

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÁ DI BOLOGNA
SEDE DI CESENA
FACOLTÁ DI AGRARIA
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

EFFETTI DEGLI STARTER E DELLE CONDIZIONI DI
MATURAZIONE SU SALAMI TIPICI

Relazione finale in
Microbiologia industriale

Relatore: Chiar.mo
Prof. Fausto Gardini

Presentata da:
Sgarzi Luca

Correlatori:
Dott.ssa Giulia Tabanelli

Sessione I
Anno Accademico 2011/2012

INDICE

Capitolo 1: Introduzione	1
1.1 I salami e tecnologia di produzione	1
1.1.1 Fasi preliminari	2
1.1.2 Effetti degli additivi	2
1.1.3 Insaccamento	5
1.1.4 Stagionatura	5
1.2 Gruppi microbici principali	7
1.2.1 Impiego dei microrganismi starter	9
1.2.2 Batteri lattici	10
1.2.3 Famiglia Micrococcaceae	11
1.2.4 Muffe	12
1.3 Trasformazioni biochimiche durante la maturazione	14
1.3.1 Attività proteolitica	14
1.3.2 Attività lipolitica	17
1.4 Ammine biogene	19
1.4.1 Effetti tossicologici delle ammine biogene	20
1.4.2 Legislazione	21
1.4.3 Meccanismo di produzione delle ammine biogene	22
1.4.4 Le ammine biogene nei salumi fermentati	24
1.4.5 Microrganismi produttori	26
1.4.6 Fattori che regolano la produzione di ammine biogene	28
Capitolo 2: Obiettivi	33

Capitolo 3: Materiali e metodi	37
3.1 Microrganismi impiegati	37
3.2 Produzione dei salami	37
3.2.1 Tipo Felino	37
3.2.2 Tipo Milano	38
3.3 Perdita di peso e pH	40
3.4 Analisi microbiologiche	40
3.5 Analisi del contenuto di ammine biogene	41
3.5.1 Estrazione delle ammine	41
3.5.2 Fase di derivatizzazione	41
3.5.3 HPLC e condizioni cromatografiche	42
3.5.4 Preparazione della soluzione di standard interno	43
3.5.5 Preparazione delle soluzioni standard di ammine biogene	43
3.5.6 Preparazione degli eluenti per HPLC	43
3.6 Analisi del profilo aromatico mediante gascromatografia	44
3.7 Valutazione sensoriale	45
3.8 Analisi statistiche	45
Capitolo 4: Risultati	47
4.1 Perdite di peso, pH e conteggi microbici	47
4.2 Accumulo di ammine biogene	51
4.3 Analisi SPME-GC dei composti volatili dei salami	55
4.4 Panel test	61
Capitolo 5: Conclusioni	65
Bibliografia	67

Capitolo 1: Introduzione

La trasformazione per via fermentativa di numerose materie prime alimentari rappresenta un mezzo per rendere più serbevoli numerosi alimenti: questi vengono intimamente modificati e migliorati dal punto di vista organolettico grazie all'effetto dell'azione di microrganismi definiti “utili” o “virtuosi”.

I microrganismi, ovviamente, sono i protagonisti poiché la buona riuscita della trasformazione degli alimenti fermentati dipende soprattutto dalla loro attività; gli alimenti fermentati, infatti, hanno origini antiche e la loro produzione tradizionale avviene grazie l'azione di microrganismi che, naturalmente, sono presenti nella materia prima.

I nostri avi, nonostante non conoscessero gli agenti della fermentazione, riuscivano a raggiungere risultati positivi grazie all'utilizzo di tecnologie, primitive ma efficaci, imparate empiricamente.

Attualmente, infatti, gli alimenti fermentati sono soprattutto prodotti industriali e le fermentazioni sono guidate tramite l'impiego di colture microbiche selezionate (gli starter).

L'utilizzo di tali fermenti come starter ed il conseguente controllo diretto e indiretto delle fermentazioni hanno permesso un notevole miglioramento della qualità di numerosi prodotti e l'eliminazione di numerosi rischi di natura igienico-sanitaria, un tempo comuni soprattutto per gli alimenti fermentati di origine animale (Zambonelli *et al.*, 2001).

1.1 I Salami e tecnologia di produzione

Secondo la Gazzetta Ufficiale (4-10-2005, n. 231, art. 16):

si intende per «salame» il prodotto di salumeria, costituito da carni ottenute da muscolatura striata appartenente alla carcassa di suino con aggiunta di sale ed eventualmente di carni di altre specie animali, macinate e miscelate con grasso suino in proporzioni variabili, ed insaccato in budello naturale o artificiale.

Il salame è il prodotto della fermentazione lattica di carne cruda tritata, salata, miscelata con grasso tritato o in cubetti, addizionata di varie spezie, insaccata e pressata in contenitori costituiti da budelli naturali o ricostituiti.

1.1.1 Fasi preliminari

Dopo la macellazione e la fase successiva di sezionatura, la carne subisce una rapida refrigerazione a 0/2°C. Successivamente la carne (parte magra e grassa) è prima sgrossata al cutter, poi passata al tritacarne vero e proprio con calibro variabile a seconda della grana che si vuole ottenere.

La carne così lavorata passa alla fase di impastatura in cui vengono aggiunti gli ingredienti non carnei quale sale, spezie, starter microbici, antiossidante e conservante.

Questi ingredienti hanno un'importante influenza per un ottimo sviluppo dei microrganismi favorevoli a scapito di quelli patogeni o alteranti e per una corretta maturazione.

carne magra triturrata	50-98 %
grasso suino (triturrato o in cubetti)	2-50 %
NaCl	2,3-4 %
nitrati	250 mg/kg
nitriti	150 mg/kg
zuccheri	0,2-1 %
acido ascorbico	50 mg/kg
spezie e aromatizzanti	a seconda della tipologia

Tabella 1.1: Componenti dell'impasto medio di salami.

1.1.2 Effetti degli additivi

Il **sale** (NaCl) esercita una selezione sui microrganismi presenti in base alle loro caratteristiche di resistenza ad esso. Infatti i microrganismi possono essere suddivisi in alosensibili (la cui crescita è bloccata a concentrazioni di NaCl maggiori al 2,5%), alotolleranti (sviluppano meglio in assenza di sale, ma crescono anche a concentrazioni di NaCl maggiori al 2,5%) o alofili (crescono a concentrazioni di NaCl molto alte). L'aggiunta di NaCl è fatta anche per abbassare l'acqua libera (a_w) dell'impasto a 0,96-0,97 in modo che molti microrganismi degradativi non riescano a sviluppare: si ha, infatti, l'inibizione di molti microrganismi della carne, le *Enterococcaceae*, e lo sviluppo di alofili come le *Micrococcaceae* e i batteri lattici.

I **nitrati** (NO_3^-) e i **nitriti** (NO_2^-) aggiunti sono usati per diversi motivi tra cui il loro effetto sul colore (nitrosomioglobina), la loro azione antimicrobica (clostridi), la loro funzione antiossidante (irrancidimento) e il loro effetto sull'aroma (effetto Perigo). Oggi è possibile impiegare nitrati e nitriti in alcuni alimenti in quantità molto ridotte come stabilito dalla direttiva 2006/52/CE, che riporta, a titolo di regola generale, la dose massima di E249 (nitrito di potassio) e di E250 (nitrito di sodio) che può essere aggiunta durante la fabbricazione. Tale dose è di 150 mg/kg per i prodotti a base di carne in generale e di 100 mg/kg per i prodotti a base di carne sterilizzati, come mostrato in Tabella 1.2.

MATRICE	Nitrito di potassio (E249) Nitrito di sodio (E250)	Nitrato di potassio (E251) Nitrato di sodio (E252)
Prodotti a base di carne pastorizzati (NaNO_2 per mg/Kg)	150	Non consentiti
Prodotti a base di carne sterilizzati (NaNO_2 per mg/Kg)	100	Non consentiti
Prodotti a base di carne NON trattati termicamente (NaNO_3 per mg/Kg)	150	150

Tabella 1.2: Limiti di legge per l'impiego di nitriti e nitrati.

I nitrati vengono addizionati come riserva poiché la presenza di alcuni microrganismi nitrato-riduttasi li convertono alla forma attiva di nitriti. Giocano un ruolo fondamentale le *Micrococcaceae*, in particolare gli stafilococchi, poiché posseggono l'enzima nitrato-riduttasi che ad un ottimo di pH di 5,2 riesce a compiere il passaggio da nitrati a nitriti.

Infine, per reazione chimica spontanea in mezzo acido, si ha la conversione dei nitriti (NO_2^-) in acido nitroso (HNO_2) che poi si converte in ossido nitrico (NO), la forma attiva, importante per la stabilizzazione del colore in quanto si lega alla mioglobina presente nella carne formando la nitrosomioglobina *colorata di rosso*. Il mantenimento del colore rosso della carne, a partire dalla fase di maturazione, è però dato dall'abbassamento del pH che denatura la parte proteica della nitrosomioglobina formando il nitroso-mioemocromogeno, di colore rosso vivo (Figura 1.1).

Anche l'azione antimicrobica è svolta dall'ossido nitrico che inibisce lo sviluppo di numerosi microrganismi, selezionando la microflora batterica utile: l'effetto inibitorio riguarda in particolare i clostridi (*Clostridium botulinum*) dei quali è inibita la produzione di energia. Nitrati e nitriti sono risultati efficaci anche in ambiente anaerobico verso *Staphylococcus aureus*, anche se in quantità minore rispetto ai clostridi.

Infine, come ultimo effetto, i nitrati e i nitriti sono usati per migliorare l'aroma delle carni grazie all'*effetto Perigo*: l'aroma delle carni in cui sono presenti nitrati e nitriti è migliore rispetto a carni in cui non si ha l'utilizzo anche se i meccanismi chimici completi non sono pienamente compresi a causa del complesso numero di composti nei salami e all'alta reattività dei nitriti.

L'aggiunta di nitrati e nitriti, però, ha anche controindicazioni poiché durante la digestione, se sono presenti ammine secondarie e terziarie, si ha la formazione di nitrosamine che sono risultate cancerogene per l'uomo.

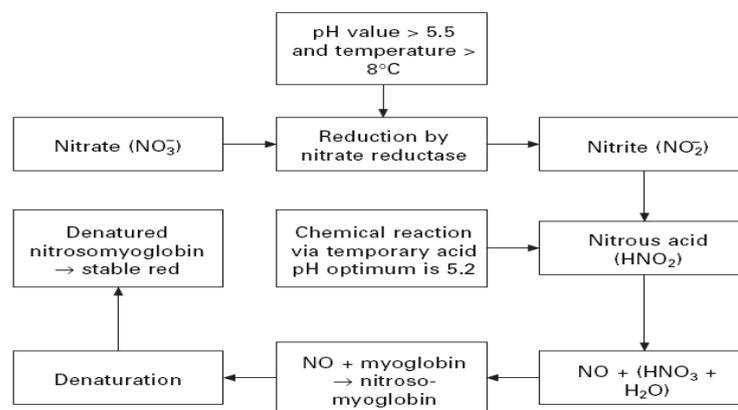


Figura 1.1: Meccanismo dello sviluppo del colore.

Nella carne l'unica fonte glucidica presente è il glicogeno che, però, viene trasformato in acido lattico ed è praticamente tutto consumato durante i processi post-mortem: si hanno, quindi, impasti che sono del tutto privi di zuccheri fermentescibili e che necessitano un'aggiunta.

Gli **zuccheri** usati aggiunti agli impasti sono soprattutto glucosio, saccarosio e lattosio poiché rappresentano l'unica fonte per poter far avviare i processi fermentativi dei batteri lattici: si ha una rapida colonizzazione del prodotto da parte di specie non pericolose che producono acido lattico con conseguente abbassamento del pH e, quindi, selezione della microflora positiva.

Oltre a zuccheri, nitrati e nitriti e sale, spesso vengono addizionati altri additivi ed ingredienti quali spezie, l'acido ascorbico e l'aglio.

Lo scopo principale delle spezie è di migliorare e accrescere il sapore e l'aroma del prodotto finale. Lo sviluppo microbico è influenzato in maniera negativa dalle spezie ed in

particolare il pepe ha attività antimicrobica soprattutto su *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Le spezie, tuttavia, rappresentano una grande fonte d'inquinamento per il prodotto finito determinando, così, un grossissimo rischio per i salumifici.

L'acido ascorbico è aggiunto sia per la propria azione antiossidante sia perché favorisce la presa di colore.

1.1.3 Insaccamento

L'impasto viene insaccato ad una temperatura di 0/-4°C in budelli naturali o artificiali che vengono chiusi con una clippatrice o legati a mano. Solo a questo punto i salami assumono la loro forma tipica e vengono appesi e sistemati su carretti.

I motivi per cui si scelgono budelli artificiali o naturali sono di natura tecnologica e microbiologica: gli artificiali (in genere derivano da fibre vegetali o da fibre animali quali collagene) si preferiscono ai naturali (derivano dall'intestino di suini, bovini, equini ed ovini) per la regolarità del loro calibro, la mancanza di flora microbica, l'assenza di odori sgradevoli e di grassi che potrebbero comportare un irrancidimento del prodotto.

Il budello svolge un compito necessario per il successivo periodo di maturazione favorendo l'anaerobiosi, limitando le perdite di umidità (il budello è permeabile) e fungendo da barriera naturale contro eventuali patogeni.

Temperature maggiori a 0°C e velocità di riempimento troppo elevate determinano il rischio di possibile fusione del grasso all'interno del budello creando uno strato impermeabilizzante sul budello.

1.1.4 Stagionatura

È il periodo di tempo nel quale avvengono una serie di trasformazioni fisiche, chimiche, biologiche e microbiologiche che conferiranno le caratteristiche organolettiche tipiche all'insaccato. La fase di stagionatura si può suddividere in due sottofasi diverse tra loro per le condizioni di T, U.R. e durata: asciugatura e maturazione.

- *Asciugatura*: dopo l'insacco i salami vengono portati e lasciati circa una settimana nelle camere condizionate d'asciugamento a T e U.R. controllate per consentire al salame di perdere buona parte dell'acqua dal proprio interno. Qui sono nebulizzati con una

soluzione di acqua e spore di *Penicillium* per permettere la futura formazione di muffe bianche sulla superficie esterna del budello. In questi primissimi giorni ha luogo il processo di fermentazione lattica da parte degli starter (sviluppo popolazione microbica), pertanto si assiste ad un sensibile abbassamento del pH (valori $< 5,0$): l'entità e la velocità del processo fermentativo dipendono dal tipo di colture starter, dalla presenza e dalla quantità di zuccheri nell'impasto, dalla T e U.R. delle celle d'asciugamento. L'abbassamento del pH favorisce la stabilità microbiologica del prodotto, in quanto i microrganismi alterativi, degradativi e patogeni vengono inibiti, mentre si ha lo sviluppo dei batteri utili (i cosiddetti batteri "virtuosi").

Si ha anche il raggiungimento del punto isoelettrico ($\approx 5,2$) delle proteine della carne (punto in cui le proteine trattengono meno acqua) con la formazione di un gel proteico che determina la struttura del prodotto e favorisce la perdita di umidità.

Come ultimo aspetto dell'abbassamento del pH (valori $< 5,2$), si ha la conversione dei nitriti (NaNO_2) in ossido nitrico (NO) fondamentale per la stabilizzazione del colore. Inoltre, il prodotto perde umidità e di conseguenza l' a_w diminuisce: la perdita di acqua deve avvenire il più uniformemente possibile, quindi le cinetiche di disidratazione devono essere controllate attentamente per evitare di formare una crosta superficiale dipendente dalla troppo rapida evaporazione degli strati esterni che, pertanto, si oppongono a ulteriori passaggi di acqua dal cuore del prodotto. Sulla movimentazione dell'acqua, oltre al tipo d'asciugamento utilizzato, incidono altri fattori come il rapporto tra carne magra e carne grassa (meno carne magra c'è e meno acqua è presente) e la dimensione delle particelle di grasso (più le particelle sono fini e minore è la quantità d'acqua che esce perché si creano più deviazioni; il tempo d'uscita sarà, invece, maggiore). Anche l' a_w , come il pH, è un fattore di controllo per molti microrganismi indesiderati poiché, con l'abbattimento dell' a_w , il substrato diviene più selettivo: per valori inferiori a 0,97, infatti, molti batteri degradativi non riescono a sopravvivere. Verso la fine dell'asciugatura iniziano a comparire le muffe sulla superficie esterna del budello.

- *Maturazione e stagionatura*: terminata la fase d'asciugamento, i salami sono spostati nelle camere di maturazione per il tempo necessario, a seconda del tipo e delle dimensioni del prodotto, dove rimangono fino alla completa stagionatura. Questa fase può durare anche svariati mesi, a seconda del tipo di prodotto. Tale fase è caratterizzata da

un'intensa attività microbica (sviluppo popolazione batterica invariato) che si affianca alle attività dovute agli enzimi endogeni della carne (lipasi e proteasi). Durante questo periodo si ha il pieno sviluppo delle muffe sulla superficie esterna del salame che comporta una lenta, ma continua, perdita d'acqua da parte del salame ed all'innalzamento del pH. La presenza di muffe all'esterno del prodotto ha una duplice funzione: quella di regolazione degli scambi idrici tra le diverse parti del prodotto (determinando un ulteriore abbassamento dell' a_w) ed abbassamento dell'acidità (disacidificazione): le muffe, infatti, entrano nel prodotto tramite le ife cercando nutrimento e lo trovano nell'acido lattico che man mano viene utilizzato e consumato, determinando un progressivo innalzamento del pH.

1.2 Gruppi microbici principali

L'ecosistema microbico che si può trovare nei prodotti carnei fermentati è molto vario e dipende da svariati fattori. Infatti la prevalenza di uno o più gruppi microbici dipende, oltre che dalla qualità della materia prima, anche dalla tecnica adoperata e ciò comporta la presenza di una microflora complessa (Comi *et al.*, 1992). Questa flora microbica esercita un ruolo fondamentale sulle qualità organolettiche del prodotto.

La carne che viene manipolata e lavorata rappresenta un prodotto molto sporco poiché può essere altamente contaminata da una vasta gamma di microrganismi il cui numero e tipologia dipende strettamente dalle condizioni di macellazione, trasporto, conservazione e di trasformazione. La microflora che caratterizza la carne prima di essere tritata e poi insaccata può avere origine estrinseca (proveniente dalle parti superficiali e rappresenta una contaminazione ambientale) o origine intrinseca (proveniente dai tessuti profondi dell'animale), anche se in realtà la carne ha quasi unicamente contaminazione microbica superficiale dovuta alla triturazione in quanto si aumenta notevolmente la superficie disponibile. Le vie di contaminazione sono molteplici ed è per questo che è assolutamente necessario seguire precise norme igieniche di prevenzione e di contenimento della carica microbica durante la macellazione e le successive fasi di preparazione dei salami. Si tratta di una ricca ed abbondante miscellanea di specie appartenenti ai più differenti gruppi: *enterobacteriaceae*, *micrococcaceae*, batteri lattici, *pseudomonadaceae*, batteri sporigeni aerobi ed anaerobi, muffe, lieviti ed altri.

In generale si può fare una classificazione dei microrganismi in utili (di cui si vuole lo sviluppo) e dannosi (di cui si vuole l'inibizione):

- microrganismi utili: sono utilizzati i batteri lattici omofermentanti mesofili del genere *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*) e del genere *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*) insieme a micrococcaceae del genere *Micrococcus* e *Staphylococcus* (specie non emolitiche come ad esempio *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*); questi costituiscono la flora predominante durante la fermentazione e spesso rimangono tali anche in maturazione;
- microrganismi alteranti e degradativi: costituiti da enterococchi (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), che conferiscono ai salami gusti e odori sgradevoli, e batteri lattici eterofermentanti, che determinano un sapore acre causato dall'acido acetico prodotto;
- microrganismi patogeni: costituiti da *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*.

Non bisogna dimenticare però che tra gli ingredienti dei salumi vi è il cloruro di sodio, che esplica una forte azione selettiva nei confronti dei microrganismi presenti. Per questa ragione, i microrganismi che interessano i salami sono soprattutto microrganismi alotolleranti, che riescono a crescere in presenza di concentrazioni di sale compatibile con quelle riscontrate nell'impasto (2,5-4%) (Zambonelli *et al.*, 2001). Questi batteri appartengono a molte specie, alcune delle quali sono note per la loro patogenicità e possono comportare rischi di carattere igienico-sanitario.

Appena completato l'insacco, quindi nell'impasto comincia lo sviluppo dei batteri alotolleranti presenti in maggior numero. I micrococchi, aerobi obbligati sviluppano fino a che non si esaurisce l'ossigeno. Successivamente prendono il sopravvento gli stafilococchi, anaerobi facoltativi, che hanno un'attività che dura più a lungo (Zambonelli *et al.*, 2001).

I batteri lattici, però, sono presenti nell'impasto in numero inferiore e quindi il loro sviluppo comincia tardivamente rispetto a quello delle *micrococcaceae*. Quando essi iniziano a svilupparsi e, grazie all'azione acidificante e alla possibile produzione di molecole antimicrobiche, prendono il sopravvento e diventano dominanti già dopo 24 ore dall'impasto. Dopo 1-2 giorni, i batteri lattici rimangono i padroni del campo ed il loro sviluppo si prolunga fino a quando sono presenti zuccheri disponibili nell'impasto.

Dal 2-3° giorno, sul budello comincia a manifestarsi anche lo sviluppo di muffe: queste sono in genere rappresentate da specie dal genere *Penicillium* (Zambonelli *et al.*, 2001). Possono anche formarsi larghe colonie di aspergilli, particolarmente sgradite perché tossigene, è questo il caso di stagionature di più lunga durata.

Lo sviluppo microbico è influenzato dalla quantità di zuccheri presenti nella carne, o eventualmente aggiunti, dal sale e, in maniera negativa dalle spezie.

1.2.1 Impiego dei microrganismi starter

Attraverso l'impiego di adeguate colture starter gli inconvenienti legati alle fermentazioni naturali possono essere ridotti ed eliminati. In tal caso, però, una sola coltura non è sufficiente poichè il processo microbiologico è complesso. In realtà per la produzione dei salami, si alternano tre diverse colture starter (sulla falsariga di ciò che avviene in una fermentazione naturale): prima i batteri lattici per la fermentazione principale, poi micrococchi e/o stafilococchi per le prime fasi del processo e gli aromi in maturazione ed infine le muffe per un più sicuro ammuffimento del budello (Zambonelli *et al.*, 2001).

I ceppi starter sono aggiunti all'impasto in modo da realizzare una concentrazione microbica di almeno un milione di cellule per grammo e devono essere selezionati seguendo sia criteri di sicurezza (non patogeni e non tossinogeni) sia criteri di efficienza tecnologica ed economica. Infatti essi non solo devono essere in grado di svilupparsi nelle condizioni ecologiche del processo produttivo ma devono essere in possesso della più alta competitività nelle condizioni nelle quali si trovano ad operare.

Le colture starter hanno il principale compito di guidare in modo programmabile il processo fermentativo durante il quale producono quei composti che sono propri del gruppo o della specie d'appartenenza e dunque sono ben note le trasformazioni chimiche e biochimiche che provocano.

Inoltre, l'attività degli starter prosegue con l'autolisi spontanea delle cellule microbiche, che avviene al termine del loro sviluppo e che si protrae per lungo tempo determinando conseguenze importanti sulla qualità del prodotto. L'autolisi è dovuta all'attività degli enzimi che regolano la struttura e la formazione della parete cellulare: al termine dello sviluppo cellulare, infatti, l'attività di tali enzimi continua e determina l'idrolizzazione della parete cellulare con rilascio nel mezzo del contenuto cellulare integro

e biologicamente ancora attivo. Ciò che interessa maggiormente è il patrimonio enzimatico intracellulare che continua a svolgere la propria azione specifica sui componenti del mezzo: ciò significa che l'arresto della moltiplicazione determina la fine dell'attività diretta delle cellule ma non di quella indiretta e che la composizione del fermentato può ancora subire ulteriori modificazioni (Zambonelli *et al.*, 2001).

Lo sviluppo dell'aroma quindi è dovuto principalmente a questi fenomeni poichè gli enzimi rilasciati dai gruppi microbici presenti agiscono sullo stesso mezzo: gli enzimi che maggiormente interessano sono le proteasi dei batteri lattici e le lipasi delle *micrococcacee*.

La maggior parte di queste colture sono basate sui batteri lattici (ceppi *Lactobacillus* o *Pediococcus*) per assicurare una rapida acidificazione e sulle *Micrococcaceae* (ceppi *Kocuria* o *Staphylococcus*) per avere un buon profilo sensoriale (Toldrà F., 2006).

1.2.2 Batteri lattici

I batteri lattici sono organismi a larga diffusione ambientale e sono ampiamente presenti negli ambienti di macellazione e di lavorazione della carni. Per la loro ubiquitarità e per le loro caratteristiche generali trovano buone condizioni di sviluppo in vari prodotti carnei.

Tali batteri sviluppano molto velocemente negli impasti di salami per la loro resistenza al pH, alla presenza di sale, nitrati e nitriti, per le loro esigenze di O₂ (crescono bene in assenza di O₂) nonché per la loro elevata presenza iniziale.

I batteri lattici sono i principali agenti della fermentazione dei salami poiché sono in grado di fermentare velocemente gli zuccheri presenti nell'impasto, di abbassare il pH del prodotto e di renderlo qualitativamente sicuro impedendo lo sviluppo di batteri tossigeni e alteranti ma anche di contribuire all'aroma e al gusto del prodotto: per questi motivi, quindi, possono essere aggiunti agli impasti come colture starter.

Il principale fattore limitante per il loro sviluppo è rappresentato dai glucidi fermentescibili che vengono rapidamente utilizzati e trasformati in acido lattico per l'abbassamento del pH intorno a valori finali di 5,3: l'entità dell'abbassamento del pH è quindi correlata alla quantità di zucchero aggiunto.

L'attività dei batteri lattici, però, non si limita soltanto a ciò: dopo un certo tempo dal termine dello sviluppo, le cellule batteriche vanno incontro ad autolisi rilasciando nella

matrice il loro contenuto enzimatico (soprattutto proteasi) ancora attivo che comincia a manifestare i primi effetti dopo circa 20 giorni.

Il principale requisito per la scelta delle specie idonee si basa sulla più alta competitività nelle condizioni in cui si trovano ad operare e, in particolar modo fra queste, il sale non costituisce un ostacolo poiché la maggior parte delle specie del gruppo presenta un sufficiente grado di alotolleranza.

Importante è anche il comportamento verso la temperatura, poiché la stagionatura dei salami viene condotta a livelli inferiori a 20°C: la selezione va dunque eseguita con batteri lattici mesofili.

I più idonei a questo fine sono gli omofermentanti appartenenti al 2° gruppo perché danno una fermentazione più pulita (con minima quantità di composti secondari) ed un più pronto abbassamento del pH (Zambonelli *et al.*, 2001): questi appartengono al genere *Lactobacillus* come *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei*.

I batteri lattici eterofermentanti non sono voluti poiché accumulano prodotti sgraditi come la CO₂ (gonfiori con conseguenti irrancidimenti e buchi nell'impasto), H₂O₂ (inverdimento del prodotto) e altri composti che potrebbero influenzare le caratteristiche organolettiche tipiche dei salami.

1.2.3 Famiglia Micrococcaceae

Anche la famiglia delle *Micrococcaceae* comprende batteri alta diffusione ambientale, anche se il loro habitat naturale è in particolare la pelle dei mammiferi.

Vi sono sia specie virtuose impiegate come starter nella produzione dei salami sia specie che possono produrre potenti tossine o enterotossine termoresistenti come lo *Staphylococcus aureus*, la specie tossigena responsabile del più alto numero di tossinfezioni alimentari.

Sono utilizzate come starter poiché sono in grado di ridurre i nitrati a nitriti favorendo la sicurezza del prodotto (prevenzione dello sviluppo dei clostridi e stabilizzazione del colore), hanno una buona attività lipolitica contribuendo alla migliore maturazione dei salami ed infine hanno una buona capacità autolitica, in modo che la coltura possa svolgere tutto il suo potenziale lipolitico non solo nel corso dello sviluppo, ma anche successivamente (Zambonelli *et al.*, 2001).

L'aggiunta di colture starter di micrococchi o di stafilococchi assicura il miglior andamento dello sviluppo microbico fin dal primo momento e conferisce aroma e sapore (attività proteolitica e lipolitica), colore (produzione di catalasi con rimozione di H₂O₂) e miglior qualità al prodotto.

Per il genere *Micrococcus* la specie più frequente è *Kocuria varians* mentre per il genere *Staphylococcus* sono usate le specie *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus*, entrambi coagulasi negativi.

I micrococchi, essendo aerobi obbligati, hanno scarsa possibilità di sviluppo se non subito dopo l'insacco: il metabolismo aerobio comporta la respirazione di O₂ con formazione principalmente di H₂O e CO₂, quindi un ambiente anaerobico che contribuisce all'inibizione dell'irrancimento, sfavorevole per le specie dannose e favorevole per lo sviluppo di batteri lattici.

Inizialmente i micrococchi sono prevalenti perché costituiscono un'importante componente della microflora spontanea degli impasti, ma, terminato O₂, sono sostituiti dagli stafilococchi.

Gli stafilococchi si differenziano dai micrococchi per essere anaerobi facoltativi e, in assenza di O₂ consumato precedentemente dai micrococchi, conducono una fermentazione sostanzialmente lattica con produzione di piccole quantità di altri prodotti (acido acetico).

1.2.4 Muffe

Le muffe sono accomunate da un metabolismo strettamente aerobio e fanno parte di un grande gruppo di organismi eterotrofi, i funghi, che vivono come saprofiti o parassiti o in simbiosi con altri organismi.

Con il termine «muffe», infatti, s'intendono funghi che sviluppano, con colonie ampiamente diffuse, su materiali di varia natura senza la formazione di grandi corpi fruttiferi.

La loro principale caratteristica distintiva è la struttura vegetativa filamentosa nota col nome di micelio: esso consiste in un sistema di cellule riunite in lunghi filamenti chiamati ife.

Le ife rappresentano un sistema molto efficiente per sfruttare le risorse del substrato poiché penetrano profondamente nel mezzo su cui sviluppano provvedendo alla nutrizione dell'intero fungo che riesce ad utilizzare la maggior parte dei composti organici naturali.

Poiché si ha una grande eterogeneità, fra le diverse muffe sono riscontrabili forti differenze di comportamento che riguardano soprattutto la risposta verso l' a_w e verso la temperatura (Zambonelli *et al.*, 2001).

La selezione delle muffe si svolge tenendo conto di tre caratteri fondamentali: non devono produrre micotossine (ciò è legato al ceppo e deve essere comunque testato ceppo per ceppo), devono avere preferibilmente micelio bianco e devono avere velocità di moltiplicazione sul budello colonizzandolo rapidamente e completamente (Zambonelli *et al.*, 2001).

Il principale aspetto negativo delle muffe, oltre al fatto che sono molto alteranti, è che gli aspergilli sono grandi produttori di micotossine, tossiche per l'uomo: per tale motivo nei salami si usano unicamente penicilli perché presentano alcuni ceppi del tutto privi di questa capacità.

Le muffe che sono fatte oggetto di selezione e che vengono usate come colture starter appartengono al genere *Penicillium*, in particolare la legislazione consente l'uso del *Penicillium nalgiovense*: è la specie preferita poiché soddisfa sia il fatto di avere il micelio bianco (rende più gradevole l'aspetto esteriore dei prodotti) sia la capacità di non produrre micotossine; inoltre presenta potere proteolitico e lipolitico. (Zambonelli *et al.*, 2001).

Infine, come ultima caratteristica, le muffe non devono possedere attività cellulolitica: ciò impedisce che i salami cadano dall'essere appesi durante la maturazione.

I penicilli cominciano a moltiplicarsi superficialmente ma il loro micelio penetra all'interno dell'impasto dove trova come unica fonte di carbonio l'acido lattico prodotto dalla fermentazione lattica: determinano, così, una disacidificazione e un contemporaneo aumento del pH.

La loro presenza è importante anche perché mantengono l'umidità del prodotto ad un livello quasi costante in tutto il volume: le muffe, infatti, funzionano come regolatrici dell'umidità, sottraendo H₂O in caso di eccessi ed impedendo il disseccamento in caso contrario.

Inoltre, le muffe prevengono anche la formazione di croste sul budello, la presenza di queste non permetterebbe la disidratazione dei salami, e favoriscono la sbucciatura con un maggiore distacco dalle fette.

A livello industriale l'inoculo delle muffe selezionate avviene tramite una soluzione di H₂O e spore per spennellamento, immersione o nebulizzazione.

1.3 Trasformazioni biochimiche durante la maturazione

Molti cambiamenti biochimici sono stati osservati durante la lavorazione delle carni fermentate, essendo la maggior parte di loro come una conseguenza delle reazioni enzimatiche endogene e/o microbiche.

La proteolisi e la lipolisi costituiscono due dei più importanti fenomeni enzimatici, responsabili della generazione di composti con diretta influenza su sapore e aroma (Toldrà F., 2006).

1.3.1 Attività proteolitica

La proteolisi è il più complesso evento che concorre alla stagionatura dei salumi e consiste nella progressiva degradazione e scomposizione delle proteine (Toldrà F., 2006).

Durante la fermentazione e la maturazione del salame la proteolisi determina l'idrolisi delle proteine miofibrillari e sarcoplasmatiche della carne con conseguente indebolimento della rete miofibrillare e formazione di catene polipeptidiche di piccole-medie dimensioni ed aminoacidi liberi.

Inizialmente l'idrolisi delle proteine è principalmente attribuita alle proteasi batteriche (Lücke F. K., 1985), in particolare a quelle prodotte dai LAB (Guo S. L. e Chen M. T., 1991; Dierick *et al.*, 1974; Martin M., 1975).

Le proteine presenti nel mezzo, però, non possono essere utilizzate direttamente dai batteri. Queste, in un primo momento, devono essere idrolizzate a peptidi e aminoacidi liberi che, essendo più piccoli, possono essere traspostati nella cellula e, una volta entrati nel citoplasma, per azione delle peptidasi intracellulari vengono ripartiti per formare aminoacidi liberi (Law B. A., 1980).

Questo processo proteolitico contribuisce a dare consistenza al prodotto, mediante degradazione della struttura miofibrillare, e all'aroma (positivo e/o negativo), mediante

l'accumulo di numerosi composti a basso peso molecolare, inclusi i peptidi, gli aminoacidi, le aldeidi, gli acidi organici e le ammine (substrato di successive reazioni che portano alla formazione di numerosi altri composti) attraverso il catabolismo (decarbossilazione e deaminazione) degli aminoacidi (Hierro *et al.*, 1999).

Generalmente nei salami i processi proteolitici sono guidati dall'azione di enzimi specifici: l'idrolisi, infatti, è data dalla combinazione dell'azione delle esopeptidasi e proteasi degli starter (per autolisi) e dagli enzimi endogeni del muscolo (catepsine).

Anche se non è del tutto noto in che maniera i microrganismi partecipino ai cambiamenti proteolitici durante la maturazione, per quanto riguarda gli starter, la proteolisi è attribuita alle proteasi delle *Micrococcaceae* e dei batteri lattici che giocano un ruolo essenziale nella formazione dell'aroma. In salami spagnoli, infatti, l'esistenza intra ed extracellulare di tali proteasi è stata dimostrata in vitro da Selgas *et al.* (1993) notando che l'attività extracellulare risulta generalmente più alta.

Per alcune specie del genere *Staphylococcus* è anche stata dimostrata la forte azione proteolitica (Montel *et al.*, 1992; Hammes *et al.*, 1995).

In alcuni studi sui batteri lattici è stato osservato che diverse specie di *Lactobacillus* e *Pediococcus*, utilizzate come starter, non hanno un ruolo importante nell'idrolisi delle proteine, mentre le loro peptidasi intracellulari possono aumentare i livelli di aminoacidi liberi (Montel *et al.*, 1992).

Nonostante la probabile esistenza delle proteinasi legate alla parete cellulare dei lattobacilli, questi microrganismi e i LAB in generale sono considerati essere debolmente proteolitici se paragonati con altri gruppi di batteri (*Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, coliformi) (Kröckel L., 1995).

Infatti, diversi autori hanno dimostrato che differenti LAB usati come starter mancano di qualsiasi tipo d'attività proteolitica (Nordal e Slinde, 1980; Lücke e Hechelmann, 1988).

Inoltre, secondo Law e Kolstad (1983), non ci sono prove dirette che tali microrganismi abbiano un ruolo fondamentale nella formazione di composti aromatici nei prodotti carni fermentati poiché non è certo se i loro enzimi siano coinvolti nella proteolisi della carne.

Anche le muffe possono contribuire al processo proteolitico poiché alcune specie come il *Penicillium* e l'*Aspergillus* presentano attività proteolitica: inoltre, in alcuni ceppi di *Penicillium*, sono state identificate diverse proteinasi.

Tale processo proteolitico è anche influenzato dall'attività delle proteasi endogene presenti nelle cellule sarcoplasmatiche della carne, come le catepsine B, H, D e L che mostrano grande stabilità nei processi di essiccazione a lungo termine, buona attività a valori di pH acido e sono in grado d'agire contro le proteine miofibrillari (Toldrà F., 2006).

Altre importanti endopeptidasi muscolari come le calpaine mostrano scarsa stabilità e il loro pH ottimale, vicino a 7, è lontano da quello dei salami (Toldrà F., 2006).

Nei salami fermentati l'andamento della proteolisi ed il ruolo specifico del contributo degli enzimi endogeni e microbici sono influenzati da variabili quali la formazione del prodotto (incroci iniziali e età dei suini), le condizioni di trasformazione dei salami e la scelta delle colture starter che presentano differenti attività enzimatiche, esercitando un'azione combinata con gli enzimi endogeni muscolari.

La percentuale del contributo di ogni gruppo di enzimi non è del tutto chiarita, ma secondo ricerche recenti (Molly *et al.*, 1997), sembra che la degradazione delle proteine, in particolare di miosina e actina, sia avviata dalla catepsina D, una proteasi acida del muscolo che è favorita dalla diminuzione del pH (valori di pH attorno a 4,5) e che è in grado di degradare entrambe le proteine (Toldrà *et al.*, 2001).

Poiché le aminopeptidasi muscolari svolgono un'attività ottimale a pH neutro o basico (Toldrà e Flores, 1998), le ultime fasi della proteolisi sarebbero dominate dalle peptidasi batteriche (Sanz e Toldrà, 1999; Flores *et al.*, 1998).

Infatti, numerosi studi negli ultimi dieci anni hanno concluso che le proteinasi indigene, in particolare la catepsina D, sono principalmente responsabili della proteolisi durante la fermentazione, mentre gli enzimi batterici (catepsina L) sono più importanti durante le ultime fasi di maturazione (Toldrà *et al.*, 1992).

Altri importanti fattori sono correlati col processo tecnologico. Per esempio, la temperatura e il tempo di maturazione determineranno una maggiore o minore azione degli enzimi e la quantità di sale aggiunto, che è un risaputo inibitore delle catepsine e di altre proteasi, regolerà anche l'azione enzimatica e di conseguenza la proteolisi ed il sapore (Toldrà F., 2006).

1.3.2 Attività lipolitica

La lipolisi, ossia la parziale degradazione della frazione lipidica, svolge un ruolo primario nella formazione dell'aroma dei salami.

Essa consiste nella scomposizione dei trigliceridi e dei fosfolipidi ad opera di enzimi di natura endogena (lipasi dei tessuti muscolari e adiposi significativi nelle prime fasi della fermentazione) o esogena (lipasi microbiche).

Le lipasi sono idrolasi che agiscono prevalentemente sui legami carbossilici dell'estere presenti negli acilgliceroli liberando acidi organici, mono e digliceridi, acidi grassi liberi e glicerolo.

Nel caso dei fosfolipidi, che costituiscono una frazione minore dei grassi totali, le fosfolipasi del muscolo sono le uniche lipasi responsabili della loro idrolisi (Toldrà *et al.*, 2001).

Gli acidi grassi, attraverso ulteriori reazioni ossidative, agiscono da precursori di altri componenti dell'aroma come esteri, aldeidi, chetoni, lattoni e alcoli altrettanto importanti nel caratterizzare il profilo sensoriale del prodotto finale.

Il grasso dei salami ha un elevato contenuto in acidi grassi che contribuiscono al conferimento del sapore: la specificità delle lipasi influenza lo sviluppo dell'aroma poiché gli acidi grassi a corta e media catena hanno il più alto impatto sull'aroma stesso. Esiste anche una correlazione positiva tra l'aroma, l'acidità del grasso e il contenuto di acidi grassi a corta catena: il grasso, quindi, è essenziale nello sviluppo di un aroma corretto durante la maturazione dei salami.

La scomposizione iniziale dei trigliceridi sarebbe il risultato di lipasi endogene come la lipasi acida lisosomiale, molto attiva a pH attorno a 5.0, e la lipasi neutra, che è naturalmente presente nel tessuto grasso (Toldrà *et al.*, 2001).

Le lipasi microbiche, invece, derivano prevalentemente dal genere *Staphylococcus* e *Micrococcus*, anche se non mancano lipasi prodotte da specie del genere *Lactobacillus* e dalle muffe: nello specifico queste ultime svolgono un ruolo importante sia all'esterno dei prodotti su cui sviluppano sia all'interno grazie alle loro ife contribuendo ad un maggiore odore tramite la loro grande attività lipolitica.

Dellarras C. (1982) trova che in prodotti carnei il genere *Staphylococcus* ha una maggiore attività lipolitica rispetto al genere *Micrococcus*. Nonostante ciò, per quanto

riguarda le *Micrococcaceae*, esiste una maggiore attività lipolitica extracellulare che intracellulare: ciò è molto importante poiché il carico di micrococchi diminuisce progressivamente dopo 15-20 giorni dalla maturazione (Selgas *et al.*, 1988; Palumbo *et al.*, 1976).

Alcuni batteri lattici sono caratterizzati da attività lipolitica anche se Nordal e Slinde (1980) non osservano significativi comportamenti lipolitici quando i LAB sono usati come colture starter nella produzione di salami.

Molti batteri lattici non possono idrolizzare i trigliceridi ma possono comunque agire sui mono e digliceridi, contribuendo così all'idrolisi dei grassi e alla formazione di acidi grassi liberi.

La conseguenza di tali attività è che i mono e digliceridi sono in grado di legare la frazione proteica idrosolubile con quella grassa liposolubile favorendo la consistenza, la stabilità e la compattezza del prodotto. Oltre a ciò, gli acidi grassi liberi presenti, alterando le membrane di microrganismi alterativi e patogeni, possono svolgere un'azione antimicrobica. Partecipa anche alla formazione di particolari molecole responsabili del caratteristico aroma e odore degli insaccati, come ad esempio alcuni esteri etilici, metilchetoni, 2-alcanoni, 2-metilbutanale e 3-metilbutanale.

Contemporaneamente, però, si può osservare anche un irrancidimento del prodotto poiché i fenomeni di lipolisi liberano vari acidi grassi che possono fungere da substrato per reazioni ossidative: l'irrancidimento ossidativo è, infatti, l'alterazione più grave e più frequente a carico dei grassi alimentari, quindi è presente anche nelle carni fermentate come i salami.

Le reazioni ossidative sono di natura chimica con sviluppo di radicali che, per la loro reattività, innescano una propagazione a catena. Nella fase di terminazione di tali reazioni, i radicali si stabilizzano formando diversi composti organici come aldeidi e chetoni volatili, responsabili dell'odore di rancido.

Vi sono diversi fattori che possono influenzare l'alterazione in modo negativo (temperatura alta, esposizione alla luce, presenza dell'enzima lipossidasi, presenza di perossidi, contatto con alcuni metalli e presenza di pro-ossidanti come l'emoglobina e la mioglobina) e in modo positivo (presenza di antiossidanti).

1.4 Ammine biogene

Le ammine biogene sono dei componenti frequentemente presenti negli organismi viventi dove sono responsabili di molte funzioni essenziali: esse, infatti, esplicano diversi ruoli metabolici negli organismi.

Sono basi organiche a basso peso molecolare, la cui struttura chimica può essere alifatica (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina), eterociclica (istamina e triptamina) o aromatica (tiramina, 2-feniletilamina) e sono il prodotto della decarbossilazione, da parte di enzimi di origine microbica, di aminoacidi (Silla Santos, 1996).

Possono essere prodotte da diversi microrganismi attraverso attività aminoacido-decarbossilasica e attraverso transaminazione e aminazione di aldeidi e chetoni (Askar e Treptow, 1996); esistono, inoltre, anche le ammine naturali (presenti naturalmente in molti prodotti alimentari) che, tuttavia, non destano preoccupazione in quanto generalmente prive di effetti tossicologici.

La produzione di ammine biogene in alcuni alimenti, perciò, richiede una popolazione microbica dotata di enzimi decarbossilasici, un substrato ricco di precursori (aminoacidi) e delle condizioni “ambientali”, nel sistema alimento, idonee per lo sviluppo di tale flora (ten Brink *et al.*, 1990).

Negli alimenti si possono trovare diverse ammine biogene, tra cui le più importanti sono: istamina (HI), putrescina (PU), cadaverina (CA), tiramina (TY), triptamina (TRY), 2-feniletilamina (PHE), spermina (SM) e spermidina (SD) (Shalaby, 1996).

A loro volta, istidina, tirosina, triptofano, lisina, fenilalanina e ornitina sono rispettivamente i precursori per la sintesi di HI, TY, TRY, CA, PHE e PU. SM e SD possono inoltre essere prodotti attraverso il metabolismo dell'arginina, assieme all'agmatina (Lonvaud-Funel, 2001).

Il loro contenuto può risultare elevato in prodotti fermentati derivanti da materie prime particolarmente ricche in sostanze proteiche, come i salami e le salsicce secche, e la loro presenza nei diversi alimenti ha portato gli studiosi ad ipotizzarne l'utilizzo come indicatori della qualità di alcune materie prime (Hernández-Jover *et al.*, 1997).

1.4.1 Effetti tossicologici delle ammine biogene

Le ammine biogene, se assunte in dosi elevate, hanno diverse implicazioni tossicologiche, tuttavia limitati quantitativi non sono dannosi per la salute poiché l'organismo umano riesce ad eliminarli attraverso appositi sistemi. Un'eccessiva assunzione può generare problemi anche molto gravi che possono riguardare il sistema gastrico, intestinale e nervoso, oltre che la pressione sanguigna, in quanto le ammine biogene sono sostanze vasoattive.

L'assunzione di grandi quantitativi di tiramina e istamina (ammine ottenute dalla decarbossilazione, rispettivamente, di tirosina e istidina) possono provocare problemi come ipertensione, ipotensione, mal di testa, nausea e vomito (Edwards e Sandine, 1981), mentre putrescina e cadaverina (ammine ottenute per decarbossilazione da ornitina e lisina, rispettivamente) una volta assunte possono reagire con i nitriti per formare nitrosamine cancerogene (Askar e Treptow, 1996).

La 2-feniletilamina e la tiramina portano ad un incremento della pressione sanguigna, invece l'istamina può ridurla. Quest'ultima inoltre può svolgere importanti funzioni a livello del sistema nervoso ed è un mediatore di risposte allergiche: è per questo motivo che molte volte vengono diagnosticate come allergie alimentari le intossicazioni da istamina (Halász *et al.*, 1994 ; Stratton *et al.*, 1991).

In realtà non esistono dosi tossicologiche per l'uomo perché le ammine biogene sono di difficile quantificazione: esse, infatti, sono molto variabili non solo per soggetto ma anche per condizioni contingenti come l'assunzione contemporanea di diverse ammine (Bjedanes *et al.*, 1978), di farmaci antidepressivi (MAO, ovvero inibitori dell'attività ossidasica), di poliamine (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina) o di alcool (Silla Santos, 1996; Lehane e Olley, 2000).

L'alcool in particolare riduce la soglia tossicologica delle ammine in quanto interagisce con i meccanismi di detossificazione dell'organismo umano, instaurando una condizione di concorrenza per la quale l'enzima aminossidasi (MAO) opera con difficoltà e rilascia nel circolo sanguigno le ammine biogene senza trasformarle in prodotti innocui per l'organismo umano.

In Tabella 1.3 sono raccolti gli effetti farmacologici delle diverse ammine.

Ammina	Effetti farmacologici
Istamina	Libera adrenalina e noradrenalina Stimola la muscolatura liscia dell'utero, intestino tratto respiratorio Stimola i neuroni motori e sensoriali Controlla la secrezione gastrica
Tiramina	Vasocostrittore Aumenta il battito cardiaco Causa lacrimazione e salivazione Aumento della glicemia Causa emicrania
Putrescina Cadaverina	Ipotensione Bradycardia Potenziano la tossicità delle altre ammine
β -feniletilamina	Rilascia noradrenalina Aumenta la pressione sanguigna Causa emicrania
Triptamina	Aumenta la pressione sanguigna

Tabella 1.3: Effetti farmacologici delle ammine biogene.

1.4.2 Legislazione

Delle diverse ammine solamente per l'istamina esiste una dose disciplinata per legge, che corrisponde a 100 mg di ammina per kg di alimento, assunti con 2 mg/l di etanolo.

Infatti, il Decreto Legislativo n. 531 del 30-12-1992, attuativo della Direttiva CEE 91/493, prevede che il valore medio della concentrazione di istamina rilevato in nove campioni, prelevati da un lotto, non superi 100 mg kg⁻¹; solo due unità campionarie possono avere un tenore compreso fra 100 e 200 mg kg⁻¹. Infine nessun campione deve avere un tenore in ammine superiore a 200 mg kg⁻¹. Tali limiti però si applicano solo ai prodotti ittici appartenenti alle famiglie degli Sgombridi e dei Clupeidi non trattati con maturazione

enzimatica in salamoia. In tal caso i tenori di istamina non devono superare il doppio dei valori precedentemente illustrati.

Livelli di istamina superiori a 500-1000 mg kg⁻¹ di prodotto sono considerati potenzialmente tossici per la salute umana; la soglia di tossicità dipende dalla presenza di farmaci inibitori delle MAO, di alcool e di altre ammine (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina) (Silla Santos, 1996).

Gli effetti dell'istamina in rapporto alla quantità assunta durante un pasto, può indurre reazioni deboli (8-40 mg), moderate (70-1000 mg) o importanti (1500-4000 mg) (Ienistea, 1973).

Nonostante l'attività tossica riconosciuta di alcune ammine e il loro elevato contenuto in alcuni prodotti fermentati (soprattutto formaggi e salumi), non sono ancora note le concentrazioni e i livelli di pericolosità per l'uomo, ma in letteratura possono trovarsi dei dati indicativi. Per esempio, le indicazioni per tiramina e 2-feniletilamina, che però non hanno valore legale, dicono che un'assunzione di 100-800 mg/kg di alimento di tiramina e 30 mg/kg di alimento di 2-feniletilamina risultano tossiche per l'uomo (Taylor, 1985; Silla Santos, 1996).

Il consumo di 6 mg di tiramina può produrre deboli reazioni, mentre il consumo di 10-25 mg di questa ammina da parte di pazienti che facciano uso di sostanze MAO può essere causa di importanti problematiche (McCabe, 1986). L'ingestione di 100-125 mg di tiramina può indurre emicrania (Crock, 1981).

Valori soglia di 100-800 mg kg⁻¹ per la tiramina e 30 mg kg⁻¹ per la feniletilamina sono stati riportati come dosi tossiche negli alimenti (ten Brink *et al.*, 1990).

1.4.3 Meccanismo di produzione delle ammine biogene

Le ammine biogene sono il prodotto della decarbossilazione svolta su aminoacidi liberi da parte dell'enzima decarbossilasi specifico, di cui sono dotati alcuni ceppi microbici. Tale processo metabolico viene svolto nel citoplasma della cellula.

La capacità di decarbossilare gli aminoacidi è generalmente considerata una caratteristica ceppo dipendente piuttosto che una proprietà di specie (Bover-Cid e Holzapfel, 1999).

La decarbossilazione coinvolge il gruppo α -carbossilico che viene sottratto alla struttura dell'aminoacido ottenendo così l'ammina corrispondente.

In Figura 1.2 vengono riassunte le principali ammine biogene e i loro precursori.

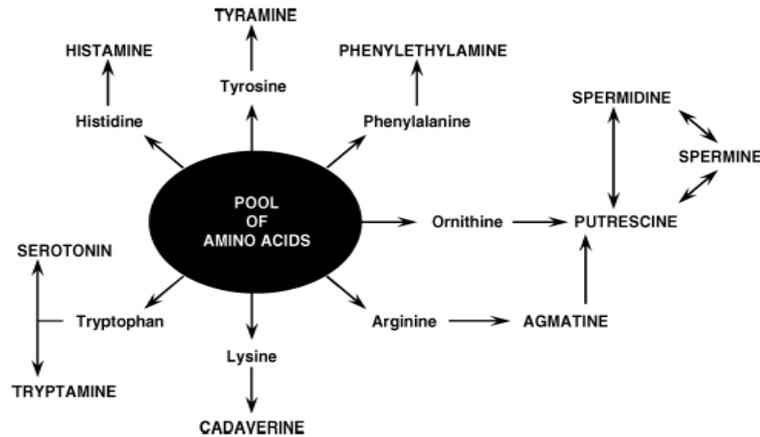


Figura 1.2: Aminoacidi precursori e ammine biogene (Ancin-Azpilicuetta C. *et al.*, 2008).

Nei microrganismi la loro attività proteolitica gioca un ruolo fondamentale nel rilascio di aminoacidi liberi dal substrato proteico.

Sono stati individuati due meccanismi attraverso i quali è possibile che avvenga il processo di decarbossilazione degli aminoacidi e la differenza risiede nella necessità o meno che vi sia il piridossalfosfato come cofattore perché l'enzima operi la decarbossilazione:

- (PLP)-dipendente Piridossalfosfato-dipendente: la molecola catalizza la decarbossilazione reagendo con gli aminoacidi e formando così una base di Schiff. Questa fungerà da substrato vero e proprio della decarbossilazione, che porterà alla produzione dell'ammina, di una molecola di acqua e del piridossalfosfato. E' un sistema tipicamente individuabile in diverse specie di batteri Gram-negativi (Landete *et al.*, 2007);

- (PLP)-indipendente Piridossalfosfato-indipendente: la decarbossilazione non coinvolge il piridossalfosfato, ma un residuo dell'acido piruvico e sono tipici dei batteri Gram-positivi, ed in particolare dei batteri lattici LAB coinvolti nella fermentazione degli alimenti.

1.4.4 Le ammine biogene nei salumi fermentati

In tutti gli alimenti che contengono proteine o aminoacidi liberi e che permettono lo sviluppo e l'attività biochimica dei microrganismi è possibile rilevare quantitativi variabili di ammine biogene. La quantità totale delle diverse ammine che si possono formare dipende dalla natura dell'alimento e dai microrganismi presenti (ten Brink *et al.*, 1990); non meno influenzanti sono la tecnologia applicata e lo stato di conservazione del prodotto.

La presenza di microrganismi decarbossilasi-positivi, la disponibilità di aminoacidi liberi e le condizioni dell'ambiente che permettano lo sviluppo microbico, la sintesi e l'attività decarbossilasica rappresentano le condizioni necessarie per la formazione di ammine biogene (ten Brink *et al.*, 1990; Shalaby, 1996)

L'elevata carica microbica che contraddistingue i prodotti fermentati, conduce a considerare in essi l'accumulo di ammine biogene, specialmente TY, 2-PHE, TRY, CA, PU ed HI.

In tali prodotti è stato, però, dimostrato che il contenuto di questi composti è soggetto a fluttuazioni dovute alla composizione quali-quantitativa della microflora (che si evolve costantemente durante la fermentazione e la stagionatura), alle variabili chimico-fisiche del prodotto, alle procedure igieniche adottate ma soprattutto alla disponibilità di precursori.

Molti dei microrganismi presenti negli alimenti possiedono enzimi aminoacido decarbossilasi. Sono state riscontrate specie del genere *Bacillus* (Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994a), *Pseudomonas* (Tiecco *et al.*, 1986), *Photobacterium* (Morii *et al.*, 1988; Jørgensen *et al.*, 2000), e specie appartenenti al genere della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, così come *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (Edwards *et al.*, 1987; Roig-Sagués *et al.*, 1996; Marino *et al.*, 2000) e *Micrococcaceae*, come *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Kocuria* (Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994b; Martuscelli *et al.*, 2000). Oltre a batteri lattici (LAB) appartenenti al genere *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* sono in grado di decarbossilare gli aminoacidi (Maijala *et al.*, 1993; de Llano *et al.*, 1998; Bover-Cid e Holzapfel, 1999).

Nei salumi fermentati le ammine biogene possono derivare da un cattivo stato igienico della materia prima (la carne fresca) ma anche dal metabolismo di ceppi microbici selvaggi ammino-produttori durante la stagionatura: l'alta concentrazione di proteine in

questi prodotti e l'attività proteolitica durante la stagionatura, appunto, fungono da precursori dell'attività decarbossilasica della microflora endogena.

Una grande variabilità nel contenuto di ammine biogene caratterizza i salumi fermentati: infatti, salami con profilo microbiologico comparabile potrebbero differire nel loro contenuto in ammine biogene, indicando che la produzione di questi componenti dipendono da un'ampia e complicata interazione di fattori.

Un esempio di tale presenza nelle matrici carnee fermentate è rappresentato dagli studi relativi i salami spagnoli Chorizo, Fuet, Sobrasada e Salsichon (Hernandez-Jover *et al.*, 1996 a, b, 1997; Roig-Sagués *et al.*, 1999; Bover-Cid *et al.*, 2000), in cui la tiramina è stata rilevata come predominante in termini di quantità rispetto le altre ammine (in alcuni salami supera i 600 mg/kg, con un valore medio di 200 mg/kg), ma in alcuni campioni la putrescina è stata rilevata in quantità superiori a 450 mg/kg. La cadaverina, malgrado la variabilità correlata alla sua presenza, è stata rilevata in quantità rilevanti nel Chorizo e nel Salsichon (oltre 600 mg/kg ma con valori medi inferiori a 20 mg/kg). La 2-feniletilamina e la triptamina sono state rilevate in concentrazioni superiori a 50 mg/kg. L'istamina non è stata rilevata in tutti i campioni, ma la sua presenza può raggiungere valori preoccupanti per la salute (300 mg/kg) in particolare nel Chorizo e nel Fuet.

Bover-Cid *et al.*, (2000) osservò notevoli differenze nel contenuto in ammine biogene nei salami dipendenti dalla qualità igienica della carne utilizzata. Infatti i salami prodotti da carne congelata si sono mostrati caratterizzati solo dalla presenza di tiramina, la quale raggiunge un livello massimo pari a 100mg/kg, mentre in caso intervengano abusi termici sulla carne cruda si rileva uno sviluppo massiccio (oltre 3 cicli logaritmici) di enterococchi e *Enterobacteriaceae* con un conseguente e veloce accumulo di tiramina (circa 250mg/kg), cadaverina (340mg/kg) e putrescina (80mg/kg).

Numerosi lavori in bibliografia confermano il ruolo chiave della qualità delle materie prime; tuttavia, le altre variabili (come il pH, a_w , potenziale di ossido-riduzione, NaCl, etc.) possono avere un'importante effetto sulla produzione di ammine biogene nei salami.

Eerola *et al.* (1998) trova che la tiramina e la putrescina sono le ammine biogene più abbondanti ritrovate nelle salsicce secche fermentate prodotte in Finlandia. Alte concentrazioni di cadaverina furono riscontrate nelle salsicce Danish e Pepperoni, mentre la spermina e la spermidina furono rilevate in bassi livelli in tutti i campioni analizzati, come già osservato nei salami spagnoli (Hernandez *et al.*, 1997). L'istamina fu prevalentemente

riscontrata nelle salsicce domestiche e russe nelle quali, tuttavia, la sua concentrazione era generalmente inferiore a 100 mg/kg. Senorez *et al.* (2000) trova alte concentrazioni di ammine biogene presenti nelle salsicce turche Sucuks dove fu riscontrata la triptamina nel 75% dei campioni mentre la tiramina e l'istamina erano presenti in alcuni campioni in quantità notevole (più di 1100 e 350 mg/kg, rispettivamente). Ayhan *et al.* (1999), invece, in un altro studio relativo alle salsicce turche Soudjoucks, non rileva mai l'istamina mentre la più importante ammina fu la putrescina (più di 400 mg/kg), seguita dalla tiramina (250mg/kg).

Putrescina, cadaverina, tiramina e istamina furono riscontrate in salami francesi, sia in prodotti artigianali che industriali. Fu riscontrata l'istamina a concentrazioni più alte di 100 mg/kg solo nei prodotti industriali, mentre gli alti livelli di putrescina e tiramina (400 e 200 mg/kg, rispettivamente) furono rilevate nei salami con la più alta concentrazione di *Pseudomonas*, cocchi Gram-positivi e lieviti (Montel *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda i salumi italiani, Parente *et al.* (2001) ha esaminato la salsiccia e la soppressata e ha rilevato che la tiramina rappresenta la più importante ammina biogena con livelli più alti di 500 mg/kg, seguita da putrescina e cadaverina, mentre valori di istamina più alti di 50 mg/kg sono riscontrati solo in alcuni campioni di soppressata; la 2-fenilettilamina fu rilevata in basse quantità.

Sempre gli autori italiani trovarono che nei prodotti industriali l'accumulo di ammine biogene non era minore che nei prodotti artigianali, come già osservato da Montel *et al.* (1999). Infatti, la presenza di colture di starter commerciali non sempre inibisce la produzione di ammine biogene, come riportato da Bauer *et al.* (1994), in contrasto con i risultati di altri autori (Eitenmiller *et al.*, 1978; Maijala *et al.*, 1995).

1.4.5 Microrganismi produttori

Anche se la produzione di ammine biogene dipende da numerosi fattori, uno dei più importanti è attribuito all'attività dei microrganismi starter e non starter presenti nei salami poiché possiedono una differente attitudine a decarbossilare gli aminoacidi.

Infatti, è stato osservato che all'interno della medesima specie la presenza, l'attività e la specificità dell'enzima aminodecarbossilasi sono risultate specifiche del ceppo e non del genere (Bover-Cid e Holzapfel, 1999).

La produzione di ammine biogene nella carne è stata attribuita all'azione di diversi microrganismi (Silla Santos, 1996):

- **Enterobatteriaceae:** le *Enterobacteriaceae* isolate dai salami sono generalmente considerate microrganismi con un'alta attività decarbossilasica. In particolare, la presenza di cadaverina e putrescina è di solito associata all'attività di batteri Gram-negativi (Suzzi e Gardini 2003; Bover-Cid *et al.*, 2009).

- **Batteri lattici:** i batteri lattici, agenti delle fermentazioni degli alimenti, sono generalmente considerati sicuri dal punto di vista igienico-sanitario, quindi non sono tossigeni o patogeni. Molti autori però (Maijala, 1993; Silla Santos, 1998; Montel *et al.*, 1999; Bover-Cid *et al.*, 2001b) non hanno osservato attività decarbossilasica nei lattobacilli isolati dai salami, tuttavia alcune specie di batteri lattici possono produrre ammine biogene come alcuni ceppi di *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* che sono in grado di produrre tiramina. E' stato dimostrato inoltre che, nonostante la capacità di decarbossilare l'istidina non sia molto diffusa tra i batteri lattici, ci sono comunque molti ceppi in grado di produrla (Landete *et al.*, 2008).

- **Micrococcaceae:** poche informazioni sono disponibili riguardo alla produzione di ammine biogene da parte delle *Micrococcaceae*. L'attività decarbossilasica sull'istidina fu osservata in alcune specie appartenenti al genere *Micrococcus* e *Staphilococcus* (Landeta *et al.*, 2007). Fu anche osservata la produzione di istamina nel 76% dei ceppi di *Staphilococcus xylosus* isolate da salami spagnoli (Silla Santos, 1998).

- **Altri microrganismi:** è ben nota la produzione di ammine biogene da parte di altri batteri Gram-negativi, soprattutto nei prodotti a base di pesce, come la *Pseudomonas* che è una grande produttrice di istamina. Ciò nonostante, le specifiche condizioni ambientali che caratterizzano la produzione e lo stoccaggio di molti prodotti fermentati, come i salami, risultano essere proibitive per il loro sviluppo e la loro attività enzimatica, a meno che non vi siano particolari eventi (abusi termici della carne cruda) o l'utilizzo di sbagliate procedure di produzione come scorrette pratiche igieniche.

Vi sono poche informazioni in letteratura riguardanti il possibile contributo dei lieviti alla produzione di ammine biogene negli alimenti fermentati.

1.4.6 Fattori che regolano la produzione di ammine biogene

I fattori che influenzano la produzione di ammine biogene sono diversi: alcuni influenzano le cinetiche di crescita dei microrganismi altri, invece, mostrano effetti diretti sulla produzione delle ammine stesse.

Tra questi possiamo ricordare:

- **disponibilità di precursori:** gli aminoacidi precursori delle ammine sono il pre-requisito fondamentale per la produzione di ammine biogene (Joosten, 1987). Essi possono essere presenti in forma libera nel prodotto alimentare, oppure possono essere liberati nella matrice a seguito di attività proteolitiche a carico di piccoli peptidi e proteine svolte da enzimi endogeni o microbici.

- **presenza nella cellula di permeasi:** sono le proteine di membrana che permettono l'assorbimento degli aminoacidi dalla matrice alimentare, precursori delle ammine biogene.

- **pH:** è uno dei principali fattori influenti sulla produzione delle ammine biogene grazie all'effetto che esso svolge sulle diverse attività metaboliche e sullo sviluppo cellulare.

È noto che ogni enzima ha un proprio optimum di pH, in particolare tutti gli enzimi decarbossilasici batterici mostrano un ottimo di pH acido compreso nell'intervallo 5,0-6,5 (Gale, 1946).

La produzione di ammine è stata correlata da diversi autori alla necessità dei microrganismi di contrastare l'abbassamento di pH nel mezzo in cui sviluppano (Chander *et al.*, 1988).

Altri autori hanno comunque riscontrato una riduzione nella aminobiogenesi a bassi pH, come conseguenza di una ridotta crescita in tali condizioni dei microrganismi decarbossilasi-positivi (Maijala *et al.*, 1993). E' noto, infatti, che una rapida ed acuta diminuzione del pH nei salami riduce la crescita dei microrganismi amino-positivi, in particolare le *Enterobacteriaceae* (Maijala *et al.*, 1993; Bover-Cid *et al.*, 2001a).

- **temperatura:** svolge un doppio effetto, un'azione diretta sullo sviluppo cellulare dei ceppi (anche amino-positivi) e una indiretta sull'attività degli enzimi proteolitici e decarbossilasici (Silla Santos, 1996). Questi enzimi presentano un range di

temperatura ottimale tra i 20 e i 35°C mentre temperature minori riducono notevolmente la loro attività (Tiecco *et al.*, 1986; Halász *et al.*, 1994).

La temperatura, però, non presenta nessun effetto sulle ammine poiché esse sono termostabili, fatta eccezione per la spermina. Inoltre, anche gli enzimi decarbossilasici possono presentare resistenze ai trattamenti termici. Dunque negli alimenti trattati termicamente non sarà assicurata la distruzione di ammine biogene.

Ciò nonostante, la temperatura può influenzare molti aspetti correlati alla produzione delle ammine biogene e molto spesso può indurre un effetto antagonista alla loro produzione. Essa, infatti, può influenzare le cinetiche di crescita dei microrganismi, la resa cellulare e l'attività enzimatica. Inoltre la temperatura influenza notevolmente le relazioni tra le attività dei diversi microrganismi presenti nei salami, svolgendo un ruolo di potenziale controllo dei fenomeni di decarbossilazione: un esempio di tale influenza è data dalle temperature di fermentazione (24°C) che favoriscono i LAB starter che sviluppano più velocemente superando e sostituendo i microrganismi non starter produttori di ammine (Maijala *et al.*, 1995). Temperature superiori, invece, favoriscono le reazioni proteolitiche e decarbossilasiche, con conseguente aumento della concentrazione di ammine biogene in fase di conservazione e stoccaggio. Una conservazione svolta a 15°C permette di mantenere gli enzimi decarbossilasici in stato di inattività, oltre al fatto che in tale periodo la maggior parte dei microrganismi ha raggiunto la fase stazionaria e si avviano a quella di morte (Bover-Cid *et al.*, 2000). Temperature inferiori (come lo stoccaggio prolungato della carne a 4°C), al contrario, possono favorire l'attività delle *Pseudomonadaceae* psicrotrote produttrici di putrescina (Paulsen e Bauer, 1997). Tuttavia, sono stati individuati bassi contenuti di ammine biogene in prodotti fermentati e stoccati a 4°C rispetto a quelli stoccati a 15°C (Bover-Cid *et al.*, 2000).

- **concentrazione di NaCl nella matrice:** la variazione della quantità d'acqua e il rapporto sale/acqua durante la fermentazione e lo stoccaggio dei salami ha un'importante ruolo nella moltiplicazione dei microrganismi.

Elevate concentrazioni di NaCl (5-8%) condizionano la produzione di ammine biogene poiché riducono lo sviluppo cellulare batterico (Ababouch *et al.*, 1991).

Alcuni esperimenti condotti su un ceppo di *Lb. bulgaricus* hanno dimostrato che aumentando la concentrazione di NaCl da 0% a 6% diminuiva proporzionalmente la concentrazione di ammine prodotte dal microrganismo (Chander *et al.*, 1989); inoltre,

Henry Chin e Koehler (1986) dimostrarono che la variazione della concentrazione di NaCl dal 3.5% al 5.5% poteva inibire la produzione di istamina.

L'effetto che consegue all'aggiunta di sale è legato sia alla sua capacità di ridurre l'attività dell'acqua nell'alimento sia alla sua capacità indiretta di destabilizzare la membrana cellulare dell'enzima decarbossilasi rendendo difficoltoso il mantenimento una volta rilasciato dalla cellula dopo autolisi (Sumner *et al.*, 1990).

- **fonti di carbonio:** la presenza di fonti carbonio utili nella matrice alimentare, come il glucosio, rappresenta un elemento molto influente sulla produzione di ammine biogene.

L'aggiunta di zucchero nei salami, infatti, influenza le dinamiche della popolazione batterica e, inevitabilmente, la produzione di ammine biogene perché può migliorare la crescita delle colture starter. Il glucosio favorisce la sintesi di istamina, mentre acidi organici e la glicina la inibiscono (Maijala *et al.*, 1993).

Lo sviluppo di enterococchi è anticipato se lo zucchero (glucosio e lattosio) non è stato aggiunto e le colonie di *Enterobacteriaceae* sono significativamente più alte (10^5 contro 10^3 UFC/g).

L'assenza di zucchero durante la fase di stoccaggio può influenzare molto sulla possibilità d'incremento della formazione di ammine biogene.

- **diametro del budello:** un differente diametro dei salami corrisponde ad un differente grado di anaerobiosi, potenziale di ossidoriduzione, concentrazione di NaCl e valore della a_w : tutte queste variabili, infatti, influenzano il contenuto di ammine biogene.

Bover-Cid *et al.*, (1999) trovò una relazione tra il contenuto di ammine biogene e le dimensioni dei salami fermentati.

Il diametro dei salami influisce molto sull'ecosistema dove i microrganismi crescono; per esempio, in salami con diametro maggiore la concentrazione di NaCl è solitamente più bassa e l' a_w più alta. Un maggior diametro potrebbe essere una ragione per l'alta produzione di alcune ammine, come la tiramina e la putrescina (Parente *et al.*, 2001). Generalmente, i livelli di ammine biogene sono più alti in salami con diametro più grande rispetto ai salami più sottili e nella parte centrale dei salami rispetto al bordo.

- **additivi:** il solfito di sodio, se utilizzato in concentrazioni ridotte (500-1000 mg/kg) non riduce l'accumulo di tiramina ma inibisce quello di cadaverina (Bover-Cid *et al.*, 2001a). L'aggiunta di nitrito di sodio (150 mg/kg), può ridurre significativamente

l'accumulo di putrescina e cadaverina, ma può, in determinate condizioni, triplicare quello di istamina (Cantoni *et al.*, 1994).

- **condizioni di conservazione del prodotto:** la conservazione è un punto critico per la formazione di ammine biogene, soprattutto per quanto riguarda la temperatura e la durata del periodo. Infatti, durante tale periodo il prodotto subisce numerose modifiche legate anche ad un intenso processo di proteolisi che può fornire aminoacidi per la produzione di ammine biogene. È bene, quindi, che in tale periodo tutti i parametri ambientali siano tenuti sotto controllo così da limitare alcuni fenomeni non voluti e poco positivi.

- **effetti interattivi:** la produzione di ammine biogene è un processo estremamente complesso, dipendente da numerose variabili legate ai microrganismi, come le attività proteolitica e decarbossilasica e la cinetica di crescita, che interagiscono tra di loro. Inoltre, non esiste una regola univoca per collegare queste variabili con i differenti meccanismi metabolici necessari per la formazione di ammine biogene.

Capitolo 2: Obiettivi

I salami fermentati sono il risultato di una complessa attività microbiologica, che consiste nella fermentazione lattica (che avviene nei primi giorni dopo l'insacco) e in numerose trasformazioni biochimiche, caratterizzanti il periodo di maturazione (più o meno prolungato). Tra i principali agenti di queste attività ci sono i micrococchi, gli stafilococchi e i batteri lattici (LAB). Inoltre, in molti salami fermentati prodotti nell'area Mediterranea, rivestono un ruolo cruciale le muffe che crescono sul budello durante la maturazione (Talon *et al.*, 2007; Hammes *et al.*, 2003; Demeyere, 2004; Zambonelli *et al.*, 1992).

Tra i fattori più importanti, che determinano le caratteristiche e la qualità dei salami fermentati, ci sono la scelta delle colture starter e delle condizioni ambientali, che caratterizzano la fermentazione e la maturazione (Toldrà, 2006).

Negli ultimi decenni la maggior parte dei salami fermentati prodotti in Europa sono stati preparati utilizzando colture starter. Queste colture appartengono soprattutto ai LAB (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*) e agli stafilococchi coagulasi negativi (CNS, come *Staphylococcus xilosus* e *Staphylococcus carnosus*). Inoltre, quando necessario, muffe bianche selezionate (solitamente appartenenti alle specie *Penicillium nalgiovense*) vengono inoculate sulla superficie dei salami (Hugas & Monfort, 1997; Toldrà, 2006; Talon & Leroy, 2011).

La crescita di queste specie è fortemente influenzata dalla composizione dell'impasto della carne (tipo di carne, sale, aggiunta di zuccheri, nitrati/nitriti, spezie, ecc.) e dalle condizioni ambientali (temperatura e umidità relativa) applicate dopo l'insacco per consentire l'asciugamento e la maturazione dei salami. Nei salami mediterranei le temperature sono relativamente basse sin dall'inizio (meno di 25°C) e diminuiscono durante la maturazione (fino a 15-17°C o meno). Anche l'umidità relativa (RH) deve essere strettamente controllata per permettere una corretta cinetica della perdita d'acqua dei salami; i valori di umidità relativa (RH) diminuiscono durante la maturazione seguendo l'andamento della temperatura (Feiner, 2006). La selezione e le interazioni tra materie prime, ceppi microbici, tecnologia e ingredienti sono determinanti per le proprietà sensoriali, il profilo volatile, la sicurezza e la shelf-life dei prodotti (Talon & Leroy, 2011; Toldrà, 2006; Hammes *et al.*, 2003). L'interazione tra le colture starter e le condizioni

ambientali guidano i metabolismi cellulari verso diversi risultati, positivi o negativi, per la qualità dei salami. In primo luogo queste attività determinano la formazione delle caratteristiche organolettiche dei prodotti, ma possono anche influenzare la sicurezza e il profilo igienico dei salami, contrastando la crescita patogena e l'accumulo di composti tossici (Toldrà, 2006; Hammes *et al.*, 2003). Tra questi ultimi, le ammine biogene hanno ricevuto particolare attenzione negli ultimi anni. Alcune di queste ammine bioattive, infatti, possono avere effetti acuti anche gravi in particolare sui consumatori a rischio/sensibili (Silla-Santos, 1996). La presenza delle ammine biogene più tossiche (istamina, tiramina, 2-feniletilamina) è stata rilevata a diversi gradi nella carne fermentata (Ansorena *et al.*, 2002). Tuttavia è difficile ipotizzare la completa assenza di ammine biogene nella carne fermentata perciò è di fondamentale importanza ridurre il loro accumulo al livello più basso possibile (Suzzi & Gardini, 2003).

Le ammine biogene sono il risultato della degradazione di aminoacidi, così come molti altri composti che sono importanti per il sapore dei salami (Fernández & Zúñiga, 2006; Olesen & Stahnke, 2004). Insieme agli aminoacidi, il metabolismo degli acidi grassi liberi, liberati dall'azione della lipasi, è fondamentale per la formazione di molecole con un alto impatto sensoriale. In tal modo, la combinazione dell'attività degli enzimi microbici ed endogeni e delle reazioni chimiche (ad esempio autossidazione lipidica) sono responsabili della formazione dell'aroma nei salami fermentati (Ordóñez *et al.*, 1999).

Alla base di questo elaborato finale di tesi c'è un caso di studio che ha avuto lo scopo di valutare l'effetto dell'impiego di diverse colture starter e di diverse condizioni ambientali applicate durante l'asciugamento sulle caratteristiche qualitative, sensoriali e sanitarie di due diversi tipi di salami fermentati. I salami oggetto di studio sono stati prodotti industrialmente ed erano di tipo Felino (Coloretti, Chiavari, Armaforte, Carri, & Castagnetti, 2008) e di tipo Milano (Demeyer, 2004). Questi due tipi di prodotti differiscono oltre che per dimensioni e peso, anche per il rapporto tra carne grassa e carne magra, il livello di macinatura e per alcuni ingredienti.

Per ogni tipologia di salame, due colture starter sono state usate e sono state effettuati due diversi processi di asciugamento per quanto riguarda la temperatura e la programmata di umidità relativa delle celle. La fase di asciugamento è una fase essenziale per la qualità dei salami e corrisponde ai primi giorni del processo di maturazione. Durante questa fase, infatti, inizia la fermentazione della carne e avvengono eventi fondamentali, che influenzano

tutti i successivi aspetti della maturazione. In particolare, in questa prova l'effetto del processo d'asciugamento, solitamente applicato dal produttore, è stato confrontato con un processo modificato, caratterizzato dalla presenza di periodi nei quali i controller delle celle d'asciugamento sono stati spenti e, di conseguenza, la temperatura e soprattutto l'RH variavano spontaneamente.

Alla fine della maturazione (41 giorni per il tipo Felino e 76 giorni per il tipo Milano) i salami sono stati valutati da un gruppo panel esperto e i risultati sono stati confrontati con quelli delle analisi SPME-GC-MS dei composti volatili che caratterizzano ciascun salame. Inoltre, i salami sono stati campionati per determinare il numero dei più importanti gruppi microbici ed è stato analizzato il contenuto di ammine biogene accumulate a fine maturazione.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Microrganismi impiegati

Alcuni ceppi appartenenti alle famiglie delle Staphylococcaceae e dei *Lactobacillus* sono stati utilizzati come starter commerciali in polvere per la produzione di salami.

In modo particolare sono stati impiegati i ceppi di *Staphylococcus carnosus* e di *Staphylococcus xilosus* per la produzione del salame tipo Felino, mentre sono stati impiegati i ceppi di *Staphylococcus carnosus*, di *Staphylococcus xilosus*, di *Lactobacillus sakèi* e di *Lactobacillus curvatus* per la produzione del salame tipo Milano. L'iniziale concentrazione di cellule vitali per ciascuna coltura starter disidratata era di circa 11 log UFC/g.

3.2 Produzione dei salami

I salami sono stati prodotti in uno stabilimento locale (ALCISA S.p.A., Zola Predosa, Bologna). Sono stati presi in considerazione due diversi salami fermentati tipicamente prodotti nel Nord Italia: il tipo Felino e il tipo Milano.

3.2.1 Tipo Felino

I salami tipo Felino sono stati prodotti usando carne magra di maiale (73% p/p), grasso di maiale (27% p/p), NaCl (2.3% p/p), ascorbato di sodio (0.05% p/p), destrosio (0.30% p/p), KNO₃ (0.015% p/p), NaNO₂ (0.010% p/p) e spezie (pepe nero e aglio).

Dopo la macinatura (7 mm) e l'impastatura, l'impasto è stato diviso in due lotti: il lotto A è stato inoculato con 0,025% di starter commerciali in polvere, contenenti un ceppo di *S. carnosus* e un ceppo di *S. xylosus*, mentre al lotto B è stata aggiunta una miscela di 5 diversi ceppi di *S. xylosus* alla concentrazione di 0,025%.

L'impasto di carne è stato immediatamente insaccato in budelli naturali per ottenere salami con un peso iniziale di circa 1400-1500 g, una lunghezza di circa 60 cm e un diametro di 50-60 mm. I salami sono stati tenuti per 24 ore a 6°C prima di entrare nelle celle di fermentazione.

3.2.2 Tipo Milano

I salami tipo Milano sono stati preparati con spalla di maiale (72% p/p) e pancetta (28% p/p), NaCl (2.6% p/p), ascorbato di sodio (0.05% p/p), destrosio (0.50% p/p), KNO₃ (0.015% p/p), NaNO₂ (0.010% p/p), vino (1% v/p) e spezie (pepe bianco in polvere e pepe nero mezza grana, 0.12% p/p).

Dopo la macinatura (3,5 mm) e l'impastatura, l'impasto è stato diviso in due lotti: al lotto C è stato aggiunto lo 0,025% di coltura starter commerciale, contenente gli stessi ceppi di *S. carnosus* e *S. xylosus* usati nel lotto A, ed il ceppo *L. sakèi*, mentre il lotto D è stato inoculato con 0,025% di coltura starter commerciale, contenente *L. curvatus*, *L. sakèi* e la stessa miscela di 5 ceppi di *S. xylosus* usati nel lotto B.

Dopo la macinatura e l'impastatura degli ingredienti, l'impasto di carne è stato tenuto per 24 ore a 4°C, prima di essere insaccato in budelli sintetici. I salami avevano una lunghezza di 14 cm, un diametro di 50-60 mm e un peso iniziale di 360 g. Successivamente, i salami sono stati trasferiti nella cella d'asciugatura.

Prima della fermentazione, entrambi i tipi di salame sono stati nebulizzati con una sospensione di spore per inocularli con i ceppi selezionati di *Penicillium nalgiovense*.

Per ogni lotto e per ogni tipo di salame sono state seguite due diverse condizioni d'asciugamento (tradizionale e modificato), come illustrato nella Figura 3.1.

Il termine “switch off” indica che la temperatura e l'umidità relativa (RH) nelle celle d'asciugamento variano spontaneamente, senza nessun controllo. In questo periodo la temperatura segna piccoli aumenti, mentre l'RH tende rapidamente al 100%. Dopo l'applicazione dei diversi programmi d'asciugamento, i salami sono stati tenuti nella cella di maturazione a 13-15°C e a 80-86% RH fino a 41 giorni per il salame tipo Felino e fino a 76 giorni per il salame tipo Milano.

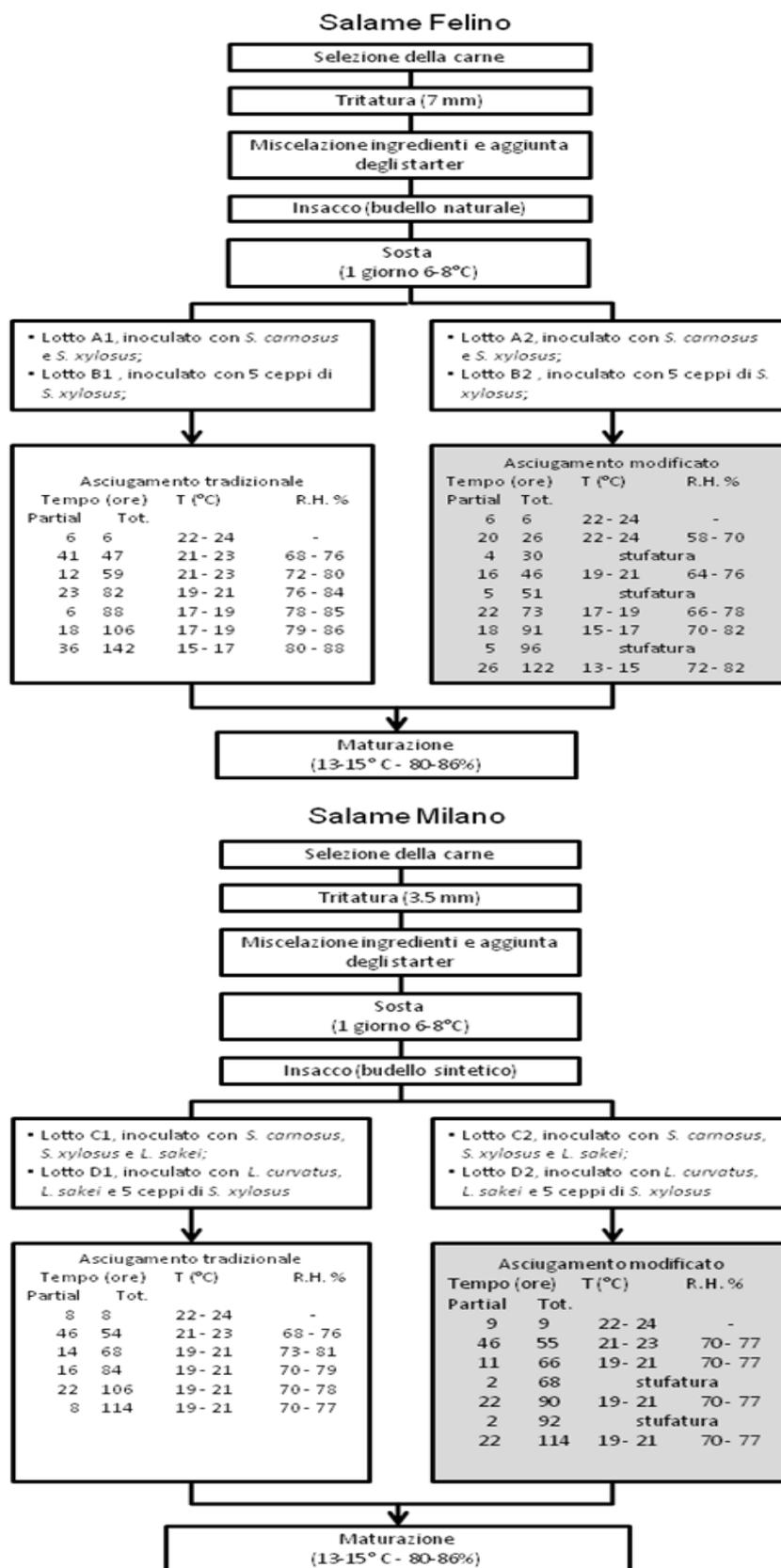


Figura 3.1: Foglio di flusso per la produzione dei salami Felino e Milano (Tabanelli *et al.*, 2012).

3.3 Perdita di peso e pH

Durante la maturazione, è stata misurata per ogni tipo di salame la perdita di peso e sono stati determinati il pH e l'attività dell'acqua utilizzando rispettivamente un pHmetro Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) e un Aqualab CX3-TE (Labo-Scientifica, Parma, Italy). Ogni valore è la media dei risultati ottenuti in 3 diversi salami.

3.4 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state eseguite alla fine del periodo di maturazione: dopo 76 giorni per il salame tipo Milano e dopo 41 giorni per il salame tipo Felino.

Dopo la rimozione asettica del budello, sono stati prelevati circa 10 g di ciascun campione che, posti in sacchetto sterile sono stati addizionati di 90 ml di soluzione fisiologica sterile (9‰ di cloruro di sodio), omogeneizzati per 2 minuti in Stomacher (modello Lab Blender Seward, London, UK). Sono state eseguite diluizioni decimali e i campionamenti sono stati effettuati per piastramento su terreni selettivi.

I gruppi microbici presi in considerazione sono stati i lieviti (su Sabouraud Dextrose Base, Oxoid) con l'aggiunta di 200 mg/l di cloramfenicolo, la carica mesofila totale (su Plate Count Agar, Oxoid), i lattobacilli (su MRS Agar, Oxoid), i cocchi Gram-positivi e catalasi positivi (Micrococcaceae e Staphylococcaceae) (su Baird-Parker, Oxoid) con l'aggiunta di un'emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito, gli enterococchi (su terreno Slanetz and Bartley, Oxoid) e le enterobatteriaceae (su Violet Red Bile Glucose Agar, Oxoid).

Sono state effettuate tre replicazioni per ogni conteggio microbico. Ogni conteggio è la media dei risultati ottenuti campionando tre salami diversi.

Le temperature e i tempi di incubazione sono stati i seguenti:

- | | |
|----------------------|--|
| - Lieviti | 28°C per 72 ore |
| - Mesofili totali | 30°C per 48 ore |
| - Lattobacilli | 30°C per 48 ore (immersione) |
| - Cocchi | 37°C per 48 ore |
| - Enterococchi | 44°C per 48 ore |
| - Enterobatteriaceae | 37°C per 24 ore (immersione doppio strato) |

3.5 Analisi del contenuto di ammine biogene

La determinazione quali-quantitativa delle ammine biogene prodotte dai ceppi oggetto di studio è stata eseguita attraverso l'impiego della tecnica di cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), come descritto da Lanciotti *et al.* (2007). La quantità di ammine è stata espressa in mg/L in riferimento alla curva di calibrazione ottenuta con gli standard di istamina acquosa derivatizzati come descritto per i campioni.

3.5.1 Estrazione delle ammine

Seguendo il metodo riportato da Coloretti *et al.* (2008), 10 grammi di campione congelato sono stati portati a temperatura ambiente, spezzettati e poi addizionati di 20 ml di acido tricloroacetico (TCA 5%) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A) ed, infine, sono stati posti in un bagnetto termostato a 75°C per 30 minuti. L'estratto è stato centrifugato (2700 rpm, 10 min, 4°C, Beckmann Coulter, USA) ed è stato raccolto il surnatante contenente le ammine eventualmente prodotte dai ceppi nei vari campioni mediante un filtro di carta. Il processo è stato ripetuto una seconda volta e l'estratto è stato portato a volume a 50 ml con la stessa soluzione di TCA 5%. Gli estratti così ottenuti sono stati conservati per un massimo di 3-4 giorni a 4°C prima di essere sottoposti a derivatizzazione.

3.5.2 Fase di derivatizzazione (Martuscelli *et al.*, 2000)

In un matraccio da 10 ml (preferibilmente ambrato per preservare i campioni dalla degradazione ad opera della luce) sono stati aggiunti 1 ml di campione, 300 µl di NaHCO₃ saturo, 100 µl di una soluzione a 500 ppm di standard interno (1,7-diaminoeptano, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e una quantità variabile di una soluzione di KOH 1M in modo da portare il campione a un valore di pH di $11,5 \pm 0,01$ (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy).

Sono stati in seguito aggiunti 4 ml di soluzione di dansilcloruro (ottenuta sciogliendo 20 mg di dansilcloruro (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) in 4 ml di acetone per HPLC per ogni campione da derivatizzare) e i campioni chiusi e parafilmati sono posti in agitazione in bagnetto termostato a 40°C per 45 minuti (195 strokes) al buio protetti dalla

luce. Al termine di questi 45 minuti la reazione viene bloccata attraverso l'aggiunta di 400 μl di una soluzione di ammoniaca (NH_3 30%). I campioni devono sostare al buio per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente vengono portati a volume con acetonitrile per HPLC. I campioni vengono poi filtrati con filtri in nylon (\varnothing 0,22 μm) e posti in vials, protetti dalla luce a -18°C per non più di 7 giorni. I campioni così ottenuti e conservati sono pronti per l'iniezione nello strumento di analisi.

3.5.3 HPLC e condizioni cromatografiche

La strumentazione utilizzata nella sperimentazione è costituita da un sistema Jasco PU-2089 Plus con iniettore manuale Rheodyne model con loop di 20 μl e da una colonna cromatografica di tipo C18 a fase inversa (Waters Spherisorb ODS-2, 150x4,6 mm, 3 μm) con precolonna (Waters Spherisorb S5 ODS2, 4,6x10mm).

La rilevazione avviene tramite l'utilizzo di un detector UV-VIS Jasco UV 2070 Plus a 254 nm. Nella Tabella 3.1 è indicato il gradiente di concentrazione degli eluenti utilizzati per l'analisi cromatografica delle ammine biogene.

Tempo (minuti)	CH₃CN (%)	K₂HPO₄ (%)	H₂O (%)
0,0	65	35	0
1,0	65	35	0
5,0	80	20	0
5,1	80	0	20
6,0	90	0	10
15,0	90	0	10
20,0	65	35	0
25,0	65	35	0

Tabella 3.1: Gradienti di concentrazione degli eluenti durante l'analisi HPLC.

Per tutti i campioni il tempo di analisi è di 25 minuti, con un tempo di equilibratura di 10 minuti prima di ogni nuova iniezione.

I cromatogrammi ottenuti vengono integrati e le aree calcolate vengono rapportate a curve di taratura precedentemente ottenute attraverso l'impiego di soluzioni standard di ammine biogene.

3.5.4 Preparazione della soluzione di standard interno

La soluzione di standard interno viene preparata sciogliendo 25 mg di 1,7-diaminoeptano in 50 ml di acqua per HPLC (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.). La soluzione così ottenuta ha una concentrazione di 500 ppm e viene conservata a temperatura refrigerata per un periodo di un mese.

3.5.5 Preparazione delle soluzioni standard di ammine biogene

Per la costruzione di rette di taratura utilizzate per la quantificazione delle ammine biogene nei campioni analizzati, sono state preparate delle soluzioni standard di ammine biogene. In questo caso sono state preparate soluzioni di istamina e tiramina. Queste soluzioni a titolo noto vengono poi sottoposte alla medesima procedura di derivatizzazione dei campioni e i derivatizzati vengono iniettati con la stessa programmata di gradienti.

Vengono preparate delle soluzioni "madre" a una concentrazione di 1000 ppm, che successivamente vengono opportunamente diluite per ottenere le diverse soluzioni standard a concentrazione variabile (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 50 ppm e 75 ppm). Queste soluzioni sono necessarie per l'identificazione delle ammine in funzione dei tempi di ritenzione e per la quantificazione delle stesse attraverso le rette di taratura.

3.5.6 Preparazione degli eluenti per HPLC

Gli eluenti utilizzati sono acetonitrile (CH_3CN , Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.), acqua per HPLC (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e un tampone fosfato (soluzione di potassio fosfato monoacido a 10 mM, portato a pH7 attraverso l'aggiunta di HCl 1M (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy).

Gli eluenti vengono preventivamente filtrati con filtro a porosità 0,22 μm in nylon (per l'acetonitrile) o acetato di cellulosa (per l'acqua e il tampone acetato). Successivamente vengono sonicati per 10 minuti a 20°C (Starsonic 90, Liarre) prima del loro utilizzo.

3.6 Analisi del profilo aromatico mediante gascromatografia

Alla fine della maturazione, l'analisi gascromatografica abbinata ad estrazione SPME è stata eseguita allo scopo di identificare i composti volatili dei salami ottenuti da ceppi di starter differenti e con diverse condizioni d'asciugamento.

Porzione di campione del peso di 3 g sono stati posti in vials, del volume di 10 ml, sigillati con setti di politetrafluoroetilene/silicone, parafilm e chiusi con ghiera metalliche.

Prima dell'analisi sono stati riscaldati a 47°C per 10 minuti al fine di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio liquido-vapore. In seguito è stata inserita nello spazio di testa una fibra di silice fusa ricoperta da una fase fissa mista di Carboxen-polidimetilsilossano (CAR/PDMS, 75 µm, SUPELCO, Steiheim, Germania) idonea per la preconcentrazione sia delle molecole polari che di quelle apolari. La fibra è stata lasciata inserita per 40 minuti alla temperatura di 45°C.

La fibra, su cui sono stati precedentemente assorbiti i composti volatili, è stata inserita nel blocco di iniezione e si è dato avvio alla corsa cromatografica. La fase di desorbimento è durata 10 minuti. Per la separazione dei composti volatili è stato usato un gascromatografo Agilent Hewlett-Packard 6890 abbinato ad uno spettrometro di massa detector 5970 (Hewlett-Packard, Ginevra, Svizzera). L'iniettore è stato mantenuto isotermicamente a 250°C ed era in condizioni di splitless.

Per la separazione dei picchi è stata utilizzata una colonna capillare Varian con lunghezza di 50 m, diametro interno di 320 µm mentre la fase interna era di 1.2 µm.

La rampa di temperatura è stata la seguente: 50°C per 1 minuto seguito da un aumento a 65°C con una velocità di incremento della temperatura di 4.5°C/minuto; da 65-230°C con un incremento di 10°C/minuto ed infine una permanenza di 25 minuti. Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1 ml/min. La frammentazione a livello dello spettrometro di massa è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. I composti sono stati identificati confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 1998 e WILEY (sesta edizione, Stati Uniti d'America) del 1995.

Per ogni salame i risultati GC-SPME sono espressi come media di tre differenti salami.

3.7 Valutazione sensoriale

Per la valutazione sensoriale è stato usato un panel di sette esperti assaggiatori per analisi descrittive di prodotti carnei secondo il metodo di Chiavari *et al.* (2007). I salami sono stati valutati alla fine della maturazione considerando l'aspetto, l'odore, l'aroma e la struttura. Le caratteristiche dei salami sono state apprezzate attraverso l'osservazione, una leggera manipolazione, e/o l'assaggio. L'intensità del parametro sapore è stato contrassegnato su una scala arbitraria con punteggi da 1 (basso) a 7 (alto) (Figura 3.2).

Prima del taglio ciascun salame è stato spellato intero, ne sono state eliminate le due estremità fino a diametro costante e la fetta è stata tagliata a forma ellittica tenendo il coltello con un angolo di incidenza di 45°, per il tipo Gentile, e perpendicolare rispetto all'asse del salame per il tipo Milano. Ad ogni giudice è stata distribuita una fetta di salame identificata da una combinazione di 3 cifre, dello spessore di 5 mm, posta in contenitore di polietilene a chiusura ermetica. I campioni sono stati assaggiati in sedute effettuate alle ore 11:00, in cabine separate con luce bianca; tra un campione ed il successivo ogni giudice aveva a disposizione acqua minerale naturale e un quarto di mela quali mezzi di neutralizzazione dei sapori. Tutti i campioni sono stati esaminati in 2 sedute differenti in giorni diversi; in entrambe le sedute i campioni sono stati distribuiti in ordine diverso ad ogni giudice. I dati sensoriali sono stati elaborati utilizzando il pacchetto Microsoft EXCEL 2007 con plugin statistico XLSTAT versione 7.5.2.

3.8 Analisi statistiche

I dati sono stati statisticamente analizzati usando la procedura unidirezionale ANOVA di Statistica 6.1 (StatSoft Italy srl, Vigenza, Italy). Le differenze tra i valori medi sono stati rilevati dal test HSD Tukey's e le valutazioni/stime si basavano su un livello di significatività di $P \leq 0.05$.

Scheda di valutazione

Assaggiatore: _____ Data: _____ n. campione _____

DEFINIZIONE DELL'ODORE

	debole	media	elevata
Intensità dell'odore	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

Sottolineare il/i descrittore/i prevalente:

Famiglia carneo	(carne fresca - carne acida - carne stagionata - salumificio - grasso - altro)
Famiglia animale	(stalla - brodo - budello - cuoio - altro)
Famiglia speziato	(pepe - aglio - noce moscata - macis - garofanino - cannella - peperone - altro)
Famiglia altro	(rancido - acetico - ammoniaca - ossidato - muffa - vino - altro)

DEFINIZIONE DEL COLORE

	rosa	rosso scuro
Intensità	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--	
	non uniforme	uniforme
Uniformità	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--	

VALUTAZIONE VISIVA DELLA STRUTTURA

	bassa	media	elevata
Compattezza	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Elasticità	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Triturazione parte magra	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Triturazione parte grassa	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

DEFINIZIONE DELL'AROMA

	debole	media	elevata
Intensità dell'aroma	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

Sottolineare il/i descrittore/i prevalente:

Famiglia carneo	(carne fresca - carne acida - carne stagionata - salumificio - grasso - altro)
Famiglia animale	(stalla - brodo - budello - cuoio - altro)
Famiglia speziato	(pepe - aglio - noce moscata - macis - garofanino - cannella - peperone - altro)
Famiglia altro	(rancido - acetico - ammoniaca - ossidato - muffa - vino - altro)

DEFINIZIONE SAPORI FONDAMENTALI

	debole	medio	elevato
Salato	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Acido	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Amaro	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

SENSAZIONI TRIGEMINALI

	debole	medio	elevato
Piccante	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

VALUTAZIONE PERCETTIVA DELLA STRUTTURA

	bassa	media	elevata
Durezza	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Umidità	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		
Masticabilità	--1-----2-----3-----4-----5-----6-----7--		

Figura 3.2: Scheda di valutazione utilizzata per la valutazione sensoriale dei salami (Chiavari, Coloretti, Ferri, & Nanni, 2007).

Capitolo 4: Risultati

In accordo col consueto protocollo industriale applicato nell'industria (ALCISA S.p.A.), i salami tipo Felino sono stati inoculati solo con stafilococchi (*S. carnosus* e *S. xilosus*). Al contrario per i salami Milano anche batteri lattici quali *L. sakèi* e *L. curvatus* sono stati inclusi insieme agli stessi stafilococchi usati per i salami tipo Felino.

Il programma d'asciugamento modificato era rivolto ad entrambi i tipi di salame ed era effettuato al fine di ridurre l'indurimento superficiale e la formazione della crosta. Inoltre, nel caso dei salami di tipo Felino, il programma d'asciugamento modificato è stato caratterizzato da bassi valori di umidità relativa (RH) e rivolto alla lenta crescita delle muffe sul budello nella prima parte della maturazione per evitare il rischio di formazione di gusti sgradevoli ("muffa") (Del Monte *et al.*, 1990). Dopo questo primo passo, la maturazione dei due salami è stata effettuata nelle stesse condizioni. Durante la maturazione sono stati monitorati la perdita d'acqua, a_w e pH.

4.1. Perdite di peso, pH e conteggi microbici

Nei salami di tipo Felino le perdite di peso alla fine della maturazione non sono state significativamente influenzate dalle colture starter, dai processi di fermentazione e dalle condizioni d'asciugamento (Figura 4.1). Dopo 41 giorni, esse variavano tra 35 e 37.5 %.

Questo andamento si riflette anche sui valori di a_w che alla fine della maturazione erano simili (0.93-0.94) sia nel lotto A che nel lotto B. Comunque le perdite di peso dopo due giorni erano più alte nei due tipi di campioni sottoposti al programma d'asciugamento tradizionale (10.5% e 9.4% vs. 7.3% e 6.1%, rispettivamente). Il valore iniziale di pH dell'impasto di carne era 5.5-5.6. Dopo due giorni non era cambiato nei campioni A2, B1 e B2, mentre una leggera diminuzione di pH è stata osservata nei salami A1 (pH 5.4).

Generalmente dopo circa 5 giorni di fermentazione il valore di pH raggiunge il suo valore minimo (4.9-5.0) con l'eccezione dei salami B2, nei quali il valore più basso (5.1) è stato osservato dopo circa cinque giorni. Poi, il pH aumenta raggiungendo alla fine della maturazione valori compresi tra 5.3-5.4 in tutti i campioni, senza differenze significative.

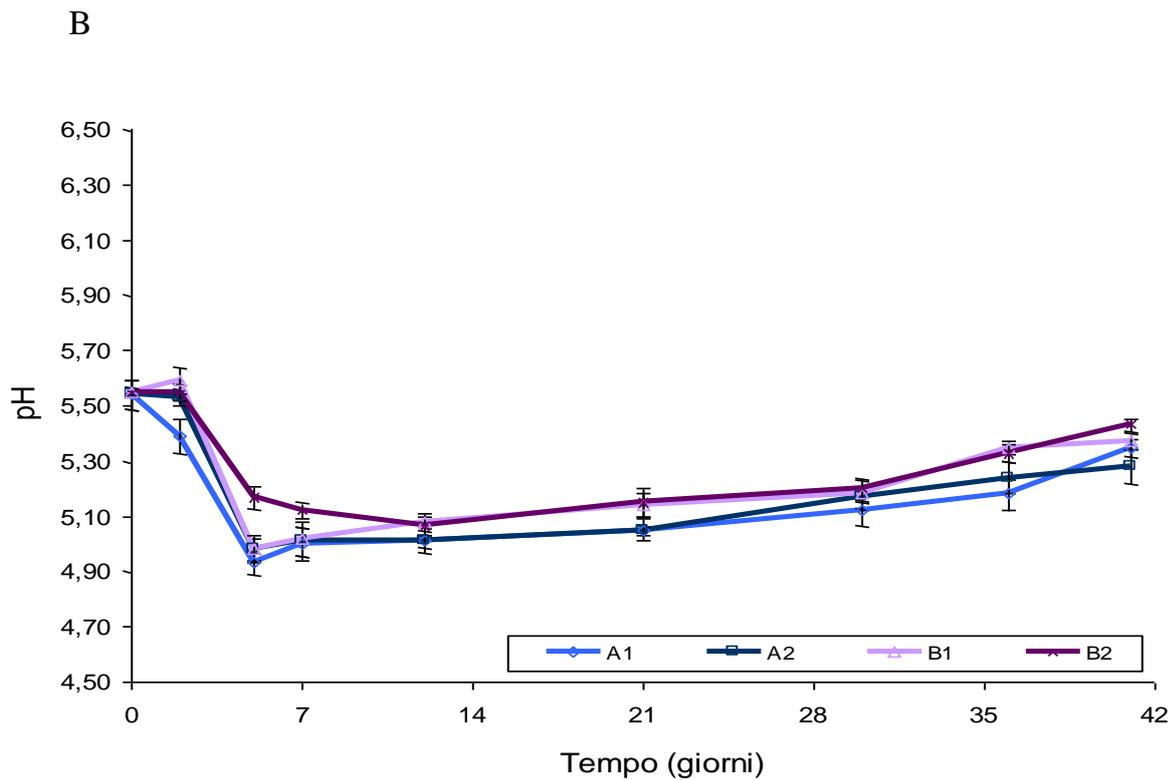
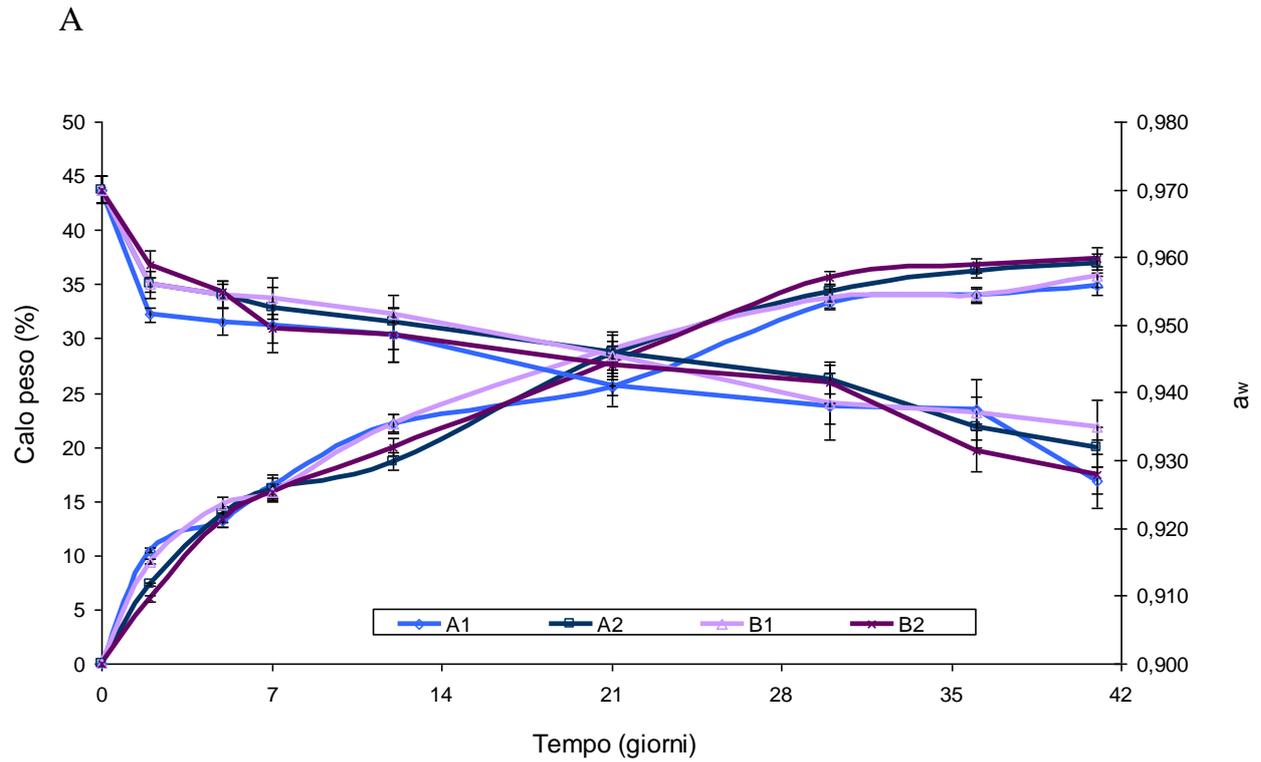


Figura 4.1: Calo peso, a_w (A) e cambiamenti del pH (B) durante l'asciugamento e la maturazione dei salami di tipo Felino.

Alla fine della maturazione i conteggi dei lactobacilli sono più bassi nel lotto A (7.50 e 7.72 log UFC/g, rispettivamente) rispetto al lotto B (8.02 e 8.37 log UFC/g), come riportato in Tabella 4.1. I conteggi più alti dei cocchi Gram-positivi catalasi positivi (6.42 e

6.28 log UFC/g) sono stati trovati nel lotto A2 e B1; nei salami A1 e B2 la concentrazione di questi microrganismi era circa 5.85 log UFC/g. E' degno di nota l'alto numero di stafilococchi coagulasi positivi (CPS), la concentrazione dei quali varia tra 4.61 (salame A1) e 5.66 (salame B1) log UFC/g, un'unità log sotto i conteggi stafilococchi coagulasi negativi (CNS). Tuttavia, lo *Staphylococcus aureus* era sempre sotto il limite di rilevazione. Gli Enterococchi erano presenti in tutti i salami alla concentrazione di circa 5.0 log UFC/g (solo nel lotto B2 i conteggi erano significativamente più bassi), mentre le *Enterobacteriaceae* erano sempre sotto il limite di rilevazione (1.0 log UFC/g). I funghi e le muffe erano contenuti a livello di circa 5.0 e 3.0 log UFC/g, rispettivamente, senza differenze significative in relazione alle colture starter e alle condizioni di fermentazione.

Microrganismi	Tipo Felino			
	A1	A2	B1	B2
Lieviti	3.13 ^a (± 0.12)	3.82 ^b (± 0.12)	3.15 ^a (± 0.06)	2.95 ^a (± 0.14)
Muffe	5.04 (± 0.37)	4.73 (± 0.04)	5.37 (± 0.13)	5.32 (± 0.13)
Lactobacilli	7.50 ^a (± 0.10)	7.72 ^a (± 0.08)	8.02 ^b (± 0.21)	8.37 ^c (± 0.11)
Micrococci e stafilococchi	5.87 ^a (± 0.16)	6.42 ^b (± 0.13)	6.28 ^b (± 0.06)	5.85 ^a (± 0.16)
Stafilococchi coagulasi positivi	4.61 ^a (± 0.06)	4.97 ^b (± 0.11)	5.66 ^c (± 0.11)	4.66 ^a (± 0.15)
Enterococchi	5.04 ^a (± 0.11)	5.16 ^a (± 0.15)	5.04 ^a (± 0.08)	4.54 ^b (± 0.15)
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabella 4.1: Conteggi microbici, espressi come log UFC/g nel salame di tipo Felino alla fine delle rispettive maturazioni. I dati riportati sono la media di tre ripetizioni e tra parentesi è riportata la deviazione standard. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata (P<0.05). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

A confronto col tipo Felino, i salami stagionati di tipo Milano erano caratterizzati da più pronunciate perdite di peso, che variavano tra 41 e 43% (Figura 4.2). Le cinetiche e i risultati finali sono simili per tutti i campioni. Conseguentemente, i valori finali di a_w erano compresi tra 0.88 e 0.87 senza differenze significative. Le variazioni di pH nei differenti campioni mostrano un andamento simile e uniforme. Dopo due giorni è stata registrata una marcata diminuzione del pH (circa 4.9 nel lotto C e 5.1 nel lotto D); comunque, i valori più bassi (4.7-4.8) sono stati raggiunti dopo 5-7 giorni di fermentazione. Poi, il pH aumenta raggiungendo 6.3-6.4 alla fine della maturazione, con valori leggermente più bassi osservati nei salami D.

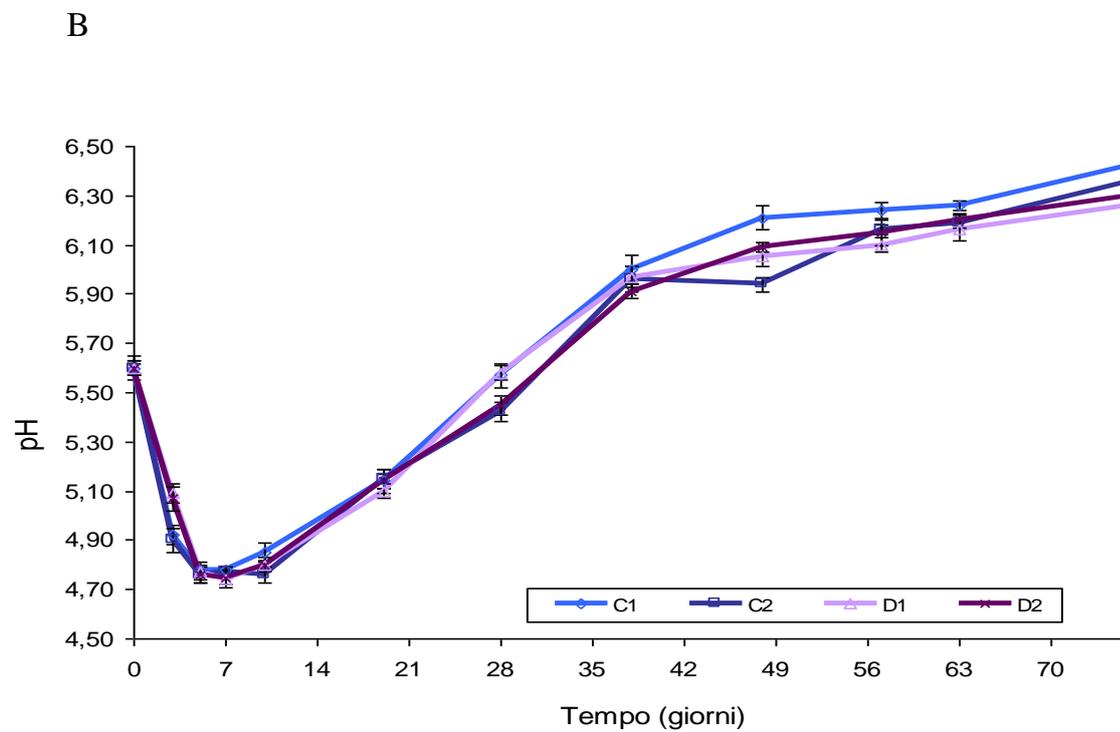
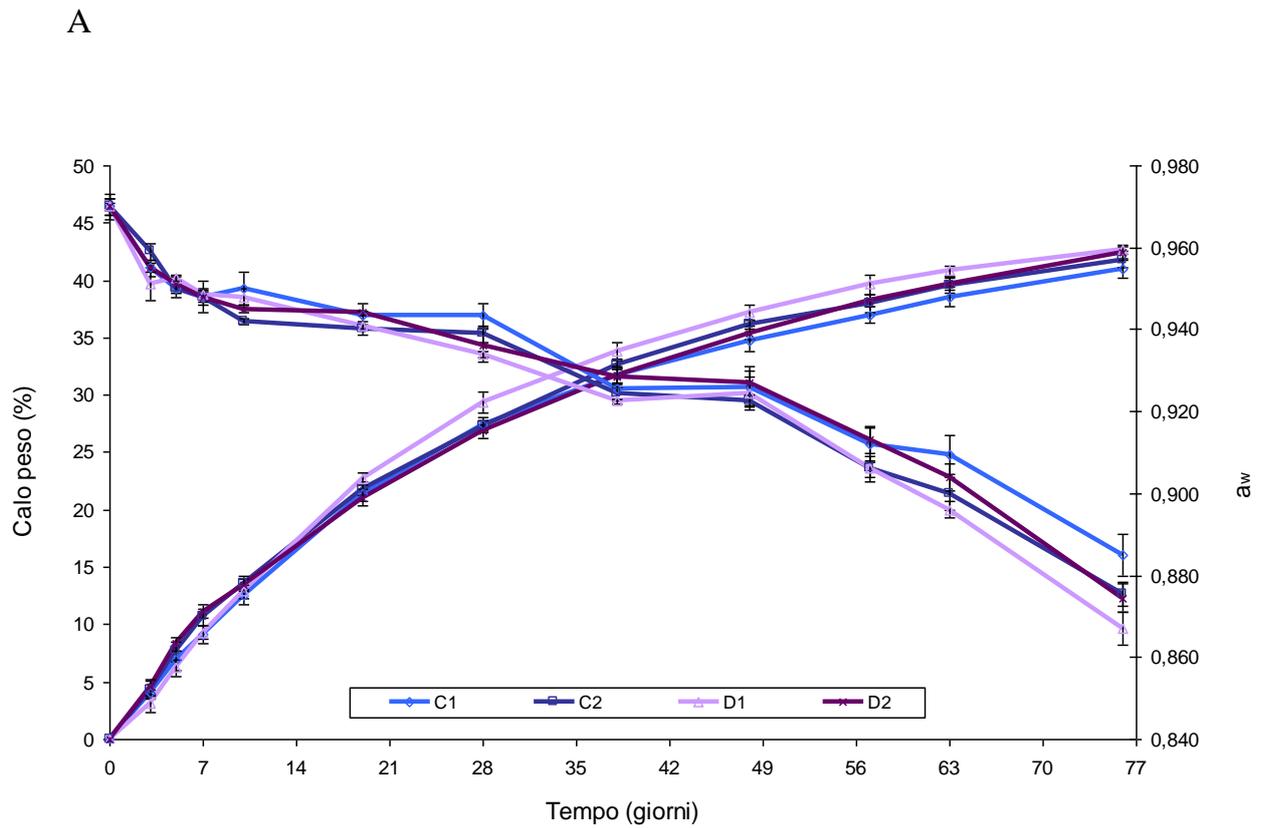


Figura 4.2: Calo peso, a_w (A) e cambiamenti del pH (B) durante l'asciugamento e la maturazione dei salami di tipo Milano.

La concentrazione di lactobacilli nei salami tipo Milano alla fine della maturazione era più alta di 7.70 log UFC/g con l'eccezione dei salami C2 (6.52 log UFC/g) (Tabella 4.2). I micrococchi e gli stafilococchi mostravano conteggi più alti nel lotto C (7.81 e 7.36 log UFC/g) rispetto il lotto D (7.09 e 6.81 log UFC/g). A differenza del tipo Felino, nei salami tipo Milano i CPS erano sempre sotto il limite di rilevazione. Anche i conteggi degli enterococchi erano più bassi. Questi raggiungono la massima concentrazione nel lotto C, ma il loro numero non ha mai superato 4.20 log UFC/g. La concentrazione delle *Enterobacteriaceae* era in tutti i casi più bassa di 1 log UFC/g. Il numero di muffe variava da 4.12 (salami C2) a 4.77 (salami C1), mentre i lieviti sono stati conteggiati leggermente più bassi rispetto le muffe.

Microrganismi	Tipo Milano			
	C1	C2	D1	D2
Lieviti	3.93 ^a (± 0.08)	3.01 ^b (± 0.12)	3.98 ^a (± 0.14)	4.02 ^a (± 0.15)
Muffe	4.77 (± 0.09)	4.13 (± 0.13)	4.48 (± 0.11)	4.62 (± 0.16)
Lactobacilli	7.77 ^a (± 0.12)	6.52 ^b (± 0.08)	7.71 ^a (± 0.20)	7.81 ^a (± 0.14)
Micrococchi e stafilococchi	7.81 ^a (± 0.11)	7.36 ^{ab} (± 0.07)	7.09 ^{ab} (± 0.33)	6.81 ^b (± 0.20)
Stafilococchi coagulasi positivi	< 1	< 1	< 1	< 1
Enterococchi	4.20 ^a (± 0.08)	4.12 ^a (± 0.12)	3.65 ^b (± 0.16)	3.46 ^b (± 0.09)
<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1	< 1	< 1	< 1

Tabella 4.2: Conteggi microbici, espressi come log UFC/g nel salame di tipo Milano alla fine delle rispettive maturazioni. I dati riportati sono la media di tre ripetizioni e tra parentesi è riportata la deviazione standard. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata (P<0.05). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

4.2 Accumulo di ammine biogene

Nelle Figure 4.3 e 4.4 sono riportate le concentrazioni di ammine biogene trovate nei salami alla fine della maturazione.

Come è possibile osservare, la concentrazione di questi composti è marcatamente più alta nei salami tipo Felino. Mentre la spermina e la spermidina sono state rilevate solo sporadicamente e in basse quantità in tutti i tipi di salame (dati non riportati), la presenza

delle altre ammine biogene varia considerevolmente in relazione ai tipi di salame, alle colture starter e alle condizioni di fermentazione.

In particolare, i salami tipo Felino sono caratterizzati da alte concentrazioni di istamina: infatti, questa ammina è stata trovata con quantità più alte di 50 mg/kg in tutti i campioni, con un preoccupante livello massimo (113.64 mg/kg) nel lotto A2. La tiramina è l'ammina più abbondante in questo tipo di salame, con un massimo di 254.38 nel salame B1. Lo stesso campione ha anche la più alta concentrazione di putrescina (173.28 mg/kg); questo valore è comparabile con quello trovato nel lotto A2 e significativamente più alto rispetto i salami A1 e B2. Oltre al contenuto più alto di istamina, il lotto A2 è caratterizzato anche dal massimo accumulo di cadaverina (228.39 mg/kg), che è più del doppio se confrontata con gli altri salami tipo Felino. Infine, la 2-fenilettilamina è assente o presente in basse quantità nel lotto A, mentre una concentrazione più alta di 20 mg/kg è stata trovata nel lotto B.

Tra i salami tipo Milano, i campioni C mostrano le più alte quantità di istamina; comunque il suo contenuto non eccede i 20 mg/kg. La tiramina è la principale ammina trovata alla fine della maturazione, ma è accumulata con un contenuto più basso (non eccede i 120 mg/kg, con un minimo di 79.57 mg/kg nel salame C1) rispetto i salami tipo Felino. La putrescina è stata trovata a un livello più alto (71.64 e 85.08 mg/kg nel lotto D). La concentrazione di cadaverina è compresa tra 35 e 45 mg/kg con l'eccezione dei campioni C2 (52.98 mg/kg), mentre la 2-fenilettilamina è stata trovata solo nei lotto D a una concentrazione simile a quelle trovate nei salami tipo Felino.

In assenza di limiti legali per le concentrazioni di ammine biogene negli alimenti fermentati, recentemente l'EFSA ha dichiarato che l'assunzione fino a 50 mg/kg di istamina e 600 mg/kg di tiramina può essere considerata sicura per gli individui sani; tuttavia, questi limiti diminuiscono drasticamente in caso di intolleranza o uso di farmaci inibitori la monoamino-ossidasi (EFSA, 2001).

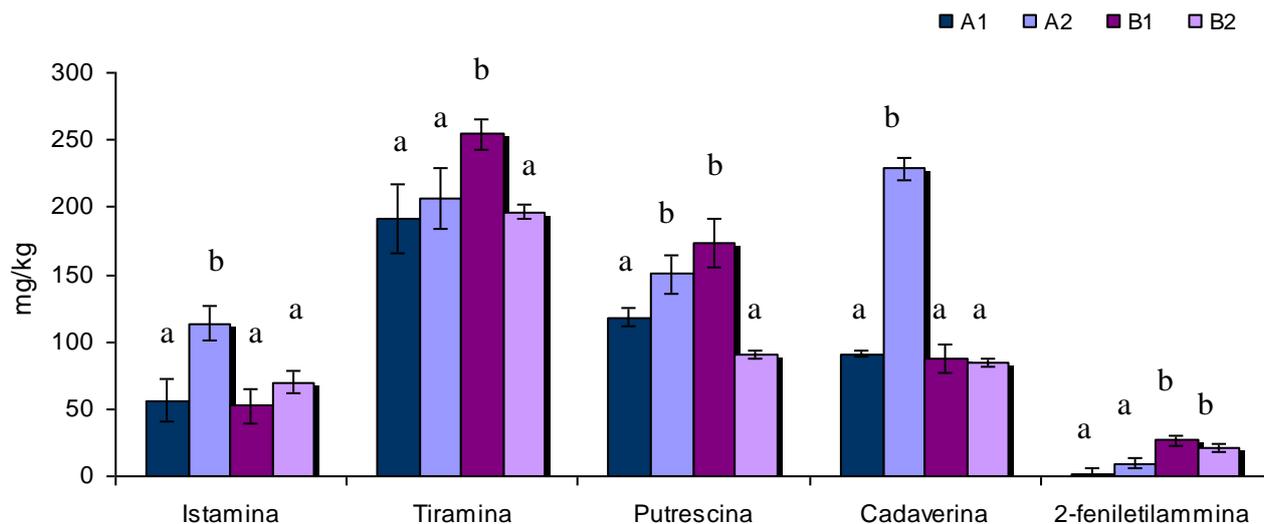


Figura 4.3: Contenuto di ammine biogene (mg/kg) ritrovate nei salami di tipo Felino a fine maturazione. I dati riportati sono la media di tre ripetizioni ed è stata effettuata un'analisi ANOVA. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata ($P < 0.05$). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

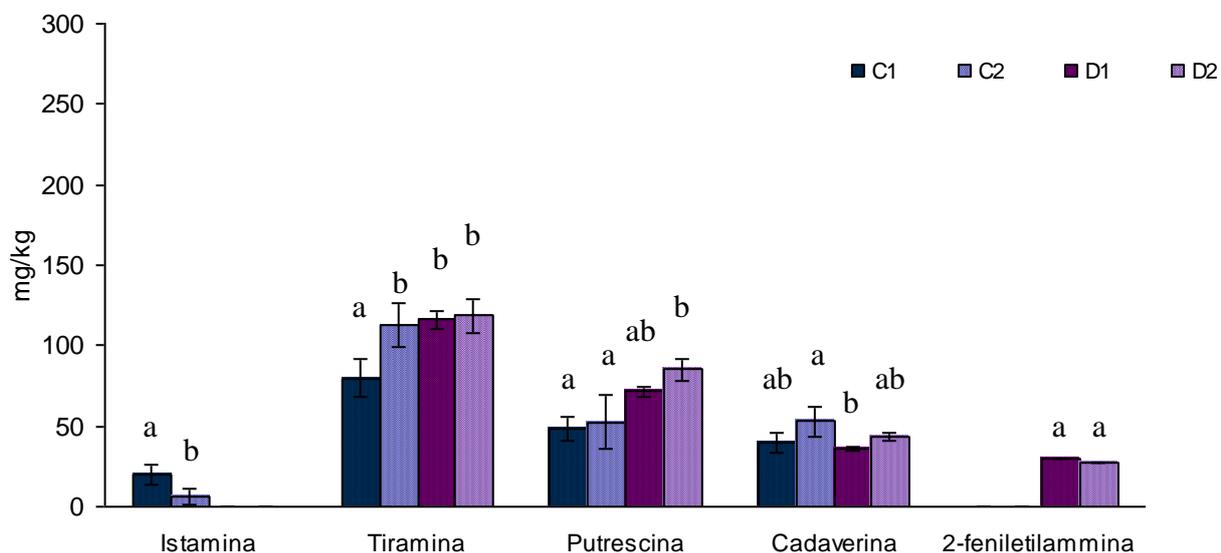


Figura 4.4: Contenuto di ammine biogene (mg/kg) ritrovate nei salami di tipo Milano a fine maturazione. I dati riportati sono la media di tre ripetizioni ed è stata effettuata un'analisi ANOVA. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata ($P < 0.05$). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

Le colture starter contenenti LAB usate per i salami tipo Milano sono state in grado di ridurre il contenuto di ammine biogene, anche se non può essere fatto nessun confronto statistico perché i due tipi di salami sono molto differenti. La riduzione delle ammine biogene può essere attribuita alla più veloce colonizzazione dell'impasto di carne garantito dai lactobacilli. Infatti, nei salami tipo Felino, dove solo gli stafilococchi sono stati usati come colture starter, il processo di acidificazione è stato molto lento. L'assenza di una rapida diminuzione del pH (o la sua debole diminuzione nel campione A1) per due giorni indica la difficoltà di queste colture starter di prevalere e la possibilità che in questa prima fase avvenga una spontanea fermentazione (Luongo *et al.*, 2001). Il ritardo della diminuzione del pH in questi salami ha conseguenze sulle caratteristiche dei prodotti stagionati. Indipendentemente dagli stafilococchi inoculati, il numero di CNS alla fine della maturazione è basso. La mancanza di dati intermedi non consente di affermare che questi stafilococchi abbiano fallito nella completa colonizzazione dell'ambiente. Tuttavia, è possibile affermare che essi non sono stati capaci di mantenere la dominanza fino alla fine della maturazione. I LAB selvaggi hanno dominato la popolazione microbica (specialmente nel lotto B) e alte concentrazioni di CPS ed enterococchi sono state rilevate in tutti questi salami. Questo andamento microbico può spiegare il contenuto di ammine biogene dei salami A e B, nei quali è stato trovato un alto contenuto di cadaverina, tiramina e istamina.

La produzione di tiramina nei salami dipende dall'attività dei LAB e gli enterococchi sono conosciuti per avere la principale attività di tirosina decarbossilasi (Suzzi & Gardini 2003; Buňková *et al.*, 2009; Pircher *et al.*, 2007). Anche se la decarbossilazione dell'istidina non è ampiamente diffusa tra i LAB, ci sono molti ceppi nei quali questa capacità è stata dimostrata (Landete *et al.*, 2008). L'attività dell'istidina decarbossilasi è stata trovata, seppur sporadicamente, anche tra gli stafilococchi (Landete *et al.*, 2007).

La capacità dei LAB e degli stafilococchi di produrre le ammine alifatiche, cadaverina e putrescina, è ancora più rara (Pircher *et al.*, 2007). La presenza nei salami di queste ammine alifatiche insieme all'istamina è spesso attribuita all'attività dei batteri Gram-negativi, soprattutto le *Enterobacteriaceae* (Suzzi & Gardini 2003; Bover-Cid *et al.*, 2009). Questo aspetto potrebbe rafforzare le ipotesi che la coltura starter di stafilococchi abbia fallito nel dominare completamente il microbiota nella prima parte della fermentazione, lasciando importanti nicchie ecologiche ai microorganismi selvaggi tra i quali gli enterobatteri (Luongo *et al.*, 2001). Infatti, nonostante l'assenza delle

Enterobacteriaceae vitali dopo la maturazione, è stato dimostrato che molte decarbossilasi rimangono attive indipendentemente dall'integrità della cellula (Moreno-Arribas & Lonvaud Funel, 1999; Rossi *et al.*, 2011; Kanki *et al.*, 2007).

Invece, risultati abbastanza differenti sono stati ottenuti nei salami tipo Milano, nei quali, indipendentemente dalle condizioni di processo, la presenza dei lactobacilli selezionati in entrambe le colture starter usate è stata capace di garantire un'omogenea e rapida diminuzione del pH. Infatti, i LAB e i CNS sono stati trovati in più alti numeri (nonostante il fatto che l' a_w finale di questi salami sia marcatamente più bassa), mentre i CPS sono assenti; gli enterococchi mostrano contenuti più bassi e tutte le ammine biogene sono state trovate a livelli bassi, specialmente l'istamina.

Di particolare interesse sono le quantità di 2-feniletilamina (che deriva dalla decarbossilazione della fenilalanina), ritrovate in tutti i salami nei quali è stato usato lo starter costituito da 5 ceppi di *S. xilosus* (lotti B e D). La 2-feniletilamina può essere prodotta dai LAB attraverso l'azione della tirosina decarbossilasi che può usare come substrato la fenilalanina, anche se con una più bassa affinità, a causa della somiglianza della sua struttura chimica con la tirosina (Pessione *et al.*, 2009). La presenza di questa ammina nel salame inoculato con 5 ceppi di *S. xilosus* (B e D) è probabilmente dovuta a una specifica azione proteolitica esercitata da queste colture, che rendono disponibili quantità di precursore più alte rispetto ad altre colture starter. Questa ipotesi è stata confermata anche dai risultati relativi ai composti volatili, derivati dal metabolismo della fenilalanina, come descritto nel prossimo paragrafo.

4.3 Analisi SPME-GC dei composti volatili dei salami

Il profilo volatile dei salami è stato misurato usando la tecnica SPME-GC-MS. I risultati ottenuti in base alle condizioni stabilite, espressi come percentuale dell'area di ogni picco, sono riportati in Tabella 4.3 e 4.4 per i salami tipo Felino e tipo Milano, rispettivamente. Le percentuali sono state calcolate escludendo i composti derivanti dalle spezie (pepe nero), in particolare i terpeni (Ravidran & Kallapurackal, 2001). Nelle Tabelle i composti sono stati raggruppati in famiglie chimiche, cioè idrocarburi, aldeidi, chetoni, alcoli e acidi.

Composti	A1	A2	B1	B2
Eptano	1.31 (±0.18)	0.88 (±0.78)	0.67 (±0.51)	0.49 (±0.01)
2,4,4-trimetil pentene	- *	-	0.27 (±0.15)	0.27 (±0.01)
Ottano	1.29 ^a (±0.19)	1.18 ^a (±0.41)	0.35 ^b (±0.18)	0.45 ^b (±0.12)
Toluene	0.44 ^a (±0.04)	0.69 ^b (±0.30)	0.38 ^a (±0.15)	0.29 ^a (±0.10)
6,6-dimetil undecano	0.17 (±0.14)	0.09 (±0.13)	0.17 (±0.03)	-
Idrocarburi	3.21^a (±0.24)	2.84^{ab} (±0.91)	1.84^{ab} (±0.54)	1.50^b (±0.08)
3-metil butanale	0.62 (±0.03)	0.55 (±0.16)	0.67 (±0.07)	0.85 (±0.09)
Pentanale	3.92 ^a (±0.80)	2.34 ^b (±0.65)	2.12 ^b (±0.41)	2.02 ^b (±0.58)
Esanale	47.70 ^a (±2.65)	40.11 ^b (±2.56)	36.67 ^{bc} (±1.55)	32.93 ^c (±1.74)
Eptanale	1.97 (±0.57)	1.82 (±1.14)	1.24 (±0.32)	2.29 (±2.25)
Ottanale	0.25 (±0.08)	0.25 (±0.08)	0.36 (±0.17)	0.27 (±0.23)
2-eptanale	-	0.58 (±0.43)	-	-
5-eptanale, 2,6-dimetil	-	0.51 (±0.89)	-	-
Nonanale	0.60 ^a (±0.05)	0.88 ^a (±0.44)	1.24 ^b (±0.90)	0.98 ^{ab} (±0.56)
Benzaldeide	0.88 ^a (±0.07)	1.88 ^a (±0.45)	4.77 ^b (±0.78)	5.00 ^b (±1.07)
Benzenacetaldide	2.67 ^a (±0.49)	6.85 ^a (±2.17)	14.63 ^b (±2.08)	16.93 ^b (±6.81)
Aldeidi	58.61 (±0.44)	55.78 (±1.61)	61.70 (±3.14)	61.27 (±7.40)
Acetone	0.66 ^a (±0.02)	0.75 ^a (±0.26)	1.43 ^b (±0.42)	1.23 ^b (±0.52)
2-butanone	7.06 ^a (±0.62)	7.36 ^a (±3.25)	15.35 ^b (±2.17)	15.37 ^b (±4.16)
2,3-pentandione	0.33 (±0.01)	0.17 (±0.15)	0.31 (±0.04)	0.32 (±0.02)
3-idrossi-2-butanone	0.84 (±0.46)	0.39 (±0.24)	0.78 (±0.06)	1.57 (±1.24)
2,5-ottandione	0.11 ^a (±0.02)	0.33 ^{ab} (±0.21)	0.45 ^{ab} (±0.16)	0.55 ^b (±0.08)
4-nonanone	-	1.06 (±1.49)	-	-
2-nonanone	-	0.23 (±0.09)	0.11 (±0.01)	-
3-otten-2-one	0.13 (±0.02)	0.15 (±0.10)	0.20 (±0.05)	0.18 (±0.07)
2-nonanone	0.17 (±0.05)	-	-	0.14 (±0.10)
Chetoni	9.31^a (±0.96)	10.44^a (±1.29)	18.62^b (±2.21)	19.35^b (±5.73)
Alcol etilico	2.22 (±0.33)	3.60 (±0.17)	2.35 (±0.67)	2.08 (±0.13)
2-butanolo	5.94 ^{ab} (±0.81)	7.53 ^a (±3.44)	1.39 ^b (±0.79)	3.33 ^{ab} (±1.73)
1-propanolo	1.01 ^a (±0.16)	0.56 ^b (±0.15)	0.49 ^b (±0.15)	0.27 ^b (±0.27)
1-pentanolo-3-metil	0.34 (±0.13)	-	0.28 (±0.17)	0.14 (±0.13)
1-penten-3-olo	2.22 ^a (±0.41)	0.58 ^b (±0.64)	0.96 ^b (±0.25)	-
2-esanolo-2,3-dimetil	0.21 (±0.10)	0.10 (±0.17)	0.09 (±0.02)	0.09 (±0.16)
1-butanolo-3-metil	0.94 (±0.26)	1.09 (±0.37)	0.83 (±0.77)	0.63 (±0.64)
1-pentanolo	2.99 ^a (±0.17)	1.97 ^b (±0.51)	1.87 ^b (±0.52)	1.52 ^b (±0.20)
2-penten-1-olo (Z)	0.39 ^a (±0.06)	0.21 ^b (±0.06)	0.20 ^b (±0.05)	0.10 ^b (±0.08)
1-esanolo	1.97 (±1.02)	4.64 (±5.78)	1.56 (±0.08)	1.59 (±0.24)
3-pentanolo-2-metil	0.16 ^a (±0.01)	0.01 ^b (±0.02)	0.20 ^a (±0.05)	-
2-eptanolo (E)	0.35 ^a (±0.03)	-	0.82 ^b (±0.14)	-
1-otten-3-olo	2.99 (±0.72)	3.09 (±1.23)	2.45 (±0.63)	2.23 (±0.52)
1-ottanolo	0.16 (±0.03)	0.20 (±0.07)	0.17 (±0.09)	0.13 (±0.04)
3 tiofene etanolo	0.24 (±0.02)	1.18 (±1.22)	0.59 (±0.33)	0.79 (±0.41)
Fenil alcol	0.14 (±0.04)	0.38 (±0.17)	0.50 (±0.22)	0.77 (±0.49)
Pentaetilene glicole	0.09 (±0.01)	0.22 (±0.03)	-	0.20 (±0.01)
Alcoli	22.38^a (±1.36)	25.36^a (±4.02)	14.75^b (±2.18)	13.87^b (±2.47)
Acido acetico	4.70 (±0.86)	3.98 (±0.45)	2.01 (±0.73)	3.48 (±1.22)
Acido propanoico	0.54 (±0.10)	0.23 (±0.20)	0.43 (±0.11)	0.47 (±0.07)
Acido butanoico	0.17 (±0.01)	0.10 (±0.05)	0.08 (±0.02)	0.11 (±0.08)
Acido caproico vinil estere	0.39 (±0.12)	0.64 (±0.29)	-	-
Acido esanoico	0.70 (±0.03)	0.64 (±0.19)	0.48 (±0.10)	0.44 (±0.04)
Acidi	6.51^a (±0.87)	5.59^a (±0.31)	2.99^b (±0.85)	4.50^a (±1.38)

*: sotto il limite di determinazione

Tabella 4.3: Composizione (in % sull'area assoluta) dei composti volatili rilevati nello spazio di testa dei salami di tipo Felino a fine maturazione. Tra parentesi è riportata la deviazione standard (± standard deviation) ed è stata effettuata un'analisi ANOVA. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata (P<0.05). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

Composti	C1	C2	D1	D2
2,4,4-trimetilpentene	1.66 (±1.44)	0.79 (±0.28)	0.91 (±1.00)	-*
4-metil-1-(1-metiletil)cicloesano	0.73 (±0.18)	0.32 (±0.55)	0.13 (±0.23)	0.43 (±0.42)
Idrocarburi	2.39 (±1.29)	1.12 (±0.36)	1.04 (±1.21)	0.43 (±0.42)
2,3-dimetilpentanale	-	2.12 (±0.79)	1.19 (±0.46)	-
3-metilbutanale	2.87 ^a (±1.45)	5.30 ^b (±3.29)	0.95 ^c (±0.60)	8.84 ^b (±7.75)
Pentanale	2.35 ^{ab} (±0.67)	4.30 ^{ab} (±0.81)	4.50 ^a (±1.41)	2.04 ^b (±0.22)
Esanale	36.87 ^a (±5.78)	52.25 ^b (±1.46)	48.83 ^b (±4.05)	27.81 ^a (±4.71)
Eptanale	2.18 (±1.84)	1.24 (±0.39)	1.59 (±0.20)	5.17 (±6.75)
Ottanale	-	0.10 (±0.18)	0.21 (±0.37)	1.08 (±1.87)
2-eptenale	0.81 (±0.06)	1.28 (±0.63)	1.32 (±0.44)	0.56 (±0.29)
Nonanale	1.05 (±1.22)	1.06 (±0.90)	2.39 (±2.47)	1.07 (±0.82)
2,4-eptadienale (E,E)	-	0.16 (±0.15)	-	-
Decanale	-	-	-	0.15 (±0.27)
Benzaldeide	1.63 ^a (±0.68)	1.94 ^a (±0.76)	5.63 ^b (±2.01)	4.51 ^b (±1.03)
Benzenacetaldide	7.98 ^a (±7.52)	4.11 ^b (±1.86)	13.73 ^c (±5.72)	16.06 ^c (±1.58)
Aldeidi	55.74^a (±6.32)	73.86^{bc} (±1.81)	80.34^c (±2.96)	67.29^{ab} (±5.90)
Acetone	12.62 ^a (±1.97)	1.91 ^b (±0.45)	3.27 ^b (±1.19)	16.07 ^a (±4.76)
2-butanone	8.62 ^a (±0.70)	4.70 ^{bc} (±1.07)	1.68 ^b (±0.31)	5.13 ^c (±2.01)
2,3-butandione	0.12 (±0.21)	0.72 (±0.03)	0.62 (±0.09)	0.51 (±0.13)
2,3-pentandione	0.66 (±0.21)	-	0.55 (±0.10)	-
3-idrossi-2-butanone	2.84 ^a (±1.70)	0.41 ^b (±0.36)	0.15 ^b (±0.09)	1.82 ^a (±2.52)
2,5-ottandione	0.61 (±0.19)	0.76 (±0.45)	0.51 (±0.05)	0.48 (±0.30)
3-otten-2-one	0.17 (±0.16)	0.33 (±0.16)	0.30 (±0.10)	-
Chetoni	25.64^a (±4.02)	8.83^b (±0.50)	7.08^b (±0.87)	24.01^a (±7.70)
Alcol etilico	1.97 (±1.03)	0.89 (±0.14)	0.57 (±0.18)	-
2-butanolo	2.89 ^a (±1.36)	2.53 ^a (±1.58)	0.19 ^b (±0.33)	0.25 ^b (±0.39)
1-pentanol-3-meil	0.24 (±0.22)	0.09 (±0.16)	0.84 (±0.69)	0.08 (±0.13)
1-penten-3-olo	2.05 (±1.78)	0.75 (±1.30)	1.40 (±1.54)	-
1-butanolo-3-metil	-	0.52 (±0.45)	-	0.27 (±0.48)
1-pentanol	1.76 ^{ab} (±0.92)	2.55 ^a (±0.33)	2.30 ^{ab} (±0.48)	1.00 ^b (±0.09)
2-penten-1-olo (Z)	-	0.34 (±0.02)	0.28 (±0.03)	-
1-hesanol	0.58 (±0.52)	0.67 (±0.06)	0.51 (±0.16)	0.54 (±0.29)
3-pentanol	0.34 (±0.39)	0.16 (±0.14)	0.13 (±0.12)	0.21 (±0.18)
3,5-ottadien-2-olo	-	-	-	0.12 (±0.13)
1-otten-3-olo	1.18 ^{ab} (±0.38)	2.52 ^a (±0.97)	2.21 ^{ab} (±0.33)	0.76 ^b (±0.21)
4-etil-cicloesanol	0.18 (±0.25)	0.22 (±0.15)	0.03 (±0.05)	-
1-ottanol	-	0.07 (±0.12)	0.10 (±0.21)	-
3 tiofene etanol	0.38 (±0.66)	0.24 (±0.19)	0.41 (±0.14)	0.60 (±0.16)
Fenetil alcol	-	0.09 (±0.16)	0.19 (±0.18)	-
Pentaetilene glicole	-	0.37 (±0.35)	-	-
4-metil-tiazolo	-	0.19 (±0.17)	-	-
Alcoli	11.57^a (±3.52)	12.20^a (±2.15)	9.16^{ab} (±2.24)	3.83^b (±0.62)
Acido acetico	3.13 (±0.73)	2.69 (±1.41)	1.39 (±0.46)	3.46 (±1.93)
Acido propanoico	0.95 (±0.27)	0.72 (±0.33)	0.54 (±0.12)	0.48 (±0.13)
Acido esanoico	0.59 (±0.04)	0.59 (±0.15)	0.45 (±0.09)	0.53 (±0.16)
Acidi	4.67 (±0.90)	3.90 (±1.81)	2.38 (±0.47)	4.47 (±2.03)

*: sotto il limite di determinazione

Tabella 4.4: Composizione (in % sull'area assoluta) dei composti volatili rilevati nello spazio di testa dei salami di tipo Milano a fine maturazione. Tra parentesi è riportata la deviazione standard (± standard deviation) ed è stata effettuata un'analisi ANOVA. Le lettere indicano differenze significative tra i campioni secondo l'analisi ANOVA applicata (P<0.05). Dati con la stessa lettera non sono significativamente differenti.

Nei campioni del tipo Felino gli idrocarburi sono i composti trovati in concentrazione più bassa (1.50-3.21%); i più alti livelli sono stati trovati nei campioni A1, a causa dell'alta concentrazione di eptano. Al contrario, le aldeidi sono i composti aromatici più rappresentativi. Nonostante l'assenza di differenze significative nella loro percentuale totale, alcune variazioni possono essere messe in evidenza nelle aldeidi individuali, tra le quali l'esanale è la più importante. I lotti A sono caratterizzati dalle più alte concentrazioni di queste aldeidi alifatiche. D'altra parte, i lotti B mostrano i contenuti significativamente più alti di benzaldeide (4.77 e 5.00%) e benzenacetaldede (14.63 e 16.93%). La percentuale di eptanale, ottanale, 3-metil-butanale non mostrano significative differenze mentre nei salami A (soprattutto A1) sono state trovate concentrazioni di pentanale leggermente più alte e di nonanale più basse.

La percentuale di chetoni è significativamente più alta nei lotti B, senza differenze dipendenti dalle condizioni di fermentazione. Questo andamento è principalmente determinato dal 2-butanone trovato a concentrazione doppia (15.35 e 15.37%) nei lotti B, se confrontati con i salami A (7.06 e 7.36%). Anche la quantità di acetone è significativamente più alta nei salami B. Al contrario, gli alcoli sono più alti nei lotti A, dovuti alle quantità di 2-butanolo. L'1-otten-3-olo, l'esanolo, l'1-pentanolo sono stati generalmente trovati in più alte percentuali nei salami A. Nessuna significativa differenza è stata trovata per l'etanolo.

Infine, gli acidi, rappresentati soprattutto dall'acido acetico, sono stati trovati significativamente più bassi nel lotto B1.

Nei salami tipo Milano (Tabella 4.4) la quantità di idrocarburi è più alta nel lotto C1 (2.39%) e più bassa nel lotto D2 (0.46%). Le aldeidi sono i composti più rilevanti e la loro presenza è particolarmente alta nei salami D1 (80.36%) e salami C2 (73.86%). Come nel tipo Felino, l'esanale è l'aldeide più importante e rappresenta circa la metà del totale dei composti volatili rilevati nei lotti C2 e D1. Anche un contenuto significativamente più alto di pentanale è stato trovato negli stessi salami (4.30 e 4.50%, rispettivamente), mentre le concentrazioni più alte di 3-metil-butanale sono state trovate nei lotti C2 e D2 (5.30 e 8.84%).

La benzaldeide e la benzenacetaldede sono più alte nei salami D e rappresentano circa il 20% dei composti volatili. Inoltre, un alto livello di eptanale è stato osservato nel lotto D2. La concentrazione di chetone, dovuta alla relativa proporzione di acetone in questi campioni (12.62 e 16.07%, rispettivamente), è marcatamente più alta nei lotti C1 e D2.

Anche le quantità di 2-butanone e 3-idrossi-2-butanone sono più alte in questi campioni. Gli alcoli sono generalmente caratterizzati da una percentuale più alta nei salami C e più bassa nel lotto D2. I campioni C mostrano una rilevante presenza di 2-butanolo (2.89 e 2.53%), mentre l'1-ottan-3-olo e l'1-pentanololo sono stati trovati in più alta percentuale nei lotti C2 e D1. La presenza di acidi, rappresentati soprattutto dall'acido acetico, non sono stati influenzati dalle colture starter e dalle condizioni di asciugamento.

Riguardo ai composti volatili, in generale si può affermare che nei salami tipo Felino le principali differenze potrebbero riferirsi alla coltura starter usata mentre nei salami tipo Milano sono state riscontrate differenze anche in relazione alle condizioni d'asciugamento.

L'esanale e, più in generale, le aldeidi alifatiche (eptanale, nonanale, ottanale, decanale, 2-eptanale, etc.) derivano dal metabolismo lipidico. Queste aldeidi danno note erbose, rancide e floreali dipendenti dalle concentrazioni. Comunque, esse sono composti che sono sempre stati trovati nei salami fermentati (Ordoñez *et al.*, 1999; Olivares, Navarro, & Flores, 2009). Nei salami tipo Felino le quantità più alte di esanale nei campioni A rispetto ai B sono il risultato di una possibile influenza delle colture starter sulle lipolisi e sul tasso di autossidazione. D'altra parte l'alta concentrazione di esanale nei salami tipo Milano C2 e D1 indica un presumibile effetto interattivo delle condizioni d'asciugamento e delle colture starter sul risultato finale. Le differenti condizioni d'asciugamento possono influenzare la quantità di acidi grassi liberi e, conseguentemente, la disponibilità dei precursori di parecchi composti aromatici, inclusi le aldeidi alifatiche (Navarro *et al.*, 1997).

Lo spegnimento della circolazione d'aria, come il controllo della temperatura e dell'RH, hanno ritardato la rimozione di calore e d'umidità emessi dal prodotto, favorendo le attività della lipasi, riducendo la perdita d'acqua e influenzando la concentrazione di gas nell'atmosfera strettamente circostante i prodotti. Questi fenomeni, a loro volta, agiscono sul processo di maturazione (Mirade, 2007).

Tra le aldeidi sono state trovate differenze interessanti nella quantità di benzaldeide e benzenacetaldide (=fenilacetaldide), che danno aroma floreale, e derivano dal metabolismo della fenilalanina. La prima può essere ottenuta dalla decarbossilazione del fenilpiruvato (il risultato della deaminazione dell'aminoacido), mentre la seconda può essere ottenuta dall'ossidazione del feniletanololo o attraverso la deaminazione della 2-feniletilamina (Gummalla & Broadbent, 2001; Groot & De Bont, 1998; Ardö, 2006; Yvon & Rijnen, 2001; Cooper, 1997). Tutti i salami inoculati con i 5 ceppi di *S. xyloso* (B e D)

mostrano un maggiore metabolismo della fenilalanina, come dimostrato dalle concentrazioni significativamente più alte di benzaldeide e fenilacetaldeide, e dalle quantità di 2-fenilettilamina.

Tutti i salami con le più basse percentuali di esanale (B, C1 e D2) sono caratterizzati dalle più alte quantità di chetoni, in particolare l'acetone e il 2-butanone. Il processo attraverso il quale si forma l'acetone nei salami non è chiaro e, secondo Stahnke (1999), potrebbe essere relazionato al metabolismo degli aminoacidi a catena ramificata in combinazione col metabolismo del piruvato. Il 2-butanone contribuisce in modo importante all'aroma dei salami (note di albicocca) (Olivares *et al.*, 2009) e il suo accumulo è favorito dalla presenza di *Penicillium nalgiovense* (come in questo caso) ma non da altre specie di *Penicillium* (Sunesen & Stahnke 2003).

Il 2-eptanone e il 2-pentanone, responsabili delle note dolci e fruttate, possono essere il risultato dei processi della β -ossidazione effettuati sia dagli stafilococchi che dalle muffe (Stahnke 1999; Sunesen & Stahnke 2003).

La presenza dei prodotti derivanti dal metabolismo dell'aminoacido ramificato sono solo parzialmente influenzati dalle colture starter e dalle condizioni d'asciugamento, anche se la letteratura riporta che diverse specie e ceppi di stafilococchi potrebbero risultare nell'accumulazione molto differente di aldeidi ramificate, chetoni e idrossiacidi (Olesen & Stahnke, 2004; Masson *et al.*, 1999). Comunque nei salami tipo Milano, il 3-metil-butanale (derivante dalla leucina) è stato trovato soprattutto nei campioni sottoposti alla procedura modificata d'asciugamento, mentre il 2,3-dimetil-pentanale segue lo stesso andamento delle aldeidi alifatiche.

Anche gli alcoli rilevati, nelle condizioni adottate, derivano soprattutto dal metabolismo lipidico. L'1-otten-3-olo, che impartisce un forte sapore di fungo (Olivares *et al.*, 2009), è, insieme all'etanolo, l'alcol più importante, ma solo nei salami tipo Milano è stato trovato in proporzione più alta nel campione con la più alta quantità di esanale. Un andamento simile è stato osservato per il pentanolo. In entrambi i tipi di salami, la più alta proporzione di 2-butanolo è stata trovata nei salami prodotti senza la miscela di 5 ceppi di *S. xylosus* (B e D), indicanti una scarsa attitudine della coltura starter nella riduzione del 2-butanale.

4.4 Panel test

I due tipi di salame sono stati oggetto di una valutazione sensoriale effettuata da esperti panelisti che hanno giudicato le caratteristiche differenti su una scala arbitraria da 1 a 7. Inoltre per odore ed aroma il panel ha individuato una serie di descrittori caratterizzanti ciascun campione.

Prima di procedere al taglio delle fette per la costruzione del profilo sensoriale è stata effettuata la valutazione visiva ed in particolare sono stati considerati l'aspetto esterno (forma, colore e muffa) e le caratteristiche di taglio (tenuta della fetta, resistenza al taglio e pelabilità), riportati in Tabella 4.5 e 4.6 per Felino e Milano, rispettivamente. Tutti i salami hanno mostrato l'aspetto esterno conforme alle aspettative, di forma cilindrica regolare, con superficie bianca, regolarmente ammuffita. Al momento del taglio hanno mostrato risposta diversa a livello di durezza nonché di tenuta della fetta e di pelabilità. Solo la resistenza al taglio però ha mostrato differenze significative, poiché risultava marcatamente più alta in entrambi i salami tipo Felino prodotti col tradizionale processo d'asciugamento (A1 e B1).

Anche i salami tipo Milano B1, prodotti in condizioni tradizionali, hanno mostrato una più alta resistenza al taglio rispetto ai D2, mentre nessuna differenza è stata osservata nei lotti C.

Sigla	A1	A2	B1	B2
starter	C1 - X1	C1 - X1	M - 30	M - 30
asciugamento	classico	modificato	classico	modificato
Aspetto esterno				
forma	regolare	regolare	regolare	regolare
colore	bianco	bianco	bianco	bianco
ammuffimento	regolare, polverulento	regolare, polverulento	regolare, polverulento	regolare, polverulento
Caratteristiche al taglio				
durezza	media	molto scarsa, si impasta al taglio	elevata	scarsa
tenuta della fetta	normale	normale	normale	scarsa
elabilità	difficoltosa	normale	normale	normale

Tabella 4.5: Esame visivo e caratteristiche al taglio dei salami tipo Felino.

Sigla	C1	C2	D1	D2
starter:	L2 - C1 - X1	L2 - C1 - X1	M - 20; M - 30	M - 20; M - 30
asciugamento:	classico	modificato	classico	modificato
Aspetto esterno				
forma	regolare	regolare	regolare	regolare
colore	bianco	bianco	bianco	bianco
ammuffimento	regolare,	regolare,	regolare,	regolare,
	polverulento	polverulento	polverulento	polverulento
	facilmente	facilmente	facilmente	facilmente
	disperdibile	disperdibile	disperdibile	disperdibile
Caratteristiche al taglio				
durezza	media	media	molto elevata	elevata
tenuta della fetta	normale	normale	normale	normale
pelabilità	normale	normale	normale	normale

Tabella 4.6: Esame visivo e caratteristiche al taglio dei salami tipo Milano.

La Figura 4.5 mostra i risultati del profilo sensoriale del salame tipo Felino: tra i 15 descrittori considerati nel test, solo 5 risultano caratterizzati da una significativa differenza secondo il metodo ANOVA a una via ($P < 0.05$). L'intensità dell'odore raggiunge un punteggio più alto nel lotto A1 (4.18 ± 0.53), che è significativamente differente dal lotto A2 (3.25 ± 0.81) ma non dai salami B1 e B2 (3.35 ± 0.81 e 3.50 ± 0.58 , rispettivamente).

Un andamento simile è stato osservato per l'elasticità, più alta nel lotto A1 (3.36 ± 0.86) e più bassa nel lotto A2 (2.20 ± 0.60), mentre nei campioni B ha valori intermedi. Il sapore acido è significativamente più alto nel lotto B2 (3.06 ± 0.76) e più basso nel lotto B1 (2.10 ± 0.49) con valori intermedi nei salami A; in ogni caso, valori più alti sono stati osservati nei salami prodotti col processo d'asciugamento modificato. Al contrario, la durezza e la masticabilità sono influenzati dalla tecnologia d'asciugamento adottata, essendo significativamente più alte nei salami ottenuti col processo d'asciugamento tradizionale (campioni A1 e B1) rispetto a quello modificato (campioni A2 e B2). I descrittori amaro e piccante non sono mai stati percepiti dai panelisti e per questa ragione non sono stati riportati nella Figura 4.5.

La Figura 4.6 mostra valori medi dei descrittori individuali dei salami tipo Milano.

Solo due descrittori (acidità e masticabilità) mostrano significative differenze. Il primo risulta significativamente più alto nei campioni D2 (2.35 ± 0.55) e più basso in C2 (1.39 ± 0.72), mentre la masticabilità ottiene valori più alti nel lotto C2 (3.73 ± 0.58) e più basso nei lotti D2 (2.70 ± 0.78). L'intensità dell'aroma, come l'intensità dell'odore, ha valori medio bassi senza significative differenze. Allo stesso modo, come nei salami tipo Felino, i descrittori piccante e amaro non sono presenti in Figura 4.6 perché non sono mai stati percepiti dai panelisti.

Tra i descrittori del panel test che possono essere associati al profilo volatile dei salami, l'intensità dell'odore mostra alcune differenze significative nei salami tipo Felino; il punteggio più alto del lotto A1 corrisponde a una proporzione significativamente differente di alcune aldeidi (concentrazioni più alte di esanale e pentanale e più basse di fenilacetaldeide) e alcoli (concentrazione più alta di pentanolo e 2-penten-1-olo). Il lotto B2, caratterizzato dal più alto punteggio di acidità, ha una bassa concentrazione di esanale e di 1-otten-3-olo. Tra gli altri descrittori, per la durezza e la masticabilità i protocolli d'asciugamento modificato sono sempre risultati con punteggi più bassi, ciò indica che il più lento rilascio d'acqua osservato in questi campioni nei primi giorni dopo l'insaccamento può impartire proprietà strutturali che caratterizzano i salami dopo la maturazione. Le caratteristiche come la durezza e la masticabilità sono i risultati di complessi fenomeni nei quali la proteolisi e la conseguente capacità delle proteine di legare l'acqua gioca un ruolo maggiore, influenzando le loro interazioni con le altre macromolecole del sistema. Inoltre, la durezza e la masticabilità incidono sulla masticazione dei salami influenzando, di conseguenza, il rilascio e la percezione del sapore (Buettner & Schieberle, 2000).

Differenze significative sono ancora più basse nei salami tipo Milano. La durezza segue lo stesso andamento osservato nei salami tipo Felino. I punteggi più alti nel sapore acido sono ancora correlati con le più basse quantità di esanale e di 1-otten-3-olo. Questa osservazione rafforza la considerazione espressa da Olivares *et al.* (2009) e Adhikari *et al.*, (2006), in accordo con i quali la percezione dell'aroma nella carne fermentata dipende non solo dalla concentrazione e dalla soglia di odore dei composti volatili, ma anche dalla loro interazione con altri componenti alimentari e tra i composti volatili.

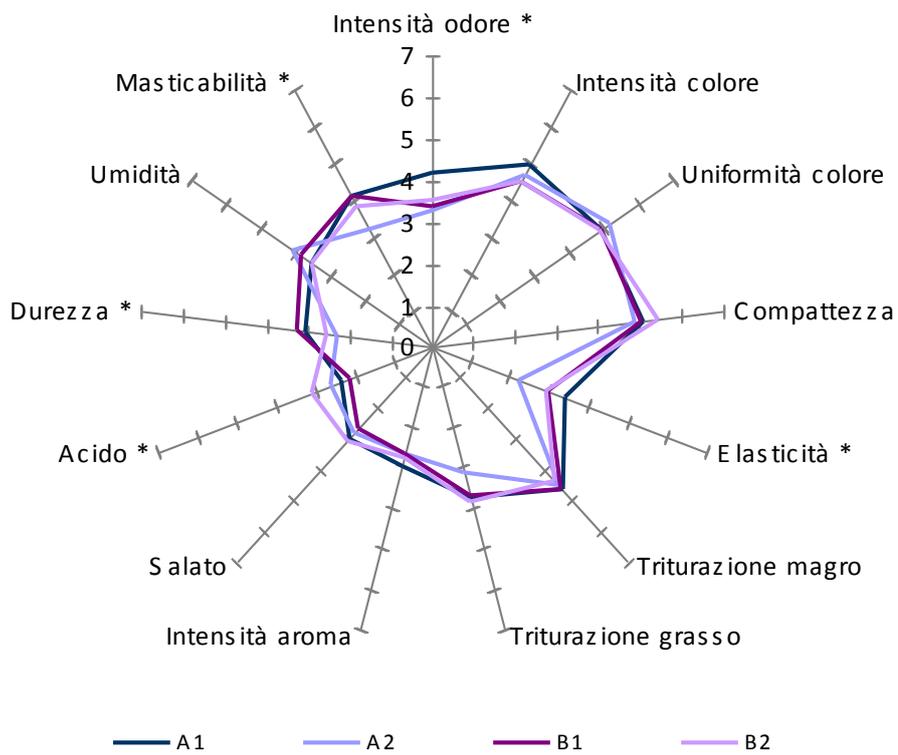


Figura 4.5: Profilo sensoriale di salami tipo Felino (sono omessi i descrittori piccante ed amaro).

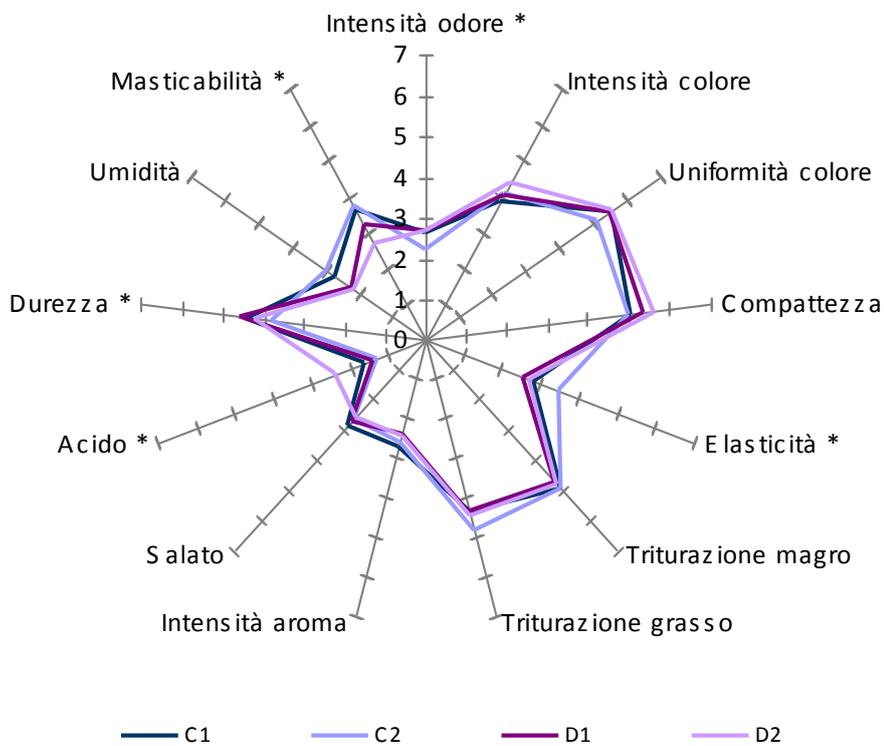


Figura 4.6: Profilo sensoriale di salami tipo Milano (sono omessi i descrittori piccante ed amaro).

Capitolo 5: Conclusioni

Il salame fermentato è una generica definizione che include un'estesa varietà di prodotti carnei basati sulla fermentazione di una miscela di carne magra e grassa macinata con aggiunta di sale, spezie e altri additivi e insaccata in budelli. Le differenze e, conseguentemente, la peculiarità di ogni prodotto regionale dipendono da un'ampia varietà delle materie prime e dei processi tecnologici nei quali, durante gli stadi di maturazione, giocano un ruolo fondamentale le caratteristiche delle materie prime, le colture starter usate e le condizioni di asciugamento e maturazione (temperatura e umidità) (Toldrà, 2006; Zambonelli *et al.*, 1992; Del Monte *et al.*, 1990).

Le condizioni applicate durante i primi giorni dopo l'insaccamento sono in grado di influenzare tutte le successive attività microbiologiche, sia qualitativamente che quantitativamente (Bover-Cid *et al.*, 2009; Feiner, 2006; Gardini *et al.*, 2008). E' stato dimostrato che la temperatura applicata nelle prime 72 ore, durante le quali avviene la fermentazione, influenza il rapporto tra le popolazioni microbiche presenti nei salami con effetti drastici sui rapporti microbici e sull'accumulo di ammine biogene; gli effetti sono verificabili anche dopo 30 giorni di maturazione (Bover-Cid *et al.*, 2009; Gardini *et al.*, 2008).

Anche per i salami tipo Felino e tipo Milano esaminati in questo studio ci sono molte evidenze che le differenze ambientali nei primi stadi della maturazione determinano diverse caratteristiche finali sull'aspetto dei salami e sul loro profilo sensoriale, come la resistenza al taglio e la durezza. In ogni caso, le maggiori differenze emerse sembrano essere associate alla scelta delle colture starter (Ammor & Mayo, 2007; Talon & Leroy, 2011).

Nei salami fermentati tradizionali italiani le condizioni d'asciugamento applicate nei primi giorni giocano un ruolo chiave durante il periodo di maturazione. In questa fase, possono avvenire difetti come l'indurimento del budello e l'eccessiva crescita di muffe. La modulazione del microbiota del salame, in particolare quella superficiale, può essere ottenuta applicando condizioni appropriate nelle celle d'asciugamento (Grassi & Montanari, 2005). Il difetto di muffa può essere evitato usando valori di umidità più bassi durante l'asciugamento, che devono essere controbilanciati da un periodo di spegnimento per ridurre il rischio di indurimento del budello (Zambonelli *et al.*, 1992; Del Monte *et al.*, 1990).

Ciò è stato particolarmente evidente nei salami tipo Felino nei quali è stato osservato un contenuto d'acqua nettamente superiore durante l'asciugamento. Inoltre, secondo il panel test, gli stessi salami mostrano valori di durezza e resistenza al taglio più bassi.

L'utilizzo di stafilococchi come colture starter per la fermentazione della carne ha diversi vantaggi dovuti alle loro attività di nitrato/nitrito riduttasi e catalasi; queste consumano ossigeno e possono fermentare lo zucchero producendo acido lattico. Inoltre, le loro specifiche attività legate alle proteasi e alle peptidasi possono influenzare il profilo aromatico nei salami.

In alcuni salami tradizionali italiani (come i salami tipo Felino), gli stafilococchi sono usati come colture starter senza l'aggiunta di ceppi di batteri lattici perché la loro attività conferisce al salame un sapore "dolce" anziché "acido", che è preferito dai consumatori (Zambonelli *et al.*, 1992). In entrambi i salami sono state osservate attività specifiche, attribuibili agli stafilococchi usati come colture starter, come il metabolismo della fenilalanina.

Tuttavia, in queste prove, gli stafilococchi aggiunti nei salmi tipo Felino, in assenza dei lactobacilli selezionati usati nei salami tipo Milano, non sono stati in grado di garantire un rapido calo del pH e di evitare la crescita di microrganismi aminobiogenetici.

Comunque, le condizioni adottate durante l'asciugamento sono state in grado d'influenzare alcuni risultati nelle analisi sensoriali dei prodotti finiti; in particolare, la durezza e la masticabilità sono risultate più basse nei salami nei quali è stato usato il processo d'asciugamento modificato, a causa delle differenti cinetiche di perdita d'acqua. Il ruolo del programma d'asciugamento modificato, nell'evitare la presenza di odore "di muffa" nei salami tipo Felino, non può essere chiarito perché in questa produzione il difetto non è stato percepito né nei salami tradizionali né in quelli modificati.

Bibliografia

- **Ababouch, L., Afilal, M. E., Benabdeljelil, H., Busta, F. (1991).**
Quantitative changes in bacteria, amino-acids and biogenic amines in sardine, stored at ambient temperature (25°C) and in ice. *International Journal of Food Science and Technology* n° 26, 297-306.
- **Adhikari, K., Hein, K. A., Elmore, J. R., Heymann, H., & Willott, A. M. (2006).**
Flavor threshold as affected by interaction among three dairy-related flavor compounds. *Journal of Sensory Studies*, 21(6), 626-643.
- **Ammor, M.S., & Mayo, B. (2007).**
Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science*, 76(1), 138-146.
- **Ancìn-Azpilicueta, C., Gonzáles-Marco, A., Jiménez-Moreno, N. (2008).**
Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* n° 48: 3, 257-275.
- **Ansorena, D., Montel, M. C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., et al. (2002).**
Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61(2), 141-147.
- **Ardö, Y. (2006).**
Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances*, 24(2), 238-242.
- **Askar, K. R. G., Treptow, H. (1996).**
Biogene Amine in Lebensmitteln. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. Eugen Ulmer GmbH and Co., Stuttgart, Germany.
- **Ayhan, K., Kolsarici, N., Ozkan, G.A. (1999).**
The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *International Journal of Food Microbiology* 53, 183-188.
- **Bauer, F., Seuss, I., Paulsen, P. and Vali, S. (1994).**
The formation of biogenic amines in meat and meat products. In *Proceedings of 40th 10 International Congress of Meat Science Technology*. S-V 25.

- **Bjeldanes, L. F., Schutz, D. E., Morris, M. M. (1978).**
On the aetiology of sgombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea pig. *Food and Cosmetics Toxicology* n° 16, 157-159.
- **Bover-Cid, S., Holzappel, W. H. (1999).**
Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* n° 53, 33-41.
- **Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (1999).**
Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science* 51, 305 - 311.
- **Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. (2000).**
Influence of hygienic quality of raw material on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 63, 1544-1550.
- **Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C.(2001a).**
Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology* 66, 185-189.
- **Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., (2001b)**
Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 65, 113– 123.
- **Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N., & Gardini, F. (2009).**
Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1397-1407.
- **Buettner, A., & Schieberle, P. (2000).**
Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles and some aspects of flavour release and flavour perception. *Food Chemistry*, 71, 347-354.

- **Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňáková, Z., Nováková, D., & Dráb, V. (2009).**
Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 229(3), 533-538.
- **Cantoni, C., Bersani, C., Damenis, L., Comi, G. (1994).**
Ammine biogene negli insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentari* 23, 1239-1243.
- **Chander, H., Batish, V. K., Babu, S., Bhatia, K. L. (1988).**
Studies on optimal conditions for amine production by *E. coli*. *Milchwissenschaft* 43, 90-91.
- **Chander, H., Batish, V. H., Babu, S., Singh, R. S. (1989).**
Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science* 54, 940-942.
- **Chiavari, C., Coloretti, F., Ferri, G., & Nanni, M. (2007).**
Proposta di un metodo per l'analisi sensoriale dei salami. *Industrie Alimentari*, 46, 507-518.
- **Chiavari, C., Coloretti, F., Armaforte, E., Carri, S., & Castagnetti, G.B. (2008).**
Combined use of starter cultures and preservatives to control production of biogenic amines and improve sensorial profile in low-acid salami. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11238-11244.
- **Comi, G., Citterio, B., Manzano, M., Cantoni, C., Debertoldi, M. (1992).**
Evaluation and characterization of *micrococcaceae* strains in italian dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft*, 72 (12), 1679-1683.
- **Cooper, R. A. (1997).**
On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, 146(1), 85-89.
- **Crock, M. (1981).**
Migraine: a biochemical headache. *Biochemical Society Transactions* 9, 351-357.
- **de Llano, D.G., Cuesta, P., Rodriguez, A. (1998).**
Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology* 26, 270-274.

- **Del Monte, P., Magnani, U., & Monari, M. (1990).**
L'industria dei salumi. Bologna - Edagricole.
- **Delarras, C. (1982).**
Etude de l'activite lipolytique des *Micrococcaceae*, Revue Francaise des Corps Gras, 29 annee 4, 165.
- **Demeyer, D. (2004).**
Meat fermentation: principles and applications. In Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, Ö Solvejg Hansen, J. Josephsen, W. K. Nip, P. S. Stanfield, et al. (Eds.), Handbook of food and beverage fermentation technology. CRC Press, Chapter 17.
- **Dierick, N., Vandekerckhove, P. V., and Demeyer, D. (1974).**
Changes in nonprotein compounds during dry sausage ripening, Journal of Food Science, 39, 301.
- **Edwards, S. T., Sandine, S. L. (1981).**
Public health significance of amine in cheese. Journal of Dairy Science n° 64, 2431-2438.
- **Edwards, S. T., Dainty, R.H., Hibbard, C.M., Ramantanis, S.V. (1987).**
Amines in fresh beef of normal pH and the role of bacteria in changes in concentration observed during storage in vacuum packs at chill temperatures
Journal of Applied Microbiology, 63, 427-434.
- **Eerola, H.S., Roig sagues, A.X., Hirvi, T.K. (1998).**
Biogenic amines in finnish dry sausages. Journal of Food Safety, Volume 18, Issue 2, pages 127-138.
- **EFSA. (2011).**
Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9(10), 2393-2486.
- **Eitenmiller, R.R., Koehler, P.E. and Reagan, J.O. (1978).**
Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. Journal of Food Science 43, 689-693.
- **Feiner, G. (2006).**
Meat products handbook: Practical science and technology. Woodhead Publishing Limited.

- **Fernández, M., & Zúñiga, M. (2006).**
Amino acid catabolic pathway of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(3), 155-183.
- **Flores, M., Sanz, Y., Spanier, A. M., Aristoy, M. C., and Toldra, F. (1998).**
In: E. T. Contis, C. T. Ho, C. J. Mussinan, T. H. Parliament, F. Shahidi, and A. M. Spanier (eds.) *Food flavors: Formation, analysis and packaging influences*. p 547, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
- **Gale, E. F. (1946).**
The bacterial amino acid decarboxylase. *Advances in Enzymology* 6, 1-32.
- **Gardini, F., Bover-Cid, S., Tofalo, R., Belletti, N., Gatto, V., Suzzi, G., et al. (2008).**
Modeling the aminogenic potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2740-2750.
- **Grassi, A., & Montanari, R. (2005).**
Simulation of the thermodynamic patterns in an ascending flow ripening chamber. *Journal of Food Engineering*, 68(1), 113-123.
- **Groot, M. N. N., & De Bont, J. A. M. (1998).**
Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3009-3013.
- **Gummalla, S., & Broadbent, J. R. (2001).**
Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus* cheese flavor adjuncts. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1011-1019.
- **Guo, S. L. and Chen, M. T. (1991).**
Studies on the microbial flora of Chinese-style sausage. I. The microbial flora and its biochemical characteristics, *Fleischwirtsch.*, 71, 1425.
- **Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994).**
Biogenic amines and their production by micro-organisms in food. *Trends in Food Science & Technology* n° 5, 42-48.

- **Hammes, W. P., Bosch, I., and Wolf, G. (1995).**
Contribution of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans* to the fermentation of protein foods, *Journal of Applied Bacteriology - Symposium Supplement*, 79, 76S.
- **Hammes, W. P., Haller, D., Michael, G., & Gänzle, W. (2003).**
Fermented meat. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods*. CRC Press, Chapter 10.
- **Henry Chin, K.D., Koehler, P.E. (1986).**
Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenethylamine. Tryptamine and tyramine during miso fermentation. *Journal of Food Protection* 49, 423-427.
- **Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. (1996a).**
Biogenic amine sources in coke cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3097-3101.
- **Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. (1996b).**
Ion pair liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Foods Chemistry* 44, 2710-2715.
- **Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C. (1997).**
Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* n° 45: 2098-102.
- **Hierro, E.M., Ordóñez, J. A., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999).**
Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39 (4), 329-367.
- **Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997).**
Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59(4), 547-554.
- **Ienistea (1973).**
Significance and detection of histamine in food. *The microbiological safety of food* eds. Hobbs, B. C. and Christian, J. H. B., 327-343.

- **Joosten, H. M. L. J., Stadhouders, J. (1987).**
Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Neth Milk Dairy J.* 41: 247-58.
- **Jørgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., (2000).**
The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology* 89, 920-934.
- **Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007).**
Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1467-1473.
- **Kröckel, L. (1995).**
Bacterial fermentation of meats, in *Fermented Meats*, Campbell-Platt, G. and Cook, P. E., Eds., Blackie Academic and Professional, Suffolk, 69.
- **Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., Gardini, F. (2007).**
Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, 104, 693-701.
- **Landeta, G., de las Rivas, B., Carrascosa, A. V., & Muñoz, R. (2007).**
Screening of biogenic amine production by coagulase-negative staphylococci isolated during industrial Spanish dry-cured ham processes. *Meat Science*, 77(4), 556-561.
- **Landete, J. M., de las Rivas, B., Marcobal, A., & Muñoz, R. (2008).**
Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(8), 697-714.
- **Law, B. A. (1980).**
Microorganisms and Nitrogen Sources, Payne, J. W., Ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- **Law, B. A. and Kolstad, J. (1983).**
Proteolytic systems in lactic acid bacteria, *Antoine van Leeuwenhoek*, 49, 225.
- **Lehane, L., Olley, J. (2000).**
Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology* n°58, 1-37.

- **Lonvaud-Funel, A. (2001).**
Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199, 9-13.
- **Lücke, F. K. (1985).**
The microbiology of fermented meats, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 1342.
- **Lücke, F. K. and Hechelmann, H. (1988).**
Cultivos starter para embutido seco y jamón curado. Composición y efecto, *Fleischwirtsch. español*, 1, 38.
- **Luongo, D., Giagnacovo, B., Fiume, I., Iorizzo, M., & Coppola, R. (2001).**
Volatile compounds in “soppressata molisana” style salami fermented by *Lactobacillus sakei*. *Italian Journal of Food Science*, 13(1), 19-28.
- **Maijala, R., Eerola, S. (1993).**
Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science* 35, 387-395.
- **Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P., Hirvi, T. (1995).**
Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affect by starter cultures and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science* 69, 1187-1190.
- **Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., and Rondinini, G. (2000)**
The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology* 31, 169-173.
- **Martin, M. (1975).**
Technologie du saucisson sec. Contribution a l'étude des phénomènes physicochimiques, Doctoral thesis, Universidad Paul Sabatier, Toulouse, France.
- **Martuscelli, M., Crudele, M. A., Gardini, F., & Suzzi, G. (2000).**
Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31(3), 228-232.
- **Masson, F., Hinrichsen, L., Talon, R., & Montel, M. C. (1999).**
Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 49(3), 173-178.

- **McCabe, B. J. (1986).**
Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimense. A review. Journal of the American Dietetic Association 86, 1059-1064.
- **Mirade, P. S. (2007).**
CFD modelling of indoor atmosphere and water exchanges during the cheese ripening process. In D. W. Sun (Ed.), Computational fluid dynamics in food processing (pp. 697e726). Boca Raton, FL, USA: CRC Press and Taylor & Francis Group.
- **Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. (1997).**
The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. Food Chemistry 59:539-545.
- **Montel, M. C., Talon, R., Cantonnet, M., Cayrol, J. (1992a).**
Peptidasic activities of starter cultures, in Proc. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, 811.
- **Montel, M. C., Talon, R., Cantonnet, M., Fournaud, J. (1992b).**
Identification of *Staphylococcus* from French dry sausage. Letters in applied microbiology, volume 15, 73-77.
- **Montel, M. C., Masson, F., Talon, R. (1999).**
Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. Sciences des Aliments 19, 247-254.
- **Moreno-Arribas, V., & Lonvaud Funel, A. (1999).**
Tyrosine decarboxylase activity of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809 isolated from wine and *L. brevis* ATCC 367. FEMS Microbiology Letters, 180(1), 55-60.
- **Morii, H., Cann, D.C., Taylor, L.Y., (1988).**
Histamine formation by luminous bacteria in mackarel stored at low temperature. Nippon Suisan Gakkaishi 54, 299-305.
- **Navarro, J. L., Nadal, M. I., Izquierdo, L., & Flores, J. (1997).**
Lipolysis in dry cured sausages as affected by processing conditions. Meat Science, 45(2), 161-168.

- **Nordal, J. and Slinde, E. (1980).**
Characteristics of some lactic acid bacteria as starter cultures in dry sausage production, *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 472.
- **Olesen, P. T., & Stahnke, L. H. (2004).**
The influence of environmental parameters on the catabolism of branched-chain amino acids by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Food Microbiology*, 21(1), 43-50.
- **Olivares, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2009).**
Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*, 115(4), 1464-1472.
- **Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999).**
Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4), 329-367.
- **Palumbo, S. A., Zaika, L. L., Kissinger, J. C., and Smith, J. L. (1976).**
Microbiology and technology of the pepperoni process, *Journal of Food Science*, 41, 12.
- **Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., Suzzi, G. (2001).**
Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 882-891.
- **Paulsen, P., Bauer, F. (1997).**
Biogenic amines in fermented sausages: 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft International* 77, 32-34.
- **Pessione, E., Pessione, A., Lamberti, C., Coisson, D. J., Riedel, K., Mazzoli, R., et al. (2009).**
First evidence of a membrane-bound, tyramine and b-phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: a twodimensional electrophoresis proteomic study. *Proteomics*, 9(10), 2695-2710.

- **Pircher, A., Bauer, F., & Paulsen, P. (2007).**
Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*, 226(1e2), 225-231.
- **Ravindran, P. N., & Kallapurackal, J. A. (2001).**
Black pepper. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices* (pp. 62-110). U.K - Woodhead Pub.
- **Rice, S., Eitenmiller, R. R., Koehler, P. E. (1976).**
Biologically active amine in food. A review. *Journal of Milk and Food Technology* 39, 353-358.
- **Rodríguez-Jerez, J.J., Colavita, G., Giaccone, V., Parisi, E. (1994a).**
Bacillus macerans, a new potential histamine producing bacteria isolated from Italian cheese. *Food Microbiology* 11, 409-415.
- **Rodríguez-Jerez, J. J., Mora-Ventura, M. T., LoÂpez-Sabater, E. I., HernaÂndez-Herrero, M. M. (1994b).**
Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in salted semi-preserved anchovies. *Journal of Food Protection* 57, 784-787.
- **Roig-Sagués, A. X., HernaÂndez-Herrero, M., LoÂpez-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J. and Mora-Ventura, M. T. (1996).**
Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened Salchichon, a Spanish cured sausage. *Journal of Food Protection* 59, 516-520.
- **Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E. I., Rodríguez-Jerez, J. J., Mora-Ventura, M. T. (1999).**
Microbiological events during the elaboration of “fuet”, a Spanish ripened sausages. Relationships between the development of histidine and tyrosine decarboxylase containing bacteria and pH and water activity. *European Food Research and Technology* 209, 108-112.

- **Rossi, F., Gardini, F., Rizzotti, L., La Gioia, F., Tabanelli, G., & Torriani, S. (2011).**
Features of the histidine decarboxylase activity of *Streptococcus thermophilus* PRI60: quantitative analysis of hdcA transcription and factors influencing histamine production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2817-2822.
- **Sanz, Y. and Toldrà, F. (1999).**
The role of exopeptidases from *Lactobacillus sakei* in dry fermented sausages. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry* 3:11-21.
- **Selgas, M. D., Sanz, B., and Ordóñez, J. A. (1988).**
Selected characteristics of micrococci isolated from Spanish dry-fermented sausages, *Food Microbiology*, 5, 185.
- **Selgas, D., García, L., García de Fernando, G., and Ordóñez, J. A. (1993).**
Lipolytic and proteolytic activity of micrococci isolated from Dry-fermented sausages, *Fleischwirtsch.*, 73, 1164.
- **Señorez, B., Isikli, N., Coksoyler, N. (2000).**
Biogenic amines in Turkish sausages (Sucucks). *Journal of Food Science*, 65, 764-767.
- **Shalaby, A. R. (1996).**
Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*.
- **Silla Santos, M. H. (1996).**
Biogenic amines: their importance in food. *International Journal Food Microbiology* n° 29, 213-231.
- **Silla Santos (1998).**
Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal Food Microbiology* 39, 227-230.
- **Stahnke, L. (1999).**
Volatiles produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces. Part I. Collection and identification. *Lebensmittel-wissenschaft & Technologie*, 32(6), 357-364.

- **Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L. (1991).**
Biogenic amine in cheese and other fermented foods. *Journal of Food Protection* 54, 460-470.
- **Sumner, S. S., Speckhard, H. W., Somers, E. B., Taylor, S. L. (1990).**
Factors controlling histamine production in Swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science* 73, 3050-3058.
- **Sunesen, L. O., & Stahnke, L. H. (2003).**
Mould starter cultures for dry sausages selection, application and effects. *Meat Science*, 65(3), 935-948.
- **Suzzi, G., Gardini, F. (2003).**
Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54.
- **Tabanelli, G., Coloretti, F., Chiavari, C., Grazia, L., Panciotti, R., Gardini, F. (2012).**
Effects of starter cultures and environmental conditions on industrial productions of two types of typical italian dry fermented sausages. *Food Control* 26, 416-426.
- **Talon, R., Leroy, S., & Lebert, I. (2007).**
Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77(1), 55-62.
- **Talon, R., & Leroy, S. (2011).**
Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89(3), 303-309.
- **Taylor, S. L.(1985).**
Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods. World Health Organization, Geneva.
- **ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., Huis in 't Veld, J. H. J. (1990).**
Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*.
- **Tiecco, G., Tantillo, G., Francioso, E., Paparella, A., De Natale, G. (1986).**
Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel corso della stagionatura. *Industrie Alimentari* 5, 209-213.

- **Toldrà, F., Rico, E., Flores, J. (1992).**
Activities of pork muscle proteases in model cured meat systems, *Biochimie*, 74 Pages: 291-296 acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199, 9-13. Amine in cheese. *Journal of Dairy Science* 64, 2431-2438. and human health. *Food Research International* 29, 675-690.
- **Toldra, F. and Flores, M. (1998).**
The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 38:331-352.
- **Toldrá, F., Sanz, Y., Flores, M., (2001).**
Meat fermentation technology. In: Hui, Y. H., Shorthose, R., Young, O., Koohmaraie, M., Rogers, R. (Eds.), *Meat Science and Applications*. Marcel Dekker INC, New York, pp. 537-561.
- **Toldrá, F. (2006).**
Chapter 181. Meat Fermentation. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, Volume Four Edited by Y. H. Hui CRC Press 2006.
- **Yvon, M., & Rijnen, L. (2001).**
Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11(4e7), 185-201.
- **Zambonelli, C., Papa, F., Romano, P., Suzzi, G., & Grazia, L. (1992).**
Microbiologia dei salumi. Bologna - Ed agricole.
- **Zambonelli, C., Tini, V., Giudici, P., Grazia, L. (2001).**
Microbiologia Degli Alimenti Fermentati. Edagricole - Edizioni Agricole della Calderoni s.r.l., Bologna, 1° edizione.

Ringraziamenti

Arrivato a questo punto non posso che esprimere la mia gratitudine per le persone che mi hanno dato la possibilità di affrontare e approfondire il presente argomento di tesi.

Per primo ringrazio il Prof. Fausto Gardini, relatore di questo elaborato, per tutto il tempo che mi ha dedicato sia durante il periodo di tirocinio sia durante tutto l'iter della tesi, ma anche per la sua grande umanità e per il suo ottimismo con i quali è riuscito a rallegrarmi nei momenti di preoccupazione e non solo.

In secondo luogo, ma non per minore importanza, un grande e sentito ringraziamento alla correlatrice, Dott.ssa Giulia Tabanelli, per tutte le ore che ha impiegato per il mio lavoro, per quanto a sua volta ha dovuto fare, per i consigli e gli insegnamenti che mi ha dato in questi mesi, ma soprattutto perché mi ha sempre sopportato.

Un sincero ringraziamento va anche alla direzione di ALCISA S.p.A. che ha permesso la mia esperienza di tirocinio all'interno dell'azienda, in particolare al Dott. Claudio Mazzini, al Sig. Massimo Bacchi e ad altri dipendenti per la loro grande disponibilità, per tutte le spiegazioni datemi in maniera semplice ma dettagliata e soprattutto perché mi hanno fornito il materiale oggetto di studio.

Ringrazio anche il Prof. Luigi Grazia, il Dott. Fabio Coloretti, la Dott.ssa Cristiana Chiavari e l'intero gruppo panel per aver partecipato a questo progetto.

La mia riconoscenza va poi alla mia famiglia: ai miei genitori che, oltre ad avermi sostenuto economicamente in questi anni, con il loro affetto hanno condiviso con me successi e momenti difficili; ai miei nonni che mi hanno sempre incoraggiato.

Infine ringrazio Marta, la mia ragazza, che durante gli anni universitari mi è sempre stata vicina, anche se fisicamente eravamo lontani, con il suo amore e la sua comprensione.

Non posso poi non ricordare gli amici, quelli di sempre e quelli conosciuti all'università: con tutti ci siamo aiutati reciprocamente per superare gli ostacoli incontrati nello studio, ma con i quali ho trascorso anche bellissimi momenti di svago.