsulation of healthier oils to enhance the physicochemical and nutritional properties of deer pate. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 125, 7.
- Vieira, A. R., Abar, L., Chan, D. S. M., Vingeliene, S., Polemiti, E., Stevens, C., et al. (2017). Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR continuous update Project. *Annals of Oncology*, 28(8), 1788–1802.

- Walter, J. *et al.* (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2578–2585.
- Wang M, Wan J, Rong H, He F, Wang H, Zhou J, Cai C, Wang Y, Xu R, Yin Z, Zhou W. (2019). Alterations in Gut Glutamate Metabolism Associated with Changes in Gut Microbiota Composition in Children with Autism Spectrum Disorder. *mSystems*, Jan 29;4(1): e00321-18.
- Wang, C., Huang, Z., Yu, K., Ding, R., Ye, K., Dai, C., Xu, X., Zhou, G., & Li, C. (2017). High-salt diet has a certain impact on protein digestion and gut microbiota: a sequencing and proteome combined study. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1838.
- Wang, X., Gibson, G. R., Sailer, M., Theis, S., & Rastall, R. A. (2020). Prebiotics inhibit proteolysis by gut bacteria in a host diet-dependent manner: A three-stage continuous in vitro gut model experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(10), e02730-19.
- Wang, X.; Gibson, G.R.; Sailer, M.; Theis, S.; Rastall, R.A. (2020). Prebiotics inhibit proteolysis by gut bacteria in a host diet-dependent manner: A three-stage continuous in vitro gut model experiment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86, e02730-19.
- Weiss J. (2003). Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans*, 31(4):785–90.
- Weitkunat K, Stuhlmann C, Postel A, Rumberger S, Fankhanel M, Woting A, et al. (2017). Short-chain fatty acids and inulin, but not guar gum, prevent diet-induced obesity and insulin resistance through differential mechanisms in mice. *Sci Rep*, 7(1):6109.
- Williams, B. A., Zhang, D., Lisle, A. T., Mikkelsen, D., McSweeney, C. S., Kang, S., et al. (2016). Soluble arabinoxylan enhances large intestinal microbial health biomarkers in pigs fed a red meat-containing diet. *Nutrition*, 32(4), 491–497.
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition and Dietetics*, 64, S113–S119.
- Wilson KA, Han Y, Zhang M, Hess JP, Chapman KA, Cline GW, Tochtrop GP, Brunengraber H, Zhang GF. (2017). Inter-relations between 3-hydroxypropionate and propionate metabolism in rat liver: relevance to disorders of propionyl-CoA metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 313(4):E413–Ee28.

Winter, J., Nyskohus, L., Young, G. P., Hu, Y., Conlon, M. A., Bird, A. R., et al. (2011). Inhibition by resistant starch of red meat-induced promutagenic adducts in mouse colon. *Cancer Prevention Research*, 4(11), 1920–1928 (Philadelphia, Pa).

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR), Continuous Update Project Expert Report. (2018). *Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer*. Available from: <http://dietandcancerreport.org/>. (Accessed 4 July 2019).

Xu, H., Heinze, T. M., Paine, D. D., Cerniglia, C. E. & Chen, H. Sudan azo dyes and Para Red degradation by prevalent bacteria of the human gastrointestinal tract. *Anaerobe* 16, 114–119 (2010).

Yamamoto N. (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers*, 43(2):129–34.

Zhang Z, Li D, Tang R. (2019). Changes in mouse gut microbial community in response to the different types of commonly consumed meat. *Microorganisms*, 7(3):76.

Zhang, Q., Yu, H., Xiao, X., Hu, L., Xin, F., & Yu, X. (2018). Inulin-type fructan improves diabetic phenotype and gut microbiota profiles in rats. *PeerJ*, 6, e4446.

Zhao, Z. W., Feng, Q. X., Yin, Z. F., Shuang, J. B., Bai, B., Yu, P. F., et al. (2017). Red and processed meat consumption and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 8(47), 83306–83314.

Zhu Y, Lin X, LiH, Li Y, Shi X, Zhao F, Xu X, Li C, Zhou G. Intake of meat proteins substantially increased the relative abundance of genus *Lactobacillus* in rat feces. *PLoS One* 2016;11(4): e0152678.

Zhu Y, Lin X, Zhao F, Shi X, Li H, Li Y, ZhuW, Xu X, Li C, Zhou G. (2015). Meat, dairy, and plant proteins alter bacterial composition of rat gut bacteria. *Sci Re*, 5:15220.

Zweigner J, Schumann RR, Weber JR. (2006). The role of lipopolysaccharide binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect*, 8(3):946–52.

7. Sitografia

<https://www.ruminantia.it/effetti-delle-proteine-della-carne-bovina-sul-microbiota-intestinale-umano/>

https://it.wikipedia.org/wiki/Acido_caprilico

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://dietandcancerreport.org/>.

http://www.mime4health.it/nqcontent.cfm?a_id=19441

<https://monographs.iarc.fr/>.