

PREMESSA

Gli alimenti di origine animale, in virtù della loro valenza nutritiva e della cultura che essi racchiudono, hanno da sempre rappresentato una viva fonte di interesse.

Già Ippocrate, padre della medicina, quattro secoli e mezzo prima di Cristo, apprezzava la carne di maiale e la descriveva come un alimento altamente digeribile, capace di fornire forza al corpo umano.

È tra i romani, come scrive Catone il Censore, che si diffonde la tecnica di conservare le cosce del suino mediante salatura e successiva asciugatura, anche se, in realtà, l'osservazione empirica della capacità conservante del sale è ancora più antica.

Anche i Galli conservavano ed insaccavano le carni suine, così come facevano i Longobardi, che consumavano grandi quantità di carni suine per lo più salate e trasformate.

Attraverso i secoli la fama degli insaccati suini va sempre più accrescendosi, a tal punto che nel cinquecento divengono l'oggetto ispiratore di alcuni sonetti.

Anche in tempi più recenti tali prodotti sono ampiamente decantati e non mancano ammiratori di prestigio, tanto da ricevere la prestigiosa ammirazione da parte di Gabriele D'Annunzio che si autodefinisce "cupidissimo amatore" del culatello.

Allo stato attuale i prodotti carnei stagionati, forti di una tradizione ed una cultura antichissima e affascinante, costituiscono un tassello importante del mosaico dei consumi moderni. Negli ultimi anni in Italia, a differenza di altri comparti che hanno visto una certa recessione dettata dalle restrizioni economiche globali, quello dei salumi ha fatto registrare una lieve crescita dei consumi attestandosi mediamente a circa 2,3 milioni di tonnellate (dati ISMEA aprile 2008). La particolare evoluzione positiva dei consumi è da ascrivere a vari fattori ed in particolare al dinamismo dell'offerta, in grado di proporre un elevato numero di prodotti ricchi di chiari tratti di identità ed allo stesso tempo in possesso dei requisiti rispondenti alle esigenze dei consumi moderni.

Nell'attuale contesto alimentare, in cui il consumatore è sempre più attento alle note qualitative sia materiali sia immateriali, il panorama delle produzioni italiane evidenzia notevoli potenzialità.

L'Italia, insieme alla Germania e alla Spagna, è infatti il paese in cui la tradizione norcina è maggiormente radicata e in cui l'offerta di prodotti, tra di loro differenti, è maggiore. Ogni Regione e in alcuni casi nell'ambito della stessa, ogni Comune, ha uno o più prodotti legati fortemente alla tradizione del territorio. A testimonianza di tale patrimonio sono le numerose certificazioni di tutela DOP, IGP e STG che sono state attribuite ai vari prodotti della tradizione norcina italiana.

I prestigiosi riconoscimenti attraverso i marchi di certificazione a tutela del prodotto sono sicuramente un elemento essenziale per il futuro di prodotti ricchi di tradizione. Tuttavia, affinché tali prodotti possano permanere con successo nel mercato moderno, è necessario i "riconoscimenti di tradizionalità" siano accompagnati da opportuni strumenti tecnologici che rendono compatibile la coesistenza dei caratteri di unicità del prodotto con le esigenze moderne produttive e distributive.

La Ventricina, salume tradizionale dell'area territoriale a cavallo del fiume Trigno che si estende tra le regioni del Molise e dell'Abruzzo, può essere considerata uno dei prodotti della salumeria italiana che meglio identifica lo scontro tra i caratteri di unicità e le esigenze produttive moderne. La riduzione delle carni in cubetti, operazione condotta rigorosamente a mano, se da un lato rappresenta uno degli elementi caratterizzanti i tratti finali del prodotto dall'altro costituisce un limite di enorme entità per la preparazione del prodotto in un'ottica compatibile con gli attuali sistemi produttivi.

Condizione che sta determinando una sempre più incalzante esigenza di individuare tecnologie in grado di innovare in maniera puntuale il processo tradizionale di preparazione della ventricina senza rinunciare ai caratteri di unicità del prodotto.

INTRODUZIONE

CAPITOLO I

1. I PRODOTTI CARNEI TRASFORMATI

I prodotti ottenuti dalla trasformazione delle carni bene custodiscono ed identificano le arti produttive e gastronomiche dell'eterogeneo territorio italiano.

E' ampiamente riconosciuto che tali prodotti rappresentano una quota importante, peculiare e diversificata dell'alimentazione italiana. Identificano uno degli elementi più suggestivi della cultura dei popoli, esaltano ed incarnano l'immaterialità della tradizione che negli anni si sedimenta, si arricchisce e nel contempo si armonizza con le esigenze della modernità. In essi si sintetizzano e si annidano gli irripetibili fattori ambientali, le maestrie tramandata di generazioni in generazione, i razionali e spesso empirici metodi produttivi. Nota da evidenziare è il buon grado di dinamicità caratterizzanti tali prodotti; la continua ricerca nel migliorare e perfezionare gli aromi, la struttura, il valore nutrizionale, quindi la qualità, fanno dei prodotti a base di carne una perla dell'alimentazione destinata a splendere negli anni.

1.1 LA MATERIA PRIMA DA TRASFORMARE, LA CARNE

La carne è il prodotto di una serie di modificazioni che interessano il tessuto muscolare dopo la morte dell'animale e che ne determinano la trasformazione.

Le modalità con cui questi processi avvengono dipendono dallo stato fisiologico in cui l'animale si trova al momento della macellazione, dalle condizioni in cui tale operazione viene svolta, dalle successive fasi di lavorazione, trasformazione e conservazione.

La composizione chimica, **tabella 1**, anche se influenzata da numerosi fattori (specie, tipo genetico, età, regime e tipo di alimentazione, tecnologia di allevamento), può essere così approssimata: 75% di acqua, 19% di proteine, 3,5% di sostanze solubili non proteiche, 2,5% di grasso.

**INFLUENZA DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E
CHIMICHE DELLA VENTRICINA**

Tabella 1. Composizione chimica di un tipico muscolo di mammifero adulto dopo il rigor-mortis ma prima del verificarsi di alterazioni degradative postmortalì. Fonte: Lawrie, 1983.

Componenti	Peso	Umido	%
1. Acqua			75,0
2. Proteine			19,0
(a) <i>Miofibrillari</i>		11,5	
<i>miosina* (mero miosine H e L, e varie proteine a catena corta ad esse</i>	6,5		
<i>actina*</i>	2,5		
<i>tropomiosine</i>	1,5		
<i>troponine C, I e T</i>	0,4		
<i>actinine α e β</i>	0,4		
<i>Proteina M, ecc.</i>	0,2		
(b) <i>Sarcoplasmatiche</i>		5,5	
<i>gliceraldeide fosfato deidrogenasi</i>	1,2		
<i>aldolasi</i>	0,6		
<i>creatine chinasi</i>	0,5		
<i>altri enzimi glicolitici</i>	2,2		
<i>mioglobina</i>	0,2		
<i>emoglobina ed altre proteine extracellulari non specificate</i>	0,6		
(c) <i>Tessuto connettivo ed organelli</i>		2,0	
<i>collagene</i>	1,0		
<i>elastina</i>	0,05		
<i>mitocondriali ecc. (compresi il citocromo c ed altri enzimi insolubili)</i>	0,95		
3. Lipidi		2,5	
<i>Lipidi neutri, fosfolipidi, acidi grassi, sostanze liposolubili</i>	2,5		
4. Carboidrati			
<i>glucosio-6-fosfato</i>	0,15		
<i>glicogeno</i>	0,10		
<i>glucosio, tracce di altri prodotti intermedi della glicolisi</i>	0,05		
5. Varie sostanze solubili			2,3
(a) <i>Azotate</i>		1,65	
<i>creatina</i>	0,55		
<i>inosina monofosfato</i>	0,30		
<i>di- e tri- fosfopiridina</i>	0,30		
<i>nucleotidi</i>	0,10		
<i>aminoacidi</i>	0,35		
<i>carnosina, anserina</i>	0,35		
(b) <i>Inorganiche</i>		0,65	
<i>fosforo totale solubile</i>	0,20		
<i>potassio</i>	0,35		
<i>sodio</i>	0,05		
<i>magnesio</i>	0,02		
6. Vitamine			
<i>Varie vitamine lipo- ed idro- solubili, in quantità molto piccole</i>			

Dopo la macellazione, la carne va incontro a diverse modificazioni dovute principalmente al perdurare delle attività da parte delle cellule, che compongono i tessuti, anche in seguito alla morte dell'animale. Nella fase successiva alla morte,

infatti, all'interno dei tessuti muscolari dell'animale avvengono una serie di importanti attività biochimiche che contribuiscono alla definizione dei caratteri finali di quella che sarà la carne.

In tale fase, in virtù delle condizioni che si instaurano, l'equilibrio che in vivo è presente tra anabolismo e catabolismo, si sposta verso i processi catabolici.

L'effetto più evidente ed importante dell'evoluzione di tali fenomeni è il *rigor-mortis* che sopraggiunge dopo alcune ore, variabili in funzione della specie, manifestandosi con l'irrigidimento delle masse muscolari, per poi scomparire progressivamente in 1 o 2 giorni.

Le variazioni di pH dei tessuti bene evidenzia l'evoluzione di tali processi. Da valori iniziali di neutralità pari a circa 7,4-7,5, caratterizzanti i tessuti dell'animale vivo e che permangono poco dopo la macellazione, il pH diminuisce rapidamente nel giro di poche ore raggiungendo valori di 5,3-5,5. Il decremento è da attribuire all'acido lattico che si forma durante la glicolisi anaerobica a partire dal glucosio derivante dal glicogeno cellulare. Tali valori hanno una durata limitata nel tempo in virtù dei successivi eventi che tendono a neutralizzare parzialmente l'acido lattico attraverso gli ioni calcio e sodio che si liberano per effetto della denaturazione delle proteine determinando la stabilizzazione del pH intorno a valori di 5,6-5,8.

L'effetto tangibile dell'insorgenza del *rigor-mortis* equivale ad un irrigidimento delle carni che diventano dure. Tale manifestazione è da ricondurre al consumo dell'ATP attraverso i processi glicolitici che rende irreversibili i legami tra actina e miosina che determinando la formazione di actomiosina.

Successivamente, per azione di enzimi proteolitici presenti nel sarcoplasma muscolare (calpaine attive a pH maggiore di 6 e le catepsine attivate invece da valori inferiori a 6), i muscoli si rilassano nuovamente. Quali siano però le strutture interessate non è ancora ben chiaro anche se, il tessuto connettivale non sembra interessato mentre un coinvolgimento delle strutture miofibrillari non è ancora accertato. Su queste ultime, è ipotizzabile una rottura dei legami che spiegherebbe il motivo per cui le carni inteneriscono senza che l'actomiosina subisca dissociazioni.

Sicuramente implicate nei processi proteolitici, sono le proteine sarcoplasmatiche dalle quali si formano peptidi ed aminoacidi. Questi fenomeni non si esauriscono nel breve termine ma anzi perdurano a lungo, come accade nei salumi a carne cruda (prosciutti e

simili, salami) il cui processo di maturazione e le cui caratteristiche organolettiche, sono dovute anche ad autolisi cellulare.

L'elevata percentuale di acqua e di proteine presenti, fanno della carne fresca un prodotto altamente deperibile. Infatti in queste condizioni, la carne rappresenta un mezzo ideale per lo sviluppo microbico, soprattutto se le condizioni di macellazione determinano la presenza di un elevato livello di contaminazione iniziale. In generale, i microrganismi sono quelli naturalmente presenti nel prodotto, a cui devono sommarsi quelli apportati attraverso contaminazioni di varia origine e quelli volutamente aggiunti come starter nei processi di trasformazione. Esistono differenti metodi con cui è possibile aumentare la shelf-life della carne e dei prodotti che ne derivano:

- Utilizzo delle basse temperature (refrigerazione, congelamento e surgelazione);
- Utilizzo delle basse temperature in associazione con modalità di confezionamento in atmosfera modificata (MAP) con elevata concentrazione di CO₂ (>25%);
- Utilizzo delle alte temperature (pastorizzazione, sterilizzazione);
- Abbattimento dell'attività dell'acqua (salagione, liofilizzazione essiccamento/affumicatura, aggiunta di addensanti);
- Impiego di agenti conservanti ad attività antimicrobica (battericidi/batteriostatici);
- Trattamenti con elevate pressioni (poco diffusi);
- Trattamenti con radiazioni ionizzanti (non consentiti in Europa).

1.2 I SALUMI

Il termine salume identifica, in maniera molto generica, prodotti alimentari a base di carne trattati e conservati per mezzo della salagione.

L'animale da cui generalmente si ottiene la carne per la preparazione di tali prodotti, è il suino. Tuttavia non si può escludere l'impiego esclusivo o in miscela, con le carni suine, di carni bovine, equine, ovine e di specie avicole.

La parte grassa è invece sempre di origine suina in quanto notoriamente dotata di caratteristiche tecnologiche ed organolettiche superiori rispetto a quelle del grasso proveniente da altre specie.

Tutti i salumi, indipendentemente dalla particolare tipologia di preparazione, hanno in comune la salagione la cui funzione è quella di aumentare ed assicurare la conservazione di prodotti altamente deteriorabili.

L'osservazione empirica dell'efficacia della salagione nella conservare la carne risale a tempi antichissimi tanto che già nel 1000 a.C. erano disponibili carni salate ed affumicate (Jensen, 1949a). Originariamente veniva effettuata spargendo, sulla superficie della carne, del sale grezzo naturale associato a varie impurità tra cui soprattutto i nitrati. Sono appunto il cloruro di sodio ed i nitrati che svolgono le azioni più importanti nelle fasi di conservazione. Il cloruro di sodio, inibisce lo sviluppo dei batteri dannosi favorendo quello dei microrganismi utili. I nitrati (che nei prodotti si riducono a nitriti), inibiscono lo sviluppo di batteri sporigeni anaerobi tossigeni resistenti agli altri trattamenti.

I prodotti carnei accumulati dall'evento della salagione, come riportato da Manetti e Tosonotti (1984), i salumi prodotti in Italia, possono essere ricondotti a cinque tradizioni fondamentali che ne permettono una classificazione geografica:

1. *Germanica Mitteleuropea*, che comprende Valle d'Aosta e Trentino-Alto Adige.
2. *Celtica*, comprendente Liguria, Piemonte, Lombardia Veneto ed Emilia Romagna.
3. *Etrusco-Latina*, comprendente Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo e Molise.
4. *Greca*, comprendente Campania, Basilicata, Calabria, Puglia e Sicilia.

5. *Punico-Fenicia*, limitata alla sola Sardegna.

Allo stato attuale, le suddivisioni tradizionali sono però largamente superate dalla realtà produttiva che si è venuta a creare in conseguenza dello sviluppo delle grandi realtà industriali. Condizione che hanno determinato la comparsa su ampia scala di prodotti originariamente poco noti e diffuse solo nell'area di origine.

Una più precisa differenziazione e/o classificazione dei salumi può essere fatta in funzione di vari fattori:

- Origine animale della carne, esclusivamente suina oppure mista;
- Modalità di preparazione (triturazione) della parte magra;
- Modalità di preparazione della parte grassa (lardo in cubetti o tritato);
- Intensità della salagione e tipo/quantità di spezie aggiunte;
- Tipo di budello impiegato e di conseguenza dimensioni del prodotto, nonché tipo di legatura;
- Sviluppo di muffe sulla superficie;
- Condizioni/tempi di stagionatura.

1.3 CLASSIFICAZIONE DEI SALUMI

In funzione delle modalità di produzione e dei trattamenti applicati, i salumi **figura 1**, possono essere classificati sulla base dello schema riportato in **figura 2**, in due grandi categorie:

1. *Salumi non insaccati* (pezzo anatomico intero)
2. *Salumi insaccati* (carne tritata)

I salumi non insaccati, sono rappresentati da una serie di prodotti ottenuti attraverso la salagione, l'aggiunta di spezie e l'eventuale cottura ed affumicatura di parti anatomiche intere comprendenti anche la struttura ossea (coscia, spalla ecc.), oppure disossate (lombi, coppa, pancetta ecc.).



Figura 1. Salumi italiani

Tra i principali prodotti appartenenti a tale categoria sono da distinguere quelli crudi da quelli cotti in:

- *Prosciutto crudo*, realizzato a partire dalla coscia di suino. Tra i prodotti di salumeria è il più conosciuto ed apprezzato. Il suo consumo infatti è in continua crescita e oltre ai prosciutti tipici di alcune zone, (Parma, San Daniele, Veneto) è oggi possibile reperire una grande quantità di prodotti simili. Per la sua produzione, si utilizza come conservante solo il sale senza alcuna aggiunta di nitrati o nitriti che ne fanno di un prodotto qualitativamente valido non solo dal punto di vista organolettico.

- *Coppa e simili*, rientrano in questa categoria la coppa, la bresaola (preparata a partire dalla coscia di manzo), il culatello, la spalla, tutti salumi che hanno in comune il fatto di essere preparati con parti anatomiche intere salate e stagionate.
- *Pancetta e bacon*, sono prodotti simili ma che differiscono per la natura della materia prima, per le modalità di salagione e per il trattamento o non trattamento con affumicamento. La pancetta poi è un tipico prodotto italiano mentre il bacon è prodotto e consumato prevalentemente nei paesi nord europei.
- *Prosciutto cotto*, negli ultimi anni la tecnologia di produzione si è molto perfezionata raggiungendo elevati margini di sicurezza riguardo la conservabilità. Anche in questo caso la materia prima è la coscia di suino. Un tempo erano destinate a tale produzione le cosce giudicate non idonee alla lavorazione del prosciutto crudo, oggi, a causa della forte richiesta del consumatore, una buona percentuale del prodotto è ottenuto da cosce di suini, caratterizzati da un'elevata precocità di sviluppo, allevati a tale scopo. Oltre al prosciutto cotto in senso stretto, appartenenti alla stessa categoria sono da ricordare prodotti simili quali la spalla cotta, arrosti vari, prosciutti cotti ricostituiti (composti da scarti di lavorazione del crudo opportunamente preparati e pressati).

I salumi insaccati, prodotti a partire da carni crude e tritate, si dividono in due grandi categorie: quelli di pronto consumo e quelli destinati alla trasformazione per via fermentativa. I primi sono rappresentati da salsicce, cotechini e zamponi, i secondi da salami di vario tipo.

Per le salsicce, i cotechini e gli zamponi, il presupposto tecnologico fondamentale è l'assenza di uno sviluppo microbico. Essendo prodotti che non subiscono alcuna trasformazione fermentativa, non possono essere consumati crudi, ma devono essere sottoposti a cottura prima del consumo.

I salami invece, sono il prodotto della fermentazione lattica di carni crude tritate, salate, miscelate con grasso, addizionate di varie spezie, insaccate e pressate in budelli naturali o sintetici.

Prodotti carnei salati	Pezzo anatomico intero	Crudi	Affumicati		Prosciutti di Westfalia e Praga, bacon, Speck
			Non affumicati		Prosciutti, Culatello, Pancetta, Lardo, Bresaola, Violino, ecc.
		Cotti	Affumicati		Prosciutto cotto affumicato
			Non affumicati		Prosciutto, Spalla, Arista, Lombata, Arrosto
	Carne trita	Crudi	Fermentati	Affumicati	Salame Ungherese, Salame Napoletano
				Non affumicati	Salami
			Non fermentati	Non affumicati	Salsiccia, Cotechino, Zampone
		Cotti	Affumicati		Wurstel, Salame cotto affumicato
			Non affumicati		Mortadella, Salame cotto

Figura 2. Classificazione dei salumi. Fonte Zambonelli 1992

1.4 I PRODOTTI DI SALUMERIA TIPICI E TRADIZIONALI

Anche se esiste una netta distinzione tra i termini “tradizionale” e “tipico”, molto spesso questi vengono confusi ed identificati come simili.

Il prodotto tradizionale è legato, appunto, alla tradizione, alla continuità delle informazioni che non subiscono interruzioni e si trasmettono di generazione in generazione. Tutte le fasi di realizzazione di un prodotto sono tramandate nel tempo, si fa riferimento ad un sapere pratico. Tutte le fasi della lavorazione (es. raccolta delle spezie, tempi, ritmi di lavorazione etc..) vengono osservati e riprodotti.

Tradizionale è ciò che viene trasmesso, “tradito” di persona in persona, di generazione in generazione, dove il flusso delle informazioni, di insegnamento e di pratica si fondono (Angelini, 1999). Ma tradimento e tradizione hanno la stessa origine etimologica, dal latino *tradere*, consegnare. Senza qualche adattamento, infatti, non si consegna la storia al futuro (Barberis, 2002).

Il prodotto tipico è contraddistinto da un’unicità; Angelini (1999) definisce quest’ultima come tutto ciò che implica il riconoscimento dell’esistenza di caratteristiche di produzione costanti ed uniformi di un prodotto.

Sono definiti tipici i prodotti che hanno caratteristiche specifiche legate ad un contesto di tempo, luogo e relazioni, e con il mutare di questi, cambiano anch’essi; estrarli, quindi dal loro contesto significa eliminare i caratteri di luogo, tempo e relazioni che li rendono specifici (Angelini, 1999). Va inoltre evidenziato, per la sua importanza, il fatto che la ricchezza di significati del binomio storia-territorio conferisce al prodotto

tipico un insieme di caratteristiche che sono di particolare valore e non riproducibili dalla tecnologia.

La valorizzazione del prodotto tipico è una delle strategie messe in atto dalla politica agricola europea e italiana a sostegno dello sviluppo rurale. A sostegno di questa politica la CE ha istituito (reg. n. 2081/92) le certificazioni DOP (Denominazione di Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta), con le quali ha voluto tutelare quei prodotti la cui "specificità" deriva da un determinato ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali e umani. In Italia si contano 149 prodotti attualmente riconosciuti DOP e IGP, con gli ortofrutticoli al primo posto, seguiti da formaggi e dagli oli extravergine d'oliva (INEA, L'Agricoltura Italiana Conta, 2005). I salumi rappresentano il 19% del totale con 28 prodotti certificati.

Dall'elenco nazionale dei prodotti agro-alimentari tradizionali, pubblicato dal MiPAF e aggiornato al 2005 risultano 4016 prodotti di cui 800 ottenuti da carni e loro preparazioni. La sopravvivenza delle produzioni tradizionali di salumi è dovuta soprattutto alle molte famiglie rurali che continuano la tradizione della lavorazione del maiale, accompagnate molte volte da piccoli produttori che mettono a disposizione del mercato modiche quantità di prodotti rispetto a quelle che sono le richieste. Infatti, nell'era post-euforia consumistica, iniziata con il boom economico, c'è una riscoperta della tradizione come legame con le proprie origini e radici, alla base di molte scelte alimentari, compresa la rivalutazione del prodotto tipico di salumeria. Anche un'indagine di mercato fatta per tracciare una mappa dei comportamenti alimentari degli italiani (G.P.F & Associati, La mappa dei comportamenti alimentari, 1985 s.i.d.), mette in evidenza che se escludiamo la fascia dei consumatori "salutisti", complessivamente non raggiungono il 20% del totale, oltre il 30% dei consumatori italiani è favorevole al consumo di salumi anche se in tempi, modi, qualità e quantità estremamente diversificati (Picchi G., 2002).

Per quanto riguarda il consumo di salumi, la quantità disponibile totale è stata nel 2004 di 1.152 milioni di tonnellate, per un controvalore di 7.136 milioni di euro. Ogni italiano consuma in media 30,8 Kg di carne suina (fresca e trasformata) che è divenuta, così, la più richiesta dal consumatore.

CAPITOLO 2

2. GLI INSACCATI FERMENTATI

Gli insaccati carnei fermentati sono il risultato delle trasformazioni microbiologiche, biochimiche, fisiche e sensoriali che avvengono a carico di un impasto carneo costituito da parti magre, grasso e vari ingredienti e/o additivi, insaccato in budelli naturali o artificiali, nel corso della loro maturazione in determinate condizioni di umidità e temperatura. Si tratta di un gruppo di prodotti molto eterogeneo con grandi variazioni rispetto alle materie prime e nei livelli di ingredienti utilizzati. In Europa è prodotta una gran varietà di insaccati carnei fermentati, molti dei quali hanno ricevuto l'attestazione DOP e IGP.

Gli insaccati carnei fermentati sono dunque delle carni "curate" la cui stabilizzazione nei confronti delle alterazioni è assicurata da una serie di eventi microbiologici, biochimici e fisici quali:

- l'abbassamento del pH come conseguenza della fermentazione lattica del glicogeno o di glucidi eventualmente aggiunti;
- l'abbassamento dell'attività dell'acqua (a_w) per effetto dell'aggiunta di sale e della disidratazione che accompagna la stagionatura;
- le condizioni termo-igrometriche che ricorrono durante la maturazione, che in genere risultano favorevoli a microrganismi utili e sfavorevoli a microrganismi dannosi;
- la produzione di sostanze dotate di attività antimicrobica;
- l'eventuale aggiunta di additivi antimicrobici;
- l'azione dell'eventuale pratica di affumicamento.

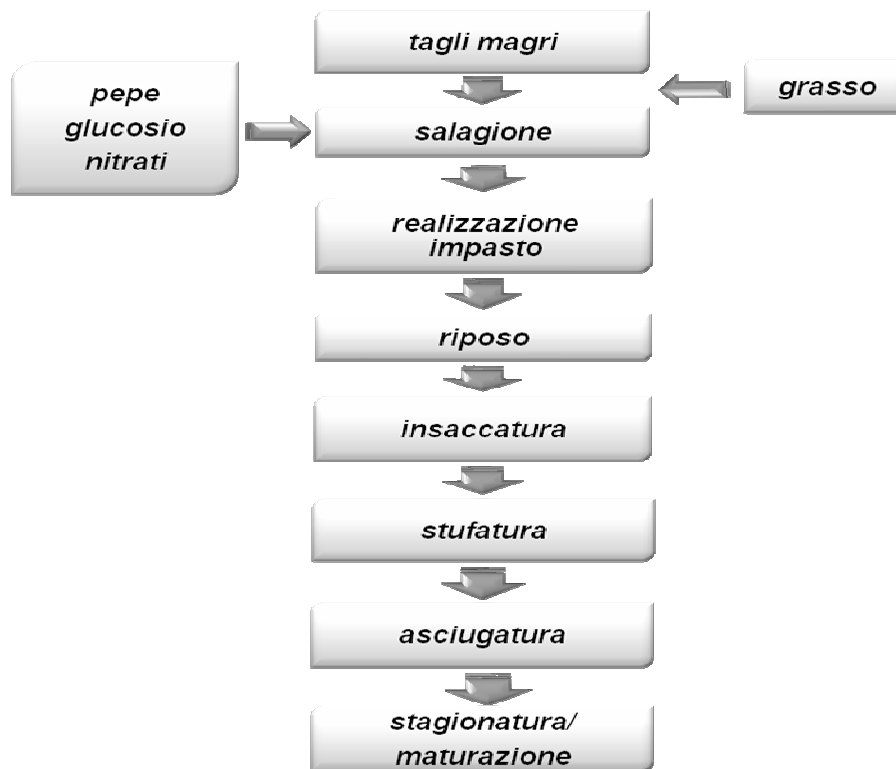


Figura 3. Diagramma di flusso della preparazione di un generico salame insaccato fermentato di carne suina

Nel processo tecnologico che porta alla produzione dei salumi, è prevista l'aggiunta di: sale, conservanti e spezie.

In particolare, la salagione viene seguita per miscelamento ovvero per addizione diretta all'impasto. Il sale, cloruro di sodio, viene aggiunto in quantità comprese tra il 2,5 e il 4% in funzione del tipo di prodotto. Per effetto della perdita di umidità nel corso della maturazione, la concentrazione di NaCl raggiunge valori di 3,5-6% nei prodotti finiti.

I nitrati ed eventualmente i nitriti, sono aggiunti sotto forma di NaNO_3 (E251) oppure KNO_3 (E252) e di NaNO_2 (E250) oppure KNO_2 (E249). Le quantità consentite dalla legislazione vigente in Italia sono di 250mg/Kg per i nitrati mentre per i nitriti esse scendono a valori di 150mg/Kg (D.M. n° 209 del 27/02/1996).

I nitrati, per azione di enzimi endogeni e microrganismi, vengono ridotti a nitriti fino alle prime fasi della maturazione.

All'impasto vengono poi aggiunti diversi altri ingredienti tra cui: spezie, zuccheri, starter microbici.

Le spezie, hanno la funzione di conferire al prodotto gusti ed aromi particolari. Generalmente si tratta di pepe, intero spaccato o in polvere, aggiunto in quantità di 0,05-0,4g/Kg di impasto; aglio tritato o pestato ed eventualmente macerato in vino rosso, in

quantità di 0,05-0,15g/Kg di impasto; semi di finocchio, peperone dolce o piccante o altro in funzione della ricetta.

Gli zuccheri, glucosio, saccarosio o lattosio, sono aggiunti come substrato nutritivo per i batteri lattici che, fermentandoli, producono l'abbassamento del pH (Acton *et al.*, 1977; Girard *et al.*, 1988; Grazia, 1990). Le quantità variano da 0,1-0,2 a 0,5-1% per saccarosio e glucosio e da 0,5 a 2% per il lattosio.

Gli starter microbici, sono invece delle colture selezionate di batteri lattici, aggiunte per controllare la fermentazione lattica. Le specie utilizzate sono *Lactobacillus plantarum* o *Pediococcus acidilactici* o *pentosaceus*.

Le cellule batteriche possono essere addizionate, in numero compreso tra 1 e 10 milioni per grammo, allo stato secco come starter liofilizzati, oppure in sospensione (Cantoni *et al.*, 1987; Simonetti *et al.*, 1983).

Triturazione e preparazione dell'impasto

La prima fase del processo produttivo, consiste nella triturazione delle materie prime, tagli magri e grassi, nella loro miscelazione con gli altri ingredienti e nell'omogeneizzazione del tutto.

La triturazione può essere eseguita in maniera differente in funzione del tipo di salame che si vuol ottenere. Per quelli a grana fine si preferisce usare il tritacarne, per i salami a grana grossa si utilizza il coltello.

Insaccatura

Subito dopo la miscelazione e l'omogeneizzazione dell'impasto, il prodotto viene insaccato all'interno di budelli, i quali hanno la funzione di contenere l'impasto. Essi devono possedere alcuni requisiti fondamentali come: porosità per permettere una buona respirazione dell'impasto; elasticità e morbidezza per assicurare l'aderenza della massa carnea; facilità di pelatura. I budelli generalmente impiegati, possono essere di origine naturale o sintetica.

I budelli naturali sono parti dell'intestino di suini, bovini, equini o ovini, caratterizzati da diametri differenti, in funzione della regione anatomica da cui provengono, per cui l'utilizzo dell'una o dell'altra parte condiziona le dimensioni e l'aspetto esteriore del prodotto finito.

Così per il tipo “*Felino*” si impiega il budello gentile suino (tratto terminale dell’intestinale retto), per il tipo “*Varzi*” il cresponetto suino (tratto iniziale del colon), per il tipo “*Genova*” il dritto o colon di manzo privo di mucosa, per le salsicce fermentate il tenue di suino ecc.

I vantaggi legati all’impiego di questo tipo di budelli, sono dati dalla: miglior interazione con l’impasto, tempi di stagionatura più lunghi (possono essere un fattore negativo per prodotti a breve stagionatura). Gli svantaggi sono legati alla non omogeneità nel calibro, alla successiva difficoltà di pelatura, alla deumidificazione disomogenea (sono per tanto indicati per impasti magri in cui la deumidificazione è più veloce).

In sostituzione ai budelli naturali, oggi sono molto impiegati gli involucri sintetici derivanti da fibre animali (pelle degli animali da macello o tessuti connettivali), vegetali (cellulosiche) o materie plastiche.

Prima dell’uso vengono inumiditi mediante immersione in acqua fredda o tiepida per 10-20 minuti.

I vantaggi legati all’impiego di questo tipo di budelli, sono: la maggiore costanza del calibro, la grande traspirabilità, l’assenza di microflora batterica, l’assenza di grassi, di odori, la facilità di pelatura. Tuttavia non mancano inconvenienti legati ad esempio all’impossibilità del loro impiego nella preparazione di prodotti tipici certificati, i cui disciplinari non lo consentono (Cocolin, 2007; Zambonelli, 1992).

Stagionatura

Subito dopo l’insacco, i salami sono sottoposti alla stagionatura nel corso della quale assumono le caratteristiche proprie dei prodotti finiti.

Appesi su appositi supporti, i salami vengono posti in camere condizionate e ventilate dove subiscono una serie di trasformazioni, per effetto di vari fattori di natura fisica, microbiologica e biochimica, che, nel loro insieme danno luogo alla maturazione.

La stagionatura consiste in tre differenti fasi, che si succedono in un periodo variabile dai 15 ai 90 giorni ed oltre, distinte per le condizioni di temperatura e umidità relativa dell’ambiente e per la durata: stufatura, asciugatura e stagionatura vera e propria (Zambonelli, 1992).

La stufatura è la prima fase della stagionatura durante la quale si realizzano i principali eventi microbiologici, con lo sviluppo della microflora utile e l'inibizione di quella dannosa.

Le camere sono condizionate a 18-26°C di temperatura e 84-90% di umidità relativa, per un tempo di 1-4 giorni. In questo periodo, si realizza un primo abbassamento del pH e dell' a_w che passa dai valori iniziali di 0,95-0,97 dell'impasto fresco, a valori di 0,93-0,95 (Demeyer *et al.*, 1979, Demeyer *et al.*, 1986).

Durante l'asciugatura, fase che segue la stufatura, la temperatura viene abbassata fino a 16-22°C e l'umidità relativa al 90-80% per un tempo di 5-10 giorni.

La fermentazione lattica degli zuccheri giunge al termine e il pH si abbassa ulteriormente fino a valori di 5,3-4,9 che approssimano quelli definitivi. L' a_w diminuisce fino a 0,93 per via dell'ulteriore perdita di umidità e sulla superficie esterna del budello diviene visibile lo sviluppo delle muffe.

Uno scorretto condizionamento in questa fase, può portare ad un'eccessiva disidratazione del budello con conseguente formazione di incrostazioni e indurimento.

L'ultima fase, quella di stagionatura vera e propria, e la fase più lunga nel corso della quale non si ha più lo sviluppo di batteri ma, si realizzano le reazioni biochimiche che sono alla base della maturazione.

La sua durata varia notevolmente in funzione del tipo di prodotto ed è compresa tra 4 e 8 settimane, le temperature sono comprese tra 10 e 15°C mentre l'umidità relativa viene abbassata fino all'80-65%.

Sulla superficie esterna dei budelli, il massimo sviluppo delle muffe, oltre a regolare gli scambi idrici tra le parti superficiali e quelle interne del prodotto, ne provoca la parziale disacidificazione con risalita del pH (Dragoni *et al.*, 1978; Dragoni *et al.*, 1979).

Maturazione

Durante la maturazione, che dura all'incirca dai 15 ai 90 giorni ma anche più, secondo il tipo di prodotto, nell'impasto si realizzano tutte quelle modificazioni proprie dei prodotti finiti. Tali trasformazioni sono dovute all'azione combinata di fattori chimici, fisici, biochimici e microbiologici.

L'umidità diminuisce considerevolmente fino a valori del 27-45%, con conseguente diminuzione dell' a_w e aumento della concentrazione dell'NaCl. Queste condizioni, causano un'ulteriore azione inibente e selettiva nei confronti della microflora presente e

la denaturazione irreversibile delle proteine, che perdono definitivamente la loro capacità di assorbire l'acqua e legarsi con essa. Per ottenere l'uniformità dell'asciugamento, si fa ricorso al controllo dell'umidità relativa dell'ambiente di stagionatura e all'azione delle muffe superficiali. Complessivamente i prodotti maturi hanno una perdita di peso di circa il 25-30%.

Il pH si abbassa, passando da valori iniziali di 5,6-6,2 a valori finali di 4,9-5,3 anche in dipendenza dell'impiego o meno di zucchero e dalla quantità eventualmente aggiunta. Tale abbassamento, è dovuto allo sviluppo dei batteri lattici naturalmente presenti nell'impasto o eventualmente aggiunti come starter. In queste condizioni di pH la carne rilascia più uniformemente e rapidamente l'umidità, in quanto le proteine, che hanno un punto isoelettrico intorno a valori di pH pari a 5,2-5,4, vengono denaturate perdendo così la loro capacità di trattenere l'acqua (Zambonelli, *et al* 1992).

L'iniziale abbassamento del pH subisce un lieve incremento nella seconda fase di maturazione quando, il micelio delle muffe, penetrando nel prodotto, utilizza l'acido lattico come fonte energetica e di conseguenza produce una leggera diminuzione dell'acidità (Grazia, 1989; Grazia, *et al.*, 1986).

Le proteine sono soggette ad idrolisi con formazione di peptidi a basso peso molecolare e solubili e di amminoacidi; l'idrolisi è provocata dall'azione di enzimi proteolitici (catepsine) presenti nelle cellule animali e forse, dall'azione di proteasi di origine microbica (Dierick *et al.*, 1974). Queste, possono essere prodotte direttamente dai batteri lattici durante lo sviluppo oppure possono essere rilasciate dalle cellule microbiche in seguito ad autolisi. Probabilmente a tale azione concorrono anche le muffe il cui micelio penetra in profondità nell'impasto.

Nel complesso, la denaturazione proteica, contribuisce in maniera determinante al conferimento delle migliori caratteristiche organolettiche.

Anche i grassi subiscono una parziale idrolisi, con liberazione di acidi grassi e glicerina, ad opera di enzimi endogeni e microbici in particolare di micrococchi e batteri lattici (Fryer, 1967; Cantoni *et al.*, 1966).

2.1 MODIFICAZIONI CHIMICO-FISICHE DEGLI INSACCATI FERMENTATI

L'alto contenuto di grassi, il contenuto di NaCl, la presenza di nitriti, potrebbe indurre a considerare gli insaccati fermentati come cibi non sani. Tuttavia, soprattutto nei paesi poco sviluppati, la fermentazione assume importanza rilevante come mezzo di conservazione della carne e il contenuto in grassi come essenziale fonte di energia.

Ai batteri lattici degli insaccati fermentati, sono state anche attribuite capacità terapeutiche simili a quelle svolte dei batteri lattici nel settore lattiero-caseario, ciò nonostante, allo stato attuale sembra però che non vi sia alcuna prova a favore o contro tali affermazioni.

2.1.1 Metabolismo dei carboidrati e valori di pH

La fermentazione dei carboidrati inizia subito dopo le prime fasi di preparazione degli insaccati. Come regola generale, circa il 50% di glucosio viene metabolizzato durante la fermentazione, il 74% circa dei composti prodotti è rappresentato dalla formazione di acidi organici.

L'acido lattico è predominante ma, nell'insaccato fermentato, sono presenti anche acido acetico e tracce di acido piruvico.

Un ulteriore 18% di glucosio, di cui l'83% sarà convertito in acido lattico, viene successivamente fermentato in fase di essiccamento.

Oltre alla temperatura, la produzione di acido lattico è influenzata da una serie di altri fattori significativi, compresa la composizione della microflora e la concentrazione di ossigeno.

La completa ossidazione a CO₂ e H₂O è favorita da un incremento delle concentrazioni di ossigeno.

La produzione di acido lattico è accompagnata da un calo del valore di pH. Quest'ultimo, subisce un successivo incremento come conseguenza della formazione di ammoniacca, ultimo prodotto della proteolisi. Se l'attività proteolitica è significativa, sarà proprio l'interazione tra l'acido lattico, l'ammoniaca, il contenuto di acqua e le proteine a determinare il valore finale del pH.

In un momento successivo alla maturazione è possibile avere un ulteriore lieve aumento del valore di pH, non attribuibile né alla produzione di ammoniacca né all'assimilazione

del lattato, ma all'aumento della concentrazione di sostanze tampone e all'aumento del grado di dissociazione degli elettroliti.

La produzione di acido lattico, con la conseguente caduta del valore di pH, ha importanti conseguenze per le proprietà organolettiche degli salumi fermentati e, in alcune circostanze, può eventualmente mascherare sapori ed aromi non graditi.

Valori bassi di pH possono inoltre modificare l'attività degli enzimi proteolitici e lipolitici con conseguente interazione sullo sviluppo dei componenti aromatici. Inoltre, anche la consistenza del prodotto finale è in gran parte dovuta al valore di pH ed al livello a_w . La giusta consistenza non si può ottenere in presenza di valori di pH superiori a 5,4 a meno che il livello di a_w non sia inferiore a 0,9. Per questo motivo il pH è il principale responsabile nella definizione della consistenza di prodotti semi-secchi con elevata acidità mentre, in prodotti secchi con bassa acidità, è il livello di a_w a influenzare tale caratteristica.

2.1.2 Metabolismo dei composti azotati

L'importanza della proteolisi durante la maturazione degli insaccati fermentati è ben nota. La sua evoluzione varia a seconda di una serie di fattori, compresa la natura della microflora endogena presente nella carne e le condizioni di trasformazione.

Essa infatti, aumenta con l'aumentare della temperatura, fino a che non si raggiungono i valori ai quale si ha l'inattivazione enzimatica. Le alte temperature inoltre, possono anche portare ad un aumento della velocità di produzione di acidi, quindi ad un più rapido abbassamento del pH, con conseguente riduzione dell'attività enzimatica. Viceversa, bassi valori di pH possono stimolare l'idrolisi delle proteine.

Anche la forma, nello specifico il diametro, è stato individuato come uno dei fattori, pH-correlati, influenzanti la proteolisi, soprattutto al centro dell'insaccato dove il calo di pH è particolarmente marcato.

Il contenuto proteico totale, in genere, subisce una diminuzione del 20-45% circa intorno al 14°-15° giorno di maturazione mentre, quello di azoto non proteico (NPN) aumenta di oltre il 30%. Di questa frazione fanno parte gli amminoacidi liberi, i nucleosidi e i nucleotidi. La quantità totale di NPN e la sua composizione è di grande importanza nel determinare l'aroma degli insaccati fermentati.

Anche se il livello totale di amminoacidi liberi tende ad aumentare durante la fermentazione, una marcata diminuzione può verificarsi per i singoli amminoacidi. Ad

esempio nel caso dell'arginina, della cisteina e della glutammina, la diminuzione assume particolare importanza in quanto essi sono precursori di altri amminoacidi, **tabella 2.**

Tabella 2. Possibile pathway del metabolismo degli amminoacidi nella fermentazione degli insaccati

Aminoacidi	Pathway
Arginina	Metabolizzato ad ornitina
Cisteina	Metabolizzato a piruvato o convertito a taurina
Glutammina	Convertito ad ac. glutammico ed NH ₃

Fonte Varnam, 1995

La diminuzione di amminoacidi come l'istidina invece, può essere la conseguenza delle attività di decarbossilazione.

Tuttavia, la differente composizione in amminoacidi liberi in diversi insaccati fermentati, sembra avere poco effetto sulle proprietà sensoriali, nonostante il ruolo importante svolto dagli amminoacidi nella definizione del profilo aromatico degli stessi.

2.1.3 Metabolismo dei lipidi

Gli acidi grassi liberi ed i composti carbonilici sono riconosciuti come i principali componenti del sapore degli insaccati fermentati.

La formazione di tali composti, è mediata dalla lipasi e in molti prodotti questa attività, generalmente condotta da enzimi di origine microbica, si verifica in maniera intensa durante la maturazione.

Man mano che la lipolisi procede, si ha una continua diminuzione degli acidi grassi, triacilgliceroli, accompagnata da un corrispondente aumento di diacilgliceroli, acidi grassi liberi e, in misura minore, di monoacilgliceroli (Varnam, 1995).

2.1.4 Attività dell'acqua

Nella maggior parte dei prodotti a base di carne, il livello a_w è determinato dall'aggiunta o dalla sottrazione di acqua, dall'aggiunta di soluti (in particolare NaCl) e dall'aggiunta di grassi.

Il valore di a_w di un insaccato fresco, decresce in misura differente a seconda della concentrazione di soluto presente e del tenore di grassi.

Questo decremento favorisce lo sviluppo di *Micrococcus* o *Staphylococcus* nelle fasi iniziali della fermentazione, ma non è in grado di inibire altri micro-organismi, eccezion fatta per *Campylobacter*, che è molto sensibile ai ridotti livelli di a_w .

I valori finali di a_w , sono di fondamentale importanza nel regolare la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi ed hanno una forte influenza sulla consistenza del prodotto finale e sull'attività enzimatica. Quest'ultima infatti, in presenza di bassi livelli di a_w , si riduce in quanto la molecola enzimatica in queste condizioni non è in grado di raggiungere la configurazione ottimale per poter svolgere la propria attività; gli effetti diventano significativi a livelli pari o inferiori a 0,94 (Varnam, 1995).

2.2 TRASFORMAZIONE DEI PRODOTTI CARNEI: CARATTERI MICROBIOLOGICI

La carne è un substrato in cui prendono vita una serie di azioni articolate e tra loro concatenate dalla regia dei microrganismi. I prodotti carnei sono l'espressione più significativa di tale concetto, in quanto sono il prodotto di complesse attività biochimiche espresse o influenzate dalla microflora in grado di presidiarle. Le colture starter o gli enzimi di natura microbica sono largamente impiegati al fine di modulare il processo fermentativo (Blom *et al.*, 1996; Coppola *et al.*, 1997), assicurare la sicurezza igienico sanitaria del prodotto (Hernandez *et al.*, 1993; Lucke, 2000) e definire le caratteristiche sensoriali ed aromatiche (Luongo *et al.*, 2001; Stahnke, 1999; Talon *et al.*, 1998). Differenti Autori (Geisen *et al.*, 1992; Hugas *et al.*, 2002; Montel *et al.*, 1996) hanno sottolineato una stretta e chiara correlazione tra la tipologia di coltura starter e la qualità finale del prodotto. Dalla letteratura (Coppola *et al.*, 1997; Ordonez *et al.*, 1999, Hughes *et al.*, 2002) emerge un ampio panorama che delinea le azioni espresse dalla popolazione microbica virtuosa spesso riconducibile ai generi *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Kocuria*. Negli ultimi anni va rafforzandosi la consapevolezza dell'esistenza di un importante ruolo dei ceppi riconducibili alle *Micrococcaceae* (Toldrà e Verplaetse, 1995; Hughes *et al.*, 2002) nei numerosi processi di natura enzimatica che concorrono all'idrolisi delle proteine e dei grassi ed alla definizione del quadro sensoriale. Diversi autori (Hammes *et al.*, 1995; Sorensen 1997a; Bover-Cid 2001) affermano che specie riconducibili alle *Micrococcaceae* rivestono un

ruolo importante in tali fenomeni determinando un consistente incremento degli amminoacidi liberi. Un'importanza crescente nella maturazione dei salami è attribuita ai lieviti ed in particolare alla specie *Debaryomyces hansenii* che oltre a contribuire all'accelerazione della fissazione del colore rosso sui nitrati (Lucke, 1986; Grazia *et al.* 1989) sembra che possa influenzare i caratteri del profilo aromatico in virtù di un'apprezzabile produzione di esteri volatili (Westall, 1997; Sorensen 1997b). Emerge, quindi, dalla letteratura degli ultimi anni, che i prodotti carnei fermentati non possono essere considerati il mero risultato della "fermentazione lattica di impasti di carne", ma risultano il prodotto di un complesso processo fermentativo alla cui definizione possono concorrere in maniera positiva un'ampia eterogeneità di ceppi microbici appartenenti a specie ed a generi differenti. Le associazioni che possono instaurarsi in maniera più o meno armonica tra i differenti ceppi appartenenti a biotipi, specie o generi differenti sono alla base dei caratteri qualitativi del prodotto finale.

2.3 Popolazione microbica caratteristica dei prodotti carnei fermentati

Durante tutte le operazioni dell'intero processo produttivo, dalla macellazione fino alla realizzazione dell'insaccato vero e proprio, la carne è sottoposta ad una serie di manipolazioni che contribuiscono alla sua contaminazione biologica sia da parte di batteri sia di eumiceti. Inoltre la carne rappresenta un "terreno di coltura ideale" per lo sviluppo di moltissime specie microbiche, l'unico fattore limitante è costituito dalla limitata presenza di glucidi nella sua composizione chimica, soprattutto se in fase di macellazione non vengono eseguite correttamente le opportune e delicate operazioni come lo stordimento, il dissanguamento subito dopo la iugulazione, l'eviscerazione e infine un adeguata frollatura con conseguente raggiungimento dell'intera massa muscolare dell'animale di valori di pH prossimi a 5.5-5.9. La triturazione della carne e la successiva miscelazione con gli ingredienti favoriscono ulteriormente la proliferazione della microflora spontanea e fortuita presente. La qualità e le caratteristiche organolettiche, tipiche degli insaccati fermentati, sono la risultante di attività metaboliche di una eterogenea e peculiare flora microbica in grado di colonizzare l'impasto. I microrganismi rinvenibili nelle carni sono quantitativamente e qualitativamente legati alle condizioni di macellazione, conservazione, trasporto e, genericamente, di manipolazione (Zambonelli *et al.* 1992). Non è raro rinvenire

microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed in particolare ceppi riferibili alla specie *E. coli* o ai generi *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., e *Yersinia* spp. Tali microrganismi assumono non poca importanza nel campo alimentare, in generale, e nei salami, in particolare, sia in virtù della loro potenziale patogenicità, sia per le alterazioni che possono provocare a causa del loro metabolismo particolarmente attivo. Sono batteri asporigeni, Gram negativi, aerobi o anaerobi facoltativi, che fermentano il glucosio con produzione di CO₂; alcuni sono proteolitici e producono H₂O₂. Sono mesofili anche se alcune specie riescono a sviluppare a temperature di refrigerazione. L'ambiente della carne tritata, in particolare alle basse temperature, può risultare ottimale anche per lo sviluppo delle specie riconducibili alle *Pseudomonaceae*. Batteri aerobi e Gram negativi, caratterizzati da una spiccata attività proteolitica (Shaw and Latty, 1988). Differenti specie, riferibili al genere *Pseudomonas*, sono in grado di degradare le proteine con produzione di composti basici determinando un conseguente incremento dei valori di pH della carne e l'avvio dei processi putrefattivi. Nelle carni fresche vi è la presenza, se pur contenuta, ma costante della specie *Brochothrix thermosphacta*. Microrganismo Gram-positivo e asporigeno che non presenta problemi di patogenicità ma è responsabile di alterazioni a carico dei prodotti carnei fermentati. Tale batterio, sviluppandosi in maniera accentuata all'interno del prodotto, è responsabile della formazione di composti maleodoranti che originano da metaboliti come: acetoino, diacetile, aldeidi ed acidi organici con catene carboniose ramificate composte da 5-6 unità carboniose. Inoltre la degradazione delle proteine con produzione di composti basici determina l'incremento dei valori di pH del prodotto (Gill, 1983; Dainty *et al.*, 1986). Non è da escludere inoltre la presenza e lo sviluppo di batteri sporigeni ascrivibili ai generi *Bacillus* e *Clostridium*. Per contro, accanto alla presenza di suddetti microrganismi con caratteristiche essenzialmente negative, sono rinvenibili microrganismi appartenenti alle così dette specie "virtuose" e riferibili alla famiglia delle *Micrococcaceae*, ai Batteri lattici, ad alcune specie di lieviti e di muffe.

2.4 Caratteristiche della popolazione microbica tipica degli insaccati fermentati

La dinamica popolazione microbica presente nei salami è rappresentata da un gran numero di specie che sviluppando interagiscono tra loro determinando il sopravvento dell'una o dell'altra specie, in virtù delle determinanti ecologiche che si generano a livello del prodotto carneo. L'aggiunta di cloruro di sodio svolge un ruolo determinante in quanto, abbassando l'attività dell'acqua a valori inferiori a 0,97, determina l'inibizione della maggior parte della microflora contaminante Gram negativa. Sono quindi in grado di sviluppare solo i microrganismi alotolleranti che, in funzione delle loro proprietà e del ruolo che svolgono all'interno del prodotto alimentare, possono essere suddivisi in tre gruppi.

-**Utili:** rappresentati da batteri lattici eterofermentanti appartenenti ai generi *Lactobacillus* (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*) e *Pediococcus* (*P. pentosaceus* e *P. acidilactici*) ed inoltre da *Micrococcaceae* dei generi *Kocuria* e *Staphylococcus* coagulasi negativi (*S. carnosus*, *S. simulans*, *S. xylosus*).

-**Alteranti:** gruppo nel quale rientrano microrganismi che impartiscono ai prodotti caratteristiche organolettiche non gradevoli incidendo negativamente sulla qualità del prodotto finito. A tale gruppo appartengono gli Enterococchi (*E. faecium*, *E. faecalis*), *Serratia marcenscens*, *Brochothrix thermosphacta*, e anche batteri lattici eterofermentanti obbligati.

-**Patogeni:** rappresentati da *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Salmonella*. Sono in grado di arrecare danno alla salute del consumatore.

2.5 Evoluzione della microflora batterica nel corso della maturazione

La popolazione batterica dell'impasto, **tabella 3**, proviene principalmente dalla carne dello stesso animale (cute, apparato digerente).

A questi microrganismi vanno poi aggiunti quelli derivanti da altre fonti come: l'acqua, l'ambiente e le attrezzature di lavorazione, gli altri ingredienti utilizzati come ad esempio le spezie (Solignat, 1999).

La popolazione microbica presente nell'insaccato, è invece più variegata, in quanto si arricchisce di gruppi microbici non propri della carne ma apportati dall'esterno.

Tabella 3. Gruppi batterici presenti nelle carni.

Gram	Sensibilità all'O ₂	Dominanti	Sottodominanti	Rari
+	Aerobi	<i>Micrococcus</i>	Arthrobacter Microbacterium	Macrococcus
+	Aerobi- anaerobi	Staphylococcus Lactobacillus	Corynebacterium Microbacterium Streptococcus Bacillus	Pediococcus Leuconostoc
+	Anerobi			Clostridium
-	Aerobi	Pseudomonas Brevundimonas		
-	Aerobi- anaerobi	Enterobatteri		Altermononas

Fonte: Fournand, 1982.

Nel dettaglio i batteri presenti negli impasti all'inizio della lavorazione, sono riportati in **tabella 3**.

Durante la fase di stagionatura/maturazione, si ha una selezione microbica che può essere spiegata mediante la teoria degli ostacoli di Leistner (1995).

L'impiego di elevate temperature durante le fasi di asciugatura (20-24°C), favorisce lo sviluppo di germi mesofili rispetto a quelli psicrotrofi, tale azione è potenziata dalla concomitante riduzione dell'umidità.

La concentrazione salina, favorisce la selezione di batteri utili, alotolleranti, con scomparsa dei Gram negativi psicrotrofi.

**INFLUENZA DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E
CHIMICHE DELLA VENTRICINA**

La presenza di nitriti, o perché aggiunti intenzionalmente, o perché derivanti dalla riduzione dei nitrati, provoca la scomparsa dei clostridi e favorisce lo sviluppo dei cocchi.

Tabella 4. Microrganismi negli insaccati.

Microrganismi presenti nell'impasto all'inizio della produzione	
Batteri Gram negativi	Enterobatteri: <i>Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Pseudomonas, Brevindimonas</i>
	Bacillaceae: <i>Bacillus, Clostridium</i>
	Corynebacterium: <i>Corynebacterium, Arthrobacter</i>
Batteri Gram positivi	Streptococcaceae: <i>Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus</i>
	Lactobacillaceae: <i>Lactobacillus</i>
	Micrococcaceae: <i>Micrococcus, Kocuria</i>
	Stapylococcaceae: <i>Stapylococcus</i>
Lieviti	<i>Candida, Torulopsis, Debaryomices</i>
Microrganismi esterni	
Batteri	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Pseudomonas</i>
Lieviti	<i>Debaryomices, Candida</i>
muffe	<i>Penicillium, Scopulariopsis, Aspergillus, Geotrichum, Cladosporium spp.</i>

Fonte: Solignat, 1999.

La diminuzione del potenziale redox, inibisce gli aerobi stretti o facoltativi (*Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus*, enterobatteri) e accelera la moltiplicazione di

germi microaerofili quali: *Pediococcus*, *Lactobacillus*, e aerobio-anaerobio facoltativi tra cui: *Staphylococcus spp.*

L'accumulo dei composti derivanti dal metabolismo batterico (acidi organici, forse batteriocine), completa la scomparsa dei Gram negativi, comunque dovuta essenzialmente alla diminuzione di a_w .

Alla fine del periodo di stagionatura, nel salame si ritrovano:

- Una flora lattica e coccica dominante (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, e in quantità minore *Staphylococcus*), con concentrazione di 10^7 - 10^8 ufc/g;
- Un numero di lieviti non trascurabile: 10^3 ufc/g.
- Sul budello proliferano lieviti (del genere *Debaryomyces*: *D. hansenii*, *D. prisca*) e muffe (del genere *Penicillium*: *P. nalgiovense* e *P. chrysogenum*, a micelio bianco, *P. caseicolum* e *P. candidum*) favoriti dalla riduzione dell' a_w .

In generale, si deve tener presente che, temperature tra 15 e 18°C e UR del 1'80-90%, favoriscono lo sviluppo di muffe indesiderabili (*P. solitum*, *P. cyclopium*, *P. verrocosum*, *P. chrysogenum* a micelio verde, *Aspergillus ocraceus* A), a cui segue la produzione superficiale di ocratossina A e di altre micotossine.

Per queste ragioni, la proliferazione dei miceli, dovrebbe avvenire a 12-14°C e al 76 % circa di UR.

CAPITOLO 3

3. Microrganismi indesiderati di maggior interesse per i prodotti carnei fermentati

Come noto in letteratura, la flora microbica spontanea degli insaccati crudi fermentati presenta caratteristiche di estrema eterogeneità. Accanto alle specie utili possiamo riscontrare la presenza di specie indesiderate, sia capaci di alterare le caratteristiche organolettiche del prodotto e che implicano problemi di tipo igienico, sia capaci di provocare danni alla salute del consumatore e che quindi implicano problematiche di tipo sanitario. La presenza delle specie alteranti può essere percepita in quanto il prodotto può presentare anomalie inerenti le caratteristiche organolettiche e sensoriali, che non lo rendono idoneo al consumo ma non implicano particolari problemi salutistici. La presenza delle specie patogene, al contrario, nelle maggior parte dei casi non provoca alterazioni delle caratteristiche organolettiche ed è rilevabile solo mediante analisi di tipo microbiologico e da origine a conseguenze di tipo salutistico ed epidemiologico. Ciò implica problematiche molto diverse, in quanto, i prodotti carnei fermentati non possono essere sterilizzati o risanati, possono costituire un pericolo per il consumatore nel caso in cui siano presenti tossine microbiche o germi patogeni.

3.0.1 *Enterobacteriaceae*

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende numerosi generi e specie che presentano caratteristiche comuni. Sono microrganismi di forma bastoncellare, Gram-negativi, anaerobi facoltativi, alcune specie producono tossine, ad ampia diffusione, presenti sia in ambienti di lavorazione, sia nei locali di macellazione, sia in nei locali di allevamento e sia nei magazzini di stoccaggio. Rappresentano potenziali contaminanti biologici per i prodotti carnei fermentati e possono quindi destare preoccupazioni nel controllo della sicurezza igienico-sanitaria in quanto sono i responsabili di molte infezioni alimentari di vario genere. I generi che maggiormente interessano i salami sono *Salmonella* e *Shigella*.

3.0.2 Genere *Salmonella*

Il genere *Salmonella* comprende batteri con cellule a bastoncino diritto, di dimensioni 0.7-1.5 μm x 2.0-5.0 μm , conformi alla descrizione generale della famiglia

Enterobacteriaceae: Gram-negativi, cellule con fasi mobili e non mobili, anaerobi facoltativi; fermentano il glucosio ed altri composti ternari con produzione di gas. Il genere è suddiviso in 5 sottogeneri: tra cui il sottogenere I, con le specie *S. choleraesuis*, *S. hirschfeldii*, *S. typhi*, *S. paratyphi-A*, *S. schottmuelleri*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. gallinarum*. Ogni sottogenere e ogni specie comprendono un grandissimo numero di sierovarietà. L'interesse del genere è collegato col fatto che esso comprende batteri patogeni per l'uomo e per gli animali. Le sierovarietà sono strettamente adattate ad un particolare ospite; quelle dell'uomo provocano gravi malattie quali febbri enteriche, tifo, paratifo, gastroenteriti, setticemia. Le salmonellosi vengono trasmesse da uomo ad uomo, senza ospiti intermedi, e per contaminazioni fecali di acqua ed alimenti. Le salmonelle sono batteri ai quali si devono molti casi di malattie trasmesse con gli alimenti. Esse possono trovarsi sulle materie prime impiegate per la produzione di salumi ma, essendo sensibili al sale, non rappresentano un pericolo per i prodotti in questione se non in caso di contaminazione post-produzione.

3.0.3 Genere *Shigella*

A questo genere appartengono microrganismi Gram-negativi, di forma bastoncellare, asporigeni, immobili. Le specie appartenenti a questo genere presentano un meccanismo infettivo di tipo invasivo con produzione di tossine con caratteristiche biochimiche simili a quelle di *E. coli* 0157:H7. I sintomi legati a questa tossinfezione sono costituiti da diarrea acquosa, dolori addominali, sangue nelle feci, febbre, vomito e nausea che si denotano nella tipica dissenteria bacillare. Patogeno molto pericoloso in quanto sono necessarie solo 10 UFC/g per poter generare l'infezione nell'uomo.

3.0.4 *Pseudomonas* spp.

Sono bacilli appartenenti alla famiglia *Pseudomonadaceae*. Sono Gram-negativi, asporigeni, aerobi obbligati. Presentano flagelli polari, tranne *P. mallei*, che non è mobile. Le specie di maggiore interesse sono:

- *P. mallei*: patogeno obbligato dei mammiferi, è l'agente eziologico della morva, una malattia che colpisce soprattutto gli Equini; anche i carnivori (ad esempio i felini negli zoo) possono contrarre la malattia attraverso il consumo di carne cruda di equini infetti;
- *P. pseudomallei*: è un germe ubiquitario, che può causare la melioidosi, malattia degli animali domestici e dell'uomo;
- *P. aeruginosa*: patogeno opportunisto molto diffuso nell'ambiente e negli organismi. La caratteristica più importante è l'elevata antibiotico-resistenza, conferita dal diametro piccolo dei pori della parete cellulare. Nell'uomo *P. aeruginosa* causa frequentemente infezioni nosocomiali; negli animali sono frequenti cronicizzazioni di ferite purulente e otiti recidivanti, soprattutto nei cani. *P. aeruginosa* cresce rapidamente su normali terreni di coltura, dando una colorazione verde-blu dovuta ad un pigmento idrosolubile, la piocianina, e un caratteristico odore di frutta. Produce, inoltre, anche un altro pigmento: la pioverdina, che non è idrosolubile.

3.0.5 *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum: per questo bacillo esistono sette sottotipi, tutti responsabili del botulismo, una grave intossicazione alimentare, spesso ad esito letale. Tutti i sottotipi producono la tossina botulinica. I sottotipi A, B, E, F e G sono più frequenti nell'uomo, i sottotipi C e D negli animali. L'intossicazione si verifica sempre con l'ingestione di alimenti contaminati. Nell'uomo l'evenienza più frequente è il consumo di alimenti conservati, ad esempio le conserve sott'olio. Le spore possono a volte sopravvivere se la sterilizzazione è fatta in maniera inadeguata. Quando la temperatura si abbassa le spore germinano grazie all'ambiente anaerobio creato dall'olio e le forme vegetative producono la tossina. Negli animali l'intossicazione si verifica dopo l'ingestione di carni in putrefazione o vegetali putridi. Si descrivono episodi in allevamenti di animali da pelliccia o in uccelli acquatici. La tossina botulinica è una proteina resistente agli enzimi proteolitici, ed è inattivata in 10 minuti alla temperatura di ebollizione. Agisce a livello presinaptico bloccando la liberazione dell'acetilcolina e inducendo paralisi flaccida.

3.0.6 *Brochothrix thermosphacta*

Il genere *Brochothrix* comprende l'unica specie *Brochothrix thermosphacta* e pertanto, allo stato attuale, la descrizione del genere corrisponde a quella della specie. Questo batterio ha cellule con forma a bastoncino regolare, 0.6-0.75µm X 1-2 µm, singole, in corte catenelle o in lunghi filamenti. Le cellule sono non mobili, Gram-positive e non formano spore. È aerobio e facoltativamente anaerobio, mesofilo, moderatamente alofilo ed è catalasi positivo. E' un batterio che ha molte caratteristiche simili al genere *Lactobacillus*. *Bochothrix thermosphacta* necessita di composti ternari per lo sviluppo sia aerobico che anaerobico. Questo batterio sviluppa bene in presenza di arabinosio, xilosio, ramnosio, glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio, lattosio, mannitolo, glicerolo e più debolmente in presenza di altri composti. È un microrganismo mesofilo ma con un optimum di temperatura piuttosto basso, collocato a 20-25°C: il minimo è di 0°C, il massimo di 30°C. Al di sopra dei 30°C lo sviluppo avviene raramente e a 35°C è completamente inibito. E' moderatamente alofilo e sviluppa bene in presenza del 6,5% di cloruro di sodio. Molti ceppi hanno, peraltro, la capacità di tollerare concentrazioni saline anche superiori al 10%. Inoltre, questo batterio, non produce idrogeno solforato e non riduce i nitrati a nitriti. Non è un batterio patogeno o tossigeno, ma, è molto importante e dannoso perché causa alterazioni delle carni, sulle quali si sviluppa formando prodotti metabolici maleodoranti che rendono le carni stesse non commestibili.

CAPITOLO 4

4. Azione dei microrganismi di interesse tecnologico

La tecnologia di produzione, l'aggiunta degli ingredienti e degli eventuali additivi definiscono all'interno dei prodotti carnei fermentati una serie di determinanti ecologici che, inevitabilmente, condizionano e modulano la dinamica della popolazione microbica sia spontanea sia eventualmente presente in seguito all'aggiunta di colture starter selezionate. Tali determinanti fanno sì che, sin dalle prime ore di stagionatura, diverse specie pro-tecnologiche prendano il sopravvento su quelle patogene o alteranti attivandosi e accrescendosi in modo da guidare, fino alla fine, l'intero processo fermentativo. Nella fase iniziale del processo fermentativo, in virtù di una relativa presenza di ossigeno, è favorita la crescita delle specie aerobie obbligate come i micrococchi che ben presto, esaurendo l'ossigeno a disposizione, creano condizioni di anaerobiosi che assecondano lo sviluppo dei microrganismi anaerobi facoltativi (batteri lattici e Stafilococchi). L'evolversi della maturazione è accompagnata da una serie di reazioni enzimatiche, catalizzate sia da enzimi prodotti dalle cellule microbiche sia da quelli endogeni della carne, che influenzano prepotentemente le caratteristiche finali del prodotto e che possono essere schematizzate come di seguito.

4.1 Batteri lattici: ruolo e presenza negli insaccati fermentati

Nella maggior parte delle fasi di maturazione la popolazione predominante è costituita da Batteri lattici (Samelis *et al.* 1994; Coppola *et al.*, 1995; 1998; Sanz e Toldrà 1997a,b). I lattobacilli eterofermentanti facoltativi costituiscono i principali responsabili del processo di maturazione degli insaccati fermentati. Come emerge dalla letteratura (Hammes *et al.* 1990; Hugas *et al.* 1993, Lizaso *et al.* 1999; Gonzalez and Diez 2002; Papamanoli *et al.* 2003) la specie predominante è rappresentata generalmente da *L. sakei*; di spicco è anche la presenza di ceppi riconducibili alla specie *L. curvatus*. Degna di nota è anche la presenza di ceppi riferibili al genere *Carnobacterium*; Samelis *et al.* (1998), hanno osservato che in talune tipologie di insaccati fermentati greci è possibile osservare il predominio di ceppi riconducibili a *Carnobacterium* spp., soprattutto nelle prime fasi di maturazione. Ceppi riferibili ai lattobacilli eterofermentanti obbligati e al

genere *Leuconostoc* sono isolati, soprattutto nei prodotti italiani (Zambonelli *et al.* 1992), in bassa percentuale mostrando una minima incidenza. I batteri lattici rappresentano la popolazione microbica dominante degli insaccati fermentati spontaneamente (Coppola *et al.* 1995; 1998), in virtù della capacità di crescere a bassi valori di attività dell'acqua, di sviluppare a bassi valori di pH, di tollerare discrete concentrazioni di cloruro di sodio e di nitriti ed anche in virtù del loro comportamento nei confronti dell'ossigeno. L'azione svolta da questi microrganismi è stata oggetto di diversi studi che ne hanno chiarito e definito ampiamente il ruolo durante l'intero processo di maturazione delle carni curate (Zambonelli *et al.* 1982, Coppola *et al.*, 1995, 1997, 1998). Infatti sono riferibili ai batteri lattici le più importanti trasformazioni che si hanno durante il processo di maturazione responsabili sia della serbevolezza (Hernandez *et al.*, 1993; Lucke, 2000) sia delle caratteristiche sensoriali del prodotto (Talon *et al.*, 1998; Stahnke, 1999; Luongo *et al.*, 2001). Oramai è noto il loro contributo all'aromatizzazione del prodotto essendone direttamente o indirettamente responsabili.

4.1.1 Azione acidificante

L'acidificazione del prodotto è dovuta principalmente ai batteri lattici, principali agenti della fermentazione lattica degli zuccheri con conseguente formazione di acido lattico, qualora il processo sia condotto da specie omofermentanti obbligate, oppure acido lattico ed acetico ed anidride carbonica, qualora siano le specie eterofermentanti deputate all'utilizzazione degli zuccheri. L'abbassamento del pH, proporzionale alla quantità di glucidi fermentescibili addizionati, non rappresenta soltanto un mero "determinante ecologico", cioè un *hurdle*, un ostacolo, amplificato anche dai ridotti valori di attività dell'acqua, nei confronti di microrganismi degradativi o patogeni (Bacus, 1986), ma potenzia anche l'azione derivante dai nitriti. Infatti i bassi valori di pH accelerano la conversione di nitriti in NO, una forma altamente instabile e che gioca un ruolo di indubbia importanza nella definizione della qualità degli insaccati fermentati sia relativamente alla sicurezza igienico-sanitaria, sia relativamente ai caratteri sensoriali. L'ossido d'azoto (NO) offre un valido contributo alla sicurezza igienico-sanitaria in quanto esso è la forma antimicrobica attiva in grado di ostacolare anche la germinazione degli sporigeni quali i clostridi. Contribuisce, inoltre, alla definizione del colore rosso vivo, caratteristico degli insaccati fermentati, in quanto essendo fortemente

instabile reagisce con l'ossimioglobina formando la nitrosomioglobina, pigmento che conferisce ai salami il colore rosso brillante (Hammes *et al.*, 1990; Hammes e Knauf, 1994).

Accanto alla definizione del colore rosso, non può essere tralasciato il contributo che l'azione acidificante esplica nella definizione dei caratteri reologici. L'abbassamento del pH a valori di circa 5.1 -5.2, corrispondenti al punto isoelettrico delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari, determina la coagulazione della componente proteica e quindi la definizione della caratteristica struttura.

L'intensità e la rapidità del processo di acidificazione dipendono dalla quantità e dalla qualità dello zucchero impiegato, infatti la scelta dello zucchero da aggiungere all'impasto non è indifferente poiché incide sull'andamento del fenomeno (Zambonelli *et al.*, 1992).

4.1.2 Azione proteolitica

L'attività proteolitica da parte dei batteri lattici è stata da alcuni anni al centro di un sentito dibattito e conseguentemente oggetto di studio da parte di svariati autori. Diversi autori (Bacus e Brown, 1985; Hierro *et al.*, 1997; Molly *et al.*, 1997; Kenneally *et al.*, 1999) sostengono che l'azione proteolitica che viene ad essere nei prodotti carnei fermentati non è attribuibile ai batteri lattici, altri autori, al contrario, attribuiscono ai batteri lattici un ruolo degno di nota nella definizione di tali processi (Verplaetse *et al.* 1992; Hughes *et al.* 2002, Basso *et al.* 2004). Negli ultimi decenni il loro ruolo si è andato via via definendosi ed è apparso chiaro un certo mutualismo tra gli enzimi della parete cellulare e gli enzimi endocellulari responsabili dell'idrolisi delle molecole proteiche con formazione di peptidi di dimensioni tali da poter essere trasportati all'interno della cellula batterica ove subiscono ulteriore degradazione fino a livello di amminoacidi. (Verplaetse *et al.*, 1989; Garcia de Fernande e Fox, 1991). Inoltre è stato anche osservato un aumento di peptidi e ed amminoacidi liberi in seguito all'impiego di colture starter selezionate di batteri lattici (De Masi *et al.*, 1990).

4.1.3 Azione lipolitica

Ai batteri lattici non è generalmente riconosciuta alcuna attività lipolitica ma bensì tale azione è stata attribuita maggiormente alle lipasi endogene presenti nella carne. Debevere *et al.*, 1976, hanno osservato che l'assenza di crescita microbica ottenuta con antibiotici aggiunti ai prodotti, non modifica né l'andamento né l'intensità della lipolisi nei salami. Piuttosto è stata riscontrata la formazione di esteri etilici, questi ultimi, sono composti caratterizzanti il profilo aromatico dei salami a cui impartiscono particolari aromi e si ipotizza che la loro formazione è riferibile alla presenza di alcuni microrganismi, non ascrivibili ai batteri lattici, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus warneri* (Montel *et al.*, 1996).

4.2 Micrococcaceae: ruolo e presenza negli insaccati fermentati

La microflora dei prodotti carnei curati oltre ad essere costituita da batteri lattici è per una cospicua parte anche costituita da *Micrococcaceae* riferibili soprattutto al genere *Staphylococcus* e *Kocuria*. Lo sviluppo di tali specie avviene contemporaneamente a quello dei batteri lattici ma con minore intensità, la loro maggiore carica si verifica nel mezzo del processo di stagionatura (Comi *et al.*, 1996). Per quanto concerne i micrococchi, essendo aerobi, la loro crescita viene bloccata dall'instaurarsi dell'anaerobiosi che si realizza in tali prodotti fermentati (Simonetti e Cantoni 1983; Comi *et al.*, 1986), a qualche giorno dall'insaccamento con l'esaurirsi dell'ossigeno presente nell'impasto, predominano gli stafilococchi che hanno la possibilità di sviluppare in anaerobiosi. Tale gruppo microbico, in sinergia con i batteri lattici, si rende responsabile dell'insieme delle reazioni biochimiche che permettono di ottenere tali prodotti fermentati e ed è dovuto proprio alla loro azione lo sviluppo del flavour armonioso caratterizzante questi alimenti, per questo motivo, entrambe i gruppi microbici sono utilizzati in combinazione come colture starter aggiunte durante l'operazione di impasto.

4.2.1 Azione lipolitica

L'azione lipolitica è fondamentale affinché il prodotto finito acquisisca le specifiche caratteristiche sensoriali; tale attività permette la liberazione di acidi grassi liberi che in seguito a reazioni di tipo ossidativo formano composti aromatici caratteristici per ogni singolo prodotto carneo fermentato (Demeyer *et al.*, 1974). Papamanoli *et al.* (2002) sostengono che quasi la metà degli isolati riconducibili a *S. carnosus* e *S. xylosus* esibiscono una attività lipolitica essendo in grado di idrolizzare la tributirina. Tuttavia, diversi sono gli autori che riconducono i fenomeni lipolitici essenzialmente agli enzimi tissutali ridimensionando il ruolo delle lipasi microbiche (Montel *et al.*, 1996, Molly *et al.*, 1997).

4.2.2 Azione proteolitica

Un'azione rilevante delle *Micrococcaceae* è costituita dall'attività proteolitica svolta all'interno delle carni curate, tale attività è stata ampiamente valutata e studiata da numerosi studiosi che l'hanno recentemente confermata. Infatti numerosi autori (Chen and Guo, 1992; Bacus 1986) hanno confermato che le specie appartenenti a tale famiglia sono responsabili dei fenomeni proteolitici ed del conseguente aumento in amminoacidi liberi. Nei primi giorni di stagionatura, durante la fase di crescita esponenziale, tali fenomeni sono attribuibili agli enzimi endogeni presenti nella carne al momento della macellazione e responsabili della frollatura ma, nelle fasi successive, l'incremento in azoto non proteico è dovuto soprattutto a specie ascrivibili al genere *Staphylococcus* (Coppola. *et al.*, 2001; Bover-Cid *et al.* 2001; Nazzaro *et al.* 2004). Tale attività porta anch'essa alla formazione di composti gradevoli che completano il già ricco profilo aromatico caratteristico dei salumi crudi fermentati.

4.2.3 Attività nitrato-reduttasica

Le *Micrococcaceae* grazie alla presenza di una reduttasi intracellulare riducono i nitrati che vengono aggiunti nella forma ossidata all'impasto rendendoli attivi nei confronti dei microrganismi nocivi. Tale azione, per lo *S. carnosus*, non viene condizionata dalla presenza di cloruro di sodio ed è massima a pH 6.0 e a temperature di 44°C (Zambonelli *et al.*, 1992). Permette inoltre una stabilizzazione del colore per la formazione di nitrosomioglobina che conferisce ai salami il caratteristico colore rosso (Rovina, 1992).

4.2.4 Attività catalasica

Tale azione è importante, in quanto ha il compito di prevenire l'inverdimento dei salami e l'irrancidimento dei grassi eliminando l'eventuale perossido di idrogeno prodotto dai lattobacilli (Liepe, 1983). L'enzima è stabile in un intervallo di pH compreso tra 4.0 e 9.3 e a temperature tra 25 e 55°C, mentre la sua attività è notevolmente ridotta a concentrazioni 1 M di cloruro di sodio (Gallican *et al.* 1984). La produzione di tale enzima è piuttosto bassa durante la fase di crescita esponenziale mentre raggiunge il suo massimo nella fase stazionaria (Martin e Chaven, 1987).

4.2.5 Produzione di composti aromatici

Tali composti sono rappresentati da sostanze volatili quali: esteri etilici, metilchetoni e metilaldeidi. Si è supposto che la produzione di metilchetoni da reazione di ossidazione degli acidi grassi liberi sia associata alla presenza di *S. xylosus* e *S. carnosus* mentre la presenza di alcoli o alcani, che conferiscono l'aroma di rancido sembrerebbe legata alla presenza di *S. saprophyticus* e *S. warneri* (Berdaguè *et al.*, 1993; Montel *et al.*, 1996). La formazione di esteri etilici, che conferiscono il caratteristico aroma fruttato, sembrerebbe di origine microbica e strettamente legata all'attività di alcuni stafilococchi (Montel *et al.*, 1996).

CAPITOLO 5

5. La ventricina

La ventricina è uno degli oltre 4.000 prodotti tradizionali, che fino a oggi sono stati censiti in Italia. Si tratta di un insaccato stagionato a base di carne suina, abbondantemente speziato con peperone dolce e peperoncino piccante, tradizionalmente prodotto nell'area compresa tra i fiumi Trigno e Sinello, a cavallo tra le regioni Abruzzo e Molise (Tremonte et al 2005).

La peculiarità che caratterizza la Ventricina è il colore rosso dovuto all'aggiunta nell'impasto del peperone dolce in polvere, con un'eventuale quantità di piccante. Nella stessa zona, e in quelle limitrofe, questa spezia viene aggiunta anche in altri insaccati quali: la "Salsiccia dolce", la "Salsiccia di Pietracatella" (CB), la "Signora di Conca Casale" (IS); inoltre questa caratteristica è riscontrabile anche in altri insaccati che vengono prodotti anche in altre parti d'Italia, la "Salsiccia di Calabria DOP" e la "Soppressata di Calabria DOP" e all'estero quali, il "Chorizo" in Spagna e la "Salsiccia di Mangalica" in Ungheria.

Peculiare è la tecnologia di produzione caratterizzante la ventricina che è in grado di conferirle una particolare ed inedita collocazione nella classificazione dei salumi, a confine tra il mondo degli insaccati fermentati e quello dei salumi a pezzo anatomico intero. L'impiego, infatti, di cubetti di carne magra, aventi discrete dimensioni, conferisce al prodotto, caratteristiche che si discostano notevolmente da quelle proprie degli insaccati fermentati, per i quali è previsto l'impiego esclusivo di carne tritata. Allo stesso tempo, tuttavia, esso diventa custode di alcuni caratteri propri di salumi fermentati; infatti, la superficie dei cubetti di carne impiegata e lo spazio interstiziale che s'instaura tra essi rappresentano un habitat idoneo alla crescita ed allo sviluppo di un'eterogenea e peculiare popolazione microbica, deputata a presiedere il processo di fermentazione. La ventricina, pertanto, in virtù della tecnologia di preparazione, rappresenta un'affascinante modello di maturazione dominato da diversi microambienti, in grado di definire gli eventi di carattere biochimico e microbiologico responsabili della qualità finale del prodotto (Barbiero F., 2002).

5.1 Cenni storici

Il nome “ventricina” deriva dall’usanza di utilizzare lo stomaco del maiale per l’insacco di grossi cubi di carne. Ne “La Statistica del Regno di Napoli del 1811”, voluta da Gioacchino Murat, si parla di *“il ventricolo del porco ripieno di carne condito di sale e di finocchi”*. In tali scritti non è menzionato uno degli ingredienti che attualmente è caratterizzante per la Ventricina, quale il peperone. Il successivo avvento di questa spezia si pensa sia dovuto principalmente a motivi culturali, e in parte tecnologici.

La coltivazione del peperone dolce o piccante è tipica del basso Abruzzo e del Molise, dove è presente un clima favorevole. Tale spezia, comunemente coltivata nell’areale di produzione della Ventricina, ha avuto una rapida diffusione in virtù dei riflessi tecnologici riconducibili ai caratteri sensoriali quale il colore e le note organolettiche. A questo occorre aggiungere una forte valenza culturale di carattere empirico. Nella civiltà contadina, infatti, tutto ciò che è rosso è segno di benessere e garanzia di sicurezza. Infatti problemi di conservazione vengono citati sempre ne “La Statistica del Regno di Napoli del 1811”, *“i salami di questa provincia (Abruzzo Citra) non sono di troppo lodevole riuscita, perché pochi sono coloro che li comprimono, quanto basta per tenere le parti in una perfetta coerenza, acciò il vuoto non dia luogo all’aria, all’umido ed al calorico, che possono riscaldare, e pochi ancora sono quelli, che vi adattano quel sale, ch’è necessario, acciò l’esuberanza di questo non l faccia divenir rancide”*. Ancora tutt’oggi è molto facile per le piccole produzioni casalinghe incorrere in questi inconvenienti soprattutto perché non si è mai arrivati ad una vera standardizzazione del metodo di produzione.

La tecnica di realizzazione della ventricina è tramandata di generazione in generazione ed ogni zona del Vastese ha messo a punto il proprio metodo di lavorazione. Differenze si possono riscontrare anche all’interno dello stesso paese, tra una contrada e l’altra, a questo punto non si dovrebbe parlare più di ventricina, ma di ventricine; infatti, esistono ventricine con caratteristiche simili denominate in modo diverso, abbiamo:

La “Ventricina di Guilmi”

La “Ventricina di Montenero di Bisaccia”

La “Ventricina della papa lorica di Montemitro”

Differenze ci sono per quanto riguarda la scelta delle carni, la grandezza del taglio delle stesse, il quantitativo di peperone aggiunto all’impasto, il tipo di insacco. Il tipo di produzione che caratterizza la ventricina è quello casereccio, anche se il crescente

consenso ha portato alla creazione di piccole imprese artigianali che hanno trasferito la conoscenze “tradizionali” su scala più ampia, non riuscendo però ad eliminare i rischi di difetti ed adeguare il prodotto agli standard igienici stabiliti.

Differisce totalmente dalla ventricina descritte precedentemente la “Ventricina di Crognaleto” (Te), infatti, si tratta di un salume ottenuto con un’elevata percentuale di grasso suino (80%), guanciaie, lardo ed in qualche caso anche sugna; il tutto viene tritato finemente con il 20% di carne magra di spalla, oppure ritagli di lavorazione di altri salumi. Si condisce, si amalgama bene e si lascia riposare per alcune ore prima di insaccarlo nello stomaco del suino (che da il nome all’insaccato) o nella vescica. A stagionatura ultimata, si consuma spalmata sul pane.

Recentemente, nel 1998, alcuni produttori locali, hanno fondato un’associazione denominata “Accademia della Ventricina”, con lo scopo di avviare un primo tentativo di tutela del prodotto.

L’attività di tale associazione ha portato a far conoscere il prodotto a livello nazionale, attraverso il suo inserimento *nell’Atlante nazionale dei prodotti Tipici*, attraverso la creazione di un Marchio Collettivo di Qualità (CCIAA di Chieti).

Allo stesso tempo, l’obiettivo è stato anche quello di stimolare studi sul prodotto sia dal punto di vista tecnologico e microbiologico, sia da quello organolettico, attraverso l’esecuzione di panel test.

Il prodotto è stato poi anche censito e riportato in diversi programmi di iniziativa Comunitaria (LEADER II afferente al GAL VASTESE INN).

Ad ulteriore conferma della tipicità del prodotto nonché della relativa zona di origine, nel luglio del 2005 è stata presentata alla Camera dei Deputati, una proposta di legge per la valorizzazione della Ventricina ed istituzione del relativo distretto gastronomico, con richiesta dell’istituzione della certificazione di qualità DOP.

Le condizioni che permettono di beneficiare di una certificazione della qualità, quale può essere quella DOP, IGP, STG, figurano in un disciplinare di produzione che il consorzio richiedente deve predisporre, nel rispetto della legislazione vigente (Regolamenti CEE 2081/92 e 2082/92, Regolamenti Comunitari 509/2006 e 510/2006). Tale disciplinare, rappresenta un insieme di indicazioni, prassi operative e caratteristiche a cui i produttori ed il prodotto devono sottostare.

Devono essere pertanto necessariamente riportati:

- Il nome del prodotto con relativo logo identificativo;

- La descrizione del prodotto mediante la definizione delle materie prime, delle principali caratteristiche chimico-fisiche, microbiologiche ed organolettiche;
- La perimetrazione geografica entro i cui confini è delimitata l'area di produzione, nonché gli elementi che comprovano il legame del prodotto con il territorio di riferimento;
- La descrizione dei metodi di produzione e della storicità degli stessi;
- I riferimenti agli organismi di controllo;
- Gli elementi specifici dell'etichettatura connessi alla dicitura DOP o IGP;
- Le eventuali condizioni da rispettare in forza di disposizioni comunitarie e nazionali.

5.2 Disciplinare di produzione della “ventricina del vastese dop”



Figura 4. Ventricina

Secondo il disciplinare di produzione proposto, la Ventricina del Vastese **figura 5**, è un insaccato crudo di carne suina che non contiene alcun additivo, di grosso calibro (peso: 1-2,5 Kg; diametro 90-200 mm) e forma sub-ovoidale, appartenente alla famiglia dei salumi fermentati non affumicati. È speziato con peperone secco tritato, dolce o piccante, semi di finocchio e sale, insaccato e stagionato per un periodo non inferiore a 100 giorni.

Al taglio **figura 5**, presenta una grana grossa ed una colorazione rosso arancio, diffusa anche in prossimità dei pezzi di grasso.

Nello specifico, le caratteristiche proprie della Ventricina, secondo la proposta di disciplinare, devono essere quelle riportate nelle **tabelle 5-6 e 7**.

INFLUENZA DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E
CHIMICHE DELLA VENTRICINA

Tabella 5. Caratteristiche morfologiche della Ventricina (dalla proposta di disciplinare “Ventricina del Vastese DOP)

	Caratteristiche morfologiche
1	Forma: sub-sferoidale tendente all’ovale;
2	Superficie esterna: asciutta ed eventualmente ricoperta da una diffusa “piumatura” bianca per sviluppo di muffe,
3	Legatura: a doppia briglia ed un passo con spago di medio e grosso calibro;
4	Pezzatura: peso compreso tra 1 e 2,5 Kg;
5	Diametro: compreso tra 90 e 200 mm;
6	Aspetto al taglio: grana disomogenea, si distinguono i vari pezzi di carne che compongono l’impasto;
7	Stagionatura: non inferiore a 100 giorni.

Tabella 6. Caratteristiche organolettiche della Ventricina (dalla proposta di disciplinare “Ventricina del Vastese DOP)

	Caratteristiche organolettiche
1	Colore: rosso arancio diffuso anche intorno ai pezzi di grasso;
2	Sapore: leggermente piccante;
3	Aroma: caratteristico, derivante da una lunga stagionatura, dalla caratteristica speziatura e dallo sviluppo di muffe superficiali con micelio di colore bianco.

Tabella 7. Caratteristiche chimico-fisiche della Ventricina (dalla proposta di disciplinare “Ventricina del Vastese DOP)

	Caratteristiche chimico-fisiche
1	Attività dell’acqua (a_w): max 0,92;
2	pH: tra 5,2 e 5,44
3	Cloruri: max 7,5;
4	Grassi: max 42 % su sostanza secca;
5	Umidità: max 42 %;
6	non è ammessa l’aggiunta di potassio nitrico, sodio nitrico, potassio nitrato, sodio nitrato, fatto salvo il caso in cui l’eventuale minima presenza, sia dovuta a sviluppi propri della salatura e degli altri ingredienti vegetali e comunque nel limite max di 60 mg/Kg (quantità inferiore rispetto ai limiti imposti dalla legge).

La richiesta di certificazione, nasce dall'esigenza di proteggere il prodotto da un possibile volgarizzazione che, l'interessamento dell'industria ad una sua larga produzione, può creare. La creazione di tale certificazione, impone ai produttori, che ne hanno il diritto, il rispetto del disciplinare di produzione. Il



Figura 5. Aspetto della ventricina al taglio

disciplinare regola l'intero processo produttivo, dall'allevamento dei suini, alla trasformazione della materia prima in prodotto finito. Pertanto, l'area di produzione della Ventricina, deve essere quella riferita alle comunità montane del medio-alto vastese.

I suini devono provenire dalla medesima area di produzione, la materia prima deve essere rigorosamente carne fresca di suino, perfettamente dissanguata, disossata, scotennata e mondata delle principali frazioni connettivali. I tagli utilizzati sono: spalla, lonza, lombo, coscia (questi due sul 70 % dei tagli magri devono rappresentare l'80 %) e pancetta (per il 30 % assieme al grasso di prosciutto), compreso rifilatura e triti di prima qualità.

Il taglio delle carni deve prevedere l'esclusivo utilizzo del coltello e la realizzazione di cubetti, anche irregolari, della grandezza di circa 2 cm per lato.

L'impasto deve avvenire immediatamente dopo il taglio e per un tempo sufficiente a permettere il buon rimescolamento degli ingredienti, senza provocare la smelatura del grasso. L'insaccatura deve essere fatta in vesciche di maiale o bondiane di vitello, preventivamente lavate con acqua corrente e curate in acqua aromatizzata con aceto, buccia d'arancio, aglio e alloro. Dopo l'insaccatura, la Ventricina deve essere legata "a doppia briglia ed un passo", con spago di medio e grosso calibro.

La stagionatura deve avvenire in ambienti a temperatura non superiore a 13°C e per un periodo non inferiore a 100 giorni. Solo nei primi giorni è permessa la permanenza del prodotto a temperature leggermente più alte, ma massimo di 18°C. Inoltre, in un periodo non antecedente il cinquantesimo giorno di stagionatura, è ammessa la spalmatura esterna del prodotto con strutto con lo scopo di limitare il calo di peso (**figura 6**).

La tecnologia di produzione conferisce al prodotto una particolare ed inedita collocazione nella classificazione dei salumi, a confine tra gli insaccati fermentati e i salumi a pezzo anatomico intero.

L'impiego di cubetti di carne, di discrete dimensioni, conferisce al prodotto caratteristiche che discostano da quelle proprie degli insaccati fermentati per i quali è previsto l'impiego esclusivo di carne tritata.

Allo stesso tempo però alcuni caratteri sono quelli propri dei salumi fermentati, infatti, la superficie dei cubetti di carne e l'interstizio che si crea tra essi, rappresentano un habitat idoneo alla crescita e allo sviluppo di un'eterogenea popolazione microbica, responsabile dello sviluppo dei processi fermentativi.



Figura 7. Ventricine durante la maturazione

Pertanto, la Ventricina in virtù della tecnologia di preparazione, rappresenta un singolare modello di maturazione caratterizzato da diversi ambienti, in grado di definire gli eventi di carattere biochimico e microbiologici responsabili della qualità finale del prodotto.

5.3 Caratteristiche tecnologiche della ventricina

La tecnologia di produzione della ventricina è molto eterogenea, con delle caratteristiche comuni tra i vari comuni dove si produce l'insaccato. Il periodo più favorevole per la produzione tradizionale della ventricina è quello invernale, per sfruttare le basse temperature per la lavorazione delle carni e per la stagionatura. Vengono di seguito descritte le fasi di lavorazione del salume (**figura 8**)

Preparazione dell'impasto

Taglio delle carni: le carni sono tagliate a punta di coltello in cubi da 2 a circa 7 centimetri di lato a seconda della zona di produzione.

I tagli di carne utilizzati sono: *m. psoas*, *m. longissimus dorsii*, *m. semimembranoso*, *m. semitendinoso*.

Il grasso è aggiunto alla misura del 20-30%, si cerca di utilizzare quello sottocutaneo, già compreso nei tagli di carne o aggiunto e tagliato nella stessa misura dei cubi di carne.

Preparazione della concia: sono aggiunti alla carne sale, peperone dolce (*Capsicum annuum L.*, var. *longum*) in polvere e una quantità, in base al gusto, di peperoncino piccante (*Capsicum annuum L.*, var. *acuminatum*), pepe e semi di finocchio.

Alla carne tagliata è aggiunto il grasso e la concia; l'impasto è ben amalgamato con le mani e si lascia riposare, per almeno 12 ore, a temperature intorno ai 3°C.

Insaccamento

Dopo un'adeguata azione di amalgama effettuata manualmente, per "sciogliere" l'impasto, esso è insaccato utilizzando macchine a imbuto con vite senza fine, oppure con insacatrici pneumatiche.

L'insacco è effettuato in vesciche suine naturali, nel cieco suino o bondiana di vitello salinata; sono stati utilizzati anche i budelli freschi di maiale. I budelli naturali e salinati, dopo essere stati accuratamente lavati con acqua corrente, sono sottoposti a lavaggi continui, con acqua, bucce di arancia e aceto, fino al momento dell'utilizzo.

Legatura

Ogni pezzo è stato legato all'estremità libera ed imbrigliato con spago di canapa, in alcuni casi è utilizzata anche rete elastica per alimenti.

Successivamente viene effettuata la punzecchiatura con aghi sottili per favorire l'eliminazione dell'acqua e l'allontanamento di sacche d'aria eventualmente presenti; i vari pezzi sono appesi a delle pertiche di legno di canna o di metallo.

Asciugatura

La fase di asciugatura dura circa 35-50 giorni, a seconda della pezzatura e tradizionalmente viene fatta in ambienti domestici, nei quali i fattori ambientali sono condizionati empiricamente, con l'utilizzo di un camino o di un braciere e regolando il flusso dell'aria mediante l'apertura degli infissi o di eventuali prese d'aria.

Stagionatura

Terminato il periodo di asciugatura, le ventricine vengono stuccate con una leggera velatura di strutto fuso e trasferite in ambienti freschi per proseguire la stagionatura per circa 90-120 giorni; alla fine di questo periodo sono pronte per essere consumate.

Conservazione

Le ventricine vengono conservate in locali cantina e lo strato di strutto le protegge dagli agenti esterni. A Guilmi, alcune donne usano conservare le ventricine anche nella cenere del camino (Giancristofaro, 1999). In ogni caso, al momento della vendita le ventricine vengono pulite, sezionate a metà, per verificarne la bontà, e confezionate sottovuoto.

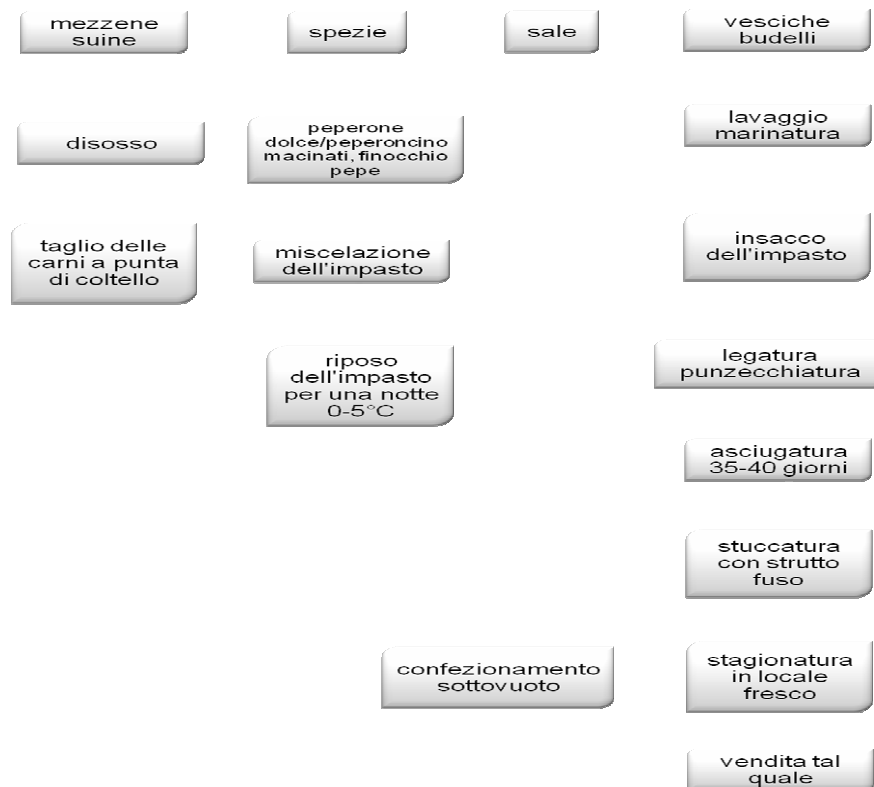


Figura 8. Diagramma di flusso della produzione della Ventricina

5.4 Caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche della ventricina

La ventricina è caratterizzata da una tecnologia di produzione che conferisce al prodotto una particolare ed inedita collocazione nella classificazione dei salumi, a confine tra gli insaccati fermentati e i salumi a pezzo anatomico intero. Infatti, l'impiego di cubetti di carne, di discrete dimensioni, conferisce al prodotto caratteristiche che in qualche modo si discostano da quelle proprie degli insaccati fermentati, per i quali è previsto l'impiego esclusivo di carne tritata. Allo stesso tempo, tuttavia, essa diventa custode di alcuni caratteri propri di salumi fermentati; infatti, la superficie dei cubetti di carne impiegata e l'interstizio che si crea tra essi rappresentano un habitat idoneo alla crescita ed allo sviluppo di un'eterogenea popolazione microbica, deputata a presiedere il processo di fermentazione. Quest'ultimo è influenzato dall'estensione della superficie interstiziale che è certamente minore nel caso l'impasto viene fatto con pezzi di carne tagliati a cubetti di grosse dimensioni, con un minore sviluppo dei processi fermentativi, infatti, la superficie dei cubetti di carne impiegata e l'interstizio che si crea tra essi rappresentano un habitat idoneo alla crescita ed allo sviluppo di un'eterogenea popolazione microbica, deputata a presiedere il processo di fermentazione.

La ventricina, pertanto, in virtù della tecnologia di preparazione, rappresenta un singolare modello di maturazione caratterizzato da diversi micro-ambienti, in grado di definire gli eventi di carattere biochimico e microbiologico responsabili della qualità finale del prodotto (Barbiero, 2002).

Pur se l'area di produzione è limitata, è possibile riscontrare delle differenze, sia tecnologiche, che poi per quanto riguarda i parametri microbiologici ed igienico-sanitari. Ci sono differenze soprattutto per quanto riguarda la polvere di peperone aggiunta, il tipo di involucro usato per l'insacco e le dimensioni dei pezzi di carne. In base a queste differenze menzionate nella zona di produzione della ventricina, è possibile riscontrare principalmente due modi di realizzare la ventricina:

- § tipo I: realizzata con pezzi di carne e grasso delle dimensioni di 5-7 cm e con l'aggiunta di abbondanti quantitativi di peperone in polvere, 30 g/Kg. Insaccata principalmente in vesciche suine del peso di 2,5-3 Kg;
- § tipo II: realizzata con pezzi di carne e grasso delle dimensioni di 2-3 cm e con l'aggiunta di quantitativi minori di polvere di peperone, 15g/Kg. Insaccata in bondiana di vitello e vesciche del peso di 2 Kg circa.

Nella ventricina di tipo I, l'utilizzazione di cubi di carne di grosse dimensioni, comporta:

- un minor compattamento dell'impasto dopo l'insacco e la quasi impossibilità di ottenere la "fetta" nel prodotto maturo, tanto che viene tradizionalmente consumato, prendendo i singoli pezzi insaccati;
- una colorazione meno carica alla superficie di taglio;
- che la minore superficie, sviluppata da pezzi così grandi, abbia delle ripercussioni sull'ottimale fermentazione e sulle caratteristiche organolettiche finali della ventricina.

Infatti, la modalità di realizzazione della ventricina si ripercuote anche sull'andamento del pH e sulla crescita dei principali microrganismi utili e su quelli indicatori di igiene, in modo minore sulla a_w .

Per quanto riguarda l'attività dell'acqua è stato osservato che l'abbassamento al di sotto della soglia critica di 0,95 a 21 giorni non è influenzato dalla grandezza dei cubi di carne utilizzati per l'impasto ma dal condizionamento dei parametri ambientali, temperatura ed umidità relativa, dei locali dove avviene la prima fase dell'asciugatura.

Per quanto concerne il pH la situazione è diversa, mentre nella ventricine di tipo II, entro le prime tre settimane di stagionatura si ha un costante abbassamento dei valori fino a 5,0-5,2, nell'altro tipo il pH si mantiene costante sui valori iniziali. Infatti si è riscontrato anche un minore sviluppo della flora microbica acidificante, Lattobacilli e delle Micrococcaceae. Nelle ventricine di tipo II c'è un incremento delle popolazioni lattiche già nella prima settimana, nel tipo II, invece, i livelli di crescita sono sempre minori.

Prendendo in considerazione i microrganismi indicatori di igiene, in tutte e due le modalità di produzione il quadro è abbastanza favorevole. I coliformi totali, scendono al di sotto della soglia analitica (10^2 UFC/g) in tutte le produzioni; invece non è rilevata la presenza di coliformi fecali.

Nella ventricina è sicuramente rilevante il ruolo delle spezie, per cui è fondamentale porre attenzione ai livelli di contaminazione delle stesse. La presenza di muffe nelle ventricine, che possono trovare favorevoli condizioni di sviluppo soprattutto nella prima fase di stagionatura quando i valori di a_w sono ancora piuttosto elevati, è riconducibile alla presenza di spezie. Nel pepe è frequente la contaminazione di *Bacillus* spp. e Clostridi solfito-riduttori, mentre nel peperone dolce è elevata la contaminazione da

muffe. Sono state riscontrate le seguenti specie di *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. circulans*.

Inoltre, un ruolo particolarmente importante nella contaminazione microbica è svolto dai budelli, in quanto anche quelli secchi o salinati possono risultare a volte notevolmente contaminati da enterobatteri e Clostridi solfito-riduttori che possono essere responsabili di odori e sapori sgradevoli. E' stata rilevata la presenza di *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum* e *Cl. bifermentans*. In nessun caso sono stati isolati: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (Piccirilli e Colavita,2008).

5.5 Il peperone e il peperoncino nella ventricina

5.5.1 Aspetti tecnologici delle spezie

Le spezie esplicano sugli alimenti un'azione protettiva conosciuta ormai da tempo. L'azione inibente è dovuta alla presenza in esse di oli essenziali i quali, quando estratti, possono presentare una buona azione batteriostatica (Tiecco, 2001). Esse sono in grado di rallentare i fenomeni di degradazione della componente grassa degli alimenti, grazie alla loro azione antiossidante. Tra le spezie che più marcatamente manifestano capacità antiossidanti vi sono il rosmarino, la salvia, la noce moscata e la paprica. Tale effetto delle spezie è di particolare importanza , quindi per alcuni alimenti ricchi ingrassi quali salami crudi, ma anche per prodotti di salumificio da conservare freschi come i wurstel di fegato, almeno da quando è invalsa l'abitudine di insaccarli in budelli artificiali.

L'effetto antiossidante della paprica, che si nota maggiormente negli insaccati crudi, viene ricondotto al suo elevato tenore in tocoferoli; l'effetto è potenziato dalla presenza nella spezia anche di acido ascorbico (Schulze, 1971). In alcune spezie come chili, cardamomo e paprica è stata osservata un'attività legante;in quest'ultima, tale proprietà è dovuta alla presenza della lecitina tanto che viene aggiunta ai salumi freschi per favorire la coesione dei lardelli di grasso nei confronti della componente muscolare. Il peperoncino svolge anche delle funzioni antibiotiche, in vitro si è visto che il peperoncino ha attività inibente verso *Escherichia coli*, ad una concentrazione del 3% (Corona *et al.*, 2001). L'attività inibente sulla crescita microbica è stata valutata in vitro anche da Dorantes *et al.* (2000) e sembra sia dovuta soprattutto all'acido *m*-cumarico e all'acido cinammico, due capsacinoidi contenuti nel peperoncino. La capsaicina e l'idrossicapsaicina, infine, sono responsabili del caratteristico sapore piccante del peperoncino.

5.5.2 Caratteristiche del peperone e del peperoncino

Dopo la carne, il peperone in polvere è l'ingrediente più importante della ventricina. I peperoni appartengono alla famiglia delle *Solanaceae*, il loro nome popolare deriva dalla somiglianza del sapore tra alcuni tipi di peperone cayenne, per esempio, ed alcune qualità di pepe vero, appartenente alla famiglia *Piperaceae*, botanicamente molto distante delle *Piperaceae* (Besler B., 1998). Le specie più importanti di peperone coltivato sono: *Capsicum annuum* L., che comprende la maggior parte delle varietà utilizzate come ortaggi e come condimento, e *Capsicum frutescens* che presenta un ciclo poliennale, diffusa in Nord-America e India, i cui frutti vengono utilizzati per la produzione di Tabasco. Il *C. annuum* (fig.1) è una pianta annuale, ermafrodita, con stelo glabro, semilegnoso e ramificazioni dicotomiche; la radice è fittonante fibrosa, molto ramificata; le foglie sono alterne, glabre, lanceolate con margine intero; i fiori sono inseriti nell'ascella delle foglie o delle ramificazioni, solitari o raggruppati, sono sempre penduli fino all'antesi, hanno una corolla bianca gamopetala su cui sono inseriti i filamenti staminali, i frutti possono essere penduli od eretti a seconda della varietà, ed a maturità assumono colorazione gialla, rossa, bruna o verde.



Figura 9. *Capsicum annuum*

In base alle caratteristiche dei frutti, Irish ha distinto nel *C. annuum* L. le seguenti varietà botaniche:

- § Frutti stretti e allungati di piccole e medie dimensioni, *var. conoides*, *var. fasciculatum*, *var. acuminatum*, *var. longum*

- § Frutti di grande dimensione isodiametrici o prismatici, *var. grossum*
- § Frutti di media dimensione di forma subsonica, *var. abbreviatum*
- § Frutti di piccole dimensioni di forma sub sferica o conica, *var. cerasi forme*

Alla *var. longum* appartengono le cultivar “Corno di bue giallo” e “Corno di bue rosso”, quest’ultima utilizzata per la produzione di peperone in polvere, mentre alla *var. acuminatum* appartengono le cultivar utilizzate per la produzione di peperoncini piccanti da condimento (Tesi, 1994).

Originario dell’America centro-meridionale il *Capsicum annuum* si coltiva nei Paesi a clima caldo e temperato. La raccolta, fortemente scalare e difficilmente meccanizzabile, avviene a livelli di maturazione diversi a seconda della destinazione del prodotto. Per la trasformazione in sottaceti il peperone viene raccolto ancora verde, mentre per l’inscatolamento e per il consumo fresco il frutto viene staccato a maturità commerciale prossima, cioè all’inizio della colorazione rossa o gialla. A maturità completa si raccolgono solo prodotti da essiccamento. Per quanto riguarda il sapore, ci sono peperoni dolci, piccanti e piccantissimi. Tutto dipende dalla quantità di capsaicina, che conferisce il sapore di piccante. In genere i peperoncini piccoli sono i più piccanti. Da questo si può dedurre che la capsaicina presente nelle bacche è indirettamente proporzionale alla grandezza dei frutti.

Le condizioni pedoclimatiche della zona di coltivazione determinano la scelta delle varietà più idonee per la resistenza ad avversità biotiche ed abiotiche, per le caratteristiche produttive e merceologiche. La coltivazione di questa specie ha determinato il diffondersi di *cultivar* aventi una grande eterogeneità di forme, pezzatura e colore delle bacche. Ciò dipende dalle differenti richieste di utilizzo del prodotto: mercato interno fresco, industria di trasformazione, essiccato (polveri di peperone e peperoncino). La scelta delle varietà è condizionata anche dagli usi e costumi delle diverse aree in cui il prodotto si è diffuso e viene commercializzato. Le diverse tipologie di *cultivar* coltivate in Italia si possono suddividere in quattro gruppi a loro volta suddivisi in più sottogruppi:

- § squadrata: Quadrato, Rettangolare (frutti grossi)
- § a trottola: Cuneo, Toppo, Marron da conserva
- § a corno: Corno di bue, Marconi

5.5.3 Riferimenti storici sul peperone

Il peperone era usato come alimento in Messico già 9000 anni fa e veniva coltivato nella zona già nel 5500 a.C. In Europa il peperoncino è arrivato con Cristoforo Colombo che lo portò dalle Americhe; acclimatato in Spagna intorno al 1515, dal 1550 erano conosciute piante con frutti rossi e gialli in diverse forme. Verso la metà del XVI secolo, i peperoni erano coltivati in Inghilterra. Nel 1585, Charles de L'Ecluse li osservò in Moravia. In Europa nel 1609 erano conosciuti peperoni con frutti più grandi, più carnosi, spesso rotondi, con sapore meno pungente, come pure qualità con frutti rossi sferici, come il peperoncino ciliegia. Nei secoli che intercorsero, i peperoni divennero un condimento indispensabile nell'Europa centrale, specialmente in Ungheria, come pure in gran parte dell'Asia e dell'India (Besler, 1998).

Inizialmente il peperoncino veniva chiamato pepe delle Indie, e a differenza delle altre spezie ha avuto un'altra linea di diffusione. Infatti il peperoncino, facilmente coltivabile, si è adattato benissimo al clima europeo e ha avuto subito un notevole successo facendo crollare i sogni di ricchezza dei commercianti di spezie. Un destino popolare che ha elevato il peperone a "spezi dei poveri". Le popolazioni contadine usavano questa droga per rendere più appetibile una cucina povera, fatta soprattutto di piatti vegetariani, nonché per conservare la carne o mitigarne il gusto alterato in epoche di scarsa possibilità di conservazione. I popoli ricchi, al contrario, non l'hanno mai considerato elemento importante della cucina. Il suo forte sapore nascondeva il gusto di cibi raffinati. Inoltre, non fu solo bandito dalla gastronomia ricca, ma anche dai pregiudizi morali. I Puritani ed altre confessioni lo vietarono considerandolo eccitante e capace di risvegliare i sensi con poteri addirittura diabolici. Ancora oggi, in molti nostri dialetti meridionali, il peperoncino piccante è chiamato diavolicchio o diavolillo.

CAPITOLO 6

6. Il valore nutritivo dei salami

L'argomento del valore nutritivo dei salami rappresenta un tema estremamente delicato, considerato il forte impatto che questi prodotti possono avere in un'alimentazione come quella moderna, divenuta sostanzialmente eccedentaria rispetto alle reali esigenze nutritive, così mutate nella popolazione di oggi, rispetto a quelle riscontrabili soltanto 30 o 40 anni fa.

Le carni conservate, così come i formaggi, hanno rivestito, fino a non molti anni orsono, un ruolo importante nell'assicurare parte del sostentamento e soprattutto nel cooperare alla copertura dell'apporto proteico della popolazione. Oggi, invece, la situazione è totalmente cambiata, nel senso che tali bisogni sono sin troppo soddisfatti, e quindi quelle stesse caratteristiche che prima risultavano benefiche rischiano, in caso di consumi poco equilibrati, e poco attenti, di trasformarsi in qualità potenzialmente nocive.

Ricordiamo sempre, però, che non è un approccio del tutto corretto quello di parlare degli effetti nutrizionali dei singoli alimenti. Infatti, è soltanto sulla base dell'insieme dei singoli alimenti e della globalità della dieta che possono essere avanzati giudizi circa i possibili benefici o, al contrario, rischi per la salute umana. E' insomma del tutto sbagliata e pericolosa la contrapposizione manichea, tanto cara ad un certo giornalismo, che mette di fronte alimenti "buoni" e alimenti "cattivi", alimenti che fanno sempre e comunque male ed alimenti che fanno sempre e comunque bene, alimenti permessi e alimenti vietati.

E' però indubbio che esistono alimenti la cui particolare composizione o le cui particolari comuni modalità di assunzione rendono molto piccola la distanza esistente tra quantità moderata e quantità eccessiva. Questo gruppo di alimenti comprende le bevande alcoliche, i dolci, i formaggi ed i salumi, tutti prodotti che, per il loro apporto calorico e per il contenuto elevato in uno o più nutrienti, vanno utilizzati con giudizio. Questo significa che, se non si presta particolare attenzione alle quantità usate e alla frequenza con la quale si fa ad essi ricorso, e se lo stile di vita non è sufficientemente attivo, si corre in modo consistente il rischio di cadere in consumi eccessivi sia riguardo a qualche particolare principio nutritivo, sia, in generale, riguardo al valore calorico della razione. Proprio per chiarire le idee rispetto al concetto di

“porzione”, e per permettere a tutti di fare un uso ragionato dei diversi cibi, sia le *Linee Guida per una sana alimentazione italiana*, INRAN 2003, sia i LARN, *Livelli di assunzione raccomandati di energia e di nutrienti*, hanno chiaramente indicato tutta una serie di “porzioni raccomandate” per le diverse tipologie di alimenti: ebbene, per ciò che riguarda le carni conservate, la porzione suggerita è di almeno 50 grammi, consigliata per non più di due volte a settimana.

Ora, dato che l’ultima indagine di sorveglianza nutrizionale effettuata dall’INRAN ha permesso di rilevare che la popolazione italiana consuma in media poco meno di due etti di salumi (in generale) la settimana, l’impatto di tale raccomandazione consisterebbe di fatto in un dimezzamento del consumo di questo tipo di prodotti.

Si tratterebbe, a ben vedere, di una conclusione sorprendente e piuttosto scioccante, considerato che l’appeal di questi prodotti esercitano sul consumatore e la grande quantità di occasioni nelle quali il ricorso ad essi risulta, oltre che gratificante, perfettamente in linea con le esigenze di praticità e di rapidità così spesso imposte dai ritmi della vita moderna.

Ebbene, in realtà possiamo a pieno titolo affermare che un più approfondito ed aggiornato esame della situazione ci permette di arrivare a conclusioni più tranquillizzanti e di escludere che ci siano particolari allarmi da far risuonare. E questo per tutta una serie di ragioni.

Innanzitutto occorre ricordare che le porzioni e le raccomandazioni sono state studiate e standardizzate cercando di prendere in considerazione da un parte le abitudini alimentari degli italiani e, dall’altra, un ideale di corretto modello alimentare. Tale modello, costruito secondo le linee guida dello schema alimentare mediterraneo, prefigura un’alimentazione con netta prevalenza di prodotti vegetali, che ricavi la maggior parte dell’energia (il 55-60%) dai carboidrati (prevalentemente complessi), nel quale i grassi non forniscano più del 30% delle calorie (meno di 1/3 come grassi saturi, che sono quelli che tendono a far innalzare il livello del colesterolo nel sangue, considerato importante fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, meno di 1/3 come grassi polinsaturi e il resto come grassi monoinsaturi, i quali sono i più adatti sia a far diminuire nel sangue il livello di colesterolo “cattivo”, sia a mantenere immutato o addirittura a far aumentare il livello di colesterolo “buono”), e nel quale le proteine non apportino più del 12-15% dell’energia, con una presenza media di colesterolo

alimentare inferiore a 300 mg al giorno ed una presenza di sodio non superiore a 2,4 grammi al giorno.

E' quindi in quest'ottica che è stata indicata per i salumi (generalmente piuttosto ricchi di grassi e di proteine oltre che, sia pure relativamente, di colesterolo e di sale) la già citata "porzione raccomandata" calcolata, in senso lato, sulla generalità della popolazione.

Ebbene, è proprio a questo punto che, per mettere bene a fuoco la questione, è indispensabile fare una serie di considerazioni e di puntualizzazioni che si rendono necessarie per aggiornare e riequilibrare il discorso, e, come vedremo, per attenuare non poco il peso delle limitazioni di consumo cui si è fatto cenno.

Come prima cosa occorre dire che negli ultimi anni la qualità dei salumi italiani è notevolmente cambiata in meglio, tanto da costringerne a rivedere la composizione *bromatologica* così come era riportata nelle "tabelle di composizione degli alimenti comunemente consumati in Italia" che vengono usate come punto fermo di riferimento nelle inchieste alimentari, nel lavoro delle dietiste e di chiunque debba, per professione, analizzare o compilare una razione, ecc..

Questo progresso è avvenuto grazie al miglioramento genetico delle razze impiegate e alla messa a punto di migliori tecniche di allevamento: i processi produttivi sono stati modificati e standardizzati, nell'ottica di rispondere alle nuove normative così come alle mutate richieste di mercato, in linea, peraltro con il rispetto delle caratteristiche tradizionali dei nostri prodotti.

Come risultato finale, oggi possiamo dire di disporre di una produzione di salumi "moderni", il cui profilo nutrizionale è decisamente interessante e rappresenta un deciso passo avanti in confronto a quello riscontrabile negli analoghi prodotti di qualche anno addietro.

Vediamo dunque di tratteggiare sinteticamente questo profilo.

Contenuto di grassi

Si tratta, innanzitutto di salumi contenenti meno grassi (ossia, più leggeri e con una minore densità calorica) e con una percentuale maggiore di grassi più insaturi. Tutto ciò è stato reso possibile, come accennato, da nuove tecniche di allevamento (che hanno favorito la presenza di masse muscolari maggiori e di depositi adiposi minori) e da una più bassa età di macellazione.

Ma non basta: questi grassi, oltre ad essere diminuiti in quantità, sono anche cambiati in qualità. In essi è, infatti, diminuita la presenza di acidi grassi saturi (che oramai non superano 1/3 del totale) e in parte (3%) sono rappresentati da acido stearico il quale nell'organismo umano si converte rapidamente in acido oleico (monoinsaturo), mentre è aumentata quella degli acidi grassi polinsaturi (che comprendono gli acidi grassi essenziali, indispensabili per il nostro metabolismo) e, soprattutto, quella degli acidi grassi monoinsaturi, ossia del prezioso acido oleico, il quale prevale con una percentuale del 47% circa del totale.

In sintesi, nei moderni salumi la composizione in acidi grassi è notevolmente simile nei prodotti insaccati.

Ma non basta ancora: oggi la frazione lipidica dei salumi presenta in molti casi altri tre aspetti favorevoli sostanzialmente innovativi:

- risulta arricchita anche nei preziosi acidi grassi polinsaturi omega-3
- presenta talvolta quantità non trascurabili di acido linoleico coniugato
- apporta quantità superiori rispetto al passato di vitamina E, che rende indiscutibilmente queste carni più resistenti nei confronti dei processi ossidativi e di irrancidimento.

Contenuto in proteine

La qualità proteica dei moderni salumi è, come sempre, molto elevata, in modo uniforme nelle varie tipologie di prodotti. Gli aminoacidi essenziali, rappresentano ben il 45% del totale degli aminoacidi di queste proteine. Inoltre, nella maggior parte dei prodotti è netta la prevalenza del tessuto muscolare sul collagene, il che eleva particolarmente l'indice di qualità. Inoltre, in molti tipi di salumi, queste proteine risultano particolarmente assimilabili, grazie ad una forma di predigestione che avviene in fase di stagionatura.

Contenuto in vitamine

Ancor prima della già citata presenza di quantità non trascurabili di vitamina E (va ricordato in contenuto in vitamine B₁ e B₂ 8variabile da un prodotto all'altro), quello in niacina e quello in vitamina B₁₂, la quale si trova in quantità rilevanti negli alimenti carnei e nei prodotti derivati.

Contenuto in minerali

Tutti i tessuti animali sono una buona fonte di alcuni oligoelementi, fra i quali hanno particolare soprattutto lo zinco e il ferro, in forma altamente biodisponibile, e il selenio è contenuto in buona quantità. Gli insaccati crudi, quindi, offrono un importante contributo alla copertura del fabbisogno giornaliero in questi minerali.

Presenza di additivi

Il progressivo miglioramento delle carni e delle tecnologie di produzione e conservazione è orientato nel senso di abbassare sempre più i livelli di sali, nitriti e nitrati che vengono utilizzati come additivi. Uno dei punti critici che, unitamente al livello dei grassi, ha a lungo penalizzato questi prodotti è stato il contenuto di sale.

Ebbene, le quantità di cloruro di sodio riscontrate oggi sono diminuite nei prodotti cotti, mentre sono un po' più alte in quelli crudi.

Un'altra considerazione. E' vero che i livelli di sale presenti non sono di per sé trascurabili, ma bisogna anche osservare che le quantità di consumo consigliabili, per quanto riguarda i salumi, sono tali da ridurre di molto l'apporto globale di sodio, e inoltre, anche che si tratta di prodotti ai quali non è prevista alcuna aggiunta di sale né a tavola e neppure nel corso della preparazione culinaria.

In conclusione, tenendo conto di quanto detto finora, è fuor di dubbio che i salumi, se usati con saggezza, abbiano pieno diritto di cittadinanza nel quadro di un'alimentazione equilibrata, in linea con le nostre tradizioni più che millenarie che ne hanno avallato l'utilità e la sicurezza d'uso. Però, allo scopo di evitare qualunque tipo di problema e/o di errori nelle scelte, occorre insistere sull'esigenza di porre sempre in primo piano l'attenzione agli equilibri complessivi dell'intera dieta.

Parte Sperimentale

Scopo del lavoro

La crescente domanda di prodotti di qualità, la maggiore consapevolezza ed informazione del consumatore e la sempre più agguerrita concorrenza sul mercato alimentare, soprattutto da parte della Grande Distribuzione Organizzata, hanno spinto le piccole aziende produttrici a cercare un modo per valorizzare i propri prodotti.

Nasce così l'esigenza di tutelare le proprie produzioni, attraverso il riconoscimento di una certificazione, con la quale garantire al consumatore gli standard qualitativi da esso richiesti.

La Ventricina, è un insaccato crudo di carne suina appartenente alla famiglia dei salumi fermentati non affumicati, tipico delle regioni Abruzzo e Molise in cui la sua produzione si riconduce ad una tradizione radicata nel tempo.

La richiesta di una certificazione DOP, da parte dei produttori della Ventricina del Vastese, ha portato alla creazione di un consorzio ed alla stesura di un disciplinare di produzione. Tale disciplinare definisce le modalità di esecuzione di ogni singola fase produttiva e le caratteristiche che il prodotto deve possedere per poter essere considerato tale. La Ventricina, come del resto tutti gli altri prodotti fermentati, durante i processi di fermentazione e maturazione, rappresenta un ecosistema complesso in cui subentrano una serie di processi chimico-fisici e microbiologici che rendono possibile la formazione degli elementi caratterizzanti il prodotto stesso.

Sebbene in letteratura ci siano numerosi studi riguardo le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche di prodotti insaccati, per quanto concerne la Ventricina, non ci sono informazioni in merito.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro sperimentale è quello di caratterizzare la Ventricina dal punto di vista chimico-tecnologico, andando a valutare le modificazioni che avvengono a carico dei nutrienti nel corso della stagionatura, relazionandole allo sviluppo della popolazione microbica implicata nei processi che portano alla formazione dei componenti caratteristici del prodotto finito.

Al fine di garantire il giusto compromesso tra i principali caratteri di tradizionalità e le esigenze del mercato e dei consumatori, verrà valutata la possibilità di adottare eventuali innovazioni di processo, tra cui la possibilità di rivedere gli ingredienti introdotti con la salagione, per meglio rispondere ai caratteri di sicurezza igienico-sanitaria, fortemente richiesti dai consumatori

CAPITOLO 7

7. Materiali e metodi

7.1 Preparazione dei campioni di ventricina

Presso un laboratorio di carattere artigianale, sito nella provincia di Campobasso, sono stati preparati due lotti di prodotti Ventricina che trovano l'elemento di differenza nella modalità di triturazione delle frazioni magre e grasse.

Pertanto nella prima fase di preparazione sono stati selezionati e mondati i tagli magri di suino (80%), rappresentati dal *longissimus dorsi* e dal *piccolo e grande psoas* e quelli grassi (20%) rappresentati dalle frazioni grasse non basso-fondenti provenienti prevalentemente dal grasso di gola.

A tal punto le carni sono state destinate alla preparazione di due differenti lotti identificati con le due sigle T ed G, ciascuno contraddistinto da una differente modalità di triturazione delle materie prime.

I campioni del lotto T sono stati realizzati impiegando un impasto costituito dalla frazione magra, opportunamente ridotta in cubetti dallo spigolo di circa 4 centimetri, unita alla frazione grassa anch'essa ridotta in cubetti della medesima dimensione.

Al contrario, i campioni del lotto G sono stati preparati mediante l'impiego della frazione magra e grassa sottoposta a preventiva triturazione meccanica (con trafilatura medio-grande Ø).

A ciascun lotto sono stati addizionati gli ingredienti della salagione rappresentati da cloruro di sodio, in ragione del 3%, nitrati, in ragione del 0,15%, nonché peperone dolce in polvere in ragione del 3%. Successivamente, dopo un opportuno periodo di riposo dell'impasto (sereno) pari a circa 12 ore, necessario per permettere una ottimale diffusione degli ingredienti all'interno della massa, l'impasto è stato insaccato in budelli naturali rappresentati dalla porzione di cieco bovino.

Gli insaccati ottenuti sono stati sottoposti, per un periodo di 90 giorni, ad opportuna stagionatura condotta in celle a temperatura e umidità controllate. In particolare nel corso dei primi 5 giorni sono state applicate temperature di 18 °C, nella successiva prima fase di maturazione, a cadenza di tre giorni, la temperatura è stata abbassata

ripetutamente di 2° C fino a raggiungere 10° C. Tale temperatura, raggiunta dopo 16 giorni di maturazione, ha accompagnato l'intero periodo di maturazione.

7.2 Valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche

I campioni provenienti dai due differenti lotti di Ventricina sono stati sottoposti ad analisi chimiche, chimico-fisiche e microbiologiche al momento della preparazione e dopo sette, quindici, quarantacinque e novanta giorni di maturazione.

Ciascun campione prima di essere analizzato è stato ridotto nelle dimensioni idonee all'analisi utilizzando l'omogeneizzatore *Waring blender* (model 32bl79; WPDDCA CICO s.a.s.). I campioni in attesa di essere sottoposti alle analisi, sono stati conservati a -18°C.

7.3 Analisi chimico-fisiche

7.3.1 Determinazione del pH

Il pH è stato misurato mediante pH-metro (Crison 2001) con elettrodo a spillo inserito direttamente nel campione. Per ciascun campione prelevato sono state effettuate tre misurazioni di tale parametro inserendo l'elettrodo in punti differenti del prodotto.

7.3.2 Determinazione dell'attività dell'acqua

I valori di a_w sono stati determinati mediante opportuno strumento "Aqualab" modello CX-1. La rilevazione di tale parametro, da parte dello strumento "AquaLab", si basa sulla tecnica del punto di rugiada. Essa prevede la formazione di un velo di condensa (o rugiada) sulla superficie di uno specchietto di acciaio raffreddato sistemato all'interno della camera analitica.

Nel momento in cui si ha la condensazione del vapore con formazione del velo di rugiada, un opportuno sensore a raggi infrarossi, costantemente puntato contro la superficie dello specchietto, rileva la temperatura e la correla alle tensione di vapore del campione utilizzando delle curve isoterme che ha in memoria.

L'attività dell'acqua del campione viene calcolata facendo il rapporto tra la tensione di vapore del campione e la tensione di vapore dell'acqua alla stessa temperatura.

7.3.3 Determinazione dell'umidità (AOAC Official Method 950.46)

La determinazione dell'umidità è stata eseguita al fine di conoscere la quantità di acqua presente nel campione. A tal proposito circa 2g di campione sono stati pesati all'interno di pesafiltri precedentemente condizionati per circa 30 min a 105° C, quindi successivamente posti in stufa per 18 ore.

Il tenore di umidità, espresso come valore percentuale, è dato dalla differenza tra il peso del campione prima e dopo l'essiccamento:

$$\text{Umidità \%} = [(P_i - P_f) / P_c] * 100$$

dove:

P_i = peso del pesafiltro + campione in grammi

P_f = peso del pesafiltro + sostanza secca in grammi

P_c = peso del campione (in grammi)

7.3.4 Determinazione delle ceneri (AOAC Official Method 920.153)

Il tenore in ceneri di un campione, rappresenta la quantità di minerali che resta come residuo incombustibile dopo incenerimento dello stesso in muffola.

Le capsule in porcellana utilizzate per l'analisi, sono state preventivamente condizionate in muffola a 550°C per circa 30 min e successivamente pesate, dopo raffreddamento in essiccatore.

Quindi dopo aver fatto la tara è stato pesato il campione, da cui preventivamente era stata allontanata l'acqua, in quantità di 0.5 g circa e posto in muffola a 550°C fino a "ceneri bianche".

Il tenore in ceneri è espresso in percentuale sulla sostanza secca e calcolato come:

$$\text{Ceneri \%} = [(P_f - P_i) / P_c] * 100$$

dove:

P_f = peso della capsula + peso delle ceneri (in grammi)

P_i = peso della capsula (in grammi)

P_c = peso del campione (in grammi)

7.3.5 Determinazione dei grassi (AOAC Official Method 991.36)

Il tenore in grassi, è stato determinato con il metodo Soxhlet il quale prevede un'estrazione con etere di petrolio, per un tempo pari a 8 ore.

Un'aliquota di campione pari a circa 2.5g è stata pesata all'interno di ditali in cellulosa nei quali è avvenuta poi l'estrazione.

I ditali sono stati posti nel corpo estrattore al quale è stato aggiunto l'etere. Il calore del bagno in cui si trova il sistema, ha permesso l'evaporazione del solvente che ricondensando ricade nel corpo estrattore e quindi nel pallone sottostante, portando con se il grasso estratto dal campione. Dopo circa 8 ore, il solvente contenuto nei palloni è stato allontanato mediante evaporatore rotante ed i palloni contenenti il grasso, sono stati posti in stufa a 105°C per 1 ora, e quindi sono stati raffreddati nell'essiccatore e pesati.

Il tenore in grassi è espresso in percentuale sul tal quale e calcolato come:

$$\text{Grasso \%} = [(Pf - Pi) / Pc] * 100$$

dove:

Pf = peso del pallone + grasso (in grammi)

Pi = peso del pallone (in grammi)

Pc = peso del campione (in grammi)

7.3.6 Determinazione delle proteine (AOAC Official Method 928.08)

La determinazione dell'azoto totale è stata effettuata con il metodo Kjeldahl.

Il campione, pesato in quantità di 0,5g è stato posto nei tubi da mineralizzazione e mineralizzato con acido solforico concentrato (10ml), in presenza di un catalizzatore al rame, in modo da ossidare tutta la sostanza organica presente e trasformare l'azoto organico presente nel campione in solfato di ammonio quindi, in azoto inorganico.

A mineralizzazione completa, si è proceduto alla distillazione in corrente di vapore.

L'azoto ammoniacale, è stato poi titolato con acido solforico 0,1N (acido debole) in presenza di un indicatore specifico per azoto.

Dal volume di acido solforico 0,1N necessario alla titolazione, si risale alla concentrazione di azoto totale presente, come:

$$N \% = [(ml_{H_2SO_4} * N_{H_2SO_4} * PE_N) / (Pc * 1000)] * 100$$

dove:

ml_{H₂SO₄} = ml di acido solforico utilizzato per la titolazione

N_{H₂SO₄} = normalità dell' acido solforico 0,1

PM_N = peso equivalente dell'azoto 14

Pc = peso del campione (in grammi)

Il contenuto in proteine, è stato calcolato moltiplicando il valore di azoto totale per il fattore di conversione relativo alla carne (6,25).

7.3.7 Determinazione dell' azoto non proteico (NPN)

La determinazione dell'azoto non proteico è stata fatta su una quantità di campione pari a 30g circa. Il campione, addizionato di circa 50ml di TCA al 20%, sono stati omogeneizzati mediante Waring blender per 1 minuto.

Il prodotto dell'omogeneizzazione, addizionato di ulteriori 50ml di TCA e filtrato su (filtri Whatman n°1) è stato sottoposto ad analisi con il Kjeldhal. A tal proposito sono stati utilizzati 15ml di campione da analizzare, 20 ml di acido solforico concentrato per la mineralizzazione e 80ml di NaOH in fase di distillazione.

Dal volume di titolante (acido solforico 0.1N) utilizzato si risale alla concentrazione percentuale dell' NPN presente, come:

$$NPN\% = \frac{ml_{H_2SO_4} * N_{H_2SO_4} * PE_N}{ml_{Filtr}} * \frac{10}{30}$$

dove:

$ml_{H_2SO_4}$ = ml di acido solforico utilizzato per la titolazione

$N_{H_2SO_4}$ = normalità dell' acido solforico

PE_N = peso equivalente dell'azoto

ml_{Filtr} = ml di campione filtrato dopo precipitazione delle proteine

7.4 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state condotte prelevando asepticamente 10 g di campione ed omogeneizzandoli per 2 minuti in un Lab-blender Stomacher 400 (Steward Medical) con 90 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

L'omogeneizzato è stato utilizzato per il successivo allestimento delle diluizioni decimali.

Oggetto della valutazione è stata la determinazione della presenza sia dei microrganismi utili sia di quelli indesiderati.

Tra i microrganismi utili le *Micrococcaceae* sono state contate su piastre di MSA (OXOID) dopo 48 ore di incubazione a 30 °C; i batteri lattici sono stati determinati su MRS agar (OXOID) dopo incubazione a 30°C per 72 ore in anaerobiosi (GASPACK Anaerobic System, BBL).

Tra gli indesiderati gli enterobatteri sono stati determinati su VRBGA (Oxoid) dopo 48h di incubazione a 37°C. I Coliformi totali e i Coliformi fecali sono stati contati su VRBLA (Oxoid) dopo 48 ore di incubazione rispettivamente a 37° e 44° C.

Gli enterococchi sono stati contati su “Slanetz & Bartley medium” (Oxoid) dopo un’incubazione di 48 ore a 37°C. I livelli delle cariche dei Clostridi sono stati determinati su RCM (Reinforced Clostridial Medium –Oxoid-) dopo 48 ore di incubazione in anaerobiosi ad una temperatura di 28°C. Le cariche di *Brochothrix thermosphacta* sono state determinate su ST Agar base (Oxoid) addizionato di STA selective supplement (Oxoid) incubando a 37°C per 48 ore.

Le cariche di *Pseudomonas* spp. sono determinate su Pseudomonas Agar (Oxoid) addizionato di SR102E supplement (Oxoid) incubando a 22°C per 24 ore.

7.5 Identificazione dei batteri lattici isolati

I batteri lattici isolati sono stati sottoposti a identificazione fenotipica e genotipica come di seguito riportato.

7.5.1 Identificazione mediante tecniche fenotipiche

I microrganismi isolati riferibili ai batteri lattici sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni volte a descrivere i caratteri morfologici e fenotipici:

- osservazione al microscopio;
- colorazione di Gram;
- saggio della catalasi;
- produzione di CO₂ da glucosio;
- capacità di crescita a 15° e 45°C
- determinazione del profilo fermentativo mediante sistema APILAB 50 CHL (Biomeriux, France)

7.5.2 Identificazione genetica dei batteri lattici mediante analisi PCR-DGGE

I microrganismi isolati dalle piastre di MRS, risultati di forma bastoncellare o coccica, Gram positivi e catalasi negativi, sono stati considerati presuntivamente come batteri

lattici. Per la loro identificazione è stata utilizzata una tecnica biomolecolare che ha previsto una preliminare estrazione del DNA dalle cellule microbiche, una successiva amplificazione della regione variabile del 16rRNA, l'analisi DGGE e il sequenziamento.

7.5.3 Estrazione DNA da colture pure

L'estrazione del DNA dagli isolati è stata eseguita su brodocolture over night, incubate a 28°C, usando la tecnica descritta da Succi *et al.* (2005).

7.5.4 Amplificazione dei batteri lattici isolati

La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state valutate attraverso la determinazione della densità ottica a 260 e 280 nm; il rapporto tra A_{260} e A_{280} ha dato una stima della purezza del DNA estratto come descritto da Sambrook *et al.* (1989).

La preparazione della miscela di reazione è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare e i reagenti sono stati tenuti sotto cappa e in ghiaccio, prima e dopo la miscelazione, sino alla fase di amplificazione. La regione del 16S rRNA amplificata è illustrata nella **figura 10**:

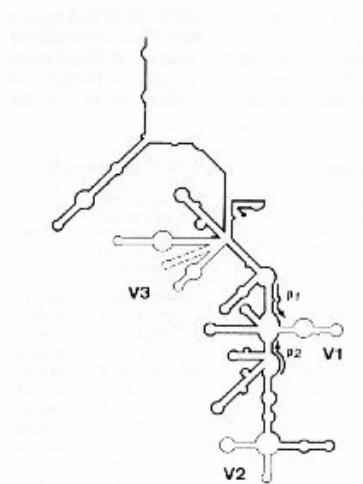


Figura 10. Rappresentazione della regione 5' della struttura secondaria del 16S rRNA (regione terminale 5'). Le regioni conservate sono rappresentate in grassetto, mentre le regioni variabili sono indicate da linee sottili (la struttura rappresentata con tratteggio è stata trovata soltanto in alcuni microrganismi). Questa parte del 16S rRNA contiene le regioni variabili definite V1, V2, V3. La posizione e la direzione dei primer, usati per la PCR in questo studio, è indicata dalle frecce.

Al fine di ottenere gli ampliconi da differenziare in un secondo tempo tramite DGGE, è stata eseguita una reazione PCR per il DNA dei batteri lattici utilizzando i primer descritti in **Tabella 8**.

Tab.8. Primer utilizzati per la PCR dei batteri lattici

PRIMER	SEQUENZA
P₁V₁GC (senso)	5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3' (Cocolin <i>et al.</i> , 2001b)
P₂V₁ (antisenso)	5'-TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC-3' (Rantsiou <i>et al.</i> , 2005)

Al primer P1V1 è stata legata una coda GC (CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) come descritto da Sheffield *et al* (1989).

Il volume finale della miscela di reazione è stato di 50 µL così costituiti:

• Buffer	10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl
- dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,2 mM ognuno
- MgCl ₂	1,5 mM
- Primer senso	0,2 µM
- Primer antisenso	0,2 µM
- <i>Taq</i> polimerasi	1,25 UI

Preparato e porzionato il mix, si è proceduto al caricamento di 2 µL (circa 200 ng) di DNA campione.

Come controllo di reazione, è stata aggiunta una prova in bianco, dove il DNA è stato sostituito con acqua. Le amplificazioni sono state eseguite in termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) usando il seguente ciclo d'amplificazione:

denaturazione iniziale	95°C x 5 min	
denaturazione	95°C x 1 min	} 35 cicli
annealing	45°C x 1 min	
estensione	72°C x 1 min	
estensione finale	72°C x 7 min	

Per confermare l'avvenuta amplificazione, prima di eseguire l'analisi DGGE, è stata effettuata una breve corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. A tal fine, sono stati caricati in ogni pozzetto 7 µL di amplificato miscelati a 3 µL di colorante Gel Loading Buffer. Il tampone di corsa è stato il TBE (Tris Borato EDTA) 0.5 X. La corsa elettroforetica è stata condotta a 40V per 10 minuti e successivamente a 120V per 60 minuti.

Trascorso il tempo il gel è stato colorato in una soluzione di bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0.5 µg/mL per circa 30 minuti. Dopo decolorazione in acqua per circa 40 minuti si è proceduto alla lettura e all'acquisizione delle immagini dei gel con GEL DOC XR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

7.5.5 Analisi DGGE dei batteri lattici isolati

Per analizzare i prodotti PCR ottenuti da colture pure, è stato usato il Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

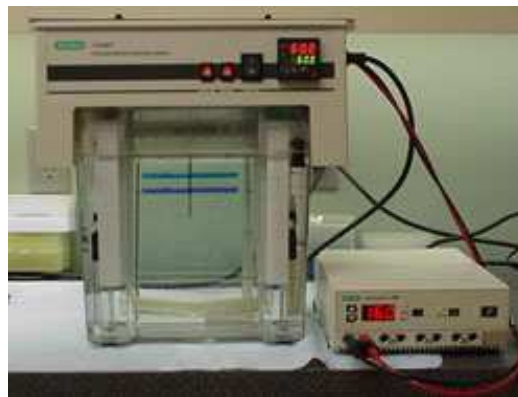


Figura 11. Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad, CA, USA)

L'elettroforesi è stata eseguita in un gel di poliacrilammide (8% [p/v] acrilammide:bisacrilammide 37.5:1) dello spessore di 0.8 mm, utilizzando un range di denaturante compreso fra il 40 e 60%, crescente nella direzione della corsa elettroforetica.

La polimerizzazione dell'acrilamide è stata ottenuta aggiungendo TEMED (15 µL in 15 ml di soluzione) e ammonio per solfato 0,1% (150 µL in 15 ml di soluzione). Dopo circa un'ora dalla preparazione del gel, 5 µl di campione di DNA amplificato sono stati mescolati con 3 µl di Gel Loading Dye in un supporto con pozzetti e poi caricati con puntali dotati di capillari. In ogni gel DGGE è stato incluso un ladder di identificazione, una miscela artificiale di ampliconi di PCR da colture pure con identità tassonomica conosciuta. I ladders sono stati caricati nel primo e nell'ultimo pozzetto di ogni gel. Nelle prove genetiche condotte sono stati adoperati, per la realizzazione del ladder dei ceppi tipo.

La corsa elettroforetica è stata impostata ad un voltaggio costante di 120 V per 4 ore, alla temperatura di 60°C. Il tampone utilizzato per la corsa elettroforetica è stato il TAE 1X.

Al termine della corsa elettroforetica, i gel sono stati immersi per 30 minuti in TAE 1X contenente bromuro di etidio (Sigma) 0.5 µg/ml. Dopo decolorazione in acqua per circa 40 minuti si è proceduto alla lettura dei gel e alla acquisizione delle immagini con GEL DOC XR System (Bio-Rad).

Per valutare il grado di similitudine tra i profili DGGE dei ceppi isolati e dei campioni prelevati direttamente da matrice ai vari tempi, è stato utilizzato il software Gel-Compare Version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Il calcolo della similarità dei profili delle bande è stato reso possibile grazie all'applicazione del coefficiente di correlazione Pearson e il dendrogramma è stato ottenuto attraverso il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) (Vauterin & Vauterin, 1992).

7.5.6 Sequenziamento dei batteri lattici

Dall'identificazione ottenuta attraverso l'analisi DGGE, alcuni ceppi sono stati selezionati per il successivo sequenziamento.

Ventotto ceppi, appartenenti a differenti cluster ottenuti tramite gel Compare dai profili DGGE, sono stati amplificati utilizzando i primer P1V1 e P4V3 (Klijin N. *et al.*, 1991; Cocolin *et al.*, 2007) per essere sequenziati. La sequenza dei primer è di seguito riportata:

PRIMER	sequenza
P₁V₁ (senso)	5'- GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3' (Cocolin <i>et al.</i> , 2001b)
P₄V₃ (antisenso)	5'- ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3' (Klijin <i>et al.</i> , 1991)

Il volume finale della miscela di reazione è stato di 100 µl così costituiti:

Buffer	10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl
dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0.2 mM ognuno
MgCl ₂	1.5 mM
sonda P1V1	0.2 µM
sonda P4V3	0.2 µM
Taq polimerasi (Roche Diagnostics)	1.25 UI

Le amplificazioni sono state eseguite in termociclatore MASTERCYCLER GRADIENT (EPPENDORF Hamburg, Germany) usando il seguente ciclo d'amplificazione:

denaturazione iniziale	95°C x 5 min
denaturazione	95°C x 1 min
annealing	42°C x 1 min
estensione	72°C x 1,5 min
estensione finale	72°C x 7 min

I prodotti d'amplificazione ottenuti sono stati purificati tramite PCR Purification Kit (Qiagen, Italia) e spediti ad una ditta esterna per il sequenziamento (MWG Biotech, Germania).

Il Kit ha permesso di allontanare dal DNA i Primers, i nucleotidi, la polimerasi, i Sali. La preparazione del campione da spedire per il sequenziamento, attraverso i reagenti del Kit, ha previsto due momenti: una prima fase di preparazione dei reagenti da utilizzare (forniti dal kit) e una seconda fase di preparazione del campione. La fase di preparazione dei reagenti ha previsto i seguenti momenti:

- aggiunta di etanolo al 100% (sterilizzato a freddo con filtri di acetato di cellulosa con pori da 20µm di diametro, Albet) al Buffer PE del Kit;
- miscela dell'indicatore del Kit con il Buffer PB contenuto nel medesimo kit. Questo passaggio è indispensabile perché il campione di DNA da purificare deve risultare di colore giallo all'aggiunta di tale miscela, altrimenti bisogna trattarlo con sodio acetato 3M a pH 5;

la seconda fase è costituita dai seguenti passaggi:aggiunta di 500 µl di Buffer PB con indicatore a 100 µl di DNA amplificato;controllo del colore che doveva sempre risultare giallo;prelevare la soluzione ottenuta e metterla nelle colonnine fornite dal Kit;centrifugare a 13000 rpm per 60 secondi, eliminare il surnatante;

- lavare la colonnina con 750 µl di Buffer PE e centrifugare a 13000 rpm per 60 secondi, si elimina il surnatante e si ripete la centrifuga per eliminare del tutto l'etanolo che potrebbe compromettere l'esito della purificazione;si trasferisce la colonnina in un tubo sterile da 1,5 ml, si aggiunge il Buffer EB e si centrifuga a 13000 rpm per 60 sec.
- Si raccoglie così il DNA e si procede all'invio.

7.6.2 Determinazione dell'attività proteolitica

L'azione proteolitica è stata valutata mediante l'analisi dei profili elettroforetici di brodi di carne ciascuno inoculato con i singoli ceppi di *L. sakei*.

Preparazione e inoculo del brodo sarcoplasmatico

I tagli magri di carne, rappresentati dal *Longissimus dorsi*, sono stati addizionati triturati e nel contempo addizionati di acqua nel rapporto di 1:2 v/v.

L'omogenizzato ottenuto è stato ripetutamente centrifugato a 12000 rpm per 10 minuti. Il surnatante contenente le sarcoplasmatiche è stato raccolto e conservato a -20 °C fino al momento dell'analisi.

Gli estratti sarcoplasmatici ottenuti sono stati sterilizzati mediante filtrazione e distribuiti (8 mL) in tubi sterili. A ciascun brodo di carne è stato inoculato (1%) un singolo ceppo di *L. sakei* oggetto dello studio. I brodi di carne opportunamente inoculati sono stati incubati a 28° C per 7 giorni

Gel elettroforesi e preparazione dei campioni

Lo studio è stato condotto per SDS-PAGE con un sistema tampone discontinuo, come descritto da Laemeli (1970), adottando per la preparazione del gel di separazione una concentrazione fissa di poliacrilamide al 12%:

Acqua bidistillata	ml 4.5
1.5 M di Tris-HCl, pH 8.8	ml 2.5
SDS 10% (w/v)	µl 100
Soluzione al 40% di acril/bis-acril (29:1) (Bio-Rad)	ml 3.0
Ammonio persolfato 10% (w/v) (Pharmacia Biotec)	µl 50
TEMED (Pharmacia Biotec)	ml 10

Lo "stacking gel", che serve a compattare le bande proteiche prima della loro effettiva separazione in base al peso molecolare nella matrice del "separating gel", è stato preparato ad una concentrazione del 4% :

Acqua bidistillata	ml 6.4
1.5 M di Tris-HCl, pH 8.8	ml 2.5
SDS 10% (w/v)	µl 100
Soluzione al 40% di acril/bis-acril (29:1)	

(Bio-Rad) ml 1.0
Ammonio persolfato 10% (w/v) (Pharmacia Biotec) µl 50
TEMED (Pharmacia Biotec) ml 10

Per la determinazione del peso molecolare delle bande sullo stesso gel sono stati caricati degli standard proteici a basso peso molecolare (Pharmacia Biotec): fosforilasi b (94 kDA), albumina (67 kDA), ovalbumina (43 kDA), anidrasi carbonica (30 kDA), inibitore della tripsina (20.1 kDA), α -lactoalbumina (14.4 kDA).

Gli standard proteici forniti dalla casa produttrice in forma liofilizzata sono stati disciolti in un opportuno volume di tampone di solubilizzazione da una concentrazione di 1 mg/ml, denaturati mediante riscaldamento a 100°C per 5', infine suddivisi in piccoli volumi e conservati a - 20°C.

La separazione elettroforetica è stata condotta in un apparecchiatura Hoefer SE 600 (Hoefer Scientific Instruments) applicando un voltaggio costante (30V) ed utilizzando un tampone di corsa a pH 8.3 (Tris-HCl, 0.025 M; glicina, 0.192M; SDS, 0.1%).

Al termine della corsa elettroforetica le bande proteiche sono state rivelate mediante colorazione con una soluzione (0.1%, w/v) di Brilliant Blue Comassie R-250 (Bio-Rad) in metanolo, acido acetico e acqua (40:10:50, v/v/v).

La successiva decolorazione è stata condotta nello stesso solvente fino a completa eliminazione del colorante legato aspecificamente al gel.

7.7 Identificazione dei cocchi coagulasi negativi (CNC)

I CNC isolati sono stati sottoposti a identificazione fenotipica e genotipica come di seguito riportato.

7.7.1 Identificazione mediante tecniche fenotipiche dei CNC

Gli isolati riferibili ai CNC sono stati sottoposti alle seguenti valutazioni volte a descrivere i caratteri morfologici e fenotipici:

- osservazione al microscopio;
- colorazione di Gram;
- saggio della catalasi;
- resistenza alla lisostafina;
- determinazione del profilo fermentativo mediante sistema APISTAPH plus (Biomeriux, France)

7.8 Identificazione genetica dei cocchi coagulasi-negativi isolati (CNC) mediante analisi PCR-DGGE

Sessanta ceppi isolati da piastre di MSA, risultati di forma coccica, Gram positivi e catalasi positivi, e presuntivamente micrococchi-stafilococchi, sono stati identificati mediante la tecnica PCR-DGGE condotta come riportato nel paragrafo 7.5.2.

7.8.1 Estrazione DNA da colture pure

L'estrazione del DNA dagli isolati è stata eseguita su 4 ml di BHI broth contenenti l'inoculo incubati a 28°C per 24 h, usando la tecnica descritta da Andrighetto *et al.* (2001) modificata per l'aggiunta di solo lisozima (50 mg/ml, Sigma, Milano) per la rottura della parete delle cellule batteriche così come descritto da Cocolin *et al.* (2004).

7.8.2 Amplificazione, analisi DGGE e sequenziamento dei cocchi coagulasi-negativi (CNC)

I ceppi di CNC, appartenenti a cluster ottenuti tramite gel Compare dai profili DGGE, sono stati amplificati utilizzando i primer P1V1 e P4V3 (Klijn N. *et al.*, 1991; Cocolin *et al.*, 2007) per essere sequenziati.

Il sequenziamento dei CNC è stato condotto come riportato nei paragrafi 7.5.4, 7.5.5 e 7.5.6.

Capitolo

RISULTATI E DISCUSSIONE

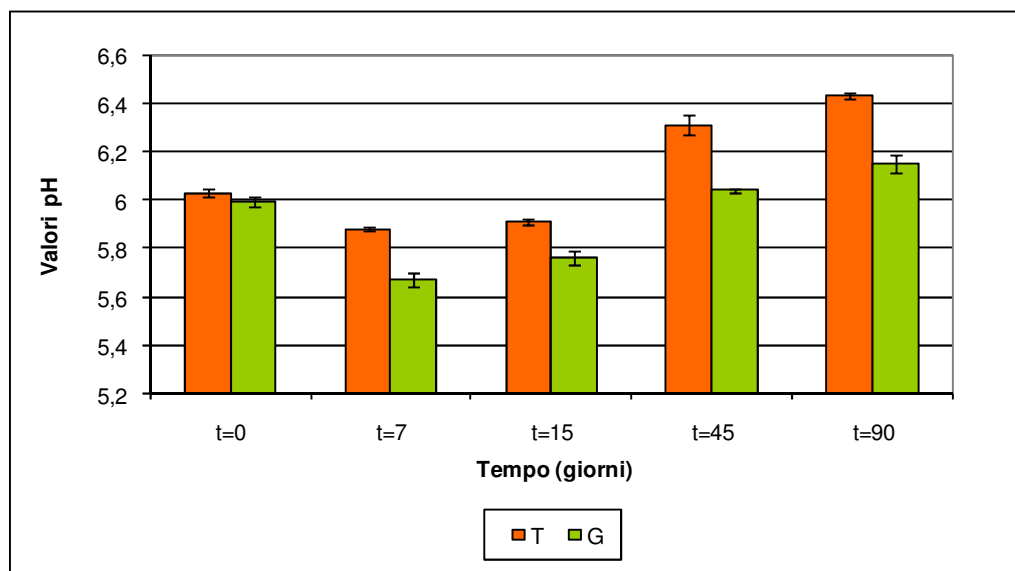
Parametri chimici e chimico-fisici della Ventricina

pH

L'andamento del pH durante il periodo di maturazione, fatto registrare dai campioni provenienti dai due differenti lotti T e G, è riportato in **Figura 1**.

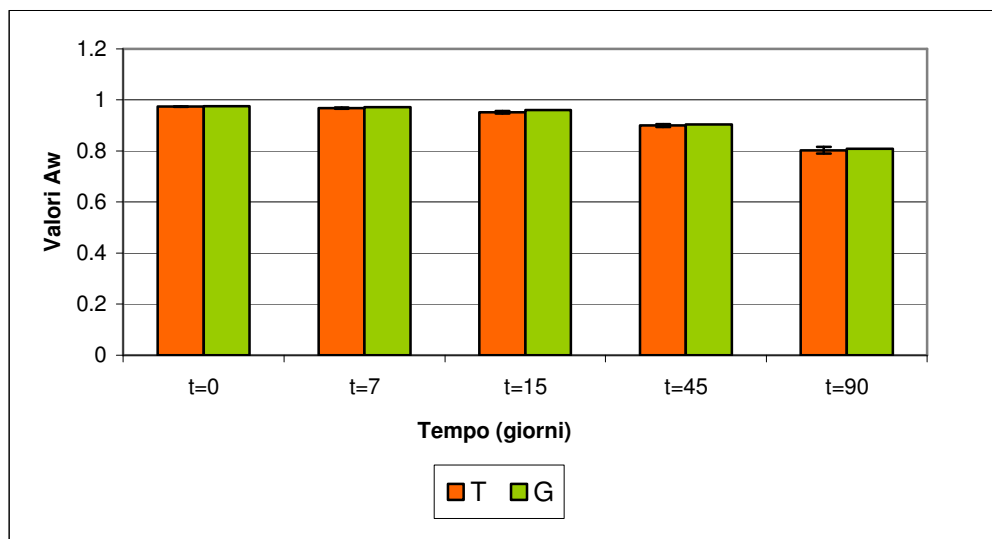
Emerge in maniera chiara che tutti i campioni sono stati caratterizzati da un decremento dei valori durante la prima settimana di maturazione. Con il procedere del processo di maturazione i campioni di entrambi i lotti hanno mostrato un incremento del pH. Differenze, pur se di modesta entità, sono state riscontrate tra i campioni provenienti dai due lotti T e G. In particolare, al settimo giorno di maturazione, il decremento del pH è stato più marcato nel lotto G. Condizione che nei campioni del lotto G ha consentito, a 7 giorni di maturazione, un decremento del pH di poco inferiore a 0,4 unità. Il medesimo fenomeno non ha caratterizzato i campioni provenienti dal lotto T, per i quali è stato riscontrato un decremento di pH di poco superiore a 0,1 unità.

Differenze tra i due lotti sono apprezzabili anche nel periodo di maturazione compreso tra 15 e 90 giorni. Infatti a ciascuna epoca di analisi, durante tale periodo, il pH registrato per i campioni provenienti dal lotto T è risultato costantemente superiore rispetto a quello fatto evidenziare dai campioni del lotto G.



Attività dell'acqua (Aw)

I dati relativi all'evoluzione dell'attività dell'acqua nel corso della maturazione dei campioni provenienti dai due differenti lotti sono riportati in **figura 2**. Un decremento di tale parametro caratterizza i campioni durante l'intero periodo di maturazione. Diminuzione che ha assunto un livello particolarmente evidente dopo il 15° giorno di maturazione. Tale evoluzione accomuna i campioni provenienti da entrambi i lotti che, in merito al presente parametro oggetto di analisi, non hanno fatto emergere importanti differenze.



Composizione centesimale

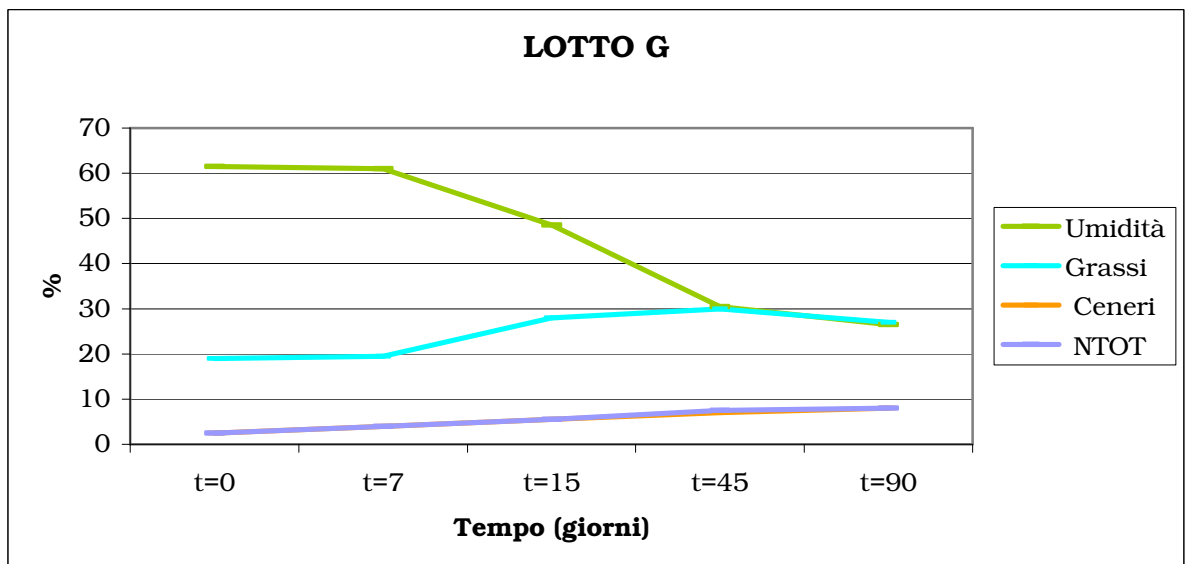
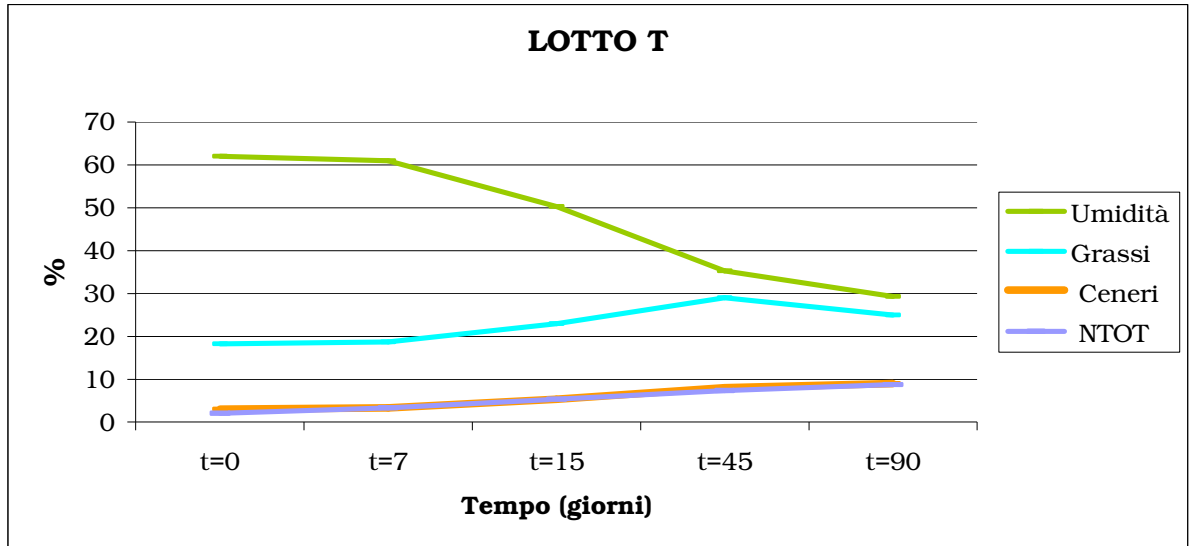
Nelle **figure** viene riportato l'andamento dell'umidità, dell'NTOT, dei grassi e delle ceneri dei campioni di Ventricina provenienti dai due lotti ai diversi tempi di maturazione (0, 7, 15, 45 e 90 giorni).

A tempo 0, l'umidità, simile nei diversi campioni, si è attestata su un valore medio del **63%** circa, valore prossimo a quello caratterizzante la carne fresca.

Allo stesso tempo, l'NTOT, nella cui computazione viene considerato sia l'azoto proteico sia quello non proteico (NPN), ha mostrato un valore medio pari a circa il **3%**. I valori evidenziati sono pressoché uguali nei campioni provenienti dai due lotti e simili a quelli riportati in letteratura relativamente alla carne fresca (**Lawrie, 1983**).

Il contenuto in grasso è risultato pari a circa il **19%** sul tal quale; anche in tal caso non sono emerse importanti differenze tra i campioni provenienti dai due lotti.

Dal 7° giorno di maturazione, la composizione chimica della Ventricina, inizia a subire delle modificazioni che comportano una riduzione del contenuto in acqua e contestualmente un incremento dell'NTOT. In particolare, l'umidità decresce fino a raggiungere al 90° giorno di maturazione, **il 28%** circa.



Tempo (giorni)	Campione	Umidità (%)	NTOT (%)	Grassi (%)	Ceneri (%)
0	T	62.63±0.15	3.00±0,4	16.74±0,11	3.11±0.3
	G	62.71±0.23	2.92±0,4	17.59±0.2	3.28±0.7
7	T	62.16±0.4	3.29±0.3	17.48±0.2	3.77±0.07
	G	62.1±0.8	3.58±0.05	18.2±0.2	3.89±0.1
15	T	48.14±0.1	3.90±0.1	25.34±0.3	4.58±0.1
	G	48.27±0.9	3.8±0.03	26.46±1.4	4.70±0.07
45	T	33.4±0.8	4.82±0.2	29.72±0.6	6.34±0.15
	G	30.46±0.9	5.55±0.17	29.57±0.6	5.94±0.15
90	T	29.08±0.6	6.44±0.2	27.52±0.5	6.88±0.15
	G	26.72±0.7	5.74±0.15	25.66±0.5	6.45±0.15

Composizione Centesimale (g/100g s.s. ± DS) rilevata nei lotti T e G durante diversi tempi di maturazione

A fine maturazione, il contenuto in azoto totale è risultato variare nei diversi campioni tra il **5,74%** ed il **6,44%** sul tal quale. La differenza riscontrata, oltre ad essere direttamente legata all'umidità dei diversi campioni, risente anche della non omogeneità del campione stesso, il cui campionamento nel corso della stagionatura diventava sempre più complesso.

Relativamente al contenuto in grassi, occorre evidenziare un decremento nei valori al 90° giorno di maturazione, decremento che appare più marcato nei campioni proveniente dal lotto G.

- *Indice di Maturazione*

Nella **tabella 10**, viene riportato il contenuto in azoto non proteico (NPN) e il rapporto NPN/NTOT (Indice di Maturazione), dei differenti campioni di Ventricina.

La valutazione del rapporto NPN/NTOT, fornisce un'indicazione più immediata delle variazioni che avvengono durante la stagionatura, a carico della frazione proteica. Il processo proteolitico, determinato dall'azione dei microrganismi, produce la liberazione di amminoacidi i quali contribuiscono all'aumento del contenuto in azoto non proteico

(NPN) che passa da valori medi dello **0,31%** a tempo 0 a valori dello **0,72%** a 90 giorni. L'incremento caratterizza in maniera sostanzialmente simile entrambi i lotti T e G. Tuttavia occorre evidenziare l'andamento altalenante che caratterizza il lotto G nella fase centrale della maturazione. Per i campioni di tale lotto infatti, il rapporto MPN/NT subisce un decremento al 45° giorno di maturazione per poi evidenziare, a 90 giorni, un rinnovato incremento.

Tempo (giorni)	T		G	
	NPN	NPN/NTOT	NPN	NPN/NTOT
0	0.305±0.00	0,11	0.283±0.00	0,10
7	0.336±0.01	0,10	0.367±0.00	0,10
15	0.435±0.00	0,11	0.429±0,02	0,11
45	0.660±0.00	0,14	0.432±0.01	0,07
90	0.729±0.00	0,11	0.692±0.01	0,12

Azoto non proteico (NPNg/100g) e NPN/NTOT esaminati nei lotti T e G a differenti tempi di maturazione

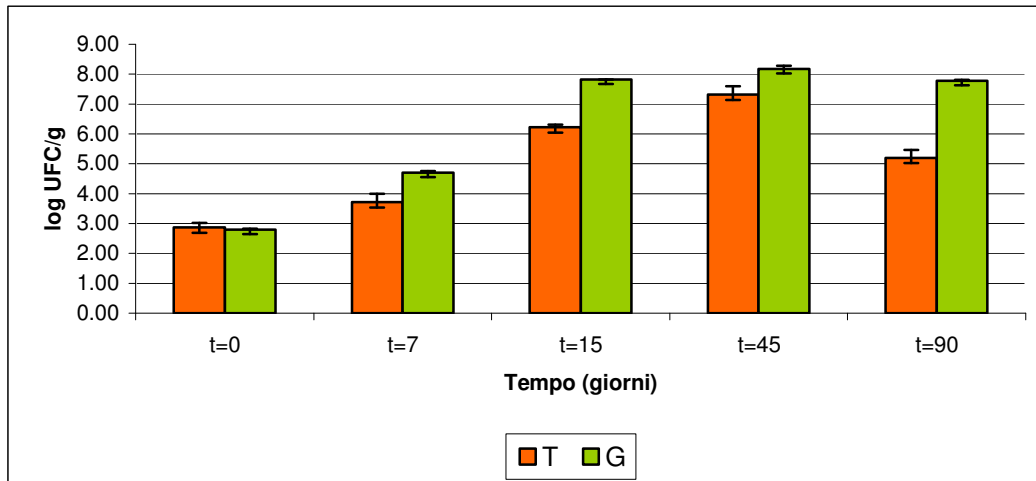
Parametri microbiologici della ventricina

I dati relativi ai batteri lattici nel corso della maturazione evidenziano un andamento crescente fino al 45° giorno di maturazione nei campioni provenienti da entrambi i lotti.

La popolazione lattica da valori iniziali di circa 3,0 log UFC/g si attestano al quarantacinquesimo giorno di maturazione intorno a valori compresi tra 7 e 8 log UFC/g.

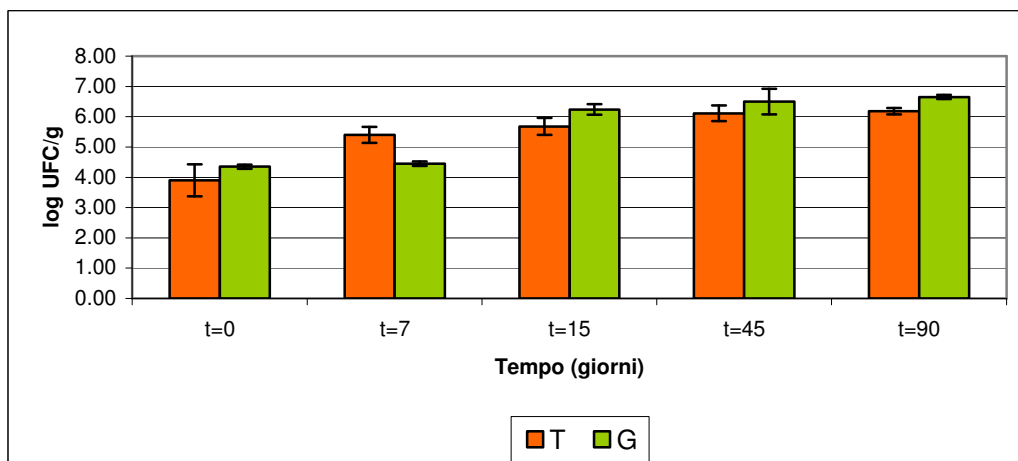
Tra i campioni provenienti dai diversi lotti emergono apprezzabili differenze; in particolare nei campioni del lotto G l'incremento della popolazione lattica appare decisamente più marcato rispetto a quello caratterizzante i campioni del lotto T.

Già al settimo giorno di maturazione l'incremento fatto registrare dai campioni del lotto G è risultato di quasi due cicli logaritmici rispetto al tempo iniziale ed è apparso di circa un ciclo logaritmico più consistente rispetto a quello evidenziato dai campioni del lotto T. Una situazione sostanzialmente analoga ha caratterizzato anche le successive epoche di analisi.



Andamento dei batteri lattici relativamente ai lotti T e G durante differenti tempi di maturazione

In figura ___ è riportato l'andamento dei micrococchi-stafilococchi (CNC). Sensibili differenze possono essere riscontrate tra i campioni provenienti dai due differenti lotti.



Andamento micrococchi-stafilococchi relativamente ai lotti T e G durante differenti tempi di maturazione

In particolare l'andamento di tali batteri durante il processo di maturazione ha evidenziato nei campioni provenienti dal lotto T un lieve incremento fino al 45 giorno di maturazione seguito da un andamento costante. Nei campioni del lotto G, i livelli di

micrococchi-stafilococchi inizialmente più bassi rispetto a quelle osservate per i campioni del lotto T, hanno fatto registrare un marcato incremento dal quindicesimo giorno di maturazione attestandosi su valori superiori a quelli registrati nei campioni provenienti dal lotto G.

L'evoluzione dei microrganismi indesiderati è risultata simile durante la maturazione dei campioni provenienti da entrambi i lotti (dati non mostrati). In particolare, i livelli di *Enterobacteriaceae*, coliformi, *Pseudomonas spp.* e *Brochotrix thermosphacta* si sono mantenuti costanti fino al 15, giorno per poi diminuire e assumere livelli di cariche irrilevabili.

Identificazione fenotipica

I batteri lattici.

Le operazioni di isolamento hanno condotto all'ottenimento di ___ isolati presunti batteri lattici. Tutti gli isolati hanno mostrato risultati positivi alla colorazione di Gram e negativi alla prova della catalasi. Lo studio della morfologia cellulare, la crescita alle temperature di 10°, 15 ° e 45 °C, nonché la capacità di produrre CO₂ da glucosio hanno consentito il delinearsi di un primo e preliminare quadro di identificazione. In particolare **xx** isolati sono attribuibili ai lattobacilli etero fermentanti facoltativi e xx isolati sono cocchi lattici eterofermentanti obbligati.

Dall'esame del profilo fermentativo (Tabella __) emerge che *Lb. sakei* rappresenta il ceppo predominante in entrambi i lotti; infatti ben **43** isolati sono stati identificati come *L. sakei*. E' da evidenziare che il raggiungimento di tale identificazione non è stata possibile con il solo software a servizio del sistema API. Tale sistema, non prevedendo all'interno della banca dati il profilo di *L. sakei*, è stato integrato con strumenti e chiavi di identificazione tradizionali. I restanti ceppi (**xx**) sono stati identificati stati identificati nella quasi totalità come *Lc. mesenteroides*. Per ulteriori due ceppi permane un risultato identificativo caratterizzato da un elevato grado di dubbio.

**INFLUENZA DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E
CHIMICHE DELLA VENTRICINA**

	Numero degli isolati lotto G	Numero degli isolati lotto T	Forma	Crescita a 45 °C	Crescita a 15 °C	Produzione e CO ₂	Identificazione delle specie con API	Qualità identificazione fenotipica	Probabile identificazione fenotipica
Tempo 0	5	4	bacilli	0	4	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	molto buona	<i>Lb. sakei</i>
	1	2	bacilli	0	2	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	dubbia	<i>Lb. sakei</i>
	4	4	cocchi	0	2	2	<i>Ln. mesenteroides</i>	eccellente	<i>Ln. mesenteroides</i>
Tempo 7	2	2	bacilli	0	2	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	eccellente	<i>Lb. sakei</i>
	3	2	bacilli	0	2	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	dubbia	<i>Lb. sakei</i>
	4	5	cocchi	0	3	3	<i>Ln. mesenteroides</i>	eccellente	<i>Ln. mesenteroides</i>
Tempo 15	4	4	bacilli	0	4	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	dubbia	<i>Lb. sakei</i>
	1	2	cocchi	0	2	2	<i>Ln. mesenteroides</i>	molto buona	<i>Ln. mesenteroides</i>
Tempo 45	6	5	bacilli	0	3	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	dubbia	<i>Lb. sakei</i>
	1	0	bacilli	0	1	0	<i>Lb. fermentum</i>	dubbia	dubbia
	0	1	bacilli	0	1	0	<i>Lb. brevis</i>	dubbia	dubbia
Tempo 90	2	1	bacilli	0	1	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	eccellente	<i>Lb. sakei</i>
	3	1	bacilli	0	1	0	<i>Lc. lactis ssp.lactis</i>	dubbia	<i>Lb. sakei</i>

Micrococchi-stafilococchi

Relativamente ai micrococchi-stafilococchi attraverso le operazioni di isolamento sono stati ottenuti ___ isolati. Le prove preliminari hanno evidenziato che la totalità degli isolati rispondono positivamente sia alla colorazione di Gram sia alla prova della catalasi. La morfologia cellulare, il rapporto nei confronti della lisostafina indica una chiara collocazione degli isolati all'interno del genere *Staphylococcus spp.*

Dall'esame del profilo fermentativo derivante dal sistema APIstaph e dai risultati precedentemente esposti (tabella __) emerge che la totalità dei ceppi sono riconducibili alla specie *S. xylosus*.

Tabella . Principali caratteristiche biochimiche di ceppi di micrococchi-stafilococchi isolati da ventricina

tempo isolamento	n° isolati lotto T	n° isolati lotto G	Resistenza alla lisostafina	D-Fruttosio	D-Mannosio	Maltosio	Lattosio	D-Trealosio	D-Mannitolo	Xilitolo	D-Melibiosio	Raffinosio	Xilosio	Saccarosio	a-metil-D-glucoside	N-acetil-glucosammina	Arginina deidronasi	Riduzione dei nitrati	Fosfatasi alcalina	Ureasi	Riferimento tassonomico
0	7	6	0	13	13	13	13	13	13	13	0	12	13	13	0	13	0	13	13	13	<i>S. xylosus</i>
7	6	5	0	11	11	11	11	11	11	11	0	3	11	11	0	11	0	11	11	11	<i>S. xylosus</i>
15	7	5	0	12	12	12	12	12	12	12	0	10	12	12	0	12	0	12	12	12	<i>S. xylosus</i>
45	9	6	0	15	15	15	15	15	15	15	0	9	15	15	0	15	0	15	15	15	<i>S. xylosus</i>
90	4	5	0	9	9	9	9	9	9	9	0	6	9	9	0	9	0	9	9	9	<i>S. xylosus</i>

I valori numerici rappresentano il numero degli isolati positivi per ciascun campione

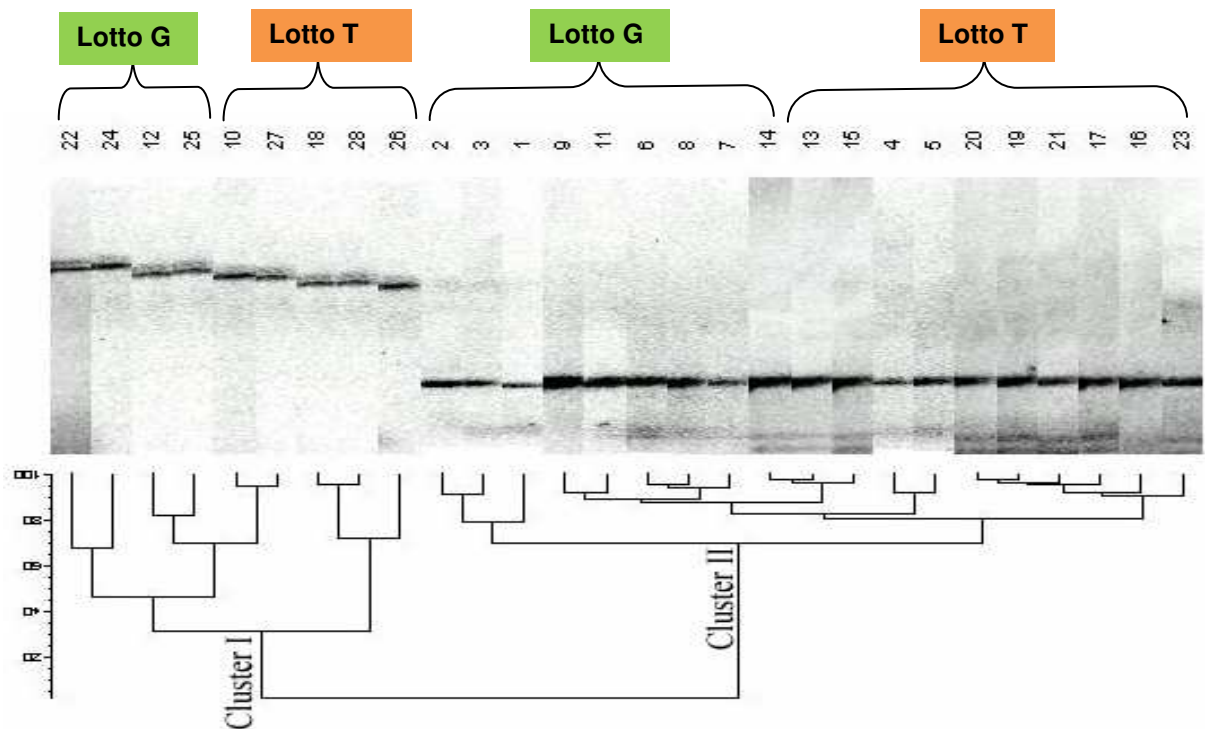
Identificazione genetica dei batteri lattici

Dall'esame di similarità, effettuata mediante il software Gel-Compare Version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), dei profili DGGE relativi a ciascun ceppo è stato ottenuto il dendrogramma riportato in figura ___.

Sulla base della similarità, all'interno del dendrogramma è possibile individuare due clusters; il primo che raggruppa 9 ceppi con una similarità del 40%; il secondo

comprende 19 ceppi con una similarità pari al 70% circa. Pertanto la popolazione lattica oggetto dello studio è riconducibile sostanzialmente a due differenti specie.

Ciascun cluster ha evidenziato al suo interno la presenza di isolati provenienti sia dai campioni del lotto T sia da quelli del lotto G.



Sequenziamento

L'identificazione a livello di specie dei 29 isolati, raggruppati, come evidenziato nel precedente paragrafo, in due cluster, è stata resa possibile grazie ai dati derivanti dal sequenziamento della regione 16S rRNA. In particolare i dati relativi al sequenziamento di sette ceppi, scelti dai due diversi cluster, hanno evidenziato che quelli appartenenti al I cluster sono stati identificati come *Ln. mesenteroides*, per quelli del cluster II, è stata definita l'identificazione come *Lb. sakei*.

Identificazione genetica dei micrococchi-stafilococchi

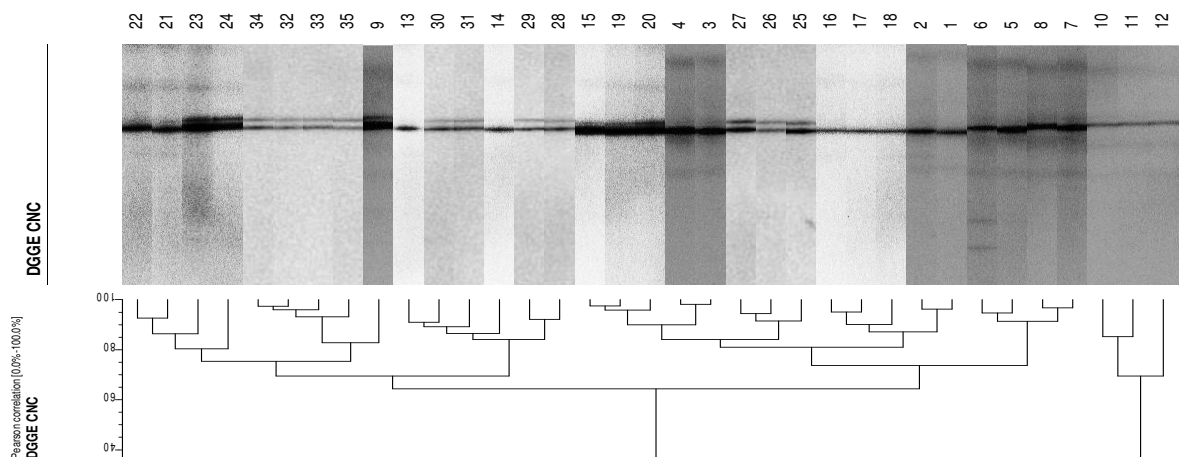
I profili DGGE, analizzati sulla base della loro similarità mediante il software Gel-Compare Version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) ha consentito l'ottenimento di un dendrogramma riportato in figura ____. Dal dendrogramma è stato possibile

evidenziare quattro differenti clusters; il primo raggruppa 14 ceppi con una similarità dell'82%, il secondo mostra la presenza di 5 ceppi con una similarità pari a circa 84%, il terzo fa registrare la presenza di 13 ceppi aventi una similarità pari a circa 80% ed il quarto cluster raggruppa tre ceppi con una similarità pari al 72%.

L'identificazione dei ceppi a livello di specie è stata resa possibile grazie al sequenziamento della regione 16S rRNA i cui risultati sono esposti nel paragrafo successivo.

Sequenziamento dei cocchi coagulasi negativi

I risultati relativi al sequenziamento della regione 16S rRNA dei dodici ceppi (27, 15, 4, 16, 13, 29, 8, 32, 21, 24, 11, 12), scelti dai 4 differenti cluster hanno permesso di stabilirne la loro identificazione a livello di specie come *Staphylococcus equorum*. Pertanto si può ritenere che la totalità dei ceppi, raggruppati in 4 cluster individuati all'interno del dendrogramma relativo all'analisi DGGE, appartengono alla specie *S. equorum*



ATTIVITA' DI INTERESSE TECNOLOGICO

Capacità acidificante

La capacità acidificante in grado di essere esplicita da parte dei ceppi di *L. sakei* è riportata in figura ____.

Dall'esame dei risultati è possibile evincere che la totalità dei ceppi sono in grado di sviluppare e esplicitare una sensibile azione acidificante in presenza di concentrazioni di Cloruro di Sodio pari al 5% di NaCl. Tuttavia i dati relativi alla capacità acidificante espressa da ciascun ceppo fanno apprezzare sostanziali differenze tra i ceppi sulla base del differente lotto di isolamento. In particolare la maggior parte dei ceppi isolati dal lotto T hanno evidenziato di esplicitare un'attività acidificante pari a 0,8-1 unità. Differente è il quadro che emerge dall'esame dei dati relativi all'attività acidificante esplicita dai ceppi isolati dal lotto G la cui maggioranza hanno garantito un decremento del pH compresa tra 1,2 e 1,4 unità.

La concentrazione pari al 10% di cloruro di sodio ha evidenziato la capacità di ostacolare, pur se in parte, l'ottimale sviluppo e attività acidificante dei ceppi oggetti dello studio. Anche in tal caso emerge una sensibile differenza tra i differenti ceppi in virtù dei due differenti lotti di Ventricina dai quali sono stati isolati. All'interno dei ceppi isolati dai campioni provenienti dal lotto T è stato possibile individuare la più alta percentuale di essi in grado determinare una riduzione dei valori di pH pari a 0,4 unità.; solo una percentuale contenuta (4%) ha permesso la riduzione del pH pari a 0,8. Più marcata è stata l'azione acidificante espressa dai ceppi isolati dal lotto G la cui maggior parte ha consentito un abbassamento del pH pari a 0,8 unità e una componente, pur se contenuta ha consentito la riduzione dei valori di pH di 1,2 unità.

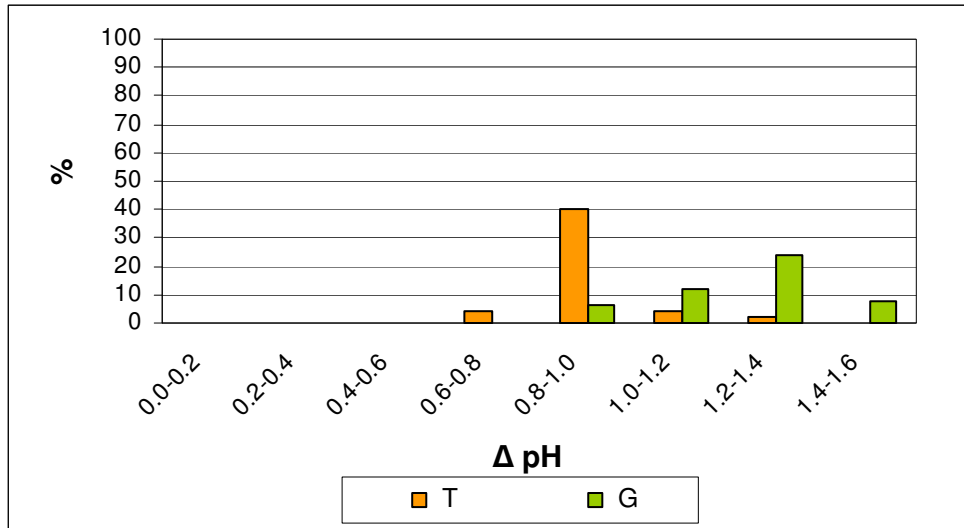


Fig.2 Decremento del pH causato da *Lactobacillus* spp in MRS broth con l'aggiunta del 5% di NaCl

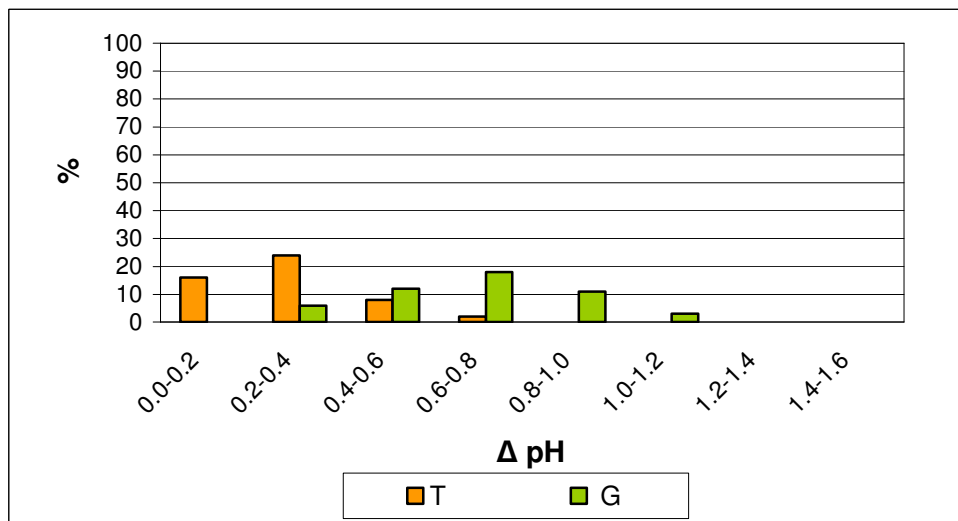


Fig.2 Decremento del pH causato da *Lactobacillus* spp in MRS broth con l'aggiunta del del 10% di NaCl

Attività proteolitica

I risultati derivanti dall'analisi dei pattern elettroforetici, ottenuti mediante SDS-PAGE a partire dagli estratti sarcoplasmatici inoculati con i ceppi isolati di *L. sakei* sono riassunti in tabella ____. In particolare in tabella sono riportati 5 macro-profili che raggruppano, sulla base della loro similarità, i profili elettroforetici relativi a ciascun estratto. Il macro-profilo 0 comprende il profilo elettroforetico dell'estratto sarcoplasmatico incunato senza alcun inoculo (controllo). Tale profilo mostra la presenza di una banda avente peso molecolare di circa 99 KDa, di una serie di tre bande avente peso molecolare compreso tra 66 e 45 KDa, di ulteriori tre bande comprese tra 45 e 33 KDa, di altre tre bande nell'intervallo tra 33 e 21 KDa e di un'ultima banda, a più basso peso molecolare, compresa tra 21 e 14 KDa.

Il macro-profilo 1 comprende i profili elettroforetici relativi a 12 estratti sarcoplasmatici inoculati con ceppi di *L. sakei* isolati a tempo 0 sia dal lotto T sia dal lotto G. Tali profili, dall'esame delle bande, appaiono sostanzialmente simili a quello del controllo. Infatti differiscono rispetto a quest'ultimo solo per la scomparsa di una banda ad elevato peso molecolare di circa 99 KDa.

Il macro-profilo 2 vede al suo interno i profili relativi agli estratti inoculati rispettivamente con ceppi di *L. sakei* di cui 4 isolati dal lotto T a 7 giorni di maturazione, 4 dal lotto T al 15° giorno di maturazione e 5 isolati dal lotto G al 7° giorno di maturazione. L'attività proteolitica esibita da tali ceppi, pur se leggermente più accentuata rispetto a quella che si evince dal macro-profilo 1, appare abbastanza contenuta. Rispetto al controllo, infatti, i differenti profili sono caratterizzati dalla scomparsa di sole due bande, una di peso molecolare pari a 99 KDa e una banda compresa tra 21 e 14 KDa.

Il macro-profilo 3, che comprende 9 estratti sarcoplasmatici inoculati con ceppi di *L. sakei* isolati rispettivamente dal lotto T al 45° (5) e al 90° giorno di maturazione (2) e dal lotto G al 15° giorno di maturazione (2), fa apprezzare un quadro sensibilmente differente rispetto a quanto osservato per i precedenti macro-profili. Infatti i profili elettroforetici di tali estratti sono caratterizzati dalla scomparsa di 4 bande proteiche rispetto al controllo, in particolare una di 99 KDa, 2 comprese nell'intervallo tra 45 e 33 KDa ed infine 1 banda nell'intervallo tra 21 e 14 KDa.

**INFLUENZA DELLA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE SULLE CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE E
CHIMICHE DELLA VENTRICINA**

Di entità ancora più marcata appare l'attività proteolitica riscontrata attraverso l'analisi dei pattern elettroforetici raggruppati nei macro-profilo 4 e 5. In particolare i 7 pattern raggruppati nel macro-profilo 4, relativi agli estratti sarcoplasmatici inoculati con ceppi di *L. sakei* di cui 1 isolato dal lotto T a 90 giorni di maturazione, 3 dal lotto G al 15° giorno di maturazione e 3 dal lotto G al 45° giorno di maturazione, fanno apprezzare la scomparsa di 5 bande proteiche.

La più accentuata azione proteolitica si evince dai pattern relativi agli estratti inoculati con ceppi di *L. sakei* isolati dal lotto G al 45° e 90° giorno di maturazione. Tali estratti mostrano infatti la scomparsa di 6 bande proteiche di cui una di circa 99 KDa, 3 comprese nell'intervallo 45-33 KDa, una nell'intervallo 33-21 KDa ed infine una nell'intervallo 21-14 KDa.

Profili	banda A	banda B	banda C	banda D	banda E	banda F	banda G	banda H	banda I	banda L	banda M
	99 KDa	66-45 KDa			45-33 KDa			33-21 KDa		21-14 KDa	
Profilo 0 (proteine estratte senza inoculo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Profilo 1 (proteine estratte inoculate con i ceppi di LAB T ₀ 1; T ₀ 3; T ₀ 4; T ₀ 5; T ₀ 7; T ₀ 8; G ₀ 2; G ₀ 3; G ₀ 4; G ₀ 6; G ₀ 8; G ₀ 9)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Profilo 2 (proteine estratte inoculate con i ceppi di LAB T ₇ 9; T ₇ 10; T ₇ 13; T ₇ 15; T ₁₅ 16; T ₁₅ 17; T ₁₅ 21; T ₁₅ 22; G ₇ 10; G ₇ 12; G ₇ 14; G ₇ 15; G ₇ 16)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Profilo 3 (proteine estratte inoculate con i ceppi di LAB T ₄₅ 23; T ₄₅ 24; T ₄₅ 25; T ₄₅ 26; T ₄₅ 27; T ₄₅ 28; T ₄₅ 29; G ₄₅ 19; G ₄₅ 21)	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Profilo 4 (proteine estratte inoculate con i ceppi di LAB T ₉₀ 30; G ₁₅ 22; G ₁₅ 24; G ₁₅ 25; G ₄₅ 27; G ₄₅ 28; G ₄₅ 29)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Profilo 5 (proteine estratte inoculate con i ceppi di LAB G ₄₅ 31; G ₄₅ 33; G ₄₅ 35; G ₉₀ 36; G ₉₀ 37; G ₉₀ 40)	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-

(+) = bande presenti; (-) = bande assenti