

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

Facoltà di Agraria



**“COMPOSTI NATURALI: EFFETTO ANTIMICROBICO SUI
MICRORGANISMI DI INTERESSE ALIMENTARE E POTENZIALE
APPLICAZIONE NELLA PREPARAZIONE DI PRODOTTI CARNEI
FERMENTATI”**

TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO
DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI
XXIII Ciclo SSD AGR/16

Dottorando
Luca Tipaldi Matricola 141246

Tutor: Prof. Raffaele Coppola

Coordinatore Prof. Emanuele Marconi

Co-tutor
Prof.ssa Elena Sorrentino

Dott. Patrizio Tremonte

INDICE

STATO DELL'ARTE

CAPITOLO 1

LA QUALITÀ ALIMENTARE E LE NUOVE SFIDE DELLA RICERCA	1
1.1 LE "NUOVE FRONTIERE" DELLA QUALITÀ ALIMENTARE	2
1.1.1 QUALITÀ ALIMENTARE E PROMOZIONE DELLA SALUTE	4
1.1.2 QUALITÀ: TRA SICUREZZA E RIDUZIONE DI ADDITIVI CHIMICI	7
1.2 I NUOVI INDIRIZZI DI RICERCA	10
1.2.1 LA NUTRIGENOMICA	11
1.2.2 I FATTORI DI BIOCONTROLLO	14
1.2.3 LE TECNOLOGIE INNOVATIVE	16

CAPITOLO 2

ESTRATTI NATURALI PER LA PRESERVAZIONE DEGLI ALIMENTI	20
2.1 GLI ESTRATTI NATURALI NEGLI ALIMENTI	21
2.1.1 LE SPEZIE NEGLI ALIMENTI	22
2.1.2 IMPIEGO DI ESTRATTI NATURALI	24
2.2 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA	27
2.2.1 AZIONE NEI CONFRONTI DEI GRAM-POSITIVI	30
2.2.2 AZIONE NEI CONFRONTI DEI GRAM-NEGATIVI	32
2.3 MECCANISMI DI AZIONI: TRA IPOTESI E CERTEZZE	33
2.3.1 AZIONE SULLA MEMBRANA	35
2.3.2 AZIONE SUL CITOPLASMA	37
2.4 USO DEGLI ESTRATTI VEGETALI: PROBLEMATICHE E REGOLAMENTAZIONE	38
2.4.1 ASPETTI LEGISLATIVI	39
2.4.2 ASPETTI TOSSICOLOGICI	42

CAPITOLO 3

RIDUZIONE DI ADDITIVI CHIMICI E ESTRATTI NATURALI: IL DIFFICILE CASO DEI PRODOTTI CARNEI FERMENTATI	44
3.1 IL COMPLESSO ECOSISTEMA MICROBICO DEGLI INSACCATI FERMENTATI	45
3.1.1 BATTERI DI INTERESSE TECNOLOGICO	47
3.1.2 BATTERI INDESIDERATI	49
3.1.3 BATTERI DANNOSI	50
3.1.4 BATTERI PERICOLOSI	55
3.2 I NITRATI E NITRITI NEGLI INSACCATI FERMENTATI	60
3.2.1 NITRATI E NITRITI A GARANZIA DELLA SICUREZZA IGIENICA	61
3.2.2 LE CRITICITÀ DEI NITRATI E NITRITI	63
3.2.3 I NUOVI INDIRIZZI LEGISLATIVI	64

3.3	STRUMENTI ALTERNATIVI ALL'IMPIEGO DI NITRATI E NITRITI	66
3.3.1	I LIMITI DEGLI STRUMENTI ALTERNATIVI	67
3.3.2	POSSIBILITÀ D'USO DI ESTRATTI NATURALI	68
3.3.3	CRITICITÀ DEGLI ESTRATTI NATURALI	69
<i>CAPITOLO 4</i>		
ESTRATTI NATURALI PER LA PROTEZIONE DEI PRODOTTI CARNEI		71
4.1	<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i>	72
4.2	PROPOLI	73
4.3	<i>MALPIGHIA PUNICIFOLIA</i>	74
4.4	<i>SPIRULINA PACIFICA</i>	76
4.5	<i>CITRUS COMPOSITUM</i>	77
4.6	<i>MEDICAGO COMPOSITA</i>	78
4.7	<i>RAPHANUS NIGER</i>	79
4.8	<i>CARICA PAPAYA</i>	80
<i>CAPITOLO 5</i>		
LE LACUNE DELLA LETTERATURA SCIENTIFICA		81
5.1	SPETTRO DI AZIONE E EFFICACIA DEGLI ESTRATTI	82
5.2	CONCENTRAZIONE, FORMULAZIONE E MODALITÀ DI IMPIEGO	83
5.3	MECCANISMI DI RESISTENZA, SENSIBILITÀ, ADATTAMENTO	84
5.4	IMPORTANZA DEGLI APPROCCI PROTEOMICI	86
LA RICERCA SPERIMENTALE		
<hr/>		
<i>CAPITOLO 6</i>		
SCOPO		91
<i>CAPITOLO 7</i>		
MATERIALI E METODI		94
7.1	COMPOSTI NATURALI	94
7.2	CEPPI BATTERICI E CONDIZIONI DI CRESCITA	95
7.3	ATTIVITÀ ANTIMICROBICA	96
7.4	EFFETTO DEI COMPOSTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DEI BATTERI	98
7.5	FORMULAZIONE DELLA MISCELA E VALUTAZIONE DELLA SUA EFFICACIA <i>IN VITRO</i>	102
7.6	VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA MISCELA <i>IN SITU</i>	102
<i>CAPITOLO 8</i>		
RISULTATI		107
8.1	ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E SPETTRO D'AZIONE DEGLI ESTRATTI NATURALI	107

8.2	EFFICACIA DEGLI ESTRATTI NATURALI	110
8.3	EFFETTO DEGLI ESTRATTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA	115
8.4	FORMULAZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO IN VITRO DELLA MISCELA DEGLI ESTRATTI NATURALI	131
8.5	INDIVIDUAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO <i>IN SITU</i> DELLA MISCELA	136
<i>CAPITOLO 9</i>		
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI		149
9.1	ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E SPETTRO D'AZIONE <i>IN VITRO</i>	151
9.2	EFFICACIA ESPRESSA <i>IN VITRO</i>	154
9.3	EFFETTO DEGLI ESTRATTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA	156
9.4	FORMULAZIONE E DELLA MISCELA	159
9.5	AZIONE <i>IN SITU</i> DELLA MISCELA DI ESTRATTI NATURALI	160
9.6	CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	163
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI		I-XI
PRODOTTI OTTENUTI DALL'ATTIVITÀ DI DOTTORATO		a

STATO DELL'ARTE

CAPITOLO 1

LA QUALITÀ ALIMENTARE E LE NUOVE SFIDE DELLA RICERCA

La *Qualità*, al confine tra le entità tangibili e il mondo immateriale, rappresenta un concetto in continua evoluzione, specchio del dinamismo delle esigenze, delle attese e dei desideri espressi dal popolo degli utenti finali, i consumatori. Definizione esauriente e ampiamente accettata è quella dettata dalle norme ISO secondo le quali la qualità è "*l'insieme delle caratteristiche di un prodotto o di un servizio che gli conferiscono la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite*". Con forza, quindi, emerge che la qualità non è un termine assoluto di paragone ma è relativa alle esigenze dell'utilizzatore finale del bene, che sia esso un prodotto o un servizio.

La qualità di un alimento è rappresentata dalla somma di una serie di addendi rappresentati da un ampio numero di caratteri storicamente riconosciuti, quali la sicurezza igienico-sanitaria, il corretto apporto di nutrienti e il gradimento sensoriale o di "neologismi" qualitativi quali la capacità di soddisfare le attese di interesse salutistico, di rispondere ad esigenze edonistiche nonché di offrire servizi al consumatore che spaziano dalla chiara informazione alla semplicità e rapidità d'uso.

1.1 LE “NUOVE FRONTIERE DELLA QUALITÀ ALIMENTARE”

Il concetto di qualità alimentare appare lontano da una condizione di staticismo ed è strettamente correlato all'evoluzione delle nuove preferenze del consumatore sempre più attento, informato e “consapevole”.

Peculiarità espressiva di tale contesto, dominato da un profondo dinamismo, è l'attenzione nei confronti di uno dei requisiti qualitativi fondamentali quale la sicurezza alimentare. Un carattere costantemente ricercato dal consumatore e che negli anni ha assunto sfaccettature differenti contaminandosi e impregnandosi sempre di più dell'essenza salutistica. Condizione che ha determinato la nascita di un nuovo binomio, spesso inscindibile, che nel mondo anglosassone è ben definito con il termine “*safety-health food*”.

Sino al decennio scorso la sicurezza alimentare, identificata fundamentalmente con l'assenza di contaminazioni chimiche, fisiche e biologiche, è stata adeguatamente garantita attraverso l'impiego di strumenti tecnologici e biotecnologici convenzionali.

Tuttavia, allo stato attuale, il dinamismo dettato dalle nuove esigenze, fa emergere profonde debolezze di tali strumenti, soprattutto di quelli tecnologici rappresentati dall'impiego di additivi chimici. Approcci, questi ultimi, che pur se hanno avuto un largo impiego in virtù del loro effetto positivo sulla preservazione dell'alimento da fenomeni alterativi e sui caratteri sensoriali, appaiono oggi fortemente criticati sia dal mondo scientifico sia da quello medico suscitando un effetto di non poco conto nella scelte del consumatore.

E' sempre più diffusa la consapevolezza che il cibo può condizionare direttamente lo stato di salute (Mollet e Rowland, 2002). Condizione che induce a considerare gli alimenti non solo come fonte di nutrimento ma anche come mezzo per prevenire le patologie legate ad errate abitudini alimentari e per migliorare lo stato psico-fisico dei consumatori (Menrad, 2003). Non a caso gli ultimi anni hanno segnato un profondo mutamento dell'offerta dei prodotti alimentari presenti sul mercato. Appare in costante crescita un'ampia gamma di prodotti innovativi e funzionali che, oltre a soddisfare le esigenze nutrizionali, sono in grado di agire positivamente sulla salute del consumatore essendo in grado di veicolare specifici nutrienti, composti o microrganismi. Gli effetti benefici riguardanti tali alimenti possono essere molteplici e spaziano dal rafforzamento del sistema immunitario all'abbassamento del colesterolo passando per un corretto bilanciamento della popolazione microbica intestinale.

La moderna avanguardia della qualità può essere dunque identificata nella ricerca di un'elevata sicurezza che s'interseca con una serie di caratteri rappresentati da un corretto apporto nutrizionale, da un positivo effetto salutistico e dal mantenimento della più elevata “genuinità”. Caratteri che per rispondere pienamente alle esigenze del consumatore devono essere trasmessi correttamente e in maniera chiara. In tale scenario assume una valenza di non poca importanza l'imballaggio destinato a contenere e/o ad avvolgere l'alimento. Elemento che, come ormai noto da oltre un decennio non è più considerato come un semplice supporto per il contenimento dell'alimento. Esso oltre ad essere comodo, pratico, e a basso impatto ambientale può e deve rappresentare uno dei principali strumenti di comunicazione tra il produttore/trasformatore e il consumatore. In

maniera semplice, veloce e chiara deve fornire una serie d'informazioni fortemente richieste dai consumatori e che riguardano la composizione centesimale, gli ingredienti, gli eventuali additivi presenti, la modalità di conservazione e di utilizzo nonché gli eventuali effetti positivi dell'alimento sulla salute.

Emerge pertanto un complesso meccanismo dominato da “evolute esigenze”, continui sproni e mutamenti qualitativi del mercato agro-alimentare in termini sia di domanda sia di offerta. Ingranaggio utile se non indispensabile, di tale meccanismo, è la ricerca applicata che nell'ultimo decennio, sulla base dei nuovi e molteplici impulsi in precedenza descritti, è fortemente mirata all'individuazione di interventi innovativi tecnologici e biotecnologici in grado rispondere a quelle che sono le nuove frontiere della qualità alimentare.

1.1.1 QUALITÀ ALIMENTARE E PROMOZIONE DELLA SALUTE

Lo stretto rapporto tra la corretta alimentazione e la potenzialità di ambire ad un migliore stato di salute è ormai ampiamente acclarato e largamente accolto. Infatti sono diversi gli effetti di una corretta alimentazione riconosciuti come positivi sulla salute dell'uomo. Numerosi alimenti sia di origine vegetale, sia di origine animale sono in grado di promuovere la salute dell'ospite in virtù della loro composizione e della presenza di specifici metaboliti. Tali metaboliti oltre ad essere presenti naturalmente possono essere intenzionalmente addizionati allo scopo di innovare l'alimento rendendolo funzionale. Le evidenze scientifiche degli ultimi decenni, che hanno correlato il miglioramento del benessere psico-fisico al consumo di determinati alimenti, hanno condotto verso la nascita di una

nuova branca scientifica identificata come “nutraceutica”. Termine, coniato nel 1989 da Stephen De Felice come chiara fusione dei due termini “nutrizione” e “farmaceutica”, che identifica l’utilizzo accurato degli alimenti per la prevenzione o addirittura la cura di determinate patologie. (Summet et al., 2010). Gli anni novanta si aprono pertanto con una chiara prospettiva tesa a rafforzare il legame tra l’alimentazione e la salute. Nella prima metà di tale decennio si diffonde l’utilizzo di alimenti addizionati e di integratori alimentari come promotori della salute del consumatore. Contemporaneamente la definizione di nutraceutico viene estesa ad un numero crescente di nuovi prodotti e/o formulati a base e/o addizionati di vitamine, minerali, erbe, amminoacidi ed altri composti da utilizzare come integratori dietetici per l’alimentazione umana. Tale slancio, naturale conseguenza di una domanda crescente e fortemente spronata, può essere letto sicuramente in termini positivi, ma allo stesso tempo determina una diffusa confusione nell’individuazione corretta del “nutraceutico”. Spesso l’attribuzione del titolo “nutraceutico” non è omogeneamente e universalmente accettata né è ben definita dalla legislazione. Meglio definito appare, invece, il concetto di “integratore alimentare” (Brower, 1999).

Tuttavia, ad oggi, sono disponibili in commercio oltre 470 preparati, ufficialmente riconosciuti come prodotti nutraceutici o come alimenti funzionali, per i quali sono ampiamente documentati gli effetti positivi sulla salute del consumatore (Summet et al., 2010).

Il percorso dell’alimentazione in chiave salutistica, condotto dagli anni novanta ad oggi, appare come una vera e propria rivoluzione. In pochi anni è superato il convenzionale approccio alimentare salutistico, prettamente incentrato sulla

prevenzione attraverso l'eliminazione o la riduzione degli alimenti che aumentano il rischio di insorgenza di alcune patologie, prende piede e si diffonde un nuovo approccio orientato verso l'assunzione di specifici prodotti alimentari, anche volontariamente modificati, che attraverso vari meccanismi possono promuovere/migliorare la salute dei consumatori. Condizione che, pur se fa permanere il ricorso alla medicina e alla farmaceutica quale principale riferimento nella cura di patologie, è stata generata da un aumentato il timore per l'utilizzo dei farmaci classici, soprattutto per le cure a medio e lungo termine, e da un considerevole interesse nei confronti di terapie alternative che fanno ricorso ad un approccio di tipo nutrizionale (Kessler et al., 2001).

Di tale nuovo approccio gli alimenti funzionali sono l'emblema, alimenti contenti ingredienti, appositamente aggiunti e sviluppati, con specifici effetti positivi sulla salute (Niva, 2007). Sebbene il termine di alimenti funzionali è stato più volte definito (Roberfroid, 2002) non esiste una definizione universalmente accettata (Alzamora et al., 2005). In moltissimi paesi non esiste una definizione legislativa di alimento funzionale ed è veramente difficile, anche per gli addetti ai lavori, tracciare una linea di confine tra la definizione di alimento convenzionale e quella di alimento funzionale (Niva, 2007). Secondo la legislazione Europea un alimento può essere considerato funzionale se viene adeguatamente dimostrato che può implicare un effetto benefico e mirato su una o più funzioni dell'organismo, al di là di adeguati effetti nutritivi, in modo tale che risultino evidenti un miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o una riduzione del rischio di malattia (Linee guida Min.. Salute 2002, FUFOS Functional Food Science in Europe).

Il regolamento (CE) n. 1924/2006 definisce i *claims* da riportare in etichetta per gli alimenti funzionali e stabilisce i profili nutrizionali degli alimenti funzionali, limitando il loro utilizzo solo per quelle categorie di alimenti con dimostrata azione benefica. Inoltre, distingue due categorie di *claims*, la prima riguarda indicazioni che fanno riferimento al miglioramento di una determinata funzione biologica correlata alla presenza di una specifica molecola, la seconda che fa riferimento alla riduzione del rischio di patologie. Per quanto attiene alla sostanza oggetto del *claim*, essa deve essere presente nell'alimento in quantità significativa (o non presente, o presente in quantità ridotta) o comunque tale da svolgere l'effetto fisiologico positivo, in forma biodisponibile per l'organismo e fornita in quantità idonea da fornire l'effetto indicato, mediante il consumo di una ragionevole porzione di prodotto.

Appare pertanto in maniera chiara che quello dell'alimentazione in chiave salutistica è un percorso in pieno fermento da un punto di vista normativo e soprattutto per quanto concerne l'aspetto della ricerca applicata; pronta, quest'ultima, ad apportare il proprio contributo alla rivoluzione che è in atto da qualche decennio.

1.1.2 QUALITÀ: TRA SICUREZZA E RIDUZIONE DI ADDITIVI CHIMICI

La sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti, nonostante i recenti progressi delle tecnologie alimentari e delle biotecnologie finalizzati alla conservazione e/o alla trasformazione delle derrate alimentari, appare una tematica sempre attuale, anche nei paesi occidentali e, pertanto, degna di attenzione per la tutela della salute pubblica (WHO, 2002). Stime piuttosto recenti hanno evidenziato che oltre

il 30% della popolazione dei paesi industrializzati soffre di disturbi gastro-intestinali riconducibili al consumo di alimenti e che nel solo anno 2000 almeno due milioni di persone sono decedute a causa di malattie legate alla scarsa qualità igienico-sanitaria degli alimenti (WHO, 2002). A tale quadro, pure se con una valenza meno allarmante, bisogna necessariamente aggiungere che le contaminazioni microbiche, oltre ad aumentare il rischio di patologie a trasmissione alimentare, riducono la shelf-life dei prodotti alimentari causando ingenti danni economici alle industrie alimentari sia in termini di prodotti alterati, sia in termini di immagine. La riduzione o l'eliminazione dei microrganismi indesiderati presenti negli alimenti permane, pertanto, un obiettivo prioritario. Obiettivo che potrebbe apparire di semplice attuazione; infatti l'ottimale applicazione di una o più delle molteplici tecnologie di conservazione e trasformazione (trattamenti di risanamento termico, l'uso delle basse temperature, l'essiccamento, la salagione, lo zuccheraggio, l'irraggiamento, l'impiego di atmosfere modificate) insieme all'impiego di opportuni ed efficaci additivi chimici possono assicurare con successo la riduzione o l'eliminazione dei pericoli igienico-sanitari e microbiologici. Tuttavia il binomio “trattamento tecnologico – uso di additivi chimici”, di successo sino agli scorsi decenni, appare oggi in forte affanno nel rispondere al moderno concetto di qualità che si arricchisce di nuovi requisiti ben identificati con il termine anglosassone “green”. Come sottolineato sin dalla fine dello scorso decennio, le preferenze dei consumatori occidentali moderni, si vanno orientando verso prodotti alimentari che abbiano un ridotto contenuto di additivi chimici e un basso impatto sull'ambiente “green food” (Tuley de Silva, 1996; Smid e Gorris, 1999). Inoltre l'Organizzazione Mondiale

della Sanità ha recentemente consigliato la riduzione del cloruro di sodio per diminuire il rischio e l'incidenza di malattie cardiovascolari, per molti prodotti alimentari tale riduzione potrebbe tradursi in un aumento dell'impiego di conservanti chimici che sicuramente non rispecchia quelle che sono le attuali preferenze dei consumatori. Diventa quindi necessario definire tecnologie innovative che, anche in combinazione con quelle esistenti, siano in grado di garantire la sicurezza dei prodotti alimentari preservandone le caratteristiche di genuinità e “naturalità”. Condizione che ha fatto divenire la riduzione o l'eliminazione dei composti chimici nella preparazione di alimenti come una delle tematiche di maggiore attualità ed interesse per il mondo scientifico. Il mondo della ricerca è concentrato sullo studio e sulla messa a punto di nuove tecnologie e biotecnologie di conservazione che siano in grado di garantire la sicurezza, di influenzare positivamente i caratteri sensoriali, di ridurre l'impiego di additivi chimici e preservare le caratteristiche nutrizionali, di freschezza e naturalità. Alcuni studi hanno evidenziato che nella sostituzione degli additivi chimici un importante ruolo potrebbe essere rappresentato dall'impiego di composti naturali in possesso di attività antimicrobica e privi di eventuali effetti negativi sulla salute dei consumatori. Numerosi sono gli sforzi messi in atto dalla ricerca applicata al fine di individuare composti naturali estratti da piante, microrganismi nonché da animali tali da poter essere impiegare come “additivi naturali”. Azioni che hanno trovato un forte sprone anche negli indirizzi di ricerca dettati dagli ultimi due Programmi Quadro (*VI e VII Frame-Work UE*) della Unione Europea. Attenzioni dettate anche dal fatto che tali composti oltre a preservare i caratteri qualitativi dell'alimento possono esplicare anche effetti

positivi sulla salute del consumatore tali da poter essere utilizzati anche come nutraceutici. Tali approcci, essendo nel contempo in grado di promuovere la riduzione o l’eliminazione degli additivi chimici nei processi di preparazione degli alimenti e di migliorare le caratteristiche nutrizionali degli alimenti, ben si coniugano con le nuove sfaccettature del carattere di sicurezza degli alimenti.

1.2 I NUOVI INDIRIZZI DI RICERCA

L’individuazione di condizioni tali da permettere la realizzazione di alimenti in grado di rispondere ai temi della sicurezza e alle più ampie problematiche relative alla promozione della salute del consumatore rappresenta uno dei punti cardini intorno al quale si muove il mondo della ricerca applicata. In tale contesto sono nati ed hanno acquisito sempre maggiore peso i nuovi indirizzi di ricerca che calamitano l’attenzione e gli sforzi di ricercatori nazionali ed internazionali. L’emergente filone della “*nutrigenomica*”, finalizzata allo studio e alla messa a punto di alimenti in grado di veicolare nutrienti tali da prevenire malattie o essere benefici per la salute del consumatore, riceve attenzioni trasversali da parte di ricercatori provenienti dai più diversi settori scientifici disciplinari. Inoltre, accanto a questo, uno spazio sempre crescente nel panorama scientifico è ormai occupato dai filoni di ricerca miranti alla definizione di “*fattori di biocontrollo*”, tali da garantire negli alimenti l’assenza di patogeni e prevenirne l’insorgenza, e di “*tecnologie innovative*” finalizzate alla riduzione di ingredienti e additivi chimici potenzialmente pericolosi o poco salutari. Filoni di ricerca che, trovando la loro applicazione nello sviluppo e/o nell’innovazione di prodotti alimentari sia

freschi sia trasformati e indistintamente di origine vegetale o animale, puntano all'unico e ambizioso scopo di migliorare la qualità delle preparazioni alimentari. Anche se attualmente sono disponibili tecnologie innovative per la conservazione di alcuni alimenti, la sostituzione o la riduzione di additivi chimici appaiono piuttosto ostiche da superare, soprattutto da parte del mondo produttivo che le percepisce quasi come un rischio. Sono quindi necessari ulteriori approfondimenti che permettano di chiarire ed approfondire questa tematica così attuale.

1.2.1 LA NUTRIGENOMICA

Il concetto di Nutrigenomica nasce dalla fusione di due branche della scienza, la genomica e la nutrizione, con lo scopo di concepire alimenti innovativi con funzioni che vanno ben oltre il valore nutritivo per approdare ad una condizione tale da essere in grado di prevenire e curare alcune patologie. Il termine nutrigenomica non deve essere erroneamente confuso con quello di nutraceutica in quanto in esso racchiude lo studio del genoma, del proteoma e del profilo metabolico dell'essere umano (genomica, proteomica, metabolomica) e la loro integrazione con lo scopo applicativo di migliorare la nutrizione e la salute dell'uomo. La nutrigenomica fornisce le basi scientifiche per lo sviluppo di prodotti alimentari che soddisfano le necessità di gruppi di consumatori che siano essi in salute, a rischio di patologie o malati (Summet, 2010). Una disciplina, quindi, che coinvolge più settori scientifici (biologia molecolare, farmacologia, bioinformatica, nutrizione, genetica, tecnologie e biotecnologie alimentari) e che si occupa quindi delle relazioni intercorrenti tra gli alimenti e gli ingredienti

alimentari, della promozione della salute e della prevenzione delle patologie (Sumi, 2008).

Diversi sono gli studi condotti negli ultimi anni che hanno fatto emergere importanti novità. Per citarne solo alcuni, degno di nota è un recente studio, condotto su cellule di lievito, il quale ha evidenziato che l'attività di un singolo gene opportunamente stimolato, nello specifico il gene SIR2, può prolungare la durata del ciclo vitale e un gene analogo, il SIRT1, è stato identificato e descritto nell'uomo. L'attività di tale gene, secondo prove condotte in laboratorio, sembrerebbe essere promossa da alcuni polifenoli come la quercetina, presente in mele e in tè, e dal resveratrolo, presente in uva e vino rosso (Hall, 2003). In natura è disponibile una miriade di composti in grado o potenzialmente in grado di influenzare l'espressione dei geni con finalità di prevenzione o terapeutiche. Emerge pertanto che la nuova sfida è quella di identificare tali molecole, caratterizzare la loro attività in laboratorio e mettere a punto alimenti personalizzati per le differenti categorie di consumatori.

Un alimento messo a punto mediante la nutrigenomica deve contenere molecole in grado di stimolare l'attività di determinati geni, che siano biodisponibili e privi di tossicità. A tal proposito sarebbe auspicabile anche l'eliminazione di additivi chimici utilizzati per la conservazione dell'alimento o per altri fini tecnologici, infatti sarebbe un controsenso la presenza di composti chimici potenzialmente tossici in un alimento progettato per migliorare la salute o per prevenire alcune patologie. Inoltre, tali alimenti devono essere in grado fornire i giusti apporti calorici e nutrizionali, essere sensorialmente accettati dal consumatore, avere un costo contenuto e garantire una shelf-life abbastanza elevata.

La nuova scienza parte dal presupposto, dimostrabile, che la dieta può avere effetti diversi su geni e funzioni proteiche. Si tratta di un fenomeno che è evidenziato dal fatto che ciascun individuo ha una propria risposta ai nutrienti: una stessa dieta può avere infatti come effetto persone normopeso o sovrappeso, persone con allergie o altre problematiche. Dunque l'obiettivo ultimo, e per ora ancora ideale, sarebbe di arrivare ad avere nuovi cibi in possesso di proprietà benefiche opportunamente sviluppate, così da contribuire ad ottimizzare la salute di ciascuno in accordo con i propri geni.

Nel suo evolversi la nutrigenomica ha preso spunto dalla considerazione che nell'organismo umano, così come avviene per un medicinale assunto per via orale, anche un nutriente segue dei percorsi di distribuzione, viene metabolizzato e infine escreto. Tenendo ovviamente conto che sono presenti alcune complicazioni non irrilevanti: un medicinale è composto da ingredienti conosciuti, per qualità e quantità, mentre la composizione chimica di un alimento è tutt'altro che fissa e ripetibile.

Mettendo a buon frutto le esperienze della farmacologia e le conoscenze interdisciplinari, la nutrigenomica è in una fase di forte sviluppo, e gode del supporto di una attiva politica europea, la quale già da alcuni anni è impegnata a sostenere il consorzio internazionale NUGO (European Nutrigenomics Organisation), che raccoglie e coordina il lavoro di venti laboratori di ricerca internazionali. Le ragioni di un simile interesse risiedono in alcune semplici considerazioni: il patrimonio genetico di ciascuno di noi ha un'influenza sulla nostra suscettibilità a contrarre malattie. Affinché queste si manifestino, occorre però il concorso di fattori ambientali e comportamentali. L'alimentazione è da

considerarsi un fattore ambientale che ha complesse interazioni con i geni, esempio emblematico è l'obesità, malattia che risulta essere multigenica (legata a più geni) e multifattoriale (legata a molti fattori) tra cui l'alimentazione. Lavorare sulla nutrizione significa dunque poter migliorare lo stato di salute dell'uomo.

1.2.2 I FATTORI DI BIOCONTROLLO

L'interesse per la bioconservazione degli alimenti ha stimolato la ricerca di nuovi composti antimicrobici di differente origine. Il termine di bioconservazione applicata agli alimenti è stato coniato per identificare principalmente quelle tecnologie innovative di conservazione che prevedono l'utilizzo di microrganismi e/o di loro metaboliti. La definizione non è ancora del tutto chiara in quanto potrebbe comprendere anche l'utilizzo di antimicrobici naturali estratti da piante o da altre matrici.

I principali fattori di biocontrollo attualmente descritti dalla maggior parte degli Autori riguardano l'impiego di colture di batteri lattici e/o di loro metaboliti ma anche l'utilizzo di batteriofagi ed endolisine.

L'impiego di batteri lattici a garanzia della sicurezza igienico-sanitaria è noto da tempo, ceppi di batteri lattici opportunamente selezionati potrebbero essere impiegati con successo come colture protettive per migliorare la salvaguardia dei caratteri di freschezza dei prodotti. I metaboliti prodotti da tali ceppi (acidi organici, acidi grassi, perossido d'idrogeno, diacetile) hanno fatto apprezzare interessanti attività antimicrobiche nei confronti di differenti microrganismi indesiderati (Holzapfel et al., 1995; Ouwehand, 1998). In merito alle attività inibenti attenzioni sono state rivolte ai ceppi produttori di batteriocine, metaboliti

in grado di inibire la crescita di diversi batteri patogeni quali *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Enterococcus* spp. (Soomro et al., 2002). La nisina, una batteriocina reperibile in commercio, esibisce una spiccata attività antimicrobica anti-*Listeria* nei prodotti carnei suini freschi e il suo utilizzo è ammesso in numerosi prodotti lattiero-caseari (Murray e Richard, 1997; Pawar et al., 2000). Alcune batteriocine sono state ampiamente studiate ed è stata ben documentata la loro attività antimicrobica, in Tabella 1.1 sono riportate le principali batteriocine prodotte da differenti specie di batteri lattici.

Tabella 1.1 Batteriocine prodotte da batteri lattici (Castellano et al. . 2008)

Producer organism	Bacteriocin	Producer organism	Bacteriocin
<i>L. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	Curvacin A
<i>L. Lactis</i> BB24	Nisin	<i>Lb. curvatus</i> CRL705	Lactocin 705
<i>L. Lactis</i> WNC	Nisin Z	<i>Lb. curvatus</i> FS47	Curvacin FS47
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lactacin 481	<i>Lb. curvatus</i> L442	Curvacin L442
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Diplococcin	<i>Lb. plantarum</i> CTC305	Plantaricin A
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lactostrepcins	<i>Lc. gelidum</i> UAL187	Leucocin A
<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	Bacteriocin 550	<i>Lc. mesenteroides</i> TA33a	Leucocin A
<i>L. fermenti</i> 46	ND	<i>Lc. carnosum</i> TA11a	Leucocin A
<i>L. helveticus</i> 27	Lactocin 27	<i>P. acidilactici</i> L50	Pediocin L50
<i>L. helveticus</i>	Helveticin J	<i>P. pentosaceus</i> Z102	Pediocin PA-1
<i>L. acidophilus</i>	Lactacin B	<i>C. piscicola</i> LV17B	Carnobacteriocin B2
<i>L. acidophilus</i>	Lactacin F	<i>C. piscicola</i> V1	Piscicocin v1a
<i>L. plantarum</i>	Plantaricin A	<i>C. piscicola</i> LV17A	Carnobacteriocin A
<i>L. sakei</i> Lb 706	Sakacin A	<i>C. piscicola</i> JG126	Piscicolin 126
<i>L. sakei</i> I151	Sakacin P	<i>C. piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocin B1/B2
<i>L. sakei</i> LTH673, 674	Sakacin K, P	<i>C. divergens</i> 750	Divergicin 750
<i>L. sakei</i> CTC494	Sakacin K	<i>C. divergens</i> LV13	Divergicin A
<i>L. sakei</i> L 45	Lactocin S	<i>E. faecium</i> CTC492	Enterocin B
<i>L. sakei</i> MN	Bavaricin MN	<i>E. faecium</i> CTC492	Enterocin A
<i>Lb. brevis</i> SB27	Brevicin 27	<i>E. casseliflavus</i> IM416K1	Enterocin 416K1
<i>L. casei</i>	Caseicin 80	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocin PA1
<i>P. acidilactici</i> H	Pediocin Ach	<i>P. pentosaceus</i> FBB61	Pediocin A

Recentemente il mondo scientifico ha rivolto l’attenzione anche nei confronti dei batteriofagi e delle endolisine da essi prodotte da impiegare come fattori di biocontrollo. I batteriofagi o fagi sono i microrganismi più abbondanti sulla terra ed ampiamente diffusi anche in alimenti di differente origine (Brussow e Kutter, 2005). Essi infettano in maniera specifica solo i batteri ma non sono in grado di infettare l’uomo, gli animali e le piante, quindi, la loro specificità li rende

sicuramente interessanti come fattori di biocontrollo anche se per alcuni alimenti rappresentano un problema di non poco conto, come nel caso dello yogurt. I batteriofagi possono efficacemente contrastare lo sviluppo dei microrganismi indesiderati in molti prodotti alimentari, recenti studi hanno mostrato che il loro impiego in prodotti carnei di pollo è in grado di inibire lo sviluppo di *Salmonella* e *Campylobacter* (Fiorentin et al., 2005; Atterbury et al., 2005) nonché di combattere le infezioni ruminanti da parte di *E. coli* (Raya et al., 2006). Le endolisine sono degli enzimi litici prodotti dai fagi non filamentosi che vengono rilasciati per lisare la parete cellulare dei batteri così da consentirne l'invasione, interferiscono con la sintesi del peptidoglicano e mostrano perciò un'interessante attività battericida (Loessner, 2005). Tuttavia la maggior parte dei lavori scientifici attualmente prodotti riguardano l'impiego delle endolisine nei confronti di patogeni di interesse zootecnico ma non sono presenti dati interessanti ed esauritivi concernenti il loro impiego in campo alimentare.

Da quanto riportato emerge che l'attenzione nei confronti dei fattori di biocontrollo, inaugurata da oltre un decennio, ha prodotto interessanti presupposti e allo stesso tempo ha generato sproni ed interrogativi che rendono tale tematica ancora pienamente attuale.

1.2.3 LE TECNOLOGIE INNOVATIVE DI CONSERVAZIONE

L'esigenza di produrre alimenti salubri e allo stesso tempo sicuri senza l'impiego di additivi chimici ha portato alla nascita di tecnologie e biotecnologie progettate per il controllo dei microrganismi indesiderati e per il mantenimento dei caratteri qualitativi. Tale esigenza nasce sulla base della domanda dei consumatori

orientata verso prodotti alimentari che siano sicuri e di elevata qualità ma, allo stesso tempo, siano minimamente processati, con ridotto contenuto di additivi chimici e con un'elevata shelf-life.

Negli ultimi anni il progresso scientifico-tecnologico ha consentito la messa a punto di tecnologie e biotecnologie finalizzate al controllo dei microrganismi indesiderati negli alimenti che hanno permesso il raggiungimento di nuovi standard qualitativi. Le principali tecniche di conservazione innovative ottimizzate e disponibili per applicazioni in campo alimentare riguardano principalmente il *superchilling*, l'utilizzo delle alte pressioni, l'impegno di imballaggi attivi e l'utilizzo di antimicrobici naturali.

Il *superchilling*, termine sicuramente non recentissimo essendo stato descritto per la prima volta nel 1920 da Danois, viene attualmente utilizzato per descrivere un processo di parziale congelamento dell'acqua presente all'interno dell'alimento da conservare (Magnussen et al., 2008). Gli alimenti che si adattano meglio a questa tipologia di conservazione sono i prodotti ittici e le carni fresche, per i quali si ha una notevole estensione della vita di scaffale (Schubring, 2009).

Tra le tecnologie che non prevedono trattamenti termici stanno prendendo piede le alte pressioni (HHP). Infatti secondo Alcuni autori sono in grado di distruggere diversi batteri alterativi e patogeni e di inattivare alcuni enzimi presenti nei prodotti alimentari e responsabili di fenomeni alterativi (Patterson, 2005). Inoltre, l'utilizzo delle HHP è in grado di ridurre significativamente la presenza di *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* in carni crude e marinate, dimostrandosi così uno strumento tecnologico valido per il controllo di questi microrganismi patogeni (Hugas et al., 2002).

Risultanti interessanti e spendibili derivano dagli sviluppi conseguiti nel settore degli imballaggi attivi, cioè confezioni che non siano solo una semplice “barriera” ma che siano anche in grado, con differenti meccanismi, di influenzare positivamente la conservazione dell’alimento. Promettente ed interessante è la tipologia di imballaggio attivo che prevede l’inserimento di sostanze antimicrobiche, spesso di origine batterica, nel materiale di confezionamento al fine di controllare lo sviluppo dei microrganismi presenti sulla superficie dell’alimento. L’imballaggio antimicrobico è sicuramente una tecnologia laboriosa ma può estendere la vita di scaffale e migliorare la sicurezza dei prodotti. La sostanza ad attività antimicrobica può essere incorporata direttamente nell’imballaggio, polimeri ma anche film edibili, può essere rilasciata mediante dispensatori presenti all’interno della confezione o essere distribuita sulla superficie dell’alimento stesso. In commercio sono disponibili alcuni imballaggi con antimicrobici che possono essere impiegati per il confezionamento dei prodotti alimentari (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 *Imballaggi antimicrobici per applicazioni in campo alimentare (G.H. Zhou et al., 2010)*

Active component	Tradename	Producer Company	Packaging forms for food applications
Allylthio-cyanate	WasaOuro	Lintec Corp.	Sachets
Silver Zeolite	Aglon™	Agion	Paper, plastics
Glucose oxidase (H ₂ O ₂)	Bioka	Bioka Ltd	Sachets
Triclosan	Microban	Microban prod.	Plastic packaging
Ethanol vapour	Ethicap	Freund	Sachets
	Oitech	Nippon Kayaku	Sachets
Carbon dioxide	Freshpax™	Multisorb technologies	Sachets
	Verifrais	SARL Codimer	
Chlorine dioxide	Micro-sphère	Bernard Technologies	Sachets, film, wraps, plastics

Infine, estremamente interessante appare, l’impiego di antimicrobici naturali quali oli essenziali, estratti naturali, chitosano, nisina e lisozima da utilizzare per

il controllo degli agenti microbici indesiderati. Essi, oltre ad esplicare un'adeguata attività antimicrobica, potrebbero sostituire gli additivi chimici e contribuire alla realizzazione dei così detti alimenti “green label”, dai quali i consumatori sono particolarmente attratti, in quanto forniscono una forte immagine di naturalezza.

Quindi, alcuni composti naturali, quali oli essenziali, grazie alla loro attività antimicrobica, potrebbero essere utilizzati in alternativa agli additivi chimici, infatti, recenti lavori scientifici hanno descritto la possibilità di impiegare tali composti naturali per la conservazione sia di alimenti facilmente deperibili come carni fresche e prodotti ittici, sia di alimenti fermentati come i formaggi (Nychas, 1995; Tassou et al., 2000; González-Molina et al., 2010; Zhou et al., 2010).

CAPITOLO 2

ESTRATTI NATURALI PER LA PRESERVAZIONE DEGLI ALIMENTI

Grazie agli sforzi messi in atto dalla ricerca scientifica, l'utilizzo di estratti naturali ad attività antimicrobica per la conservazione degli alimenti sta diventando un'opportunità sempre più reale e potrebbe segnare una svolta decisiva per la riduzione di molti additivi chimici.

Infatti, negli ultimi anni, sono stati prodotti diversi lavori scientifici che attestano l'uso di estratti naturali per la conservazione degli alimenti al fine di controllare lo sviluppo dei microrganismi indesiderati e prevenire i naturali processi alterativi dell'alimento stesso.

Gli antimicrobici presenti in natura possono derivare da piante, animali e microrganismi ma, per quanto riguarda il settore alimentare, l'interesse maggiore viene posto nei confronti degli estratti naturali ad attività antimicrobica derivanti dal mondo vegetale e soprattutto da frutta, erbe e spezie (Burt, 2004; Patrignani et al., 2008). Tuttavia i dati disponibili riguardano prevalentemente l'effetto degli estratti naturali nei confronti dei microrganismi indesiderati, non sono disponibili informazioni sull'effetto di tali composti sui microrganismi utili, che comunemente colonizzano i tantissimi prodotti fermentati, e non si conoscono quali siano i meccanismi d'azione delle sostanze naturali ad effetto antimicrobico.

Quindi, prima di poter realmente impiegare questi composti per la conservazione degli alimenti, è necessario chiarire gli aspetti precedentemente esposti, validare l'utilizzo degli estratti vegetali in sistemi alimentari complessi, determinare la loro potenziale tossicità e stabilire se alle concentrazioni d'impiego proposte influiscono in maniera negativa sui caratteri sensoriali dell'alimento.

2.1 GLI ESTRATTI NATURALI NEGLI ALIMENTI

Gli estratti naturali derivanti da differenti matrici vegetali principalmente costituiti da oli essenziali, estratti idroalcolici e altri derivati, contengono un'ampia serie di metaboliti secondari in grado di rallentare o inibire la crescita di batteri, lieviti e muffe (Burt et al., 2003; Chorianopoulos et al., 2008). La maggior parte di questi composti è oggetto di studio e non è stata ancora sfruttata a livello commerciale, i composti ad attività antimicrobica di origine naturale sono solitamente contenuti nella frazione lipidica di foglie (rosmarino, salvia basilico, origano, timo e maggiorana), fiori e boccioli (chiodi di garofano), bulbi (aglio e cipolla), semi (cumino, finocchio, noce moscata e prezzemolo), rizomi (assafetida), frutti (pepe e cardamomo) o altre parti della pianta. Quindi, gli oli essenziali e i loro costituenti, spesso sotto forma di spezie, sono da sempre utilizzati per migliorare l'aroma dei prodotti alimentari ed è nota la loro ampia attività antimicrobica in termini anche di spettro d'azione (Nychas et al., 2003; Gutierrez et al., 2008). Tali composti possono agire direttamente sulla cellula microbica inibendo la crescita o la produzione di metaboliti secondari tossici come nel caso delle micotossine, inoltre, l'attività inibente degli oli essenziali, è

maggiore nei confronti dei batteri Gram-positivi che nei confronti di quelli Gram-negativi, carattere riconducibile alle differenze inerenti la struttura della parete cellulare (Gutierrez et al., 2008; Marino et al., 2002; Chorianopoulos et al., 2008). La diversa efficacia nei confronti dei Gram-positivi è attinente ai soli oli essenziali, infatti, altri estratti naturali come origano, chiodi di garofano, cannella e citrale, sono attivi sia nei confronti dei batteri Gram-positivi sia nei confronti di quelli Gram-negativi (Kim e Fung, 2004). I principali costituenti degli oli essenziali e degli estratti naturali di origine vegetale a dimostrata attività antimicrobica sono rappresentati da composti fenolici, alcol alifatici, aldeidi, chetoni, acidi e isoflavonoidi (Chorianopoulos et al., 2008). I dati concernenti le analisi chimiche di un'ampia gamma di oli essenziali hanno permesso di stabilire che i principali costituenti chimici includono timolo, carvacrolo, eugenolo e citrale o loro precursori, inoltre, è stato ampiamente accertato che alcuni composti non fenolici, come l'isotiocianato di allile e l'olio essenziale di aglio, sono maggiormente attivi nei confronti dei microrganismi Gram-negativi e che l'isotiocianato di allile mostra attività inibente anche nei confronti di lieviti e muffe (Brijesh et al., 2009).

2.1.1 LE SPEZIE NEGLI ALIMENTI

Tradizionalmente le spezie sono aggiunte durante la preparazione degli alimenti con l'intento di migliorarne i caratteri sensoriali. Le molecole che le costituiscono possono svolgere molteplici attività utili sia per la conservazione degli alimenti, sia in termini di benefici per il consumatore grazie alla loro attività antiossidante. L'utilizzo delle spezie per il controllo delle alterazioni microbiche è noto da

tempo così come è nota la loro attività antimicrobica che, seppur su base puramente empirica, è stata sfruttata sin dall'antichità. Altra attività biologica attribuibile alle spezie, sicuramente interessante e degna di nota, è l'azione antiossidante svolta dalle molecole che le compongono che può contribuire in maniera rilevante alla prevenzione dei naturali fenomeni alterativi degli alimenti (fenomeni ossidativi) oltre ad essere benefica per il consumatore finale. La prima evidenza scientifica sulla conservazione degli alimenti mediante l'impiego di spezie risale al lontano 1880 e riguardava l'impiego dell'olio essenziale di cannella per l'inibizione delle spore di *Bacillus anthracis*. Successivamente nel 1910 è stato descritto l'impiego di cannella e senape per la conservazione del sidro di mela mentre i chiodi di garofano sono risultati utili per la conservazione di carni fresche, sciroppi e salse (Tajkarimi et al., 2010).

Attualmente sono disponibili informazioni dettagliate riguardanti l'effetto delle spezie nonché la loro composizione chimica e il loro utilizzo in sistemi alimentari. In particolare, spezie come la cannella, i chiodi di garofano, l'aglio, la senape e la cipolla possono aumentare la vita commerciale degli alimenti grazie al contenuto di alcuni composti biologicamente attivi costituiti da: fenoli, aldeidi, chetoni, eteri ed idrocarburi (Tajkarimi et al., 2010). Altre spezie, per l'esattezza il pimento, l'alloro, il cumino, il coriandolo, il rosmarino, il timo, l'origano e la salvia, in diversi studi condotti, hanno fatto apprezzare un significativo effetto batteriostatico (Burt, 2004; Celyan e Fung, 2004; Gutierrez et al., 2008).

Le spezie, oltre ad esplicare azione antimicrobica nei confronti di alcuni microrganismi, svolgono azione stimolante specialmente verso i batteri lattici, fondamentali protagonisti di molti processi fermentativi. Tale azione di stimolo è

esercitata da pepe nero, pepe bianco, pepe rosso, pepe della Giamaica, aglio, noce moscata e zenzero. L'azione di stimolo sembra essere dipendente, oltre che al tipo di spezie e dalla loro origine, anche dalle caratteristiche qualitative e quantitative della popolazione microbica. I lattobacilli sembrano risentire della presenza di questi prodotti in maggior misura rispetto ai pediococchi e l'azione di stimolo sembra essere provocata soprattutto dall'apporto di manganese fornito ai prodotti mediante l'impiego di tali ingredienti (Zaika et al., 1978; Zaika e Kissinger, 1984).

2.1.2 IMPIEGO DI ESTRATTI NATURALI

Le spezie e le erbe aromatiche, sotto forma di estratti, possono essere utilizzate negli alimenti in alternativa ai composti chimici per controllare lo sviluppo dei microrganismi indesiderati. Ad esempio, sia l'estratto idroalcolico, sia l'olio essenziale derivanti dai fiori delle *Nandina domestica*, potrebbero potenzialmente essere una valida alternativa agli additivi di sintesi contro alcuni microrganismi patogeni (Bajpai et al., 2008). Alcuni Autori hanno descritto l'impiego di estratti naturali per la conservazione di prodotti carnei freschi, prodotti ittici e anche formaggi freschi. Taluni estratti, costituiti principalmente da estratti di limone, citrale e il linaiolo, non sono solo in grado di controllare lo sviluppo dei microrganismi alterativi ma, prolungando la shelf-life, consentono un incremento della qualità totale stessa (Zhou et al., 2010; González-Molina et al., 2010).

In natura sono presenti più di 1300 piante caratterizzate dalla presenza di composti ad acclamata attività antimicrobica. Oltre 30000 molecole sono state identificate e testate per una potenziale applicazione in sistemi alimentari e, la

maggior parte di esse, appartiene ai composti fenolici. Nonostante la cospicua presenza in natura di tantissimi composti antimicrobici solo una piccola parte di essi, soprattutto oli essenziali, sono impiegati a livello commerciale come additivi naturali per la conservazione degli alimenti. Quindi, anche se recenti studi che hanno focalizzato la loro attenzione sulla conservazione degli alimenti mediante gli estratti naturali, affermano che essi possono essere in grado di aumentare la vita commerciale dei prodotti, eliminare i microrganismi patogeni e aumentare la qualità totale sono necessari ulteriori approfondimenti riguardanti tale tematica (Tajkatimi et al., 2010).

Gli estratti vegetali commerciali ad attività antimicrobica sono prodotti principalmente per distillazione di matrici vegetali precedentemente sminuzzate o sottoposte a pressione (oli essenziali), come estratti idroalcolici ma anche mediante l'utilizzo di fluidi supercritici che migliorano la resa di estrazione e la solubilità degli estratti (Burt, 2004).

Quindi, differenti estratti di spezie, piante officinali ed altre matrici vegetali, quali ad esempio, origano, rosmarino, timo, salvia, basilico, propoli, ginger, noce moscata, aglio, curcuma, finocchietto e santoreggia possono essere utilizzati efficacemente come additivi naturali da soli o in combinazione con altre tecnologie di conservazione. Essi possono agire in maniera diretta o indiretta sulla conservazione degli alimenti o esercitare un effetto inibente nei confronti della popolazione microbica alterativa, sia nei riguardi di batteri Gram-positivi, sia verso quelli Gram-negativi. Bisogna comunque tener presente che la loro efficacia varia in funzione del pH, della temperatura di conservazione, della presenza di ossigeno e dalla concentrazione dei componenti biologicamente attivi

responsabili dell'attività antimicrobica (Holley e Patel, 2005; Burt et al., 2007; Gutierrez et al., 2008; Tajkatimi et al., 2010). In Tabella 2.1 sono riportati i dati riguardanti i principali estratti naturali ad attività antimicrobica saggiati in sistemi alimentari.

Tabella 2.1 Principali estratti naturali testati in sistemi alimentari (Tajkatimi et al., 2010)

food product	antimicrobial agent (concentrations)	microbial dynamics	quality attributes	reference
fruit yoghurt	vanillin (2000 ppm)	yeast, bacterial (delays growth)	shelf life (!)	(232)
tomato juice	dove oil (0.1%) mint extract (1.0%) nisin (0.004%)	total plate count (3.9 LR) total plate count (8.34 LR) total plate count (!)	shelf life (!), vitamin C (~)	(208)
ready-to-eat fruit salad	citral (25–125 ppm) citron (300–900 ppm) citron (600 ppm)	yeasts and lactic acid bacteria (LAB) (delays growth) Salmonella enteritidis E4 (2 LR), Escherichia coli 555 (<4.5 LR) Listeria monocytogenes Scott A (4 LR)	shelf life (!) sensory characteristics (~)	(233)
raspberries	methyl jasmonate (MJ), allyl isothiocyanate (AITC) EO of <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree oil)		AC (!) AC (!) AC (!)	(234)
fresh cut water melon	nisin (25 µg/mL)	<i>L. monocytogenes</i> (0.8 LR)	quality (!)	(235)
lettuce	thyme oil (1 mL/l)	<i>E. coli</i> (6.32 LR) <i>E. coli</i> (5.57 LR)		(236)
baby carrot				
minimally processed carrots	oregano oil (250 ppm)	background spoilage microflora total viable count (TVC) (>1 LR) lactic acid bacteria (LAB) (>1 LR) <i>Pseudomonas</i> (<1 LR) <i>Aeromonas</i> spp (2 LR)	sensory characteristics (~)	(205)
minimally processed vegetables	thyme oil (1%)		sensory properties (!), shelf life (!)	(237)
wine	nisin	psychrotrophic aerobic plate count (4.19 LR) plate count agar (5.44 LR) LAB (minimum inhibitory concentration, MIC = 0.39 mg/mL) <i>Oenococcus oeni</i> (MIC 0.01 mg/mL) acetic acid bacteria (MIC 1.5 mg/mL)		(238)
milk	rutetin (8 AU/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (4.59 LR)		(161)
skimmed milk powder	nisin (100 IU/ml)	<i>S. aureus</i> counts (5.45 LR)		(239)
chicken meat	nisin (100 IU/ml) nisin	<i>L. innocua</i> (3.8 LR) <i>E. coli</i> (<1 LR)	proximate composition (~), shelf life (!)	(209)
fish	EOs of mustard oil	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (~) <i>Lactobacillus alimentarius</i> (~) <i>Brochothrix thermosphacta</i> (~) <i>Lactobacillus alimentarius</i> (delays growth)		
red meat	EOs (0.5% carvacrol + 0.5% thymol)	TVC (2.5 LR)	shelf life (!), lipid oxidation (!) sensory characteristics (~)	(240)
beef hot dog	tea catechins (300 mg/kg) dove oil (5 mL/l) thyme oil (1 mL/l)	<i>L. monocytogenes</i> (1.15–1.71 LR) <i>L. monocytogenes</i> (0.67–1.05 LR) <i>L. monocytogenes</i> (1.5 LR)	shelf life (!), lipid oxidation (!)	(241) (73)
polk bologna	nisin (125 µg/mL)	<i>L. monocytogenes</i> (1.5 LR)		(169)
minced beef	<i>Capiscum annuum</i> extract	<i>Salmonella typhimurium</i> (Minimum lethal concentration, MLC 15 g/kg) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MLC 30 g/kg)		(199)
chicken frankfurter	dove oil (1% w/w)	<i>L. monocytogenes</i> (4.5 LR)		(197)
cooked beef	grape seed extract (1%)	<i>Escherichia coli</i> (1.7 LR) <i>S. Typhimurium</i> (2.0 LR) <i>L. monocytogenes</i> (0.8 LR) <i>Aeromonas hydrophila</i> (0.4 LR)	color (~), lipid oxidation (!)	(200)

2.2 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

In generale l'attività antimicrobica espressa dagli estratti vegetali nei sistemi alimentari differisce da quella esibita in “*vitro*” a causa di numerose variabili che non sono state completamente descritte e prese in considerazione dagli studi condotti (Soicov et al., 2009). Le matrici alimentari rappresentano sicuramente dei sistemi più complessi rispetto a quelli utilizzati per l'esecuzione dei test “*in vitro*”. I principali fattori di variabilità sono relativi alla composizione degli alimenti, al pH, alla presenza di enzimi, tutti fattori intrinseci dell'alimento, che possono ostacolare o invalidare l'attività antimicrobica. Infatti, nei sistemi alimentari, rispetto ai test “*in vitro*”, sono generalmente richieste maggiori concentrazioni di estratti per ottenere il medesimo effetto antimicrobico.

Solitamente l'attività antimicrobica degli estratti naturali varia in funzione della struttura chimica e della concentrazione dei costituenti. La maggior parte dei composti antimicrobici di origine vegetale, possono essere già presenti nella pianta o essere sintetizzati in risposta alla presenza di un'infezione come meccanismo di autodifesa nei confronti di un agente biologico patogeno. Le piante che manifestano elevati livelli di composti inibenti possono essere un'ottima risorsa dalla quale attingere composti naturali da impiegare nei confronti dei microrganismi indesiderati di interesse alimentare (Rauha et al., 2000; Ibrahim et al., 2006). Tali composti possono essere presenti nelle matrici vegetali come precursori ed essere attivati per via enzimatica in presenza di determinate condizioni di stress ad opera di specifiche ossidasi ed idrolasi (Holley e Patel, 2005). Ad esempio, nella senape e nel rafano, i composti antimicrobici sono

disponibili come precursori e sono attivati da enzimi denominati mirosinasi per produrre un'ampia gamma di isotiocianati tra cui l'isotiocianato di allile che è un efficace agente naturale antimicrobico (Delaquis e Mazza, 2002).

Gli estratti con elevate concentrazioni di eugenolo, aldeide cinnamica e citrale manifestano una elevata attività antimicrobica (Lis-Balchin et al., 1998; Davidson et al., 2001). L'olio essenziale di timo è caratterizzato da un'elevata presenza di monoterpeni fenolici per i quali è stata descritta una considerevole attività antimicrobica, antivirale ed antimicotica. Anche l'attività antimicrobica di timo, salvia e rosmarino, è riconducibile alla presenza di terpeni volatili e, per salvia e rosmarino nello specifico, l'effetto antimicrobico è correlato al bornolo ma anche ad altri composti fenolici presenti nella frazione terpenica (Pina-Vaz et al., 2004). Gli oli essenziali di cumino e coriandolo manifestano un effetto antimicrobico nei confronti di *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus* (Wan et al., 1998; Frike et al., 1998). Gli estratti di maggiorana e basilico, sono fortemente attivi contro *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., inoltre, gli oli essenziali di salvia e rosmarino, inibiscono lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Gutierrez et al., 2008). Differenti Autori hanno determinato la concentrazione minima inibente (MIC) e lo spettro d'azione per alcuni oli essenziali. Gutierrez et al. (2008) hanno descritto che gli estratti di origano e timo sono fortemente attivi contro gli enterobatteri e che la MIC degli oli essenziali di origano e timo nei confronti di *Enterobacter cloacae* è pari rispettivamente a 190 e 440 ppm, nei confronti *Lactobacillus brevis* è pari rispettivamente a 55 e 440 ppm, per *Bacillus cereus* si attesta rispettivamente su

valori di 425 e 745 ppm ed infine per *Pseudomonas putida* raggiunge valori di 1500 ppm. Tendenzialmente le specie appartenenti al genere *Pseudomonas* sono maggiormente resistenti all'azione antimicrobica dei composti naturali. Uno dei fattori chiave per spiegare tale resistenza potrebbe essere la sintesi di esopolisaccaridi. Altri dati disponibili in bibliografia e riguardanti l'attività antimicrobica di succhi e matrici vegetali, hanno permesso di concludere che gli estratti di tè verde ed aglio possono trovare una valida ed ampia applicazione per controllare la crescita di svariati microrganismi patogeni; l'estratto di tè verde è attivo contro *Escherichia coli* O157:H7, mentre la caffeina a concentrazione pari o superiori allo 0,5% permette la inattivazione di *Escherichia coli* O157:H7 in sistemi liquidi (BHI) (Kim e Fung 2004; Ibrahim et al., 2006). Tuttavia l'impiego dei composti naturali per il controllo della crescita dei microrganismi patogeni e alterativi d'interesse alimentare, richiede ulteriori valutazioni riguardo lo spettro d'azione dei composti nei confronti dei microrganismi, l'effetto dei composti in prodotti particolari (alimenti fermentati) e la loro azione nei confronti dei caratteri sensoriali (Tiwari et al., 2009).

Il possibile meccanismo d'azione delle sostanze naturali ad attività antimicrobica è stato più volte discusso (Davidson, 2001; Nycas, 1995; Lopez-Malo et al., 2005; 2008) ma ancora non sono disponibili informazioni dettagliate in merito. L'attività inibente espressa dalle sostanze naturali può essere attribuita ad una singola molecola o ad un insieme di esse che intervengono a livello cellulare in più siti interessando la cellula esternamente o a livello citoplasmatico. I possibili meccanismi d'azione potrebbero interessare la membrana cellulare poiché, l'idrofobicità di alcuni composti, consente loro di penetrare ed interferire con la

membrana stessa alterandone la struttura e le funzionalità. Tale meccanismo di azione spiegherebbe la maggiore attività inibente nei confronti dei microrganismi Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi, infatti, in quest'ultimi, è presente una capsula esterna che avvolge la parete cellulare e non consente l'entrata di sostanze idrofobiche all'interno della cellula stessa. I composti di origine naturale, oltre ad alterare la struttura della parete cellulare, potrebbero interferire sulle funzionalità delle proteine di parete cellulare coinvolte nei processi di trasporto di composti essenziali per la cellula. Sebbene i dati a riguardo presenti in letteratura, suggeriscono svariate ipotesi sui meccanismi d'azione non sono disponibili delle conferme.

2.2.1 AZIONE NEI CONFRONTI DEI GRAM-POSITIVI

L'effetto antimicrobico espresso dagli estratti naturali nei confronti dei batteri varia in funzione della specie batterica considerata. Molteplici studi affermano che tendenzialmente l'azione antimicrobica degli oli essenziali è maggiore nei confronti dei batteri Gram-positivi. Se tale assunto è vero per la maggior parte degli oli essenziali, non lo è per altri estratti come origano, chiodi di garofano, cannella e citrale (Kim e Fung, 2004).

La struttura della parete batterica delle cellule Gram-positive è costituita dal 90-95% di peptidoglicano al quale sono associate altre molecole quali acidi teoici e a volte proteine. Tale struttura cellulare consente alle sostanze idrofobiche, oli essenziali, di penetrare all'interno della cellula e di esplicare la loro azione antimicrobica sia intervenendo quindi a livello della parete cellulare, sia a livello citoplasmatico.

Tra le molecole che costituiscono gli estratti idroalcolici e gli oli essenziali derivanti da matrici vegetali, i composti fenolici mostrano una maggiore efficacia nei confronti dei batteri Gram-positivi. L'effetto dei composti fenolici varia in funzione della concentrazione; a basse concentrazioni interferiscono con l'attività dei sistemi enzimatici coinvolti nella produzione di energia mentre, ad elevate concentrazioni, essi provocano la denaturazione delle proteine (Tiwari et al., 2009). Generalmente, come accennato anche precedentemente, sono quindi necessarie minori concentrazioni di estratti naturali per inibire la crescita dei microrganismi Gram-positivi. Ad esempio Gutierrez et al. (2008), hanno definito i valori della concentrazione minima inibente (MIC) di alcuni oli essenziali stabilendo che:

- ✓ la MIC dell'olio essenziale di origano nei confronti di *Enterobacter cloacae* e di *Lb. brevis* è pari rispettivamente a 190 e 55 ppm;
- ✓ la MIC dell'olio essenziali di timo per *Pseudomonas putida* e *B. cereus* è pari rispettivamente a 1500 e 425 ppm.

Sebbene i batteri Gram-positivi siano generalmente più sensibili ai composti naturali ad attività antimicrobica, alcuni oli essenziali e alcuni estratti idroalcolici, non hanno fatto apprezzare differenze in tal senso come riportato da alcuni Autori in recenti studi (Tiwari et al., 2009).

L'azione inibente degli estratti naturali è variabile in funzione della concentrazione e della presenza di specifiche molecole ad attività inibente (carvacrolo, timolo, borenolo, citrale, eugenolo, isotiocianato d'allile etc.), concentrazione che, all' varia in funzione dello stato fisiologico della pianta, della specie, di eventuali condizioni di stress ma anche dal metodo di estrazione

utilizzato. Pertanto sono necessari ulteriori approfondimenti intesi a valutare la suscettibilità dei batteri Gram-negativi a parità di estratto o composto naturale ad attività antimicrobica.

2.2.1 AZIONE NEI CONFRONTI DEI GRAM-NEGATIVI

Come accennato nel paragrafo precedente i microrganismi Gram-negativi appaiono in linea di massima meno sensibili all'azione antimicrobica degli estratti naturali e soprattutto degli oli essenziali. Innanzitutto è necessario precisare che esistono delle importanti differenze strutturali per quanto riguarda la struttura della parete batterica dei Gram-negativi rispetto ai Gram-positivi. La prima fondamentale differenza consiste nella minore percentuale di peptidoglicano che rappresenta al massimo il 20% della parete cellulare contro il 90-95% nei Gram-positivi; la seconda differenza fondamentale consiste nella membrana esterna costituita da un doppio strato di fosfolipidi connesso tramite un lipopolisaccaride alla membrana interna. Come descritto da alcuni Autori (Burt, 2004; Brul e Coote, 1999), questa conformazione della struttura cellulare non consente l'ingresso di sostanze idrofobiche, tipo oli essenziali, all'interno della cellula, come accade nei Gram-positivi, non permettendo quindi alle sostanze di esplicare l'effetto inibente o riducendolo in maniera drastica.

Al contrario dei composti fenolici presenti negli estratti naturali che mostrano una maggiore efficacia nei confronti dei Gram-positivi, alcuni composti non fenolici come l'isotiocianato di allile e l'allicina presente nell'aglio sono maggiormente attivi nei confronti dei Gram-negativi (Ward et al., 1998; Yin et al., 2003). Essi non solo a determinate concentrazioni sono in grado di inibire la crescita di *E.*

coli O157:H7, *S. typhimurium* ed altri microrganismi indesiderati ma sono attivi anche nei confronti di lieviti e muffe.

Tra i Gram-negativi la specie che mostra maggiore resistenza agli estratti naturali è *P. putida*, con un valore di MIC per gli oli essenziali di origano e timo, che si attesta su valori di circa 1500 ppm (Matasyoh et al., 2007). Come accennato nel precedente paragrafo, uno dei possibili fattori riconducibili all'elevata resistenza, è sicuramente la produzione di esopolisaccaridi da parte di *P. putida*, con conseguente formazione di biofilm sulla superficie delle cellule batteriche, che impedisce l'ingresso degli antimicrobici naturali (Mah e O'Toole 2001). Inoltre Lee et al. (2003), hanno riportato che l'estratto della radice di *Maranta arundinacea* è attivo verso *E. coli* O157:H7 mentre Ibrahim et al. (2006) riportano che la caffeina allo 0.5% inibisce *E. coli* O157:H7 in un sistema liquido (BHI).

2.3 MECCANISMI D'AZIONE TRA IPOTESI E CERTEZZE

Sebbene le proprietà antimicrobiche di molti estratti naturali siano state ampiamente discusse da parte di molti Autori, come accennato nei precedenti paragrafi, la letteratura appare abbastanza scarna di informazioni riguardanti i meccanismi d'azione degli estratti naturali ad attività antimicrobica.

Considerando la grande varietà di composti chimici presenti negli estratti naturali (oli essenziali ed estratti idroalcolici), appare molto probabile che l'attività antimicrobica non sia attribuibile ad un solo specifico meccanismo d'azione ma bensì a più siti d'azione a livello cellulare (Carson et al., 2002). In Figura 2.1

sono riportati i possibili meccanismi d'azione e i probabili target cellulari determinanti l'attività antimicrobica dei composti naturali. Nessuno dei meccanismi illustrati può essere considerato separatamente ma piuttosto alcuni di essi possono essere considerati come conseguenza di altri.

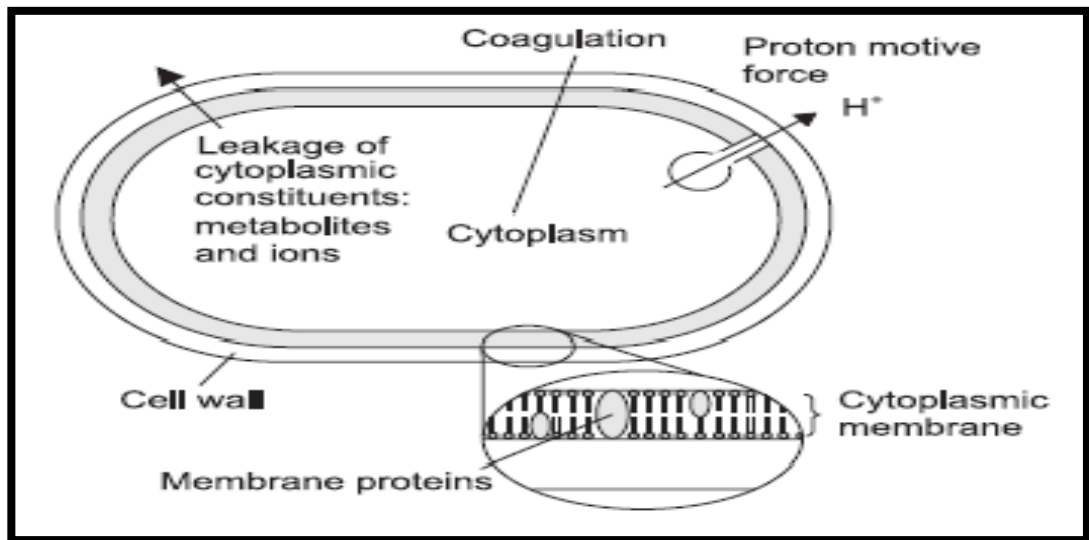


Figura 2.1 Possibili meccanismi d'azione e siti bersaglio dell'attività antimicrobica

Certamente una delle caratteristiche più importanti degli oli essenziali e dei loro costituenti è l'idrofobicità, proprietà chimica che gli consente di penetrare all'interno dei lipidi che costituiscono la membrana citoplasmatica e la membrana mitocondriale negli eucarioti, disturbando la struttura e le funzionalità cellulari (Sikkema et al., 1995). In seguito a questi eventi si può verificare una perdita di ioni e di altri metaboliti cellulari come descritto da Carson et al. (2002). Nonostante piccole variazioni del contenuto di ioni e metaboliti intracellulari possano essere tollerate dalla cellula batterica, se i fenomeni di deplezione di ioni e di composti essenziali per il metabolismo cellulare si protraggono nel tempo, possono causare morte cellulare (Burt, 2004). Alcuni dati a riguardo hanno evidenziato che l'effetto antimicrobico dell'olio essenziale di *Melaleuca*

alternifolia (albero del thè) su cellule di *E. coli* può causare la morte cellulare prima che le cellule vadano in lisi (Gustafson et al., 1998).

La struttura chimica dei singoli composti che costituiscono un estratto naturale influenza l'attività antimicrobica e determina uno specifico meccanismo d'azione (Dorman e Deans, 2000). Ad esempio, per i composti fenolici, è stata confermata l'importanza del gruppo idrossilico in relazione all'effetto inibente ma la posizione di tale gruppo funzionale a livello dell'anello fenolico non sembra influenzare l'andamento dell'attività antimicrobica, infatti, l'effetto del timolo nei confronti di *B. cereus*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* è comparabile a quello esibito dal carvacrolo (Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002). Inoltre, alcuni dati scientifici mostrano che i meccanismi dell'azione antimicrobica del carvacrolo e del timolo, a parità di concentrazione, sono differenti nei confronti delle specie microbiche Gram-positive e Gram-negative. Mentre per i composti non fenolici l'attività antimicrobica varia in funzione del gruppo alchilico, il limonene è molto più efficace del p-cymene (Dorman e Deans, 2000).

2.3.1 AZIONE SULLA MEMBRANA

L'integrità della membrana citoplasmatica è di vitale importanza per la sopravvivenza della cellula batterica in quanto responsabile di molteplici attività biologiche fondamentali. In condizioni normali rappresenta un'efficiente barriera tra citoplasma ed ambiente esterno regolando, attraverso specifici meccanismi di trasporto, l'ingresso e l'uscita di metaboliti e ioni indispensabili per i processi biologici vitali. In condizioni di stress sub-letali, quali lievi variazioni dei fattori ambientali o presenza di sostanze ad attività antimicrobica, i batteri sono in grado

di reagire sintetizzando differenti tipologie di acidi grassi al fine di variare la fluidità della membrana citoplasmatica e modificando la sintesi proteica (Mrozik et al., 2004). L'idrofobicità dei composti chimici presenti negli estratti naturali consente loro di ripartirsi all'interno del doppio strato lipidico della membrana citoplasmatica, causando alterazioni della permeabilità di membrana e del funzionamento delle proteine di membrana.

L'attività antimicrobica dell'estratto di timo nei confronti di *Salmonella typhimurium* e di *S. aureus* è dovuto all'idrofobicità dei costituenti fenolici e alla presenza dei legami ad idrogeno che, una volta inseritisi nel doppio strato fosfolipidico, sono in grado di legarsi alle proteine alterandone le normali funzioni (Juven et al., 1994). Inoltre, Tassou et al. (2000) hanno suggerito che il meccanismo d'azione dell'effetto antimicrobico dell'olio essenziale di menta è fondamentalmente legato all'alterazione della permeabilità di membrana e alla distruzione del sistema di trasporto degli elettroni (metabolismo energetico). Alcuni composti quali carvacrolo, carvone, timolo e trans-cinammaldeide in brodo-culture di *E. coli* O157:H7 provocano un incremento della concentrazione extracellulare di ATP, evento che indica un'azione distruttiva di tali molecole nei confronti della membrana citoplasmatica (Helander et al., 1998). Dall'analisi dei dati presenti in letteratura si evince che la membrana citoplasmatica appare essere il primo sito d'azione delle sostanze naturali ad attività antimicrobica, date le sue fondamentali funzioni di barriera, come conseguenza degli eventi sopra descritti si verificano tutta una serie di eventi che interessano il citoplasma e quindi l'intero sistema cellulare.

2.3.2 AZIONE SUL CITOPLASMA

L'effetto dei composti antimicrobici naturali può interessare direttamente o indirettamente l'ambiente citoplasmatico, sede di fondamentali processi biochimici. Certamente l'alterazione della fluidità e della permeabilità della membrana citoplasmatica non restano eventi isolati ma generano a livello citoplasmatico dei fenomeni che possono influire negativamente sulla ciclo vitale della cellula batterica. Infatti, come proposto da Burt (2003), i principali effetti degli estratti naturali antimicrobici sulla cellula batterica, oltre ad interessare la membrana citoplasmatica, alterano l'equilibrio citoplasmatico causando perdita di ioni e metaboliti intracellulari, causano la coagulazione del citoplasma, provocano inibizione mediante denaturazione degli enzimi e delle proteine intracellulari.

Quando i batteri sono sottoposti ad un condizione di stress, quale la presenza di sostanze inibenti, essi generalmente incrementano la sintesi di alcune proteine definite stress proteins, heat shock proteins o HSPs (Burt et al., 2007). Le proteine HSP60 e HSP70 sono chaperon molecolari che rivestono un ruolo chiave nella sintesi di nuove catene polipeptidiche in forma lineare e per il ripiegamento e la riparazione delle proteine citosoliche (Lambert et al., 2001). Le proteine HSP60 e il suo cofattore forniscono un compartimento citosolico all'interno del quale vengono ripiegate le proteine in modo tale da essere isolate e preservate. La HSP70 agisce invece a livello ribosomiale stabilizzando le catene polipeptidiche neosintetizzate (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Mayhew e Hartl, 1996). L'induzione della sintesi delle proteine HSP è stata ampiamente documentata su cellule di *E. coli* O157:H7 in presenza di condizioni di stress quali presenza di etanolo,

presenza di composti fenolici, stress osmotico ed alte temperature (Li et al., 1993; Mason et al., 1999). Inoltre un recente lavoro scientifico riporta che l'azione del carvacrolo nei confronti di *E. coli* O157:H7 determina un'induzione della sintesi della proteina HSP60 e inibisce la sintesi della flagellina privando quindi il batterio della sua patogenicità (Burt et al., 2007).

Quindi appare chiaro che lo studio delle proteine citoplasmatiche può rivestire un ruolo di primaria importanza nella definizione dei meccanismi d'azione dell'attività antimicrobica espressa dagli estratti naturali nonché nella definizione dei meccanismi di risposta da parte della cellula batterica in termini di suscettibilità o resistenza (Tipaldi, 2010).

2.4 USO DEGLI ESTRATTI NATURALI: PROBLEMATICHE E REGOLAMENTAZIONE

Sebbene la letteratura si arricchisce quotidianamente di dati riguardanti gli estratti naturali da impiegare nella preparazione e nella conservazione degli alimenti, per il raggiungimento di tale obiettivo, sono necessari ulteriori approfondimenti. L'extrapolazione dei risultati ottenuti dagli esperimenti in “*vitro*” non è applicabile direttamente ai sistemi alimentari, intesi come prodotto alimentare, in quanto esistono numerose variabili interconnesse che possono influenzare l'attività antimicrobica degli estratti naturali. Sicuramente le spezie, i loro estratti e le molecole da essi derivanti, presentano un notevole potenziale applicativo in campo alimentare ma i dati disponibili in letteratura riguardano essenzialmente la loro attività inibente in “*vitro*”. Sarebbero necessari ulteriori approfondimenti ad

esempio eseguendo prove in “*situ*” magari su scala pilota e tali dati andrebbero integrati con l’analisi sensoriale degli alimenti prodotti.

Bisogna tuttavia fare delle considerazioni di non poco conto, innanzitutto le concentrazioni di estratti naturali da utilizzare in prove in “*vivo*” devono essere incrementate rispetto a quelle previste nelle prove in “*vitro*”, è necessario quindi considerare gli eventuali effetti negativi sulla salute del consumatore e l’impatto sui caratteri sensoriali, dopodiché bisogna tenere in conto la convenienza a livello economico e gli aspetti legislativi.

2.4.1 ASPETTI LEGISLATIVI

Diversi composti sono stati registrati come oli essenziali (Eos) dalla Commissione Europea allo scopo di essere utilizzati con la specifica funzione di esaltare il sapore degli alimenti. Tali composti registrati non mostrano rischi per la salute del consumatore e tra essi sono inclusi il carvacrolo, il carvone, il limonene, il mentolo e il timolo. L’estragolo e il metil-eugenolo sono stati aboliti nel 2001 poiché considerati genotossici. I vari componenti degli EOs, per poter essere registrati dalla Commissione Europea, devono essere sottoposti a studi metabolici e tossicologici. Nel nostro paese, più che altrove, si evidenzia da sempre una diffidenza nei riguardi di tutti gli additivi alimentari. Alla base di tale diffidenza c’è il diffuso timore che le sostanze aggiunte agli alimenti possano essere dannose per la salute. L’Italia rappresenta il paese dove maggiormente viene percepito il rischio che può nascere dagli alimenti, come è emerso chiaramente in un rapporto dell’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare. Questa indagine, condotta nei 25 stati membri, ha evidenziato per il nostro paese

un atteggiamento ambivalente: da un lato la maggior parte delle persone dichiara di avere fiducia nelle autorità europee per la tutela della sicurezza alimentare, sia per bontà delle leggi sia per l'efficacia d'intervento; dall'altro l'Italia è al primo posto per la diffusa paura dell'utilizzo degli additivi e delle conseguenze che possono scatenare, come allergie ed intolleranze. D'altro canto, la grande varietà e scelta di alimenti disponibili tutto l'anno richiede necessariamente l'utilizzo di moderne tecnologie di trasformazione e conservazione degli alimenti, tra cui l'uso di una serie di additivi.

Va sottolineato che gli alimenti sono soggetti a molte variabili ambientali, come le oscillazioni di temperatura, l'ossidazione e l'esposizione a microrganismi, che ne possono modificare la composizione originaria. Pertanto, molti additivi alimentari sono essenziali per custodire la qualità e le caratteristiche degli alimenti.

Queste sostanze sono oggetto di una rigorosa regolamentazione e, per poter essere impiegate, devono avere una comprovata utilità, essere sicure e non ingannare il consumatore sulla reale qualità del prodotto. L'attuale legislazione che regola il complesso mondo degli additivi nasce dall'armonizzazione delle diverse normative degli stati membri dell'UE. Il lungo e tortuoso percorso in questo campo, si è concluso con alcune direttive recepite in Italia mediante un unico decreto nel 1996 (Decreto ministeriale, 27 febbraio 1996, n. 209 – Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CE, n. 94/35/CE, n. 94/36/CE, n. 95/2/CE, n. 95/31/CE).

Attualmente sono autorizzate circa 350 sostanze e solo queste possono essere impiegate.

Per essere autorizzato un additivo deve ovviamente avere utilità ed efficacia dimostrate ma, l'aspetto più importante, è la sua valutazione in relazione alla sicurezza. In Europa di questo si occupa l'Autorità per la Sicurezza Alimentare, a livello mondiale il compito è dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e della FAO; gli esperti di questi organismi, in base a tutti gli studi di tossicità condotti, stabiliscono il livello massimo della sostanza che non abbia effetti tossici dimostrabili. Questo è il punto di partenza per fissare la «dose giornaliera ammissibile» (DGA), che è la quantità di additivo che può essere assunta quotidianamente per tutta la vita senza rischi. La DGA prevede un ampio margine di sicurezza perché viene ottenuta dividendo per 100 la quantità che non ha effetti tossici. Dopo che un additivo è stato approvato, la sostanza continua ad essere studiata e monitorata. Periodicamente nei diversi paesi vengono condotte indagini per valutare il livello di assunzione reale degli additivi e se emerge che viene regolarmente superata la DGA, anche solo da alcune categorie di persone, l'Autorità per la Sicurezza Alimentare interviene per ridurre i livelli massimi previsti di quegli additivi o diminuire la gamma di alimenti nei quali ne è consentito l'impiego. Gli additivi, infatti, non possono essere usati ovunque: la legge fissa campi d'impiego e limitazioni ben precise. Alcune categorie di alimenti non prevedono l'aggiunta di additivi; alcuni additivi, poi, possono essere usati solo per alcuni cibi e, viceversa, in certi alimenti possono essere aggiunte solo determinate sostanze. Quindi, la regolamentazione è molto complessa e precisa.

Il processo di armonizzazione ha reso necessari diversi compromessi per andare incontro alle esigenze di ogni paese. Il risultato è che rispetto alla precedente normativa vigente in Italia, il numero di additivi consentiti è aumentato e si sono abbreviati gli elenchi degli alimenti che non possono contenerne. Comunque, tra ciò che è possibile fare e ciò che viene realmente fatto dalle aziende alimentari, esiste una grande differenza. Nel nostro paese c'è sempre stata la tendenza ad usare molto poco gli additivi e questa prassi è stata mantenuta anche con la nuova regolamentazione.

Bisogna comunque tenere in considerazione che produrre senza additivi, in certi casi, è impossibile perché per determinati alimenti essi sono davvero indispensabili.

Ad esempio, è molto difficile produrre il vino senza anidride solforosa perché ne verrebbe meno la sua conservazione e quindi la sua qualità. Allo stesso modo, non si possono ottenere degli insaccati sicuri senza i nitrati e i nitriti che prevengono lo sviluppo del botulino, mentre questi composti non sono necessari nel prosciutto e in genere nei salumi stagionati a taglio intero, perché l'interno del muscolo non può essere contaminato dal botulino.

2.4.2 ASPETTI TOSSICOLOGICI

Anche se un considerevole numero di sostanze naturali presenti negli oli essenziali sono stati classificati come GRAS (Generally recognized as safe, FDA) e quindi approvati dalla legislazione degli Stati Uniti per essere impiegati come agenti per insaporire gli alimenti, alcuni dati indicano che essi possono provocare irritazione o generare tossicità.

Ad esempio l'eugenolo, il mentolo e il timolo, quando utilizzati per il trattamento del cavo orale, possono causare irritazione. Alcuni risultati relativi a test di citotossicità e inerenti tali molecole, hanno mostrato che l'irritazione del cavo orale è correlata alla lisi delle membrane biologiche che lo compongono in quanto, questi composti, sarebbero in grado di penetrare all'interno dei tessuti grazie alla loro idrofobicità (Manable et al., 1987). Cinnamaldeide, carvacrolo, carvone e timolo sembrano non avere effetti significativi o marginali in “*vivo*” mentre in “*vitro*” mostrano lievi o moderati effetti tossici a livello cellulare. I dati di genotossicità non sembrano essere causa di preoccupazione considerando le attuali dosi di impiego (Stammati et al., 1999).

Alcuni EOs e i loro componenti sono noti per causare dermatite allergica da contatto nelle persone che li usano spesso, per questo alcune misure preventive possono essere necessarie per assicurare il benessere di coloro che le utilizzano su larga scala (Carson e Riley, 2001; Bleasel et al., 2002).

Alcuni oli essenziali usati in campo medico, paramedico e in aromaterapia hanno fatto registrare proprietà spasmolitiche e spasmogeniche, anche se queste sono difficili da associare ad un particolare componente (Lis-Balchin et al., 1996; Madeira et al., 2002). Infine, trentasette enantiomeri di α -pinene hanno mostrato di esibire differenti effetti spasmogenici (Lis-Balchin et al., 1999). Sarebbe quindi auspicabile sempre un'attenta valutazione della sicurezza prima di utilizzare gli oli essenziali o altri estratti naturali per la conservazione degli alimenti tenendo presente le problematiche inerenti le concentrazioni da impiegare.

CAPITOLO 3

RIDUZIONE DI ADDITIVI CHIMICI E ESTRATTI VEGETALI: IL DIFFICILE CASO DEI PRODOTTI CARNEI FERMENTATI

In generale la riduzione/eliminazione degli additivi chimici per la preparazione degli alimenti è una condizione auspicabile per molti prodotti sia alla luce delle recenti e pressanti disposizioni emanate dalla comunità europea, sia in virtù delle attuali preferenze dei consumatori.

Grazie all'impegno e agli sforzi messi in atto negli ultimi anni dalla ricerca scientifica, sono state messe a punto tecnologie innovative di conservazione che potrebbero consentire di tutelare la sicurezza, garantire elevati standard qualitativi e nel contempo di ridurre l'impiego di alcuni additivi chimici.

Tra le tecnologie innovative di conservazione rientra sicuramente l'impiego di sostanze naturali ad attività antimicrobica estratte principalmente da matrici vegetali. Tali sostanze oltre ad essere in grado di controllare l'evoluzione della popolazione microbica indesiderata in molti alimenti, consentendo così la riduzione dell'impiego di molti additivi chimici, sono percepite dal consumatore come indice di naturalezza e genuinità, contribuendo quindi alla definizione di quei prodotti alimentari definiti "chemical free".

L'impiego degli estratti naturali per la conservazione degli alimenti è oggetto di studio da parte di molti ricercatori e i dati disponibili mostrano risultati interessanti. L'applicazione di tali estratti a salvaguardia della sicurezza igienico-

sanitaria nonché dei caratteri sensoriali non è più una chimera ma potrebbe diventare presto una realtà a livello industriale per molti prodotti alimentari anche altamente deperibili. Se questo è vero per molti prodotti quali carni fresche, prodotti ittici, prodotti lattiero-caseari, prodotti orto-frutticoli e riso, non lo è per prodotti microbiologicamente molto più complessi come i prodotti fermentati in genere.

3.1 IL COMPLESSO ECOSISTEMA BATTERICO DEGLI INSACCATI FERMENTATI

Gli alimenti fermentati sono la scena in cui prendono vita una serie di azioni articolate e tra loro concatenate dalla regia dei microrganismi. Espressione più significativa di tale tipologia di alimenti possono ritenersi i prodotti carnei fermentati, le cui caratteristiche finali sono il risultato di complesse attività biochimiche espresse o influenzate dalla popolazione microbica in grado di presidiare l'impasto.

La popolazione microbica di un prodotto carneo fermentato è rappresentata da un gran numero di specie diverse che in fase di sviluppo interagiscono tra di loro determinando il sopravvento delle une o delle altre .

Un ruolo decisivo nella prima selezione della popolazione microbica è svolto dal cloruro di sodio che, abbassando l'attività dell'acqua dell'impasto a valori inferiori a 0,97, determina un'inibizione di gran parte della popolazione microbica contaminante Gram-negativa. Sono in grado di sviluppare nell'impasto 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 appartenenti ai generi *Lactobacillus* gruppo II eterofermentanti facoltativi (*L. sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*) e *Pediococcus* (*P. pentosaceus* e *P. acidilactici*) ed inoltre da micrococchi-stafilococchi (CNC) dei generi *Kocuria* e *Staphylococcus* coagulasi negativi (*S. carnosus*, *S. simulans*, *S. xylosus*).

- dannosi: 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*), *Pseudomonas* spp., *Brochotrix thermosphacta*, e anche batteri lattici eterofermentanti obbligati.

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

Un'ulteriore selezione tra i microrganismi alotolleranti presenti nell'impasto è operata dai nitriti che sono in grado di inibire la germinazione delle spore di *Clostridium* spp., prevenendo la formazione della tossina botulinica, mentre sono alquanto inattivi verso i batteri lattici e verso i CNC il cui sviluppo è fondamentale per questi prodotti. Studi condotti da Sanz et al. (1997), hanno dimostrato che l'impiego di nitrati o nitriti nella preparazione degli insaccati fermentati non provoca alcuna interferenza sulla crescita dei microrganismi virtuosi, rappresentati dai batteri lattici e dai CNC, mentre essi sono in grado di

determinare, in particolare i nitriti, un’efficace inibizione dei microrganismi indesiderati.

Assume un carattere selettivo sulla popolazione microbica anche la tecnologia di produzione. L’operazione di insaccatura, infatti, creando condizioni di anaerobiosi, promuove lo sviluppo dei microrganismi anaerobi come i batteri lattici e gli stafilococchi. Nelle prime ore dopo l’insacco i più tempestivi a moltiplicarsi sono i micrococchi aerobi obbligati, che utilizzano l’ossigeno residuo dell’impasto creando, così, condizioni di anaerobiosi che inibiscono il loro stesso sviluppo e favoriscono, invece, quello di microrganismi anaerobi facoltativi o aero-tolleranti (Zambonelli et al., 1992, 2001). I batteri lattici, dotati di una più rapida capacità di crescita, prendono il sopravvento sulle altre specie divenendo la popolazione dominante degli insaccati fermentati.

In tal modo i componenti di maggiore spicco della popolazione microbica degli insaccati stagionati sono i CNC ed i batteri lattici. Il processo di fermentazione e l’esito della maturazione del prodotto sono, dunque, condizionati dalla dinamica e dalle attività di tali componenti microbiche che sono state ampiamente studiate da differenti autori (Luke, 1986; Zambonelli et al., 1992; Coppola et al., 1997, 1998; Papamanoli et al., 2002, 2003).

3.1.1 BATTERI DI INTERESSE TECNOLOGICO

I differenti processi di carattere chimico, biochimico e microbiologico che avvengono durante la maturazione degli insaccati carnei fermentati sono i principali responsabili dei caratteri aromatici, sensoriali e reologici del prodotto finito.

Da diversi anni sono ormai chiari alcuni fenomeni che avvengono durante la maturazione dei salami, quali l'acidificazione e la riduzione dei nitrati attribuibili, rispettivamente, ai batteri lattici ed ai CNC, che rappresentano i principali responsabili del processo di maturazione degli insaccati fermentati (Coppola et al., 1995a, b; 1997; 1998; Luongo et al., 2001; Di Maria et al., 2002). Negli ultimi anni, inoltre, si sta delineando una prima descrizione del ruolo dei microrganismi in alcuni processi biochimici che caratterizzano la maturazione degli insaccati ed in particolare l'attenzione è stata rivolta allo studio del ruolo degli enzimi di origine microbica nella definizione delle attività proteolitiche.

Dominanti nella maggior parte delle fasi di maturazione sono i batteri lattici (Samelis et al., 1994; Coppola et al., 1995; 1998; Sanz e Toldrà, 1997a,b). I lattobacilli eterofermentanti facoltativi appaiono, tra i batteri lattici, come 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 e 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. Una consistente presenza di ceppi ascrivibili a *Carnobacterium piscicula* accanto ai ceppi di *L. sakei* è stata evidenziata anche in studi (Comi et al., 1992) condotti su salami friulani. 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.

Studi dell'ultimo decennio, condotti su differenti produzioni dell'intera Europa, hanno dimostrato che tra gli isolati riconducibili ai CNC prevale la presenza dei ceppi riferibili al genere *Staphylococcus* (Coppola et al., 1997; Papamanoli et al., 2002). Dai differenti studi, pur se condotti su insaccati fermentati in aree geografiche differenti, appare in maniera univoca che all'interno dei CNC circa il 90% dei ceppi è ascrivibile al genere *Staphylococcus*. Generalmente tra questi ultimi la totalità degli isolati risulta coagulasi negativa con una netta predominanza dei ceppi ascrivibili alla specie *S. xylosus* (De la Rosa et al., 1990; Coppola et al., 1997; Cordero e Zumalacarregui, 2000; Demeyer et al., 2000; Papamanoli et al., 2002). Tra i componenti minoritari di questo gruppo microbico prevalgono i ceppi riconducibili a *Kocuria varians* (Hammes e Hertel 1998; Cordero e Zumalacarregui, 2000; Papamanoli et al., 2002). La presenza di una più elevata percentuale di ceppi riferibili alla specie di *S. xylosus* può essere attribuita alla loro più spiccata resistenza al cloruro di sodio e ad una inferiore esigenza di ossigeno rispetto ai micrococchi.

3.1.2 BATTERI INDESIDERATI

Come noto in letteratura e da come accennato in precedenza la popolazione 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 quindi definite come dannose, sia capaci di generare rischi per la salute

del consumatore, che quindi implicano problematiche di tipo sanitario, definite come specie pericolose. 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 ben diverse problematiche, 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.

3.1.3 BATTERI DANNOSI

PSEUDOMONAS SPP.

Sono bacilli appartenenti alla famiglia *Pseudomonadaceae*, si presentano come bastoncelli dritti o leggermente incurvati, Gram-negativi, mobili, catalasi e ossidasi positivi, descritti come aerobi obbligati, anche se alcuni ceppi possono adattarsi a usare nitrati al posto dell'ossigeno atmosferico. Sono microrganismi psicrotrofici che possono moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione con temperatura ottimale di crescita di 25°C (range di crescita indicato tra 4 e 43°C). Presentano flagelli polari, tranne *P. mallei*, che non è mobile.

La famiglia riveste una notevole importanza poiché, comprende specie patogene per l'uomo e i mammiferi come *P. mallei*, *P. pseudo-mallei* e *P. aeruginosa*; quest'ultima è in grado di provocare infezioni respiratorie in pazienti con

problemi polmonari comprende, inoltre, molte specie psicotrofe responsabili di processi alterativi degli alimenti refrigerati che possono causare danni economici notevoli agli operatori del settore alimentare.

Pseudomonas fluorescens deve il nome a una molecola verde-fluorescente denominata pioverdina, ben visibile nelle colture di questo batterio, che viene prodotta dalla specie in risposta alla carenza di ferro. La pioverdina appartiene alla categoria di molecole chiamate siderofori (dal greco, trasportatori di ferro) capaci di sottrarre il ferro complessato alle proteine leganti tale minerale, dalle cellule dell'organismo infettato o dai media colturali e di veicolarlo specificamente all'interno della cellula batterica. Il pigmento prodotto può essere visibile alla luce solare come colorazione giallo-bruna, ma diventa facilmente riconoscibile esponendo le colonie alla luce U.V. della lampada di Wood, utilizzando particolari media colturali contenenti sali di fosfato di potassio e solfato di magnesio. Non richiede particolari fattori di crescita ed è in grado di utilizzare una grande varietà di composti organici come fonte di carbonio. Il metabolismo è di tipo ossidativo con produzione di solo acido dagli zuccheri.

L'importanza delle *Pseudomonadaceae* in microbiologia alimentare risiede principalmente nella loro capacità di alterare gli alimenti in qualità di organismi alterativi specifici (specific spoilage organisms), rendendoli inaccettabili per il consumo umano (Gram et al., 2002). Il ruolo di organismi alterativi specifici è legato ai seguenti fattori: sono batteri molto diffusi nell'ambiente e potenziali contaminanti di qualsiasi alimento. Dalle sedi naturali (suolo, pulviscolo atmosferico e acque superficiali) i batteri possono trasferirsi sui prodotti ortofrutticoli, sugli animali di allevamento e i prodotti derivati (carni, uova, latte)

possono svilupparsi bene alle temperature di refrigerazione con possibilità di diffondersi lungo la catena di produzione possono produrre enzimi proteolitici termostabili e lipolitici, responsabili delle variazioni organolettiche dei prodotti alimentari anche trattati termicamente (gusto amaro, odore di ammoniaca, rammollimento). Sono state condotte delle prove sperimentali su proteasi estratte da *P. fluorescens*, da cui risulta che riscaldando a 121° per 2 minuti solo il 40% dell'attività enzimatica iniziale viene persa (Patel et al., 1983); i batteri appartenenti a tale specie possono produrre pigmenti cromogeni che modificano il normale aspetto dell'alimento, possono aderire saldamente alle superfici formando un biofilm difficile da eliminare e che può diventare una continua fonte di contaminazione secondaria degli alimenti ed infine, molti ceppi, presentano una certa resistenza ai comuni prodotti per la pulizia e la disinfezione dei locali e delle attrezzature. Anche la specie *P. fragi* è associata ai prodotti carnei come microrganismo alterante, la sua presenza dominante, soprattutto nei prodotti carnei freschi, è legata alla sua capacità di utilizzare la creatina e la creatinina (Gram et al., 2002).

BROCHOTRIX THERMOSPACTA

Il genere *Brochothrix* comprende due specie, *Brochothrix thermosphacta* e *Brochothrix campestris*. Esso comprende cellule a forma bastoncellare, aerobie o anaerobie facoltative e mesofile; è caratterizzato da una moderata alofilia, non possiede il carattere della mobilità, sviluppa in un range di temperature tipico dei batteri mesofili, è un batterio catalasi positivo e positiva è anche la colorazione di Gram. Dal punto di vista nutrizionale, il genere *Brochothrix* è in grado di crescere

utilizzando diversi substrati: esso riesce infatti a fermentare numerosi zuccheri quali arabinosio, xilosio, ramnosio, glucosio, fruttosio, saccarosio, maltosio, lattosio, mannitolo, glicerolo ed altri. Tra i micronutrienti, diversi sono i composti di cui *B. thermosphacta* ha bisogno per il suo sviluppo: per la frazione azotata, infatti, esso necessita di diversi composti quali cisteina, nicotenato, pantotenato mentre tra le vitamine, sono indispensabili per tale genere microbico la biotina e la tiamina.

La gravità degli attacchi di *B. thermosphacta* sui salumi consiste nella sua capacità di formare composti azotati maleodoranti che rendono il prodotto stesso non commestibile: a causa della sua alofilia, il batterio è capace di attaccare anche numerosi insaccati ed è da questi, infatti, che viene isolato frequentemente (Gardner, 1981; Keddie e Jones, 1981).

ENTEROCOCCUS SPP

Il genere *Enterococcus* comprende numerose specie, molte delle quali precedentemente erano incluse nel vecchio genere *Streptococcus* ed altre di recente descrizione. L'analisi della sequenza del gene dell'rRNA 16S ha rivelato all'interno del genere *Enterococcus* la presenza di specie ad elevata similarità che William et al. (1991) hanno definito "gruppi specie": *E. faecium*, *E. durans* ed *E. mundtii* che presentano il 98,7-99,7% di similarità nella sequenza dell' rRNA 16S; *E. avium*, *E. raffinolactis*, *E. malodoratus* che presentano il 99,3-99,7% di similarità; *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* che presentano il 98,8% di similarità. Le specie meglio conosciute sono: *E. faecalis* e *E. faecium* sulle quali è basata la descrizione del genere; si distinguono dagli altri cocchi Gram-positivi perché

capaci di sviluppare in un ampio intervallo di temperatura, da 10°C fino a 45°C, in presenza del 6,5% di NaCl ed a pH 9.6, alcuni sopravvivono a 60°C per 30 minuti (Moreno et al., 2006). Eccezione include *E. dispar* e *E. sulfureus* (Martinez-Murcia e Collins, 1991), *E. malodoratus* (Collins et al., 1984) e *E. moraviensis* (Svec et al., 2001), che non crescono a 45°C, e *E. cecorum* e *E. columbae*, che non crescono a 10°C (Devriese et al., 1993). *E. avium*, *E. saccherominimus*, *E. cecorum* e *E. columbae* crescono poco o per niente in presenza del 6,5% di NaCl (Devriese et al., 1990,1993; Vancanneyt et al., 2004). Gli enterococchi non sono dei semplici batteri intestinali, presentano una larga diffusione ambientale e sono presenti negli alimenti e nelle acque, in cui per molto tempo sono stati considerati indicatori di contaminazione fecale.

Gli enterococchi giocano un ruolo importante nel processo di maturazione di alcuni formaggi (Coppola et al., 1990; Manopoulou et al., 2003). Essi sono inoltre presenti in altri prodotti fermentati, come gli insaccati (Franz et al., 2003; Hugas et al., 2003) e le olive (Fernandez et al., 1983; Ben Omar et al., 2004).

Gli enterococchi producono batteriocine, le cosiddette enterocine, che sono piccoli peptidi con attività antimicrobica rivolta verso i batteri Gram-positivi inclusi gli sporigeni e i patogeni, come ad esempio *Listeria* (De Vuyst e Vandanne, 1994). Inoltre, gli enterococchi sono usati in alcuni paesi come probiotici (Franz et al., 2003).

Sono batteri ampiamente presenti nell'ambiente e risiedono principalmente il tratto intestinale degli uomini e degli animali. *E. faecalis* è spesso la specie di *Enterococcus* predominante nell'intestino umano, sebbene in alcuni individui e alcuni paesi *E. faecium* supera *E. faecalis* (Devriese e Pot, 1995). Il contributo

degli enterococchi alle caratteristiche organolettiche dei prodotti alimentari fermentati e la loro abilità di produrre batteriocine (enterocine) sono caratteristiche importanti per la loro applicabilità nelle tecnologie alimentari. Tuttavia, la selezione di enterococchi da utilizzare nelle preparazioni alimentari è un lavoro difficile, a causa dei loro potenziali rischi sulla salute dell'uomo (Moreno et al., 2006; Vancanneyt et al., 2002; De Vuyst et al., 2003).

Gli enterococchi sono stati anche isolati da alcuni insaccati fermentati. Le attività biochimiche degli enterococchi negli insaccati non sono molto studiate, il loro forte contributo sull'aromatizzazione degli insaccati è dovuto alla loro attività proteolitica e lipolitica, potrebbero quindi anche essere considerati come microrganismi “virtuosi”.

3.1.4 BATTERI PERICOLOSI

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 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*.

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 e 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 al 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 e 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.

Al genere *Shigella* appartengono microrganismi Gram-negativi, di forma bastoncellare, asporigeni, immobili. Le specie appartenenti a questo genere presentano 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 necessaria solo 10 UFC/g per poter generare l'infezione nell'uomo.

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.

LISTERIA SPP.

Il genere *Listeria* comprende diverse specie di cui una sola di grande interesse per l'industria alimentare: *L. monocytogenes*. La pericolosità di tale batterio consiste in primo luogo nella sua possibilità di sviluppare efficacemente sia in presenza di ossigeno sia in sua assenza. Il metabolismo aerobio vede come suoi substrati la

quasi totalità degli zuccheri esosi ma anche il piruvato, il malato, il succinato e l' α -chetoglutarato (Friedman e Alm, 1962; Kolb e Seidel, 1960). Tale specie richiede, tuttavia, per il suo sviluppo, la presenza di diversi aminoacidi in forma semplice, quali la cisteina, l'isoleucina, la leucina mentre altri hanno azione stimolante (Gray e Killinger, 1966). Il pericolo di contaminazione delle carni con tale batterio deriva dal fatto che molte specie da allevamento sono portatori sani del patogeno, essendo esso isolato spesso dalle loro feci (Gray e Killinger, 1966; Skovgaard e Morgen, 1988): di conseguenza la correttezza delle fasi di lavorazione della carne e l'igiene negli impianti d' allevamento permettono di mantenere sotto controllo le contaminazioni delle carni da parte di *Listeria*.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La specie patogena del genere *Staphylococcus* è rappresentata da *S. aureus* che differisce sensibilmente per il suo metabolismo secondario dalle altre specie del medesimo genere. Tale batterio, come gli altri del suo genere, non sviluppa facilmente in natura per via delle sue richieste in termini di substrati fermentescibili e condizioni climatiche.

Lo *S. aureus*, infatti, richiede la continua presenza di azoto organico rappresentato da amminoacidi liberi (da 5 a 12 amminoacidi differenti); esso ha inoltre bisogno di diverse vitamine, in particolare del gruppo B, incluse la tiamina e l'acido nicotinico (Emmet e Kloos, 1975). Tale complessità nelle esigenze nutrizionali rende più facile l'azione di controllo delle contaminazioni per l'industria alimentare e limita i rischi di sviluppo di tale microrganismo nei salumi fermentati.

Per quanto riguarda l'assimilazione di carboidrati, lo *S. aureus* ha bisogno, per il suo sviluppo, degli idrati del carbonio con i quali il batterio, attraverso la fermentazione aerobia o anaerobia, riesce a produrre diversi acidi organici. Tra i substrati più facilmente fermentescibili per tale batterio vi sono i seguenti carboidrati: glucosio, fruttosio, lattosio, mannitolo, galattosio, mannosio, ribosio, xilosio e xilitolo. I principali prodotti del metabolismo aerobico da glucosio sono l'acido acetico e l'anidride carbonica, mentre il principale prodotto della fermentazione anaerobica è l'acido lattico (Theodore e Schade, 1965). Normalmente sono prodotti sia l'acido D-lattico che l'acido L-lattico (Schleifer e Kokur, 1973). Per quanto riguarda le condizioni ambientali, *S. aureus* ha un optimum di temperatura intorno ai 35°C, mentre la minima e la massima sono, rispettivamente, di 5.6°C e 46°C. Tali caratteristiche permettono al microrganismo di sopravvivere spesso ai trattamenti termici a cui i salumi sono sottoposti, dimostrando una maggiore resistenza nei prodotti con elevato contenuto proteico e, al contrario, una maggiore sensibilità al calore in presenza di NaCl. La tolleranza all'acidità è piuttosto limitata e questa caratteristica rende più agevole la prevenzione nei confronti di tale patogeno.

Riguardo alla tolleranza al cloruro di sodio, lo *S. aureus* può essere definito come un batterio moderatamente alofilo riuscendo a sviluppare fino ad un massimo di concentrazione di NaCl del 20%, proprio questa sua caratteristica lo rende pericoloso per la produzione di salumi fermentati. Il miglior modo per evitarne lo sviluppo negli insaccati è, quindi, il rapido abbattimento del pH.

3.2 NITRATI E NITRITI NEGLI INSACCATI FERMENTATI

In un ecosistema microbico complesso come quello dell'impasto di carne cruda impiegato per la produzione degli insaccati fermentati la qualità e la sicurezza igienico-sanitaria sono tradizionalmente assicurate attraverso due differenti approcci:

- ✓ di tipo biotecnologico che prevede l'impiego di colture starter selezionate;
- ✓ di tipo chimico-tecnologico che prevede l'aggiunta di additivi chimici nello specifico nitrati, nitriti ed acido ascorbico.

Allo stato attuale, nonostante gli sforzi messi in atto con i nuovi indirizzi di ricerca, l'impiego di additivi chimici, in particolare di nitrati e nitriti, risulta un approccio insostituibile. L'aggiunta di tali additivi permette di scongiurare il pericolo di sviluppo di *Clostridium botulinum* e svolge differenti funzioni tecnologiche, che vanno dal miglioramento del colore all'aumento della sapidità, influenzando positivamente i caratteri sensoriali.

Tuttavia la riduzione o l'eliminazione dei nitriti appare impellente più di ogni altro additivo chimico. Infatti i nitriti e l'acido nitroso da esso derivanti possono reagire con le ammine presenti nelle carni con formazione di nitrosammine, composti di cui è ben nota l'azione cancerogena. Differenti Autori hanno correlato l'introduzione con la dieta di nitriti da alimenti proteici e l'insorgenza di patologie colon-rettali, renali nonché alla muscolatura. Infatti le nitrosammine sono responsabili di danni ai reni, vengono ritenute corresponsabili di danni alla muscolatura e influenzano i processi digestivi sino a causare patologie del colon.

Inoltre i nitriti sono in possesso della spiacevole caratteristica di fissarsi all'emoglobina, la proteina del sangue che trasporta l'ossigeno alle cellule, trasformandola in metaemoglobina, impedendo di trasportare l'ossigeno alle cellule. Condizione che assume caratteri particolarmente preoccupanti nei bambini in cui crea asfissia, asma e difficoltà respiratorie in genere.

La problematica della sostituzione dei nitrati e nitriti negli insaccati fermentati con altri composti privi di tossicità o con particolari trattamenti che consentono di conseguire gli stessi risultati è stata oggetto di attenzione da parte di numerosi ricercatori che hanno formulato diverse possibilità che tuttavia non appaiono sufficientemente esaustive e praticabili.

3.2.1 NITRATI E NITRITI: ASPETTI TECNOLOGICI E GARANZIA DELLA SICUREZZA

I nitriti e i nitrati rappresentano additivi alimentari ampiamente utilizzati nella tecnologia di produzione dei prodotti carnei fermentati. Non sono utilizzati tal quale ma vengono aggiunti al prodotto sotto forma di sali principalmente di sodio o potassio. Il nitrato di potassio o di sodio (salnitro) è usato sia allo stato puro, sia in miscela con il sale comune ed altre sostanze ed entra a far parte della salagione in senso lato (Binkerd e Kolari, 1975). I nitrati non esplicano nessuna funzione tecnologica ma gli effetti positivi legati a tali composti sono associati alla loro riduzione in nitriti, che rappresentano la forma attiva contro *Clostridium botulinum*. I nitrati possono essere convertiti a nitriti attraverso processi enzimatici o per mezzo dell'attività microbica; si tratta di processi che avvengono in maniera incontrollata e che hanno luogo sia negli alimenti, sia nell'apparato gastrointestinale dell'uomo. L'azione antimicrobica dei nitriti in quanto tali è

rivolta quasi esclusivamente a batteri anaerobi, mentre sui microbi aerobi questi composti possono avere effetti positivi e rappresentare addirittura una fonte di azoto. In definitiva, nelle dosi in cui vengono normalmente usati, i nitrati non svolgono sulla microflora alcuna azione diretta, essendo questa a carico dei nitriti che ne derivano (Lueck, 1980).

I nitriti impiegati come additivi svolgono importanti funzioni:

- contribuiscono alla formazione del colore rosso porpora dei salumi e in particolare degli insaccati crudi fermentati, carattere qualitativo molto apprezzato dai consumatori. Infatti, in ambiente acido, i nitriti vanno in contro alla reazione di disproporzione con formazione di ossido di azoto, composto molto instabile, che si lega con la mioglobina formando la nitrosomioglobina;

- condizionano positivamente l'aroma e il sapore delle carni fermentate. Infatti, anche se è il cloruro di sodio il fattore maggiormente coinvolto nella aromatizzazione delle carni salate ed il nitrito da solo dà effetti modesti, la combinazione dei due composti dà risultati migliori ed impedisce l'irrancidimento (Mac Donald et al., 1980a);

- esplicano azione antiossidante, prevenendo l'ossidazione, rallentando l'irrancidimento e la degradazione dei lipidi (Mac Donald et al., 1980b);

- svolgono azione antimicrobica contro alcuni microrganismi, secondo molti autori è questo l'effetto di maggiore rilevanza dei composti in questione (Ingram, 1976).

Alle concentrazioni alle quali viene normalmente usato (80-150 mg per kg) il nitrito in se non causa una rapida inibizione dei microrganismi; l'effetto

inibitorio, infatti, dipende dall'azione sinergica di vari fattori coinvolti fra i quali sono da ricordare: la presenza del sale (Baird-Parker e Baillie, 1973), la temperatura, il potenziale di ossido-riduzione, il numero di microrganismi presenti; molto importante è poi il pH del mezzo col diminuire del quale l'azione inibitrice aumenta. Il nitrito, quando viene aggiunto alle carni, si converte in miscele di NO_3 , NO_2 ed NO in stato di equilibrio; l'azione antimicrobica è dovuta all'acido nitroso che si libera e agli ossidi di azoto che attaccano i gruppi amminici dei sistemi deidrogenasi microbici, provocando così l'inibizione (Quastel e Woolridge, 1927). Dal punto di vista pratico l'azione dei nitriti è molto importante per l'azione inibitrice che svolgono sui clostridi e sulla formazione di tossine. Al riguardo è molto importante osservare che la loro azione nei confronti di *Clostridium botulinum* aumenta fino a dieci volte per effetto del riscaldamento: questo fenomeno è noto con il nome Perigo (Roberts e Smart, 1974; Perigo e Roberts, 1968).

3.2.2 LE CRITICITÀ DI NITRATI E NITRITI

L'uso dei nitriti per il trattamento dei prodotti carnei presenta alcuni importanti aspetti negativi. Infatti, dalla reazione dell'acido nitroso che si libera dai nitriti e le ammine secondarie presenti nelle carni si possono formare nitrosammine, composti questi ultimi di cui è ben nota l'azione cancerogena (USDA, 1978). In alcuni casi, ad esempio il caso del bacon dopo la frittura, il prodotto può contenere fino a 200 ppm di N-nitrosopirrolidina (Greenberg, 1973). Per l'uomo l'effetto tossico dei nitriti, in caso di un'eccessiva ingestione, è legato alla formazione di metaemoglobina a partire da ossiemoglobina. L'emoglobina è un

complesso contenente ferro presente negli eritrociti il cui ruolo principale è quello di trasportare l'ossigeno, infatti si lega con l'ossigeno a formare ossiemoglobina, che è di colore rosso e facilmente dissociabile in modo da rilasciare ossigeno ai tessuti. I nitriti reagendo con l'emoglobina e convertendola in metaemoglobina, alterano gli scambi di ossigeno tra polmoni e tessuti influenzando le normali funzioni fisiologiche dell'uomo (metaemoglobinemia). Recenti studi medico-scientifici hanno stabilito delle correlazioni tra l'ingestione di nitriti e dei composti da essi derivanti, con l'insorgenza di alcune gravi patologie come leucemia infantile, cancro al cervello e colon-rettale ma anche al calo della pressione arteriosa (Demeyer et al., 2008; Chen-yu et al., 2009). In definitiva i nitriti svolgono un ruolo fondamentale per la conservazione dei prodotti carnei fermentati, in quanto sono in grado di inibire lo sviluppo dei batteri agenti di alterazioni e soprattutto di batteri patogeni o produttori di tossine. Essi hanno inoltre un'azione nettamente selettiva in quanto sono pressoché inattivi verso quei batteri il cui sviluppo è fondamentale per alcuni prodotti, quali i salami e simili. La loro azione inibitrice e selettiva si affianca dunque a quella del cloruro di sodio nel determinare la qualità e la serbevolezza dei prodotti ma è legata ad alcuni potenziali effetti negativi.

3.2.3 I NUOVI INDIRIZZI LEGISLATIVI

Come è noto gli additivi alimentari sono disciplinati dalle disposizioni contenute nel decreto del Ministro della sanità 27 febbraio 1996, n. 209, che è stato più volte modificato nel tempo, a seguito dell'evoluzione della legislazione in sede comunitaria, da ultimo con il decreto 27 febbraio 2008, pubblicato sulla G.U. R.I.

serie generale n. 97 del 24/04/2008. Quest’ultimo provvedimento recepisce nell’ordinamento nazionale la direttiva 2006/52/CE che modifica la direttiva 95/2/CE relativa agli additivi diversi dai coloranti e dagli edulcoranti e la direttiva 94/35/CE sugli edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari.

In particolare le modifiche apportate con le disposizioni del decreto 27 febbraio 2008 riguardano:

- ✓ la definizione di “coadiuvanti”;
- ✓ l’aggiornamento dell’elenco degli additivi alimentari sulla base delle valutazioni SCF e/o EFSA;
- ✓ la revisione delle condizioni d’impiego di alcuni additivi, già autorizzati, fra i quali i nitriti/nitrati (E 249, E 250, E 251 e E 252);
- ✓ l’adattamento della terminologia, finora utilizzata nell’ambito della legislazione sugli additivi, per alcune categorie di prodotti alimentari. degli integratori alimentari, degli alimenti per scopi speciali e degli alimenti per lo svezzamento. Ciò a seguito dell’adozione di disposizioni comunitarie specifiche nel settore degli integratori alimentari, degli alimenti per scopi speciali e degli alimenti per lo svezzamento.

Al riguardo si rammenta che nel decreto n.209/1996 i quantitativi dei sali di nitriti e di nitrati nei prodotti a base di carne erano indicati come “quantità introdotta indicativa” e come “residuo “, entrambi espressi in mg/kg. Viceversa con l’ultimo aggiornamento delle disposizioni vigenti, di cui al D.M. 27 febbraio 2008, tali quantitativi sono fissati quali dosi massime che possono essere aggiunte durante il processo di produzione degli alimenti e soltanto, in via eccezionale, sono stabilite dosi massime residue per alcuni prodotti tradizionali a base di carne.

Come regola generale le dosi massime consentite nei prodotti a base di carne sono state ridotte, per cui sono pari a 150 mg/kg per i nitrati (anziché i 300 mg/kg) e 150 mg/kg per i nitriti (anziché 300 mg/kg). Questi ultimi sono consentiti, limitatamente ai prodotti a base di carne sterilizzati, fino a 100 mg/kg.

3.3 STRUMENTI ALTERNATIVI ALL’IMPIEGO DI NITRATI E NITRITI

Allo stato attuale per quanto concerne l’impiego di nitrati e nitriti nei prodotti carnei fermentati, nonostante il contenimento imposto dai limiti di legge e dalle preferenze del consumatore, non è disponibile nessuna soluzione alternativa e risolutiva che consente di eliminare o limitare il loro utilizzo. Infatti, tali additivi, sono gli unici in grado di garantire la sicurezza degli insaccati carnei fermentati soprattutto in funzione della loro azione antibotulinica. Dai dati disponibili in letteratura si evince che alcuni interventi tecnologici e biotecnologici, potrebbero essere in grado di sostituire anche in parte gli additivi chimici ma, l’esigua mole di dati, non permette di trarre conclusioni definitive. Ad esempio, Haiyung et al. (2010), riportano che alcuni estratti naturali mostrano un’interessante attività inibente, sia verso le cellule, sia nei confronti delle spore di *C. botulinum*, ma l’azione antimicrobica è stata testata esclusivamente in prove in “*vitro*”. Altri autori hanno descritto l’impiego di colture di batteri lattici da impiegare per la bioconservazione di carni fresche e di carni fermentate (Olaoye e Idowu, 2010) ma non è possibile affermare con certezza che possono sostituire completamente l’impiego di nitrati. Altre tecnologie o interventi di varia natura potrebbero sostituire questi composti chimici, come ad esempio l’utilizzo di radiazioni

ionizzanti, l'impiego di altri composti chimici (anidride solforosa, sorbato di potassio), soluzioni che per vari motivi presentano alcune problematiche.

3.3.1 I LIMITI DEGLI STRUMENTI ALTERNATIVI STRUMENTI ALTERNATIVI

La problematica della sostituzione dei nitrati e dei nitriti negli insaccati fermentati con altri composti privi di tossicità o con particolari trattamenti che consentono di conseguire gli stessi risultati, è stata oggetto di attenzione da parte di numerosi ricercatori i quali hanno formulato diverse possibilità che tuttavia non appaiono sufficientemente esaustive e praticabili.

Promettente è apparso l'uso del sorbato di potassio composto che, dotato prevalentemente di azione antifungina, si è dimostrato attivo anche nella capacità di inibire la germinazione delle spore di *C. botulinum*. Esso potrebbe consentire una drastica riduzione dei nitriti a livelli molto più bassi di quelli attuali, fino a 25-50 mg/kg. La miscela sorbato + potassio (a bassa concentrazione) da origine a composti dotati di attività fortemente inibitoria, tuttavia la sua azione lascia forti interrogativi relativamente al rapporto con i microrganismi virtuosi, indispensabili per la realizzazione di un insaccato fermentato. Accanto a tale approccio appare degno di menzione l'impiego di radiazioni ionizzanti, considerato un validissimo mezzo per il trattamento di numerosi prodotti alimentari. Esse sono sterilizzanti, non lasciano residui di alcun genere e rispettano le caratteristiche dei prodotti, agiscono indipendentemente dalla temperatura ed hanno un elevato potere di penetrazione; alla dovuta intensità, sono attive anche sulle spore dei clostridi la cui germinazione è inibita, particolarmente in presenza di NaCl. Tuttavia allo stato attuale i dati concernenti

gli effetti sui prodotti carnei salati non sono molto numerosi ed ancora non consentono di trarre conclusioni. Ipotesi sono state formulate anche in merito alla sostituzione di nitrati e nitriti con l’anidride solforosa che ha un’azione analoga a quella dei nitriti, dal punto di vista sia microbiologico, sia da biochimico (azione sul colore). Tale approccio, però, basandosi comunque sull’impiego di un additivo chimico, non può essere considerato una valida risposta alla definizione di alimenti “green” o “chemical free”.

3.3.2 POSSIBILITÀ D’USO DEGLI ESTRATTI NATURALI

Come già descritto nei precedenti paragrafi, allo stato attuale la conservazione degli alimenti mediante l’utilizzo di estratti naturali appare un intervento sempre più realizzabile. Infatti, la mole di dati disponibili in letteratura mostra risultati interessanti, gli estratti naturali in virtù della loro azione antimicrobica potrebbero non solo sostituire degnamente alcuni additivi chimici ma consentirebbero anche un prolungamento della shelf-life di molti prodotti freschi.

Partendo da tale consapevolezza, tenendo in considerazione la complessità di un insaccato fermentato, appare plausibile l’impiego di estratti naturali per la preparazione di questi alimenti.

Gli estratti naturali candidabili per tale applicazione dovrebbero però essere in grado di svolgere alcune peculiari attività. Innanzitutto devono mostrare un’ottimale attività antimicrobica, efficace ed efficiente, nel senso che devono inibire i microrganismi indesiderati presenti e nel contempo non influire negativamente sulla crescita di quelli utili, indispensabili per un corretto

processo fermentativo. Infatti, proprio tale processo, è l’artefice della sicurezza igienico-sanitaria e dei caratteri sensoriali di un insaccato fermentato. I composti naturali quindi, oltre ad esplicare un’ottimale attività antimicrobica, non devono influire negativamente sul colore, sui caratteri sensoriali e non devono essere tossici per il consumatore finale. Quindi anche se differenti estratti naturali esibiscono un’interessante attività antimicrobica, soprattutto verso i batteri indesiderati, per poter essere utilizzati in sostituzione di nitrati e nitriti negli insaccati fermentati, sono necessari ulteriori approfondimenti.

3.3.3 CRITICITÀ DEGLI ESTRATTI NATURALI

Gli estratti naturali attualmente testati come additivi alimentari naturali sono numerosi, gli studi in merito riguardano la loro efficacia nei confronti dei principali microrganismi alteranti e patogeni ma, i risultati ottenuti nei test in “*vitro*” non sempre coincidono con quelli condotti in “*vivo*”. Infatti, è universalmente riconosciuto, che le concentrazioni testate nelle prove in “*vitro*” devono essere notevolmente aumentate per ottenere il medesimo effetto in “*vivo*”. Se si considera che, la maggior parte degli estratti naturali, deriva da spezie o da altre matrici vegetali, è possibile affermare che le eventuali concentrazioni da impiegare in un insaccato fermentato potrebbero alterarne i caratteri sensoriali.

Altro aspetto da chiarire resta sicuramente l’azione degli estratti naturali nei confronti dei microrganismi utili, poiché i dati disponibili riguardano essenzialmente lo studio dell’attività antimicrobica nei confronti dei soli microrganismi indesiderati. Tale aspetto è di fondamentale importanza per i

prodotti fermentati. Inoltre, per poter utilizzare le sostanze naturali come ingredienti alimentari, bisogna valutare la loro convenienza dal punto di vista economico, infatti, il loro costo di impiego non dovrebbe essere superiore a quello degli additivi chimici. Bisogna infine considerare la miriadi di componenti che costituiscono un estratto naturale, la loro concentrazione in funzione dello stato fisiologico della pianta e il potenziale instaurarsi di rapporti di interazione, tra le varie molecole presenti, che potrebbe influenzare l'entità dell'attività antimicrobica.

In ultima istanza, problematica di non poco conto, è necessario conoscere in maniera completa l'eventuale azione tossica degli estratti alle concentrazioni ottimali di impiego.

Quindi nonostante la volontà, da parte del mondo scientifico e industriale, di individuare sostanze naturali ad attività antimicrobica da impiegare in sostituzione di nitrati a nitriti, ma anche di altri additivi chimici, restano ancora delle criticità da superare riguardanti essenzialmente l'effetto degli estratti nei confronti dei microrganismi utili, la concentrazione da utilizzare, i costi di utilizzo, l'impatto sui caratteri sensoriali nonché alcuni aspetti di ordine tossicologico.

CAPITOLO 4

ESTRATTI NATURALI PER LA PROTEZIONE DEI PRODOTTI CARNEI

I prodotti carnei riproducono un ottimale substrato di crescita per molti microrganismi indesiderati in quanto presentano: un'elevata attività dell'acqua, un buon contenuto di nutrienti e fattori di crescita e non subiscono nessun trattamento di risanamento. Durante l'intero processo produttivo sono esposti a molteplici fonti di contaminazione biologica, dalla macellazione al confezionamento, solo il rispetto di rigorose condizioni igieniche e delle basse temperature consente un'adeguata conservazione del prodotto fresco per brevi periodi. Anche nel caso dei prodotti trasformati, salumi, le contaminazioni microbiche non possono essere sottovalutate poiché, taluni batteri, hanno sviluppato un'elevata trofia verso i prodotti carnei, riuscendo a moltiplicarsi anche in condizioni di sviluppo estreme, generano fenomeni alterativi e possono costituire anche un pericolo per il consumatore.

Allo stato attuale per i prodotti carnei, freschi e trasformati, sono stati raggiunti elevati standard qualitativi frutto di differenti interventi finalizzati al miglioramento dello stato di conservazione e all'eliminazione di pericoli biologici. Interventi troppo spesso legati, soprattutto per quanto riguarda i

prodotti carnei trasformati, all’impiego di additivi chimici non sempre graditi dal consumatore e troppo spesso criticati dal mondo scientifico.

Sebbene le problematiche relative ai prodotti carnei freschi sono state in parte risolte grazie all’impiego di tecnologie alimentari innovative (atmosfera modificate, super-chilling, confezionamento attivo) che hanno permesso il prolungamento della shelf-life ed un ottimale controllo della popolazione microbica indesiderata senza l’impiego di additivi chimici (impiego non previsto per legge), la sicurezza igienico-sanitaria dei prodotti carnei trasformati è ancora indissolubilmente legata all’impiego di additivi chimici. Per tale motivo, alcuni composti estratti da matrici vegetali e che esibiscono attività antimicrobica, potrebbero essere utilizzati nei prodotti carnei trasformati per modulare la dinamica della popolazione microbica senza presentare alcun rischio per la salute del consumatore.

4.1 *ROSMARINUS OFFICINALIS*

Rosmarino deriva da “Rosmarinus” che significa rugiada marina, forse proprio perché i litorali marini costituiscono il miglior habitat per queste piante, *officinalis* perché è sempre stata un’erba utilizzata nelle antiche farmacie.

Il *Rosmarinus officinalis*, comunemente chiamato Rosmarino, è un arbusto ramificato con rametti intensamente riempiti di piccole foglie strette, lunghe acuminose e sempre verdi che ne costituiscono la parte più profumata. La sua altezza può arrivare fino a 2 metri e alla sommità presenta dei fiori blu-lilla riuniti in grappoli fitti. Molto comune nelle regioni mediterranee la cui area di

diffusione si estende fino a regioni asiatiche. L'olio essenziale del rosmarino viene estratto per distillazione in corrente di vapore dalle sommità fiorite e dai ramoscelli.

Caratteristiche Organolettiche: liquido limpido da incolore a giallo-pallido.

Principi attivi: acido rosmarinico, borneolo, bornile acetato, canfora, eucaliptolo, pinene.

L'acido rosmarinico presenta molte attività particolarmente interessanti, tra cui quella antivirale, antibatterica, antiossidante.



Figura 4.1 *Pianta e rametto di rosmarino*

4.2 PROPOLI

La propoli è una sostanza resinosa che le api raccolgono dalle gemme e dalla corteccia delle piante. Si tratta quindi di una sostanza di origine prettamente vegetale anche se le api, dopo il raccolto, la elaborano con l'aggiunta di cera, polline ed enzimi prodotti dalle api stesse. Il colore può variare moltissimo nella tonalità del giallo, del rosso, del marrone e del nero. L'odore è fortemente aromatico. La sua composizione è estremamente variabile a seconda della vegetazione di origine, della stagione ecc. Tuttavia particolare menzione merita il gruppo dei flavonoidi che sembrano essere i responsabili dell'attività antibatterica, antifermentativa della propoli. L'ape modifica la struttura dei

flavonoidi, originariamente presenti nelle piante, togliendo gli zuccheri contenuti nel composto organico grazie agli enzimi prodotti dalle loro ghiandole salivari. I flavonoidi bloccano la produzione di prostaglandine all'origine del processo di invecchiamento.



Figura 4.2 Propoli

4.3 ACEROLA (*MALPIGHIA PUNICIFOLIA*)

Denominazione botanica: *Malpighia puniceifolia*

Sinonimi: Ciliegia delle Indie occidentali

Parti usate: frutti maturi senza nocciolo

L'Acerola è una pianta arbustiva originaria dell'America centrale dalla lenta crescita e dalle medie dimensioni, oggi è diffusa e coltivata in Messico, Isole dei Caraibi, Venezuela, Perù, India e Brasile. Predilige i terreni argillosi ricchi di humus. In condizioni favorevoli può raggiungere i 5 m di altezza; le giovani foglie hanno una colorazione rossastra che con il tempo si trasforma in verde scuro. Dopo il terzo anno di crescita produce frutti che per forma, dimensioni e colore sono simili alle ciliegie. Il sapore è leggermente dolciastro, acidulo. All'interno viene contenuto un grosso seme. I frutti si sviluppano sui rami del

precedente anno e maturano pochi giorni dopo la fioritura. Dai frutti maturi viene ricavato un succo che con varie lavorazioni viene trasformato in un estratto ad altissimo contenuto in complesso vitaminico. Il contenuto in vitamina C può variare in relazione al grado di maturazione del frutto, più elevato nello stadio verde e più basso a maturazione completata, oltre alla stagione, alle condizioni climatiche ed al terreno di coltivazione. Il frutto di Acerola contiene la vitamina C nelle sue due forme: acido ascorbico e di-idro-ascorbico. La vitamina C è un fattore nutrizionale indispensabile per il normale svolgimento di importanti processi biologici: interviene nella sintesi degli ormoni steroidei, previene la formazione di nitrosammine tossiche a livello intestinale, è indispensabile per il normale sviluppo del collagene, migliora l'assorbimento del ferro. I costituenti principali di suddetta pianta sono rappresentati anche dai flavonoidi e sostanze antiossidanti, vitamina A, calcio, ferro e fosforo. Le principali nobili attività attribuite a questa pianta sono l'azione antiossidante e antinvecchiamento nonché l'aumento delle difese immunitarie.

Malpighia puniceifolia, infatti, oltre ad essere dotata di una valida attività antimicrobica, può essere utilizzata anche insieme alla Propoli andando ad incrementare le naturali difese dell'organismo. Parti usate: frutti dell'Acerola e Resina della Propoli. La presenza contemporanea dell'estratto di Acerola e della Propoli costituisce un complesso di sostanze naturali veramente eccellente, in quanto nell'Acerola, oltre ad un contenuto di vitamina C superiore a quello degli agrumi, fino a 100 volte, sono presenti apprezzabili quantità di bio-flavonoidi in grado di favorire l'azione della vitamina C; nella Propoli ritroviamo, oltre a

sostanze minerali, aminoacidi, vitamine A, del gruppo B, vitamina C e bioflavonoidi.



Figura 4.3 *Pianta e frutto di Acerola*

4.4 SPIRULINA PACIFICA

La Spirulina è un'alga coltivata sin dai tempi antichi per le sue proprietà benefiche il cui uso va diffondendosi relativamente da poco in Italia. Dal nome simpatico e facile da ricordare, la Spirulina si vende in erboristeria sotto forma di capsule oppure in polvere; meno frequente il suo commercio al naturale, per via delle difficoltà di gestione del prodotto (l'odore pare non sia dei più gradevoli). Consigliata ai vegetariani per l'apporto di proteine, quest'alga è stata recentemente al centro di uno studio delle Nazioni Unite e della FAO quale possibile alternativa alimentare nei paesi poveri. La spirulina, infatti, contiene un elevato numero di nutrienti fondamentali per il benessere dell'organismo e, in linea teorica, potrebbe soddisfare i bisogni nutrizionali di quei popoli che non hanno accesso sufficiente al cibo. È un concentrato di minerali (cromo, zinco, calcio, magnesio, potassio, ferro, selenio), vitamine (del gruppo B, D, E e K), betacarotene e amminoacidi essenziali. Come integratore alimentare, una delle

caratteristiche più importanti, è la presenza della vitamina B12, difficilmente assimilabile da chi non assume alimenti di origine animale.

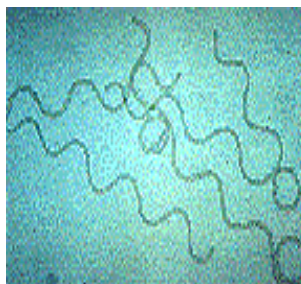


Figura 4.4 *Spirulina pacifica*

4.5 CITRUS COMPOSITUM

L'estratto naturale di *Citrus compositum* è costituito da una miscela di tre differenti specie, *Citrus limon*, *Citrus reticulata* e *Citrus sinensis*. Molto diffuso è l'utilizzo degli oli essenziali derivanti dalle tre specie che compongono l'estratto di *Citrus compositum*. Tali oli essenziali vengono estratti per spremitura a freddo della parte esterna dei frutti e raccolti mediante centrifugazione, operazione che allontana la componente acquosa, sono impiegati in aromaterapia, nella preparazione di cosmetici e venduti come prodotti erboristici in funzione delle molteplici proprietà benefiche. I costituenti principali sono rappresentati da limonene, terpinene, pineni, sabinene, mircene, citrale, linalolo, geraniolo, ottanolo, nonanolo, citronellale, bergamotene ed altri. Le proprietà attribuite a tali sostanze vanno da antisettico, antivirale, antibatterico a rilassante, rinfrescante, astringente e detergente a seconda delle concentrazioni utilizzate; si presenta generalmente come un liquido etereo e volatile con un colore che varia dal giallo all'arancione. Alcuni Autori (Viuda-Martos et al, 2009) hanno descritto l'impiego dei sottoprodotti derivanti dalla lavorazione di varie specie appartenenti al genere

Citrus da utilizzare come ingredienti innovativi, in grado di ridurre il contenuto di nitriti, nella produzione di prodotti carnei fermentati.

4.6 *MEDICAGO COMPOSITA*

L'estratto naturale di *Medicago composita* è costituito dall'insieme di più specie appartenenti al genere *Medicago*, la componente principale rimane comunque la specie ascrivibile a *Medicago sativa*. È una pianta leguminosa molto diffusa nelle zone temperate, sia allo stato selvatico, sia coltivata e le sue qualità nutritive sono molto conosciute e largamente utilizzate per l'alimentazione del bestiame. Contiene, in quantità degne di nota, proteine, amminoacidi, vitamine (A, E, C, D, B1, B2 e soprattutto la K che ha un ben documentato effetto benefico sulla coagulazione), alcuni derivati cumarinici, minerali (ferro, fosforo, zolfo, calcio, magnesio, potassio), un estrogeno vegetale e delle saponine. Nutra Alfa-Alfa è un integratore alimentare a base di estratti vegetali, derivanti da *Medicago*, conosciuto per i benefici effetti tonici e per la naturale azione regolatrice sul colesterolo. Trova impiego in differenti formulazioni erboristiche per le quali viene commercializzata per uso terapeutico per le sue proprietà remineralizzanti, nutrienti, stimolanti contro l'inappetenza, stimolanti le funzioni epato-biliari, antisettiche ed anti-coagulanti.

4.7 *RAPHANUS NIGER*

Il rafano nero della famiglia delle Crucifere, è una pianta erbacea con fiori bianchi e rosa e una radice carnosa, lunga e nera. La parte utilizzata per preparare la tintura madre è la radice di grandi dimensioni di forma allungata. La buccia è nera e la polpa, bianca, è piccante a causa della presenza di composti solforati. Si raccoglie a fine estate. Il Rafano nero, detto anche Radice nera, contiene composti organici solforati che costituiscono la rafonina. La forte presenza di zolfo conferisce alla radice del rafano nero il caratteristico sapore piccante.

Lo zolfo è uno dei più abbondanti microelementi presenti nel nostro organismo, la sua azione garantisce la disintossicazione profonda e l'ottimale respirazione delle cellule. I composti solforati circolanti nell'organismo agiscono anche a livello dei polmoni svolgendo un'azione fluidificante sui bronchi e stimolante a livello del seno frontale. Il rafano nero è colagogo e coleretico, oltre ad essere uno degli elementi più efficaci per prevenire lo scorbuto.

INDICAZIONI: digestione difficile, rivitalizza fegato e cistifellea, antiallergico, gotta, reumatismi, bronchiti, sinusiti, tossi stizzose, dermatosi e costipazione.



Figura 4.5 *Raphanus niger*

4.8 *CARICA PAPAYA*

La Papaya (*Carica papaya L.*) è una pianta originaria dell'America Centrale, molto diffusa in Brasile e nelle Isole Hawaii. Nel Mediterraneo è coltivata in Israele e in Italia, solo in Sicilia, dove deve essere coltivata, nel periodo invernale, sotto serra con notevoli problemi per la produzione.

Appartiene alla Famiglia delle *Caricaceae*, genere *Carica*, specie *Papaya L.* La papaya presenta una biologia florale molto complessa. Il dimorfismo dei fiori è molto evidente; infatti, quelli femminili, solitari o riuniti in piccoli gruppi e ascellari, sono di colore giallo chiaro, mentre quelli maschili, inseriti su lunghi racemi ascellari, hanno una corolla monopetala di colore giallo chiaro a forma di tubo. Il frutto è una bacca caratterizzata da forma e dimensioni molto variabili, in parte aranciato che racchiude piccoli semi neri, ricoperti da una pellicola mucillaginosa, esso contiene la maggior parte delle sostanze biologicamente attive: papaina, chimopapaina, enzimi proteolitici, vitamine, aminoacidi. Tra i principi attivi contenuti particolare importanza, è stata data alla papaina, composto ad attività proteolitica che potrebbe essere utilizzato per intenerire la carne, per influenzare l'attività proteolitica negli alimenti in cui tale azione è gradita e potrebbe esibire una promettente attività antimicrobica.

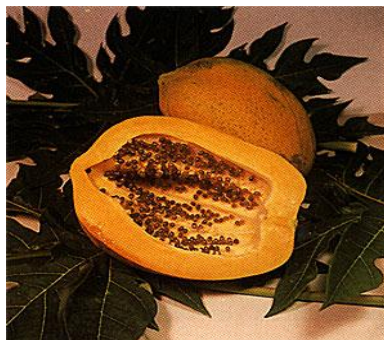


Figura 4.6 *Carica papaya*

CAPITOLO 5

LE LACUNE DELLA LETTERATURA SCIENTIFICA

Sebbene la recente letteratura scientifica sia ricca in studi che descrivono l'attività antimicrobica di molti estratti naturali, i dati disponibili riguardano l'effetto inibente prevalentemente nei confronti dei microrganismi indesiderati (patogeni e/o alteranti). Sicuramente tali informazioni sono utili per controllare lo sviluppo di taluni microrganismi indesiderati ma per poter utilizzare gli estratti naturali nella preparazione di alimenti complessi (alimenti fermentati) sono necessarie ulteriori valutazioni riguardanti lo spettro d'azione delle sostanze testate e la loro efficacia non solo nei confronti dei microrganismi dannosi ma anche nei confronti di quelli utili.

La maggior parte degli estratti naturali mostra tendenzialmente una più spiccata attività nei confronti dei batteri Gram-positivi ma taluni composti o peculiari molecole potrebbero essere maggiormente attive nei confronti di quelli Gram-negativi. Quindi non solo sarebbe necessario individuare nuovi composti ad attività antimicrobica ma anche eventualmente testare le idonee concentrazioni da impiegare negli alimenti, la formulazione di miscele di sostanze a differente attività inibente e le modalità di impiego.

I pochi dati disponibili riguardanti il meccanismo d'azione delle sostanze naturali ad attività antimicrobica hanno consentito di formulare differenti ipotesi a

riguardo, come accade per gli antibiotici, potrebbero svilupparsi fenomeni di resistenza e di adattamento da parte dei microrganismi. Tra i meccanismi d'azione suggeriti fino ad ora, riveste particolare importanza il ruolo svolto dalle proteine batteriche in quanto esse svolgono peculiari e fondamentali funzioni fisiologiche di vitale importanza per l'intero sistema cellulare.

5.1 SPETTRO D'AZIONE ED EFFICACIA DEGLI ESTRATTI

Diversi lavori scientifici hanno descritto l'effetto inibente di composti naturali nei confronti dei microrganismi, batteri, lieviti e muffe, i dati a riguardo permettono di quantificare l'attività antimicrobica esibita in “*vitro*”. Tali risultati rappresentano solo una fase preliminare dello studio volto all'utilizzazione degli estratti naturali nella preparazione degli alimenti. Infatti, non sono disponibili dati esaurienti riguardanti i microrganismi di interesse tecnologico, che per molti alimenti sono di fondamentale importanza, sia per quanto riguarda lo spettro d'azione, sia per quanto concerne l'efficacia degli estratti naturali antimicrobici. Lo spettro d'azione di alcuni estratti nei confronti dei principali microrganismi indesiderati è stato descritto da molti Autori, senza tuttavia chiarire il loro effetto nei confronti dei microrganismi utili, quindi i composti attualmente descritti potrebbero essere utilizzati per la conservazione di alcuni alimenti per i quali non è fondamentale l'azione dei microrganismi utili.

Nel caso di alimenti più complessi, come prodotti carnei fermentati, per i quali è di fondamentale importanza il processo fermentativo e quindi l'azione dei microrganismi, non è possibile utilizzare un composto naturale che inibisce in

maniera non selettiva l'intera popolazione microbica. Per valutare in maniera preliminare lo spettro d'azione degli estratti vengono solitamente utilizzate tecniche di laboratorio che prevedono prove su substrati colturali solidi (agar-diffusione) ma tali dati andrebbero completati con prove eseguite in sistemi liquidi, in quanto, l'efficacia degli estratti spesso può variare in funzione del sistema utilizzato per determinarla. Nei sistemi liquidi l'azione inibente è solitamente inferiore che in substrato solido, sono quindi necessarie solitamente concentrazioni maggiori per ottenere il medesimo effetto.

5.2 CONCENTRAZIONE, FORMULAZIONE E MODALITÀ D'IMPIEGO

La messa a punto di un estratto naturale ad attività antimicrobica ottimale da impiegare nella preparazione di un alimento è un aspetto che presenta molteplici problematiche per una sua reale realizzazione.

La maggior parte delle sostanze estratte da matrici naturali deriva da spezie, erbe o comunque da vegetali che presentano un determinato aroma. In moltissimi casi la componente biologicamente attiva di tali estratti è presente nella frazione aromatica e volatile delle matrici d'estrazione, come nel caso ad esempio degli oli essenziali, e la concentrazione delle molecole ad attività antimicrobica che costituiscono una sostanza naturale può variare in funzione di molteplici parametri. Diventa quindi imperativo determinare con precisione le concentrazioni da utilizzare in un alimento, in quanto, se un estratto esplica la sua attività antimicrobica a concentrazioni elevate potrebbe influire negativamente sui caratteri sensoriali dell'alimento stesso. Per risolvere tale problema sarebbe

necessario quantificare l'attività antimicrobica dei singoli estratti, valutare il loro spettro d'azione a determinate concentrazioni in modo da poter eventualmente sfruttare differenti estratti in funzione della loro efficacia. Se si procedesse in tal senso si potrebbero formulare delle miscele di estratti naturali ad azione sinergica in maniera da ampliare lo spettro d'azione ed ottenere una maggiore efficacia. Inoltre, come accennato in precedenza, le caratteristiche chimiche dei composti naturali antimicrobici, possono influenzarne l'azione e la stabilità in un sistema alimentare, sarebbe necessario quindi, oltre alla formulazione di idonee miscele ad attività antimicrobica, anche eseguire dei test sulle modalità di impiego poiché potrebbero condizionare negativamente l'attività antimicrobica.

A tal proposito, bisogna precisare che al momento non sono disponibili in letteratura dei dati riguardanti tali problematiche, in quanto i dati disponibili riguardano prevalentemente prove di inibizione di singoli estratti naturali.

5.3 MECCANISMI DI RESISTENZA, SENSIBILITÀ, ADATTAMENTO

I possibili meccanismi d'azione delle sostanze naturali ad attività antimicrobica non sono del tutto noti. Pochi Autori hanno descritto alcune modalità d'azione dell'attività antimicrobica esibita da estratti naturali, soprattutto oli essenziali, meccanismi che possono coinvolgere la cellula microbica in più siti sia esterni alla cellula sia a livello intracellulare. Gli oli essenziali, ad esempio, è noto che agiscono perturbando la membrana citoplasmatica grazie alla loro idrofobicità e generando quindi dei fenomeni di alterazione della fluidità che compromettono le normali funzioni di permeabilità cellulare. Il meccanismo appena descritto non

deve essere considerato in maniera assoluta, infatti è possibile che siano coinvolti più meccanismi d'azione e più siti d'azione, anche uno come conseguenza dell'altro. Ad esempio, taluni estratti naturali a determinate concentrazioni, potrebbero agire inibendo la sintesi o l'espressione di determinate proteine fondamentali per la vitalità cellulare.

Appare quindi evidente la necessità di chiarire i meccanismi d'azione delle sostanze naturali ad attività antimicrobica e valutare la loro eventuale reversibilità. I microrganismi sono in grado di reagire alla presenza di composti ad attività antimicrobica ma i meccanismi di risposta, in termini di resistenza e suscettibilità, non sono stati completamente definiti. Il danneggiamento di peculiari proteine a livello citoplasmatico e di parete è stato suggerito come possibile meccanismo d'azione di alcuni estratti naturali, non sono noti e descritti eventuali fenomeni di resistenza o di adattamento da parte dei microrganismi. Eventi, che se generati, rivestono particolare importanza in quanto verrebbe meno l'attività antimicrobica delle sostanze naturali e quindi la loro potenziale applicazione in campo alimentare. Non è escluso, infatti, che determinati microrganismi potrebbero essere in grado di mostrare una capacità di adattamento agli estratti naturali attraverso, ad esempio, la sintesi di determinate proteine prodotte esclusivamente in condizioni di stress (principio di massima economia di parti e processi).

5.4 IMPORTANZA DEGLI APPROCCI PROTEOMICI

La parola proteina viene dal greco "protos" e significa primo elemento. Le proteine sono elementi essenziali per la crescita e la riparazione, il buon funzionamento e la struttura di tutte le cellule viventi, infatti sono i costituenti fondamentali di tutte le cellule animali e vegetali. Le proteine sono tra i composti organici più complessi. Dal punto di vista chimico, una proteina è un polimero di residui amminoacidici, uniti mediante un legame peptidico, spesso in associazione con altre molecole e/o ioni metallici (in questo caso si parla di proteina coniugata). Inoltre le proteine hanno una organizzazione tridimensionale (struttura) molto complessa a cui è associata sempre una funzione biologica. La molecola proteica risulta costituita da atomi di carbonio, ossigeno, idrogeno e azoto; spesso contiene zolfo (presente negli amminoacidi metionina, cisteina e cistina) e, talvolta metalli come ferro, rame, zinco.

Il termine proteomica è stato coniato nel 1996 e per comprenderne l'evoluzione non si può prescindere da una piccola descrizione della "genomica".

Nella genomica si cerca di studiare come il DNA di una cellula, sottoposta a determinati stimoli, possa esprimere i suoi geni in un contesto globale, non singolo. Quindi uno stimolo induce il DNA cellulare a rispondere a questo fattore esterno, e la sua espressione finale sono delle proteine che risponderanno a questa nuova situazione. Questo stimolo non induce un solo gene ad esprimersi, ma una serie di geni correlati a cascata a seconda dello stimolo apportato. La genomica studia questa funzione del DNA in maniera completa e complessa e la sequenza con cui il DNA risponde a questi stimoli è DNA - mRNA - proteine. L'mRNA

espresso dal DNA si traduce in proteine. Ma queste proteine, a volte, non sono subito espresse dal mRNA, ma si esprimono in maniera diversa ed a tempi diversi. Non c'è una stretta linearità tra gene e la sua proteina complementare, o "proteoma" di una cellula.

L'analisi delle sequenze genomiche ci permette di rispondere ad alcune questioni biologiche rilevanti. Una delle prime fasi dell'analisi è la comparazione della sequenza del genoma acquisita con quelle dei genomi noti e con le sequenze dei geni la cui funzione è stata determinata, fattori che definiscono la funzione dei geni e quali sono probabilmente essenziali per un dato organismo. Tali analisi comparative possono essere interessanti ad esempio, per ricercare geni che codificano enzimi necessari per il microrganismo per giustificare le proprie caratteristiche e fornire nuove conoscenze circa l'ecologia di un organismo. Per esempio, *Helicobacter pylori* codifica proteine che contengono il doppio della quantità in aminoacidi basici, come arginina e lisina, rispetto alle proteine tipiche di altri procarioti. Presumibilmente questo aiuterà le cellule di *H. pylori* a sopravvivere nell'ambiente acido dello stomaco.

Fino ad oggi sono stati sequenziati molti genomi microbici e le dimensioni dei genomi procariotici vanno da 0,58 Mb a 8,7 Mb. I genomi procariotici più piccoli hanno le dimensioni dei virus più grandi ed i genomi procariotici più grandi presentano un numero più elevato di geni rispetto ai microrganismi eucarioti.

Il fine degli studi di genomica non è soltanto quello di stabilire il completamento genico di un organismo, ma anche quello di determinare quali geni sono espressi e la funzione delle loro molecole proteiche. Il completamento delle proteine all'interno di un organismo prende il nome di "proteoma". Il termine "proteoma"

racchiude un significato dinamico, a differenza del concetto statico di "genoma", poiché in corrispondenza di stimoli, interni od esterni alla cellula, i prodotti dell'espressione del genoma possono notevolmente variare; pertanto si può affermare che ad un genoma corrisponda una molteplicità di proteomi il cui limite superiore non è ancora definibile. E' importante sottolineare che la regolazione dell'espressione genica rappresenta un continuo che si estende per almeno nove ordini di grandezza; ne consegue che una singola proteina in un proteoma può essere differentemente rappresentata da una ad un miliardo di volte.

Quindi la "proteomica" interviene in questo stadio, quando bisogna determinare quali, quante ed in che tempi le proteine si esprimono in relazione ad un determinato stimolo, ed è complementare alla genomica in quanto si focalizza sul prodotto del gene. E' il desiderio di comprendere l'espressione totale delle proteine in seguito ad uno stimolo, a motivare il campo della "proteomica".

Il campo della proteomica ha subito un salto in avanti anche grazie alla tecnologia ed alla ricerca applicata nello studio di tecniche o strumentazioni, che negli ultimi anni ha fatto sì che si possano rilevare quantità di proteine dell'ordine di picogrammi così come riuscire a separare quantità di proteine dell'ordine di milligrammi. Il termine proteomica, quindi, non fa riferimento ad una specifica tecnica di rilevazione, ma si avvale di più tecniche, correlate le une alle altre, per comprendere il prodotto finale, la proteina. Un primo approccio alla proteomica è stato l'utilizzo dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide bidimensionale al fine di separare, identificare e misurare tutte le proteine presenti in un campione di cellule.

Si ricorre ad un approccio proteomico con l'intento di:

- ✓ valutare le variazioni dei livelli di espressione di alcune proteine in dipendenza di opportuni stimoli e/o di condizioni fisiopatologiche;
- ✓ stabilire le interazioni che le proteine assumono, in relazione ai suddetti stimoli e/o condizioni, con altre proteine da cui dipenderanno la crescita cellulare, la differenziazione, la morte programmata;
- ✓ identificare le proteine che interagiscono specificamente con ligandi naturali e di sintesi al fine di comprendere, ad esempio, i meccanismi di azione di farmaci o sostanze ad azione antimicrobica.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 6

SCOPO DELLA TESI DI DOTTORATO

La qualità e la sicurezza degli insaccati fermentati, come appare evidente dallo stato dell'arte, sono ancora strettamente legate all'impiego di nitrati e nitriti. Allo stato attuale, la ricerca applicata ha condotto alla individuazione di composti alternativi in grado di influenzare positivamente il colore, di prevenire l'ossidazione dei grassi nonché di promuovere i caratteri organolettici dei prodotti carnei fermentati. Ciò nonostante nitrati e nitriti, essendo anche in grado di inibire lo sviluppo di *Clostridium botulinum*, permangono gli unici composti garanti della sicurezza di tali prodotti.

Tuttavia, alla luce delle nuove frontiere della qualità alimentare, appare fortemente necessario il superamento di tale stato di fatto attraverso lo sviluppo e la validazione di strumenti efficaci e alternativi. Necessità che assume un carattere particolarmente rilevante anche alla luce delle aspre critiche nei confronti di nitrati e nitriti che provengono dai settori medico-scientifici i quali hanno evidenziato una stretta correlazione tra l'assunzione di nitriti da prodotti carnei e l'insorgenza di carcinomi.

Strumento potenzialmente alternativo e pertanto meritevole di attenzione potrebbe essere rappresentato dall'uso di estratti naturali in grado di espletare una ponderata attività antimicrobica. I composti, estratti dalle piante, dotati di tale

attività sono rappresentati principalmente da estratti idroalcolici ed oli essenziali il cui effetto nei confronti dei microrganismi è spesso noto e ben documentato. Tuttavia le conoscenze al momento disponibili in letteratura non consentono un loro impiego negli insaccati fermentati. Non solo non sono del tutto noti gli effetti che tali composti potrebbero esibire nei confronti di agenti microbici patogeni o comunque indesiderati, ma soprattutto resta da chiarire quale sia la loro azione nei confronti della popolazione microbica virtuosa indispensabile per il successo del processo fermentativo degli insaccati fermentati. Lacunose sono anche le informazioni in merito alle concentrazioni necessarie per l'ottenimento di un puntuale e selettivo effetto antimicrobico. Inoltre non è noto se i desiderati effetti espliciti "*in vitro*" permangano anche "*in situ*", in un ambiente complesso quale l'impasto di carne e l'insaccato durante la maturazione.

A tali interrogativi, al fine di poter utilizzare in maniera razionale gli estratti naturali nella preparazione di insaccati fermentati, occorre aggiungere un'ulteriore e stringente indagine volta alla comprensione del meccanismo di azione nei confronti dei differenti microrganismi che popolano i prodotti carnei fermentati.

Al chiarimento di tali aspetti sono state indirizzate le attività che hanno caratterizzato il progetto di ricerca relativo alla presente tesi di dottorato¹.

Azioni preliminari sono state indirizzate alla comprensione dello spettro di azione e dell'efficacia a differenti concentrazioni esibita da otto differenti estratti

¹ Le attività condotte attraverso il progetto di dottorato di ricerca ed esposte nel presente lavoro di tesi, in parte rientrano all'interno delle azioni previste per il progetto di ricerca europeo NOCHEMFOOD finanziato da parte dell'Unione Europea all'interno del VI Programma Quadro. Progetto che ha previsto come partner scientifico la partecipazione del Dipartimento STAAM dell'Università degli Studi del Molise.

naturali. Quindi si è proceduto alla conferma in differenti condizioni dell'efficacia degli estratti oggetto di studio e all'individuazione delle concentrazioni ottimali da adottare per ciascun composto. Inoltre, considerando che i fenomeni di sensibilità/resistenza/adattamento dei microrganismi agli estratti potrebbero coinvolgere la componente proteica dei microrganismi, si è inteso valutare e comprendere l'eventuale variazione dell'espressione proteica in presenza di ciascun estratto naturale. Sulla base dell'acquisizione di tali conoscenze si è proceduto alla formulazione di una miscela di estratti naturali tale da espletare un'azione antimicrobica sinergica e ottimale. L'efficacia della miscela messa a punto è stata validata "*in situ*" attraverso la preparazione di insaccati fermentati su scala pilota.

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

7.1 COMPOSTI NATURALI

I composti naturali, per i quali è stata valutata l'attività antimicrobica, sono stati estratti da differenti matrici e in dettaglio da *Carica papaya*, *Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia*, *Medicago composita*, Propolis, *Raphanus niger*, *Rosmarinus officinalis*, *Spirulina pacifica*. Le operazioni di estrazione e preparazione sono state condotte dall'azienda Bioma® (Svizzera) uno dei partner del progetto NOCHEMFOOD.

Gli estratti, sia singoli sia in miscela, sono stati ottenuti mediante un'innovativa tecnologia di estrazione che utilizza la CO₂ in condizioni supercritiche. Le specifiche tecniche delle condizioni utilizzate per l'estrazione sono oggetto di segreto industriale detenuto da parte dell'azienda produttrice.

Gli estratti, forniti in forma liofilizzata, al momento dell'utilizzo sono stati ricostituiti in una soluzione idroalcolica, anch'essa fornita dalla stessa casa produttrice e, al fine di agevolare la loro solubilizzazione, sono stati sottoposti a trattamento di sonicazione (Labsonic®, Sartorius -Italia) per 3 minuti ad intervalli ciclici di 0,7 secondi applicando un'amplitude pari all'80% e sterilizzati per filtrazione con l'ausilio di filtri monouso con porosità pari a 0,22 µm (Millipore, Italia).

7.2 CEPPI BATTERICI E CONDIZIONI DI CRESCITA

L'attività antimicrobica espressa dai singoli composti naturali oggetto dello studio è stata valutata, in primo luogo, nei confronti di 8 differenti ceppi microbici; in dettaglio nei confronti di 5 ceppi indesiderati rappresentati rispettivamente da *Clostridium sporogenes* DSM 795^T, *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090^T, *Enterococcus faecium* DSM 20477^T, *Brochothrix thermosphacta* DSM 20171^T, *Staphylococcus aureus* DSM 20714^T e di tre ceppi ritenuti utili, rappresentati da *Lactobacillus sakei* DSM 20017^T, *Staphylococcus xylosum* DSM 20266^T e *Kocuria varians* DSM 20033^T. Tutti ceppi tipo appartenenti alla collezione DSMZ (Germania).

Inoltre, l'attività antimicrobica espressa dalla miscela di composti è stata valutata anche nei confronti di 35 ceppi appartenenti alla collezione del DiSTAAM e isolati da insaccati fermentati di cui 20 ascrivibili alla specie *L. sakei*, 12 alla specie *S. xylosum* e 3 alla specie *K. varians*.

I ceppi microbici, conservati a -40° C, sono stati opportunamente riattivati utilizzando gli idonei substrati colturali incubati alle opportune temperature di crescita come riportato in tabella 7.1.

Tabella 7.1 *Microrganismi oggetto dello studio e condizioni di crescita.*

Ceppi batterici	CONDIZIONI DI CRESCITA	
	Temperatura	Medium
<i>Clostridium sporogenes</i> DSM 795 ^T	37 °C	REINFORCED CLOSTRIDIAL MEDIUM
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090 ^T	28° C	NUTRIENT BROTH
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 20477 ^T	37 °C	TRYPTICASE SOY YEAST EXTRACT MEDIUM
<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171 ^T	30° C	CORYNEBACTERIUM AGAR
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20714 ^T	37 °C	TRYPTICASE SOY YEAST EXTRACT MEDIUM
<i>Lactobacillus sakei</i>	30° C	MRS MEDIUM
<i>Staphylococcus xylosum</i>	30 °C	TRYPTICASE SOY YEAST EXTRACT MEDIUM
<i>Kocuria varians</i>	30° C	CORYNEBACTERIUM AGAR

Dalle colture over night ottenute da ciascun ceppo, sono state raccolte le cellule mediante centrifugazione (6000 rpm 10 min. 4°C, Beckman J2-21), e risospese in soluzione fisiologica (NaCl 0,9% w/v) ottenendo una concentrazione di circa 10^8 UFC/mL.

7.3 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

L'effetto antimicrobico e lo spettro d'azione dei composti naturali sono stati determinati mediante la tecnica Agar Well Diffusion Assay mentre l'efficacia è stata determinata attraverso la valutazione della crescita microbica in brodo di carne addizionato con differenti concentrazioni di estratto naturale.

7.3.1 AGAR WELL DIFFUSION ASSAY

L'azione inibente espressa dai composti naturali nei confronti dei microrganismi oggetto dello studio è stata determinata mediante Agar Well Diffusion Assay come descritto da Tremonte et al. (2007). In dettaglio, 20 mL di opportuno substrato colturale semi-agarizzato (Agar 0,8%) sono stati inoculati con ciascun ceppo, ottenendo una concentrazione di 10^6 UFC mL⁻¹, e trasferiti in capsule Petri. Con l'ausilio di una micropipetta, 75 µL di ciascun estratto naturale sono stati posizionati in uno dei pozzetti creati nel terreno semi-agarizzato in piastra. Per facilitare la diffusione delle sostanze naturali, le capsule Petri sono state poste a 4°C per 30 minuti; dopo incubazione alle ottimali condizioni di crescita è stata valutata la presenza e il diametro dell'alone di inibizione dopo 24 e 48 ore. In base al diametro di tale alone l'attività inibente è stata descritta come bassa e

indicata con la sigla "L" (alone < 5mm), moderata "M" (5 < alone < 8 mm) o elevata "H" (alone > 8 mm). La mancata formazione dell'alone è stata considerata come assenza di inibizione e indicata con la sigla "N".

7.3.2 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ANTIMICROBICA DEGLI ESTRATTI NATURALI

L'efficacia dell'azione inibente espressa dagli estratti naturali è stata determinata valutando la crescita microbica, mediante conta vitale in piastra, di ogni singolo ceppo batterico in brodo di carne addizionato con differenti concentrazioni di sostanza naturale 0.1%, 0.5% e 1% .

Il brodo di carne, scelto sulla base della sua similarità con l'ambiente rappresentato dal prodotto carneo, è stato preparato come descritto da Tremonte et al (2010). Sono stati allestiti differenti lotti (192) in funzione delle 3 differenti concentrazioni (0.1%, 0.5% e 1%) di ciascuno degli 8 estratti e degli 8 ceppi tipo oggetto dello studio. I microrganismi sono stati inoculati in modo tale da ottenere una concentrazione iniziale pari a 10^4 UFC mL⁻¹.

Dopo 24 ore di incubazione alle ottimali temperature di crescita per ciascun microrganismo è stato valutato, mediante conteggio vitale in piastra, il livello di carica. Quindi è stata determinata la variazione della carica microbica come $\Delta\text{LOG UFC mL}^{-1}$ considerando la differenza tra i livelli iniziali di carica (10^4 UFC mL⁻¹) e quelli dopo 24 ore. L'attività antimicrobica è stata descritta come bassa ($\Delta\text{LOG UFC mL}^{-1} < -0.5$), moderata ($-0.5 < \Delta\text{LOG UFC mL}^{-1} < -1$), elevata ($\Delta\text{LOG UFC mL}^{-1} > -1$) o assente ($\Delta\text{LOG UFC mL}^{-1} \geq 0$).

Ciascuna prova è stata condotta in doppio esprimendo i risultati come media di due differenti determinazioni e come controllo è stato utilizzato il brodo di carne senza l'aggiunta di estratti naturali.

7.4 EFFETTO DEI COMPOSTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA DEI BATTERI

Al fine di valutare l'effetto dei composti naturali sull'espressione proteica è stato valutato il profilo elettroforetico dei microrganismi oggetto dello studio coltivati in presenza e in assenza dei composti naturali. Pertanto per ognuno degli otto ceppi tipo sono stati preparati lotti differenti in funzione della presenza o dell'assenza di ciascun composto naturale oggetto dello studio. A diverse epoche di incubazione (0, 12, 24, 48 e 72 ore) sono state prelevate aliquote di brodocoltura dalle quali sono state separate le cellule e quindi estratte le proteine cellulari. Le proteine di ciascun estratto sono state separate mediante la tecnica elettroforetica a microfluidi che ha consentito l'ottenimento di profili elettroforetici ed elettroferogrammi specifici per ciascun estratto proteico.

7.4.1 ALLESTIMENTO DI BRODOCOLTURE

Sono stati allestiti 72 differenti lotti in funzione degli otto differenti microrganismi e della presenza/assenza delle otto differenti sostanze. Pertanto per ciascun ceppo sono stati preparati 9 lotti di cui il primo rappresentato dalla brodocoltura (250 mL) non addizionata di alcun estratto naturale, gli altri otto rappresentati da brodocolture di egual volume alla precedente ma ciascuna

addizionata di uno degli otto estratti naturali nella misura dello 0,5%. Al momento dell'inoculo e dopo 12, 24, 48 e 72 ore di incubazione alle opportune temperature sono state prelevate aliquote di brodocoltura pari a 50 mL.

7.4.2 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE BATTERICHE

Da ciascun'aliquota di brodocoltura raccolta come descritto nel precedente paragrafo, sono state separate le cellule e quindi estratte le proteine totali. Pertanto il pellet ottenuto dalla centrifugazione (6000 rpm, 10 min, 4°C - Beckman J2-21) di ciascuna aliquota è stato raccolto, sottoposto a successivi lavaggi con soluzione fisiologica e con una soluzione di 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 e quindi risospeso in circa 500 µL di una soluzione costituita di 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 e 2% SDS e addizionati di biglie di vetro. Il campione ottenuto è stato sottoposto ad agitazione mediante agitatore magnetico per 5 minuti. Tempi e condizioni sufficienti per l'ottenimento di lisati batterici grezzi che sono stati sottoposti a trattamento termico di 100°C per 3 minuti e quindi centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C (Eppendorf 5415 R). Si è proceduto al recupero del surnatante contenente le proteine batteriche.

7.4.3 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA (METODO BRADFORD)

La concentrazione proteica dei campioni in esame è stata determinata secondo il metodo Bradford. Metodo che si basa sull'azione del reattivo Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG) che si lega specificamente a residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina in una forma anionica, con assorbanza massima a 595 nm. Utilizzando una proteina con concentrazione nota, la BSA (Albumina di

Siero Bovino, 2 mg/mL), è stata costruita una retta di taratura. L'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro a 595 nm, successivamente, per poter determinare la concentrazione delle proteine presenti in ogni campione è stata valutata l'assorbanza ($\lambda=595$ nm) di 10 μ L di campione uniti a 490 μ L H₂O e 500 μ L di reattivo.

7.4.4 SEPARAZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ELETTROFORESI A MICROFLUIDI (EXPERION PRO 260, BIORAD)

I campioni di proteine sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica mediante la tecnica a microfluidi "Lab-on-a-chip" che prevede l'utilizzo di un dispositivo, integrante funzioni multiple, che si possono svolgere in un singolo chip in grado di trattare volumi di fluidi estremamente piccoli. Il microchip, è costituito da 16 alloggiamenti collegati da microcanali (Figura 7.1).

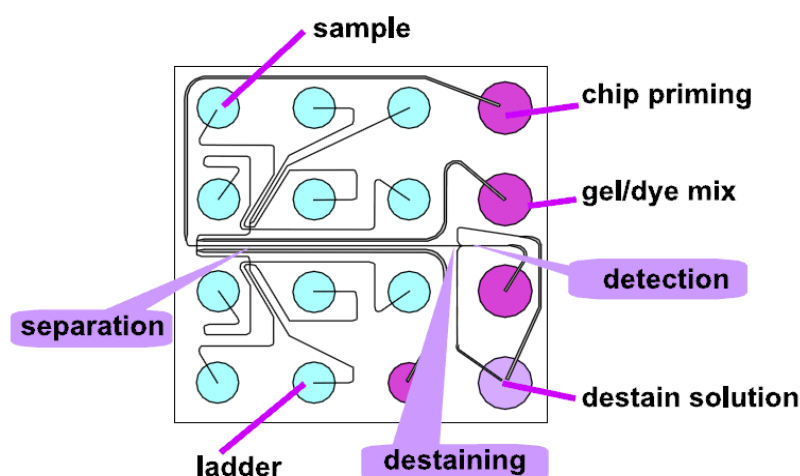


Figura 7.1 Configurazione di un dispositivo Lab-on-a-chip per la separazione delle proteine, disposizione dei microcanali e dei sedici alloggiamenti deputati a contenere i campioni e i buffers necessari per la separazione elettroforetica. In dettaglio sono evidenziati il canale di separazione, le sezioni di decolorazione e quella di rilevazione (Goetze et al., 2004)

Dieci alloggiamenti sono deputati ad ospitare aliquote di campioni (6 μ L), 4 alloggiamenti vengono caricati con il GEL-STAIN (BIORAD), un alloggiamento

con il SAMPLE BUFFER (BIORAD) ed infine uno con il LADDER Pro 260 (BIORAD). Il GEL-STAIN è stato preparato aggiungendo 20 μL di Pro260 stain (BIORAD) a 520 μL di Pro260 (BIORAD). Il buffer è stato ottenuto aggiungendo 1 μL di β -mercaptoetanololo a 30 μL di sample buffer. I campioni e il LADDER prima di essere caricati negli appositi pozzetti sono stati trattati a 95-100°C per 3-5' e diluiti con 84 μL di H_2O deionizzata e microfiltrata. Al chip, posizionato sulla piattaforma della Priming station, sono stati aggiunti 12 μL di Gel-stain nel pozzetto marcato GS (gel Priming well), in modo da inviare il Priming (fase di preparazione del chip per la corsa). Al termine del Priming, all'interno del chip sono stati pipettati 12 μL di una soluzione filtrata Gel-stain nei pozzetti marcati GS, 12 μL di gel filtrato nel pozzetto G, 6 μL di ladder nel pozzetto L e quindi 6 μL di campione in ciascun pozzetto numerato dall'1 al 10. Successivamente è stata condotta la corsa elettroforetica secondo le indicazioni della casa costruttrice utilizzando la stazione di elettroforesi automatizzata Experion analyzer (BIORAD) e il software corredato. La fluorescenza è stata rilevata utilizzando un rivelatore laser 10 mW emettente a 630 nm. La separazione e la rilevazione dei campioni proteici è avvenuta in un tempo pari a trenta minuti. Tale tecnica ha consentito di separare proteine aventi un peso molecolare compreso tra 10 e 260 kDa con una risoluzione del 5-10% che, come per l' SDS-page, varia in funzione delle caratteristiche della proteina (Goetez et al., 2004).

7.5 FORMULAZIONE DELLA MISCELA E VALUTAZIONE DELLA SUA EFFICACIA *IN VITRO*

Sulla base dei dati ottenuti dalle azioni descritte nel paragrafo 7.3 è stata definita una miscela di estratti naturali contraddistinta con la sigla NC. L'efficacia di tale miscela, come già descritto nel paragrafo 7.2, è stata valutata non solo nei confronti dei ceppi tipo ma anche rispetto a ceppi di batteri lattici e micrococchi-stafilococchi isolati da insaccati fermentati ed appartenenti alla collezione del DiSTAAM. La valutazione dell'efficacia dell'azione antimicrobica è stata determinata, come già descritto nel paragrafo 7.3.2, valutando la dinamica di crescita dei microrganismi coltivati in brodo di carne addizionato con differenti concentrazioni (0.1%, 0.5%, 1%) della miscela NC. Come controllo è stato utilizzato un brodo di carne senza nessun aggiunta, mentre come confronto è stato utilizzato brodo di carne addizionato di nitriti in concentrazione di 150 ppm.

7.6 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA MISCELA *IN SITU*

Su scala pilota presso il salumificio Spiezia, un altro partner del progetto NOCHEMFOOD, sono stati preparati quattro differenti lotti di insaccati fermentati, salame tipo Napoli, come di seguito riportato:

- lotto NN, prodotto secondo la tradizionale ricetta del salame tipo Napoli con aggiunta di nitrati/nitriti e l'impiego di colture starter selezionate commerciali (*L. sakei*, *L. plantarum*, *S. xylosum*, Sacco S.r.l., Italy);

- lotto NC prodotto come quello precedentemente descritto ma sostituendo nitrati e nitriti con la miscela NC a concentrazione di 5 mL/Kg;
- lotto NN+NC, prodotto riducendo delle metà il contenuto di nitrati e nitriti con la miscela NC ad una concentrazione di 2.5 mL/Kg,
- lotto C (controllo negativo), prodotto come per il lotto NN ma senza aggiunta di nitrati, nitriti e miscela NC.

7.6.1 LE ANALISI MICROBIOLOGICHE

Subito dopo l'insacco e dopo 3, 7, 15, 21 e 30 giorni di maturazione su tre campioni differenti di salame per ciascuno dei quattro lotti, precedentemente descritti, sono state eseguite le analisi microbiologiche volte ad indagare la presenza dei principali microrganismi utili e/o indesiderati presenti negli insaccati fermentati quali batteri lattici, micrococchi-stafilococchi, coliformi totali, enterococchi, eumiceti, *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* spp e *Clostridium* spp.

Ogni gruppo microbico è stato contato su un opportuno terreno nutritivo e rispettando le appropriate condizioni di sviluppo come di seguito descritto:

i livelli di carica dei **mesofili totali** sono stati determinati su Plate Count Agar (Oxoid) dopo incubazione a 28°C per 48 ore;

le cariche dei **batteri lattici** (LAB) sono state determinate su MRS agar con aggiunta di antimicotico (Oxoid), dopo incubazione in anaerobiosi (Gas Pack Anaerobic Sistem –Oxoid-) ad una temperatura di 28°C per 72 ore;

i **micrococchi-stafilococchi** (CNC), seminati per spatolamento, sono stati contati su Mannitol Salt Agar (Oxoid) dopo incubazione a 28°C per 48 ore;

il conteggio dei **lieviti** è stato effettuato su piastre di YPD con aggiunta di antibatterico dopo opportuna incubazione a 28°C per 72 ore;

gli **enterobatteri** sono stati determinati su VRBGA (Oxoid) dopo 48 ore di incubazione a 37°C;

i **coliformi totali** sono stati contati su VRBLA (Oxoid) dopo 48 ore di incubazione rispettivamente a 37°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 72 ore di incubazione in anaerobiosi ad una temperatura di 37°C;

le cariche di *Brochothrix thermosphacta* sono state determinate su ST Agar base (Oxoid) addizionato di STA selective supplement (Oxoid) incubando a 28°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.

I risultati sono stati espressi come media dei dati ottenuti da due determinazioni eseguite su tre campioni differenti appartenenti a ciascun lotto.

7.6.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI ESTRATTI NATURALI SULL'EVOLUZIONE DEI CARATTERI FISICI, CHIMICO-FISICI E SENSORIALI.

Ad ogni epoca di campionamento, su ciascun campione sottoposto ad analisi microbiologica è stata effettuata la determinazione del pH, dell'attività dell'acqua e del colore.

Il pH è stato misurato con pH-metro con elettrodo a vetro (Crison 2001) inserito nell'omogeneizzato di 10g di insaccato + 90 ml di H₂O fisiologica.

L'attività dell'acqua è stata determinata mediante lo strumento AQUALAB seguendo le indicazioni fornite dalla casa costruttrice.

Il colore, su base oggettiva, è stato determinato secondo la scala HUNTER (C.I.E. 1976 L*a*b*) mediante colorimetro MINOLTA. I dati colorimetrici relativi al sistema "L", "a", "b" sono stati sottoposti ad analisi della varianza.

Inoltre, al termine del periodo di maturazione di ciascuna tipologia di prodotto, è stata eseguita una valutazione dei principali attributi di interesse sensoriale come riportato in Figura 7.2.

Tale valutazione è stata affidata a 25 abituali consumatori di insaccati fermentati . In particolare sono stati valutati i caratteri visivi (omogeneità dell'impasto, compattezza ed eventuali incrostazioni) i caratteri di struttura (tenuta della fetta, resistenza al taglio) e quelli olfattivi-gustativi (odore, aroma e masticabilità). Al termine di ogni valutazione ciascun giudice ha espresso un giudizio di ogni attributo sensoriale utilizzando una scala di valori compresa tra 0 (molto negativo) e 8 (molto positivo).

SCHEDA CONSUMER TEST SALAME									
Data:									Campione N°:
Cognome Nome:									
SCALA DI VALUTAZIONE									
	1	2	3	4	5	6	7	8	
COLORE	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
UNIFORMITA'	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
DISTRIBUZIONE GRASSO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
ODORE	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
AROMA	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
DOLCE	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
SALATO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
ACIDO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
AMARO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
PICCANTE	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
RETROGUSTO	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
PERSISTENZA	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
TENEREZZA	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
ADESIVITA'	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
MASTICABILITA'	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
ELASTICITA'	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
*Aspetti visivi: osservare il campione in condizioni di buona illuminazione e ponendolo contro luce.									
*Aroma: masticare il campione e annotare l'intensità dell'aroma.									

Figura 7.2 Scheda utilizzata per l'esecuzione del consumer test.

CAPITOLO 8

RISULTATI

8.1 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E SPETTRO D'AZIONE DEGLI ESTRATTI NATURALI

I risultati relativi alla valutazione dell'attività antimicrobica mediante la tecnica di diffusione in piastra (Agar Well Diffusion Assay) hanno consentito di delineare un primo e chiaro quadro in merito alla presenza e all'intensità dell'azione inibente espressa dagli estratti naturali nei confronti dei microrganismi oggetto dello studio.

Com'è possibile apprezzare dalla Tabella 8.1 gli estratti saggiati hanno evidenziato azioni differenti sia in termini d'intensità sia in merito allo spettro d'azione.

Tabella 8.1 Risultati dell'Agar Diffusione. La dimensione dell'alone di inibizione indica l'intensità dell'inibizione, bassa L (alone < 5mm), moderata M (5 < alone < 8 mm), elevata H (alone > 8 mm) o neutrale N.

Estratto naturale	Microrganismi utili			Microrganismi indesiderati				
	<i>L. sakei</i>	<i>S. xylosum</i>	<i>K. varians</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>B. thermosphacta</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Carica papaya</i>	N	N	N	L	L	N	N	N
<i>Citrus compositum</i>	M	M	M	H	H	H	H	M
<i>Malphiglia punicifolia</i>	N	N	N	M	H	L	H	L
<i>Medicago composita</i>	L	L	M	M	L	L	L	L
Propolis	N	N	N	L	L	N	N	N
<i>Raphanus niger</i>	N	N	N	L	L	N	N	N
<i>Rosmarinus officinalis</i>	H	H	H	H	H	M	H	H
<i>Spirulina pacifica</i>	M	M	M	M	M	N	N	M

In dettaglio, i tre estratti provenienti da *C. papaya*, Propolis e *R. niger*, hanno fatto apprezzare un basso spettro di azione accompagnato da una blanda azione

inibente. Infatti, per tali estratti l'effetto inibitorio è stato riscontrato solo nei confronti di due microrganismi: *C. sporogenes* e *B. thermosphacta*; mentre è risultato assente nei confronti degli altri ceppi microbici oggetto dello studio. Inoltre, occorre rilevare che l'azione inibitoria nei confronti dei due microrganismi, essendosi manifestata con la comparsa di un alone di inibizione avente una dimensione inferiore a 5 mm, è da considerarsi come un'azione di bassa intensità (L).

Il quadro appare differente per l'estratto proveniente da *M. composita* che è contraddistinto da un'attività antimicrobica sostanzialmente di bassa intensità ma nel contempo da un ampio spettro di azione. Per tal estratto l'evento inibitorio è stato riscontrato nei confronti della totalità dei ceppi oggetto presi in considerazione nel presente studio, sia utili sia indesiderati. L'azione inibente è apparsa piuttosto blanda nei confronti della quasi totalità dei ceppi presi in esame, essendo caratterizzata dalla formazione di un alone inibitorio contraddistinto da una dimensione inferiore a 5 mm. Un carattere di distinguo qualifica il rapporto tra tale estratto e i ceppi di *C. sporogenes* e *K. varians*. In tale caso, infatti, l'azione inibitoria ha assunto un carattere di maggiore entità collocandosi nella fascia di moderata intensità (M).

L'estratto di *S. pacifica* ha evidenziato un'azione antimicrobica caratterizzata da uno spettro medio-ampio e da un'intensità sostanzialmente moderata. Il fenomeno inibitorio, eccetto per i ceppi di *E. faecium* e *P. fluorescens*, è stato apprezzato nei confronti della quasi totalità dei ceppi oggetto dello studio ritenuti sia utili sia indesiderati. In tutti i casi, qualora sia presente l'azione inibente,

l'alone di inibizione è stato contraddistinto da una dimensione compresa tra 5 e 8 mm, condizione che denota una azione inibente di moderata intensità.

Un ulteriore e differente scenario è quello che è stato evidenziato dagli estratti di *R. officinalis* e di *C. compositum* che sono stati i protagonisti di un'attività inibitoria caratterizzata da un ampio spettro di azione ed una elevata intensità. L'estratto di *R. officinalis* esercita una forte azione inibente (H) nei confronti della quasi totalità dei ceppi batterici saggiati, compreso quelli utili. Differisce solo la sua azione nei confronti del ceppo di *E. faecium* che è apparsa moderata (M). Anche l'estratto di *C. compositum* ha fatto apprezzare un effetto inibente nei confronti della totalità dei ceppi. L'azione inibente ha assunto carattere di elevata intensità (H) nei confronti di tutti i microrganismi indesiderati sia Gram-positivi sia Gram-negativi; mentre è apparsa di moderata intensità rispetto ai microrganismi ritenuti utili nella preparazione delle carni fermentate quali *L. sakei*, *S. xylosum*, *K. varians*.

In una posizione di complessa definizione ed etichettatura si colloca il quadro caratterizzante l'estratto di *M. punicifolia*. In tal caso l'azione inibente è sicuramente caratterizzata da uno spettro di moderata ampiezza. Infatti l'inibizione è stata apprezzata solo nei confronti di una parte dei ceppi oggetto dello studio. In dettaglio l'estratto ha determinato l'inibizione della totalità dei ceppi ritenuti indesiderati senza interferire sullo sviluppo di quelli ritenuti utili. L'intensità d'azione appare fortemente variabile in funzione delle differenti specie. In particolare, l'effetto inibente è stato descritto come basso (L) nei confronti *E. faecium* e *S. aureus*; come moderato nei confronti di *C. sporogenes* ed infine come elevato nei confronti di *B. thermosphacta* e *P. fluorescens*.

8.2 EFFICACIA DEGLI ESTRATTI NATURALI

I risultati relativi alla valutazione della variazione delle cariche dei differenti microrganismi in brodi di carne addizionati con diverse concentrazioni degli estratti naturali hanno offerto non solo una delucidazione in merito all'azione inibente esibita da ciascun estratto ma anche una chiara informazione relativa all'efficacia di tale azione. Gli estratti saggiati hanno fatto apprezzare risultati differenti sia per la specificità, sia per l'intensità dell'azione inibente manifestata. In generale, per tutti gli estratti, è emerso che l'attività antimicrobica è variabile in funzione della specie microbica e assume un'intensità che appare direttamente proporzionale al livello di concentrazione. Differenti, in funzione degli estratti e delle specie microbiche, sono i dati in merito all'efficacia apprezzata in presenza degli estratti alle concentrazioni più basse. Proprio l'esame di tale dato ha assunto un notevole interesse divenendo di meritevole attenzione in sede di discussione dei risultati riportati nel successivo paragrafo. Un'efficacia di bassa entità è stata evidenziata dall'estratto di Propolis (Figura 8.1).

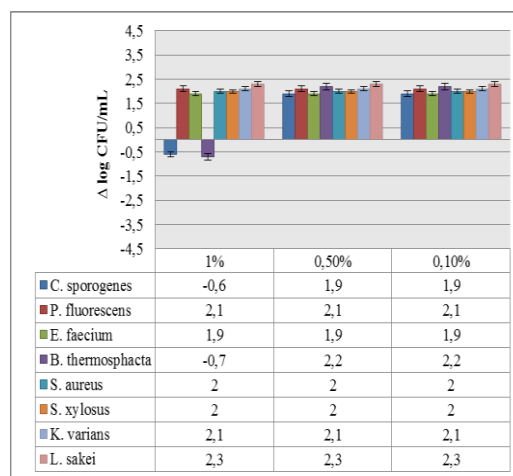


Figura 8.1 Efficacia dell'effetto antimicrobico espresso da Propolis in brodo di carne, bassa ($\Delta \text{LOG UFC/mL} < -0.5$), moderata ($< -0.5 \Delta \text{LOG UFC/mL} < -1$) o elevata ($\Delta \text{LOG/ UFC mL} > -1$).

In tal caso, l'azione inibente è stata apprezzata nei confronti di pochi ceppi solo qualora l'estratto sia presente alla più alta concentrazione adottata. Infatti, una riduzione delle cariche di circa mezzo ciclo logaritmico è stata apprezzata solo per *C. sporogenes* e *B. thermosphacta* in presenza dell'estratto a concentrazione dell'1%. A livelli di concentrazione più bassi l'effetto inibitorio non è risultato apprezzabile.

Piuttosto limitata è anche l'efficacia esibita dagli estratti di *C. papaya* e di *R. niger* (Figure 8.2A, 8.2B). Anche tali estratti, come quello di Propolis, hanno evidenziato la capacità di inibire solo lo sviluppo di *C. sporogenes* e *B. thermosphacta*. L'effetto inibitorio nei confronti di tali microrganismi è stato apprezzato con la riduzione delle cariche di circa mezzo ciclo logaritmico e di 0,2 cicli logaritmici qualora gli estratti siano stati addizionati alle concentrazioni rispettivamente dell'1% e dello 0,5%. L'impiego degli estratti nella misura dello 0,1% non ha fatto apprezzare alcun evento inibitorio.

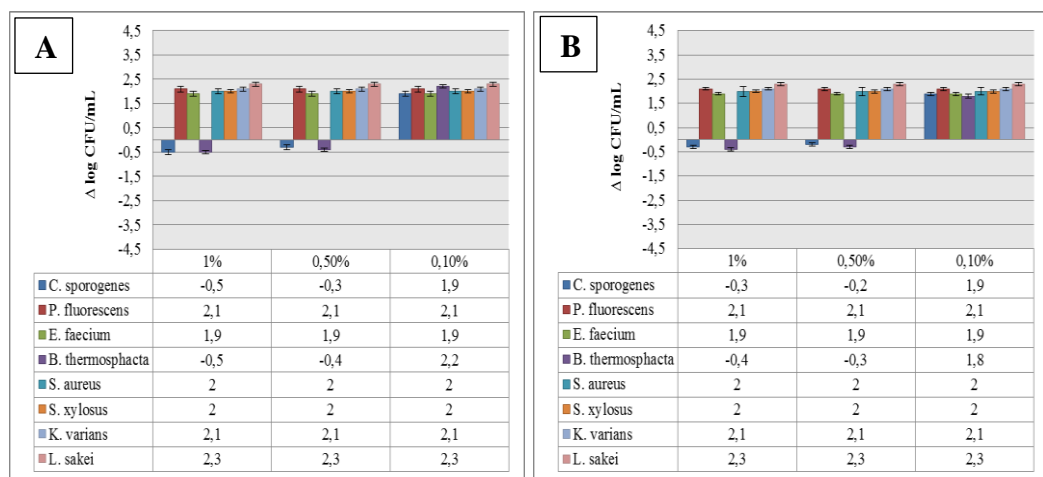


Figura 8.2A 8.2B Efficacia dell'effetto antimicrobico espresso da *Carica papaya* (A) e *Raphanus niger* (B) in brodo di carne, bassa ($\Delta\text{LOG UFC/mL} < -0,5$), moderata ($< -0,5 \Delta\text{LOG UFC/mL} < -1$) o elevata ($\Delta\text{LOG /UFC mL} > -1$).

Un quadro notevolmente differente è quello che emerge dai dati relativi all'azione e all'efficacia degli estratti di *S. Pacifica* e *M. composita* (Figure 8.3A, 8.3B). L'ampio spettro di azione esibito dai suddetti estratti è stato accompagnato da una spiccata efficacia. I due estratti hanno evidenziato la capacità di inibire la totalità dei microrganismi, sia utili sia indesiderati, anche quando impiegati alla concentrazione più bassa.

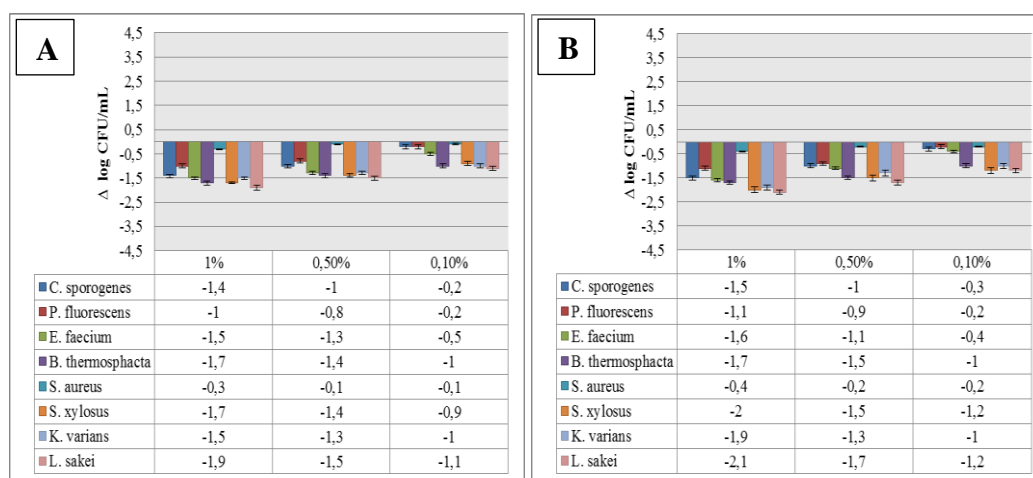


Figura 8.3A 8.3B Efficacia dell'effetto antimicrobico espresso da *Spirulina pacifica* (A) e *Medicago composita* (B) in brodo di carne, bassa ($\Delta\text{LOG UFC/mL} < -0.5$), moderata ($< -0.5 \Delta\text{LOG/UFC mL} < -1$) o elevata ($\Delta\text{LOG UFC/mL} > -1$).

In particolare è possibile apprezzare che l'effetto inibente esercitato dagli estratti nella misura dello 0,1%, rispetto a quello esibito alle concentrazioni più elevate, appare decisamente più contenuto nei confronti di *C. sporogenes*, *P. fluorescens* e *E. faecium* mentre, permane pressoché invariato, nei confronti di *B. thermosphacta* e di tutte le specie ritenute utili quali *L. sakei*, *S. xyloso* e *K. varians*.

Differente appare l'efficacia esibita dagli estratti di *R. officinalis* e *C. compositum* (Figure 8.4A e 8.4B).

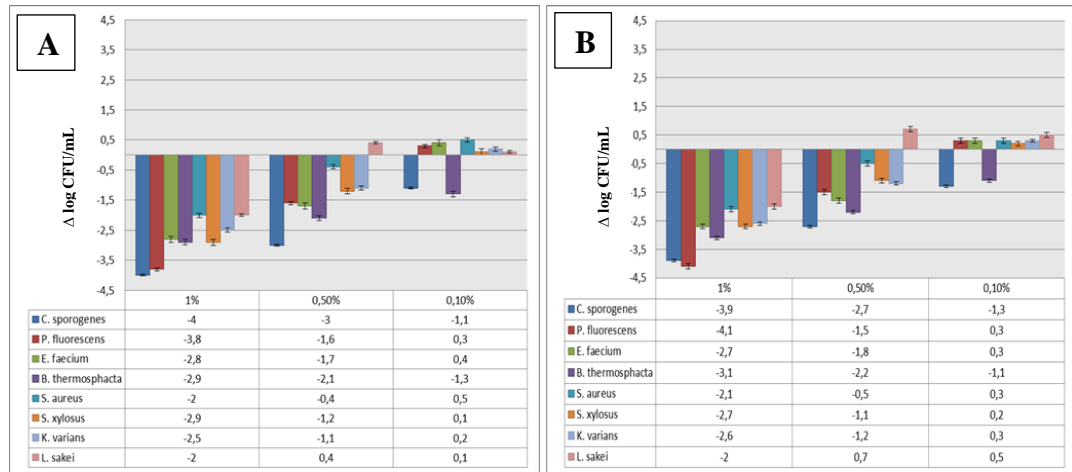


Figura 8.4A 8.4B Efficacia dell'effetto antimicrobico espresso da *Citrus compositum* (A) e *Rosmarinus officinalis*(B) in brodo di carne, bassa ($\Delta\text{LOG UFC/mL} < -0.5$), moderata ($< -0.5 \Delta\text{LOG UFC/mL} < -1$) o elevata ($\Delta\text{LOG UFC/mL} > -1$).

Tali estratti evidenziano una capacità inibente nei confronti della totalità dei microrganismi solo se impiegati in concentrazione dell'1%. In tal caso si assiste alla riduzione di circa quattro cicli logaritmici dei livelli di carica di *C. sporogenes* e di *P. fluorescens* e di oltre due cicli logaritmici per tutti gli altri microrganismi oggetto dello studio. La presenza degli estratti nella misura dello 0,5%, pur se in maniera più contenuta rispetto alla concentrazione dell'1%, ha determinato una riduzione dei livelli di carica di tutti i microrganismi tranne che per *K. varians* che ha fatto apprezzare un incremento. Infine, i due estratti, impiegati allo 0,1%, hanno fatto apprezzare efficacia solo nei confronti di *C. sporogenes* e *B. thermosphacta* per i quali è stata registrata una riduzione dei livelli di carica di oltre un ciclo logaritmico.

Degni di attenzione sono i dati relativi all'efficacia esibita dall'estratto di *M. punicifolia* (Figura 8.5). Per questo estratto l'azione inibente, pur se apprezzata nei confronti di solo tre microrganismi, quali *C. sporogenes*, *B. thermosphacta* e *P. fluorescens*; permane in misura differente anche alla più bassa concentrazione di utilizzo rappresentata dallo 0,1%. Tuttavia occorre sottolineare che l'effetto nei

confronti dei tre microrganismi appare differente. In particolare, l'inibizione nei confronti di *C. sporogenes* e *P. fluorescens* risulta particolarmente ridimensionata con il decremento della concentrazione dell'estratto; mentre l'azione verso *B. thermosphacta* permane sostanzialmente inalterata indipendentemente dalle concentrazioni utilizzate.

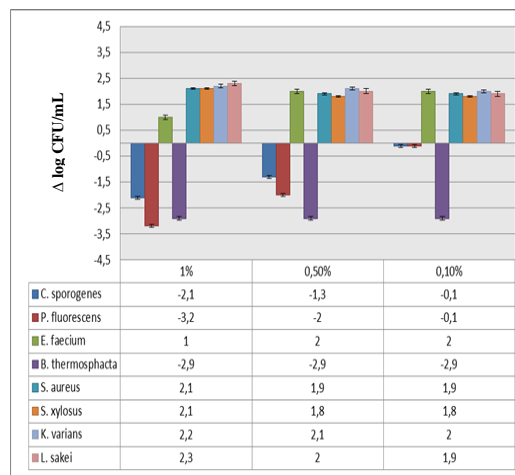


Figura 8.5 Efficacia dell'effetto antimicrobico espresso da *Malpighia punicifolia* in brodo di carne, bassa ($\Delta\text{LOG UFC/mL} < -0.5$), moderata ($-0.5 \Delta\text{LOG UFC/mL} < -1$) o elevata ($\Delta\text{LOG UFC/mL} > -1$).

8.3 EFFETTO DEGLI ESTRATTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA

L'esame dei profili elettroforetici e degli elettroferogrammi concernenti l'analisi delle proteine totali, estratte dai ceppi coltivati in assenza e in presenza di estratti naturali, ha messo in luce differenze talvolta degne di nota.

La presenza di estratti naturali nella brodocoltura, costituendo una condizione di stress per i microrganismi, determina una modifica dell'espressione proteica di quest'ultimi.

Le analisi, condotte per ogni microrganismo coltivato in assenza e/o in presenza di ciascuno degli otto estratti naturali, hanno offerto una copiosa mole di dati che, in generale, evidenzia una stretta correlazione tra l'evoluzione dei profili proteici e l'entità dell'attività antimicrobica esibita dagli estratti naturali. Per agevolare la lettura e l'interpretazione dei dati, le variazioni dei profili proteici sono state raggruppate in tre differenti macro-modalità di risposta, comuni a tutti i ceppi testati, direttamente correlabili all'intensità antimicrobica espressa dagli estratti naturali: elevata, blanda o assente.

8.3.1 ESPRESSIONE PROTEICA IN PRESENZA DI ESTRATTI FORTEMENTE INIBENTI

L'espressione proteica dei batteri coltivati in presenza di estratti naturali ad elevata attività inibente si contraddistingue generalmente per la scomparsa di proteine ad elevato e/o medio peso molecolare. E' questo il caso che accomuna l'espressione proteica dei microrganismi coltivati nelle condizioni di seguito riportate:

- *C. sporogenes* coltivato in presenza di uno degli estratti di *Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia*, *Medicago composita*, *Rosmarinus officinalis* o *Spirulina pacifica*;
- *B. thermosphacta* coltivato in presenza di uno degli estratti di *Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia*, *Rosmarinus officinalis* o di *Spirulina pacifica*;
- *E. faecium* in presenza dell'estratto di *Citrus compositum* o di *Rosmarinus officinalis*;
- *P. fluorescens* coltivato in presenza di uno degli estratti di *Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia* o *Rosmarinus officinalis*;
- *S. aureus* in presenza dell'estratto di *Rosmarinus officinalis*.

Per meglio delucidare i casi appena esposti, di seguito sarà rivolta l'attenzione ad alcuni dei profili elettroforetici e degli elettroferogrammi (Figure 8.6 - 8.12) relativi alle proteine totali di alcuni ceppi coltivati in presenza e in assenza di estratti naturali ad elevata attività antimicrobica.

In Figura 8.6 sono riportati i profili, ottenuti mediante tecnica a microfluidi, delle proteine totali estratte da brodocolture di *C. sporogenes* dopo 72 ore di incubazione in assenza (profilo 1) e in presenza (profilo 2) dell'estratto vegetale di *M. punicifolia*. I due profili evidenziano tra loro importanti differenze. In particolare la regione che comprende le bande a più alto peso molecolare fa apprezzare una più elevata concentrazione proteica nel profilo riguardante il ceppo coltivato in presenza della sostanza rispetto a quello relativo al ceppo coltivato in assenza della stessa. Differenze ancora più marcate caratterizzano la regione che comprende le bande proteiche aventi peso molecolare superiore a 50

kDa. In tale caso, si assiste alla scomparsa di tre bande nel profilo relativo al ceppo in presenza della sostanza che appaiono ben evidenti nel profilo di controllo relativo al ceppo coltivato in assenza dell'estratto.

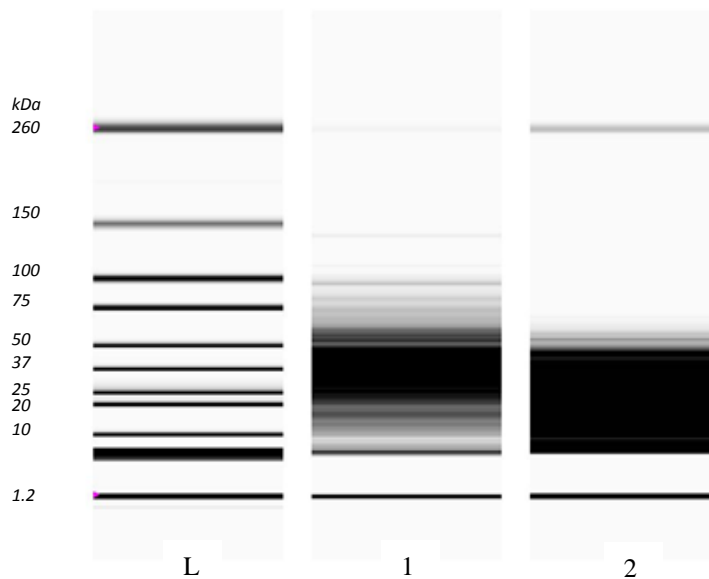


Figura 8.6 Profili delle proteine totali, ottenuti mediante Experion Pro 260 (BIORAD), del ceppi *Clostridium sporogenes* coltivati in assenza di estratto vegetale (1) e in presenza di *Malpighia punicifolia* (2.)

Le differenze appena descritte appaiono in maniera ancora più chiara dall'esame degli elettroferogrammi relativi all'analisi delle proteine estratte dai ceppi coltivati in assenza ed in presenza della sostanza (Figura 8.7). Dagli elettroferogrammi è possibile infatti apprezzare, nella regione che comprende le proteine a più basso peso molecolare, la presenza di medesimi picchi; tuttavia occorre evidenziare un'area nettamente più elevata per i picchi caratterizzanti il ceppo coltivato in assenza di estratto naturale.

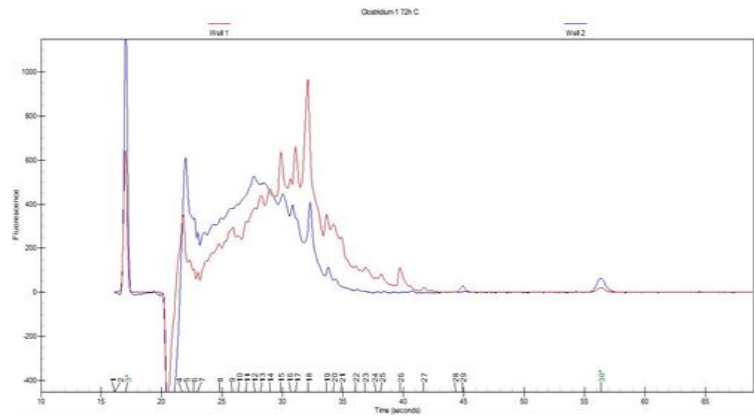


Figura 8.7 Comparazione di Elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Clostridium sporogenes* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Malpighia punicifolia* (-----).

Differenze di maggiore rilievo, tra i due elettroferogrammi, sono state riscontrate tra il trentaseiesimo e il cinquantesimo secondo di migrazione, epoca che corrisponde alla separazione delle proteine a più elevato peso molecolare. In tale regione, com'è possibile apprezzare dal dettaglio riportato in Figura 8.7, l'elettroferogramma relativo alla brodocoltura di controllo (*C. sporogenes* con assenza di estratto) ha fatto registrare la presenza di una serie di 5 picchi che risultano completamente assenti nell'elettroferogramma relativo al ceppo coltivato in presenza dell'estratto vegetale.

Un'espressione proteica sostanzialmente simile a quella appena descritta, è stata apprezzata anche quando il ceppo di *C. sporogenes* è stato coltivato in presenza degli altri composti naturali ad elevata attività inibente quali *Citrus compositum*, *Medicago composita*, *Rosmarinus officinalis* o *Spirulina pacifica*. In tutti i casi, infatti, sia i profili elettroforetici sia gli elettroferogrammi (dati non riportati) hanno fatto apprezzare la scomparsa di proteine ad elevato peso molecolare negli

estratti proteici dei ceppi coltivati in presenza degli estratti naturali, proteine che, invece, erano costantemente presenti negli estratti proteici relativi al ceppo coltivato in assenza di estratti. Una situazione sostanzialmente analoga a quella evidenziata per *C. sporogenes* caratterizza anche *B. thermosphacta* in presenza di estratti naturali che ne hanno condizionato fortemente la crescita. Come è possibile apprezzare nel dettaglio del relativo elettroferogramma (Figura 8.8) la presenza di sostanze fortemente inibenti, nello specifico *Citrus compositum*, ha determinato la scomparsa di 6 picchi compresi tra il 35° e il 45° secondo di migrazione che invece risultano ben evidenti nell'elettroferogramma relativo all'estratto proteico ottenuto dal ceppo coltivato in assenza di estratti naturali.

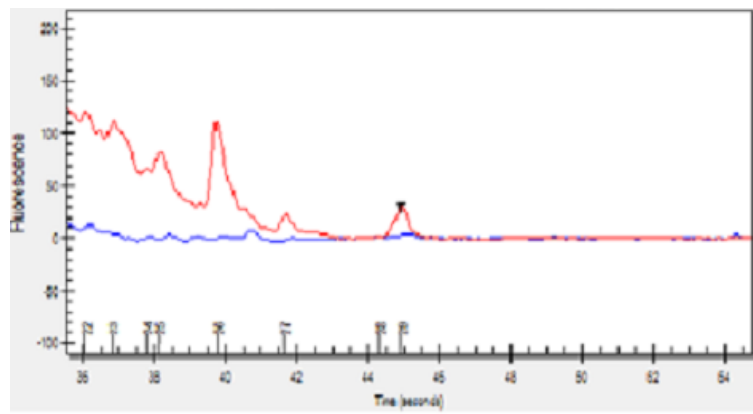


Figura 8.8 Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Brochotrix thermosphacta* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Citrus compositum* (-----).

Variazioni di rilievo hanno caratterizzato anche l'espressione proteica di *E. faecium* qualora sia stato coltivato in presenza di estratti naturali, quali *Citrus compositum* o *Rosmarinus officinalis*, che inibiscono vigorosamente la sua crescita.

Nelle Figure 8.9 e 8.10 sono riportati rispettivamente i profili e gli elettroferogrammi delle proteine totali estratte da brodo-culture di *E. faecium* dopo 72 ore di incubazione in assenza (profilo 1-Figura 8.9-, elettroferogramma rosso –Figura 8.10-) e in presenza (profilo 2-Figura 8.9, elettroferogramma blu – Figura 8.10) dell'estratto vegetale di *R. officinalis*.

Dall'esame dei profili elettroforetici è possibile apprezzare che nel profilo relativo alle proteine estratte dalla brodocoltura addizionata dell'estratto vegetale scompare una banda avente peso molecolare compreso tra 100 e 150 KDa che, invece, appare ben evidente nel profilo relativo alle proteine estratte dalla brodocoltura priva dell'estratto vegetale.

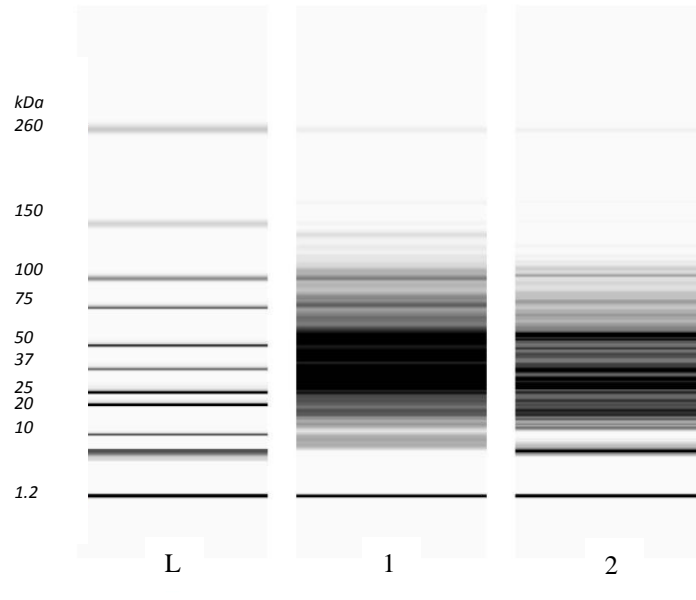


Figura 8.9 Profili delle proteine totali, ottenuti mediante Experion Pro 260 (BIORAD-), di ceppi *Enterococcus faecium* coltivati in assenza di estratto vegetale (1) e in presenza di *Rosmarinus officinalis* (2).

La variazione del corredo proteico caratterizzante la brodocoltura in presenza dell'estratto vegetale è ben apprezzabile dall'analisi degli elettroferogrammi (Figura 8.10). In particolare è possibile apprezzare che l'elettroferogramma relativo alle proteine estratte dalla brodo-coltura di controllo (senza sostanza vegetale) è in possesso di un picco compreso tra il 44° e il 45° secondo di migrazione; picco che è assente all'interno dell'elettroferogramma caratterizzante l'estratto proteico ottenuto dalla brodocoltura addizionata di *Rosmarinus officinalis*.

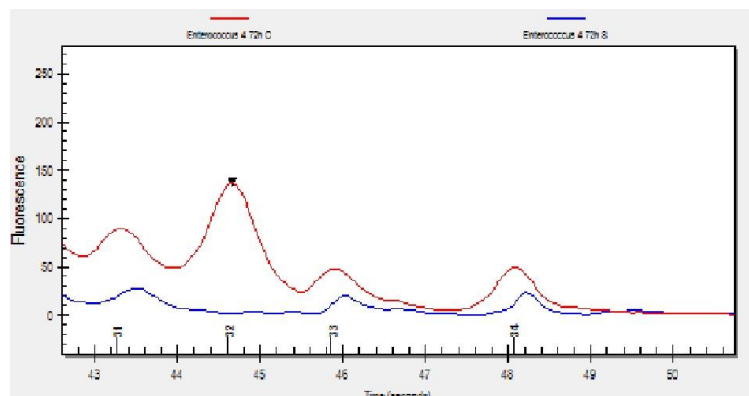


Figura 8.10 Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (*Experion Pro 260 – BIORAD-*), di proteine totali del ceppo di *Enterococcus faecium* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Rosmarinus officinalis* (-----).

Per quanto concerne *P. fluorescens* i risultati evidenziano che la presenza di estratti (*Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia* e *Rosmarinus officinalis*) in grado di inibire la sua crescita ha determinato una variazione, pur se più lieve rispetto a quelle evidenziate per i precedenti ceppi, nell'espressione del profilo proteico. In dettaglio, dalla comparazione degli elettroferogrammi delle proteine totali, estratte da brodoculture di *P. fluorescens* dopo 72 ore di incubazione in

assenza (elettroferogramma rosso – Figura 8.11) e in presenza (elettroferogramma blu – Figura 8.11) dell’estratto di *C. compositum*, è possibile apprezzare differenze nella regione compresa tra il 28° e il 33° secondo di migrazione. Nello specifico, l’elettroferogramma relativo alle proteine provenienti dal ceppo coltivato in presenza dell’estratto naturale ha evidenziato, rispetto all’elettroferogramma di controllo, il decremento di due picchi, migrati rispettivamente al 28° e al 31° secondo, e la netta scomparsa di un picco corrispondente al 33° secondo di migrazione.

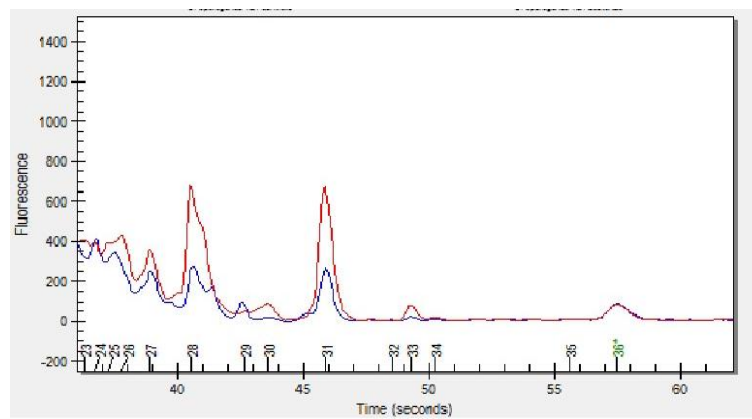


Figura 8.11 Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall’analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Pseudomonas fluorescens* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *C. compositum* (-----).

Medesime variazioni nell’espressione del profilo proteico da parte di tale microrganismo sono state riscontrate anche quando coltivato in presenza di altri due estratti, quali *Malpighia punicifolia* e *Rosmarinus officinalis*, aventi un’elevata attività inibente sulla sua crescita.

Inoltre l’estratto di *R. officinalis*, unico tra quelli saggiati in grado di inibire fortemente *S. aureus*, ha determinato la mancata espressione di una proteina

all'interno del profilo proteico di tale ceppo. Situazione apprezzabile con la scomparsa sia di una banda sia di un picco all'interno dei relativi profili elettroforetici ed elettroferogrammi. Infatti, come è possibile apprezzare dalla Figura 8.12, l'elettroferogramma relativo all'estratto proteico del ceppo coltivato in presenza di *R. officinalis* mostra l'assenza di un picco che invece appare ben evidente nell'elettroferogramma di controllo, relativo a *S. aureus* coltivato in assenza di estratto vegetale, nella regione compresa tra il 42° e il 43° secondo di migrazione.

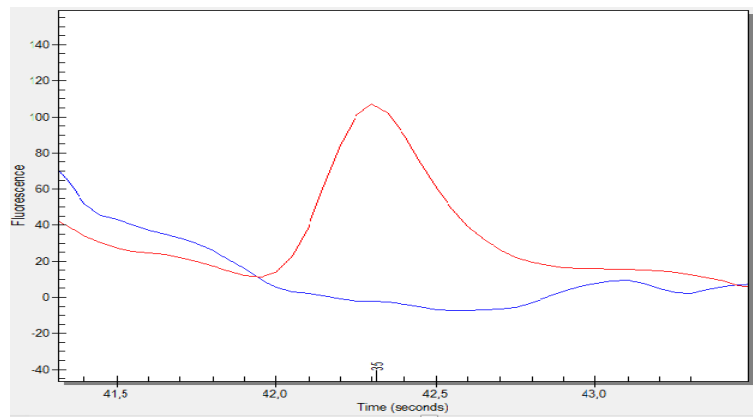


Figura 8.12. Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (*Experion Pro 260 –BIORAD-*), di proteine totali del ceppo di *Staphylococcus aureus* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *R. officinalis* (-----).

8.3.2 ESPRESSIONE PROTEICA IN PRESENZA DI ESTRATTI RALLENTANTI LO SVILUPPO

MICROBICO

Gli estratti naturali, qualora esercitino un'azione di rallentamento ma non di completa inibizione sulla crescita dei microrganismi, determinano una particolare espressione proteica da parte di questi ultimi che si manifesta con la “nuova”

espressione di una o più proteine. Tale situazione caratterizza i microrganismi coltivati nelle condizioni di seguito riportate:

- *C. sporogenes* coltivato in presenza di uno dei seguenti estratti: *Carica papaya*, *Propolis* e *Raphanus niger*;
- *B. thermosphacta* coltivato in presenza di uno dei seguenti estratti: *Medicago composita*, *Propolis* e *Raphanus niger*;
- *E. faecium* in presenza degli estratti di *Malpighia punicifolia* e di *Medicago composita*;
- *P. fluorescens* coltivato in presenza dell'estratto di *Medicago composita*;
- *S. aureus* coltivato in presenza dell'estratto di *Malpighia punicifolia* o di *Medicago composita*.

Tali scenari sono ben evidenziati dai dati che emergono dai profili elettroforetici e dagli elettroferogrammi di seguito riportati.

C. sporogenes quando coltivato in presenza degli estratti di *C. papaya*, di *Propolis* o di *R. niger*, come si è potuto evincere anche dalle prove condotte in brodo di carne, evidenzia un rallentamento della crescita senza subire una vera e propria inibizione. Tale fenomeno è accompagnato da una particolare espressione del profilo proteico che vede la presenza di proteine di neoformazione nella regione a più elevato peso molecolare. In particolare come si può apprezzare dalla Figura 8.12 nell'elettroferogramma relativo all'estratto proteico del ceppo coltivato in presenza di *R. niger* sono presenti due picchi, al 49° e 51° secondo di migrazione, che risultano assenti nell'elettroferogramma dell'estratto proteico relativo al ceppo coltivato in assenza dell'estratto naturale. La presenza dei medesimi picchi contraddistingue anche gli elettroferogrammi relativi agli estratti

proteici derivanti dai ceppi di *C. sporogenes* coltivati in presenza degli estratti di *C. papaia* e di Propolis.

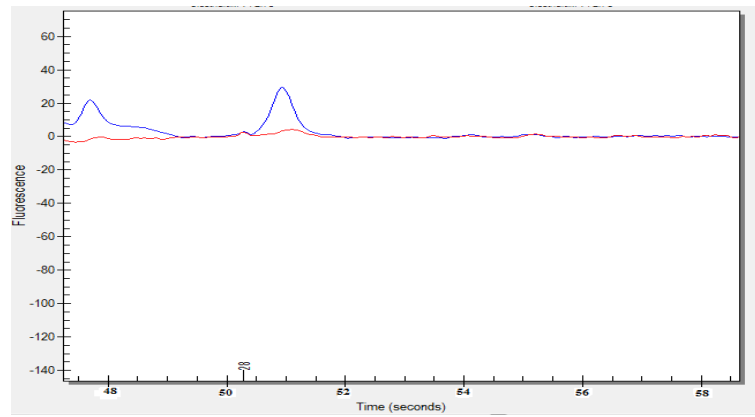


Figura 8.12 Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Clostridium sporogenes* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Raphanus niger* (-----).

Una simile variazione nell'espressione proteica è stata evidenziata anche per il ceppo di *B. thermosphacta* coltivato in presenza di uno dei seguenti estratti *M. composita*, *Propolis* o *R. niger*. In tutti i casi si assiste alla neo-espressione di una proteina avente peso molecolare di circa 200 kDa. Risultato che appare evidente dalla comparazione degli elettroferogrammi relativi alle proteine totali del ceppo di *B. thermosphacta* coltivato in assenza di estratto e in presenza di *M. composita* (Figura 8.13). In particolare, l'elettroferogramma relativo all'estratto proteico del ceppo coltivato in presenza di *M. composita* è contraddistinto dalla presenza di un picco, in corrispondenza del 59° secondo di migrazione, che appare completamente assente nell'elettroferogramma relativo all'estratto proteico del ceppo coltivato in assenza dell'estratto naturale.

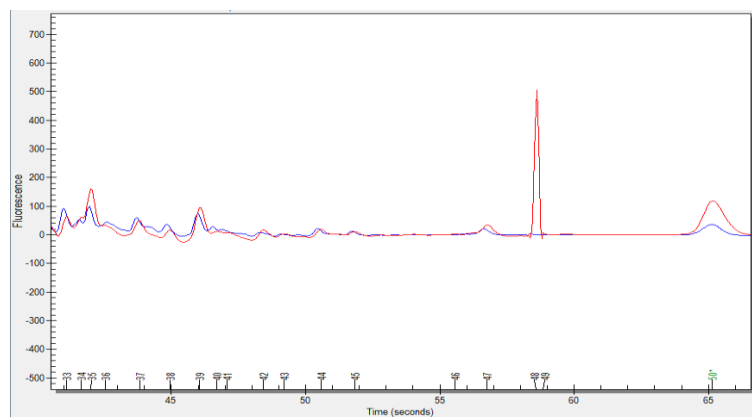


Figura 8.13. Dettaglio della comparazione di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Brochotrix thermosphacta* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Medicago composita* (-----).

L'espressione di una proteina di neo-formazione è stata riscontrata anche nel profilo proteico relativo al ceppo di *E. faecium* coltivato in presenza dell'estratto di *M. puniceifolia* e di *M. composita*. In particolare, in questi casi (dati non riportati) si assiste all'espressione di una proteina avente peso molecolare di circa 120 kDa che risulta assente qualora il ceppo venga coltivato in assenza di estratti. Relativamente all'evoluzione della componente proteica di *P. fluorescens* in presenza di *M. composita*, estratto che ha prodotto solo una parziale inibizione nella fase iniziale di incubazione, è possibile apprezzare la neo-espressione di una proteina di superiore a 200 kDa e di serie di tre proteine comprese tra 100 e 150 kDa (Figura 8.14). Tale risultato trova riscontro anche nella comparazione degli elettroferogrammi (figura 8.15). Infatti, all'interno dell'elettroferogramma relativo alle proteine totali del ceppo coltivato in presenza dell'estratto naturale è possibile osservare la presenza di un picco migrato al 49° secondo e di una serie di picchi tra il 42° e il 45° secondo di migrazione; picchi che mancano del tutto o che presentano un'area nettamente inferiore nell'elettroferogramma relativo alle

proteine estratte dalla brodo-coltura che non prevedeva la presenza dell'estratto vegetale.

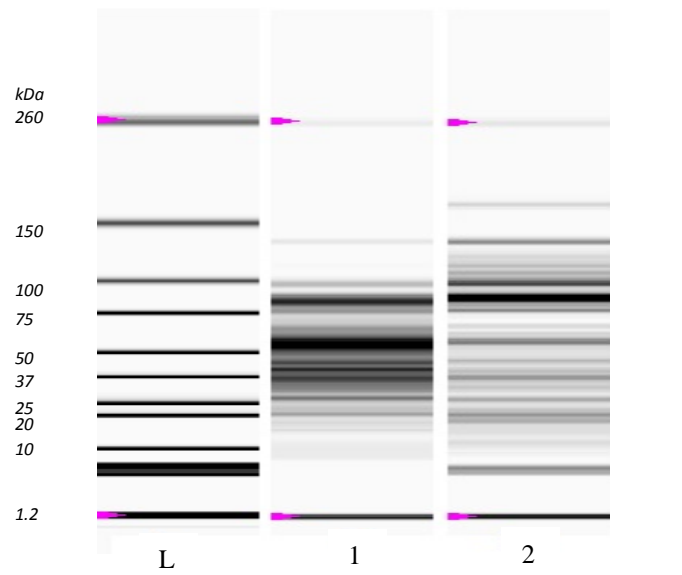


Figura 8.14. Profili delle proteine totali, ottenuti mediante Experion Pro 260 (BIORAD-), di ceppi di *Pseudomonas fluorescens* coltivati in assenza di estratto vegetale (1) e in presenza di *Medicago composita* (2).

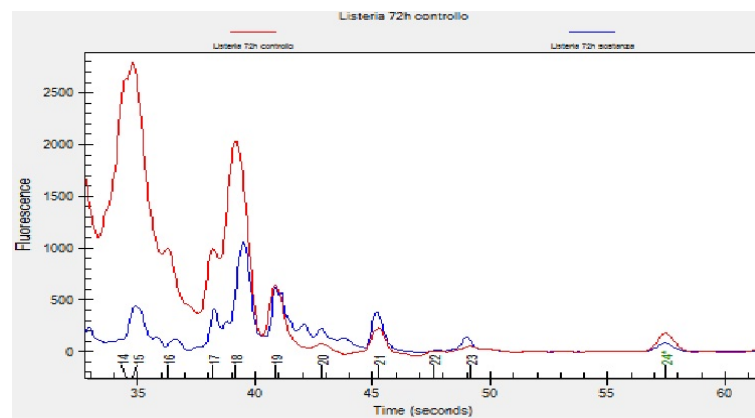


Figura 8.14 Dettaglio della comparazione della fase finale di elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Pseudomonas fluorescens* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Medicago composita* (-----).

S. aureus coltivato in presenza di uno degli estratti, quali *M. puniceifolia* o *M. composita*, che hanno determinato un rallentamento della sua crescita ma non

una completa inibizione, manifesta la neo-espressione di una proteina avente peso molecolare superiore di circa 250 kDa.

Dalla Figura 8.15 è possibile apprezzare che il profilo elettroforetico relativo alle proteine estratte dal ceppo coltivato in presenza di *M. composita* è caratterizzato dalla presenza di una ulteriore banda, pur se appena evidente, avente peso molecolare superiore a 150 kDa.

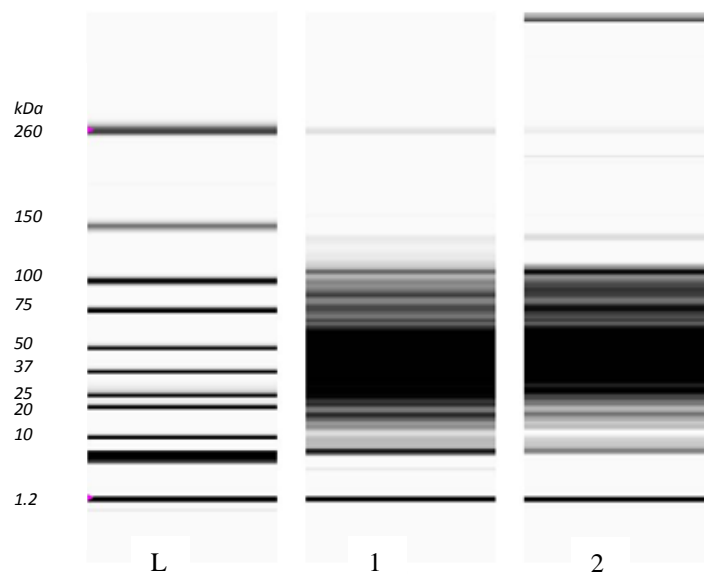


Figura 8.15 Profili delle proteine totali, ottenuti mediante Experion Pro 260 (BIORAD), del ceppo di *Staphylococcus aureus* coltivati in assenza di estratto vegetale (1) e in presenza di *Medicago composita* (2).

Tale risultato appare maggiormente evidente dall'esame degli elettroferogrammi (Figura 8.16). Infatti, all'interno dell'elettroferogramma relativo alle proteine totali del ceppo coltivato in presenza dell'estratto naturale, è possibile osservare la presenza di un picco, con tempo di migrazione pari a 54 secondi, che manca nell'elettroferogramma relativo alle proteine estratte dalla brodocoltura che non prevedeva la presenza dell'estratto vegetale.

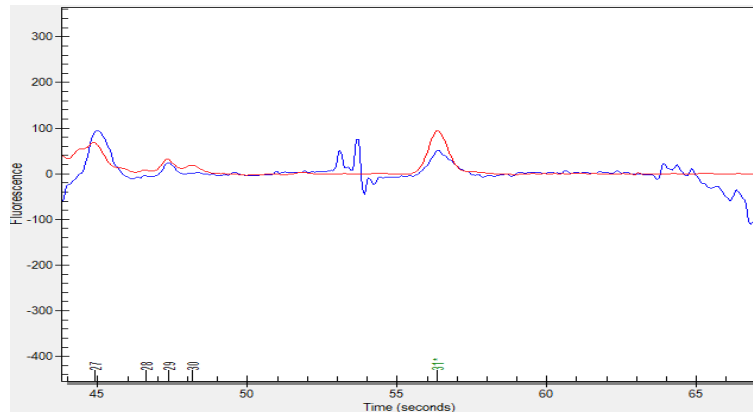


Figura 8.16 Comparazione di Elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *Staphylococcus aureus* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Medicago composita* (-----).

8.3.3 ESPRESSIONE PROTEICA IN PRESENZA DI ESTRATTI NON INIBENTI

I profili elettroforetici e gli elettroferogrammi evidenziano che non si assiste a nuove espressioni proteiche qualora i ceppi siano coltivati in presenza di estratti naturali privi di attività inibente. In tal caso le diverse condizioni colturali, in assenza o in presenza degli estratti naturali, sono associate a profili proteici caratterizzati da elettroferogrammi e profili elettroforetici perfettamente sovrapponibili. Per citare solo qualche caso, rappresentativo è quello caratterizzante l'espressione di *K. varians* in presenza e in assenza dell'estratto di *M. puniceifolia*. Infatti, i profili degli estratti proteici (Figura 8.17) relativi alle brodocolture di *K. varians* in assenza (profilo 1) e presenza della sostanza vegetale (profilo 2) hanno fatto apprezzare una medesima distribuzione delle bande proteiche in termini sia qualitativi, sia quantitativi.

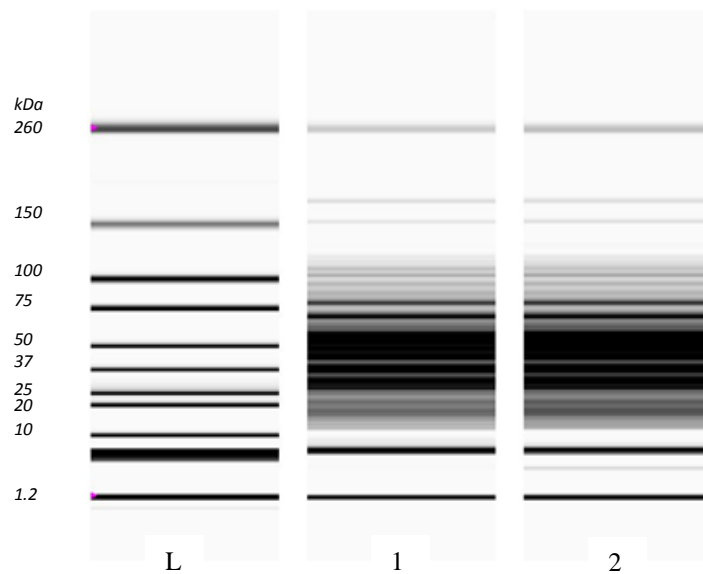


Figura 8.17 Profili delle proteine totali, ottenuti mediante Experion Pro 260 (BIORAD), del ceppo di *Kocuria varians* coltivato in assenza di estratto vegetale (1) e in presenza di *Malpighia punicifolia* (2).

L'elevata similarità dei due profili proteici si evince anche dall'analisi degli elettroferogrammi. Infatti, com'è possibile apprezzare in Figura 8.18, gli elettroferogrammi relativi agli estratti proteici derivanti dalle due brodocolture oggetto dello studio sono tendenzialmente simili e sovrapponibili, non si registrano differenze degne di nota inerenti l'area dei picchi e il tempo di migrazione delle bande proteiche.

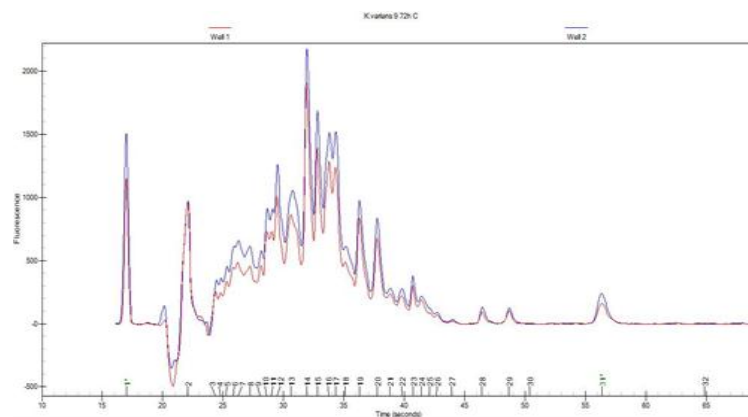


Figura 8.18 Comparazione di Elettroferogrammi ottenuti dall'analisi, mediante tecnica dei microfluidi (Experion Pro 260 –BIORAD-), di proteine totali del ceppo di *K. varians* coltivato in assenza di estratto vegetale (-----) e in presenza di *Malpighia punicifolia* (-----).

8.4 FORMULAZIONE E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO *IN VITRO* DELLA MISCELA DI ESTRATTI NATURALI

L'integrazione (Tabella 8.2) dei risultati relativi all'attività antimicrobica, in particolare quelli relativi allo spettro e all'efficacia di azione, nonché quelli inerenti l'effetto sull'espressione proteica, hanno permesso di condurre all'individuazione di estratti candidabili a far parte della formulazione di una miscela complessa.

Tabella 8.2 *Principali caratteristiche esibite dagli estratti naturali oggetto dello studio.*

<i>Estratto naturale</i>	Efficacia	Inibizione indesiderati	Inibizione utili	Induzione di stress permanente ²	Induzione di stress reversibile ¹
<i>C. papaya</i>	Bassa*	Parziale	Assente	Assente	Presente
<i>C. compositum</i>	Alta*	Totale	Parziale	Presente	Assente
<i>M. puniceifolia</i>	Alta	Parziale	Assente	Presente	Variabile
<i>M. composita</i>	Alta	Totale	Totale	Presente	Presente
<i>Propolis</i>	Bassa	Parziale	Parziale	Assente	Presente
<i>R. niger</i>	Bassa	Parziale	Parziale	Assente	Presente
<i>R. officinalis</i>	Alta	Totale	Parziale	Presente	Assente
<i>S. pacifica</i>	Alta	Totale	Totale	Presente	Assente

**in verde sono riportati i caratteri auspicabili, *in rosso i caratteri indesiderati*

Integrando tali risultati e privilegiando le condizioni di più elevata efficacia e di mancata azione nei confronti dei microrganismi ritenuti utili sono stati individuati gli estratti provenienti da *C. compositum*, *R. officinalis* e *M. puniceifolia*. Infatti l'estratto di *M. puniceifolia* mostra un'azione antimicrobica selettiva inibendo con una elevata efficacia la totalità dei ceppi tipo saggiati e ascrivibili alle specie ritenute indesiderate. Gli altri due estratti, pur mostrando un ampio spettro che alle concentrazioni più elevate coinvolge anche i microrganismi virtuosi, quando

² La situazione di stress reversibile o permanente si riferisce alla capacità da parte del ceppo di reagire alla presenza della sostanza inibente. Capacità che caratterizza la situazione di stress reversibile e si manifesta, come esposto nei paragrafi precedenti, con una crescita microbica solo inibita e la neo-espressione di nuove proteine. Nella situazione di stress permanente la crescita è fortemente inibita e la componente proteica si caratterizza per la non espressione di una o più proteine.

impiegati in basse concentrazioni (0,1%) fanno apprezzare una buona efficacia nei confronti dei ceppi ascrivibili alle specie indesiderate senza interferire sulla crescita degli utili. Sulla base di tali evidenze è stata formulata la miscela di estratti vegetali denominata NC³.

8.4.1 EFFETTO DELLA MISCELA SULLO SVILUPPO DEI PRINCIPALI MICRORGANISMI

I risultati relativi all'evoluzione delle cariche microbiche "in vitro", nei confronti dei differenti ceppi tipo, indesiderati e virtuosi, nonché verso i ceppi di *L. sakei*, *S. xylosus* e *K. varians* isolati da insaccati fermentati, hanno offerto delle prime e chiare informazioni in merito alla validità e all'efficacia della miscela.

Relativamente ai ceppi ascrivibili alle specie ritenute indesiderate emerge che la miscela ha esibito un'azione degna di nota soprattutto nei confronti di *C. sporogenes*, *B. thermosphacta* e *P. fluorescens*; mentre evidenzia un effetto inibente decisamente ridimensionato nei confronti dei ceppi di *E. faecium* e *S. aureus*. Questi ultimi due hanno mostrato scarsa sensibilità indipendentemente dalle dosi in cui la miscela è stata impiegata. Infatti, anche quando la miscela è stata impiegata in concentrazione dell'1%, è stato apprezzato per entrambi i ceppi soltanto un leggero contenimento nella fase iniziale senza assistere ad una azione inibente vera e propria. Situazione evidenziata da un andamento delle cariche (dati non riportati) sostanzialmente costante nella fase iniziale seguito da un'evoluzione lievemente crescente.

³ La concentrazione di impiego di tali composti e il rapporto tra di essi è dato non pubblicabile in quanto oggetto di brevetto europeo richiesto da parte del consorzio NOCHEMFOOD® e in corso di approvazione.

Degni di attenzione sono i dati che si riferiscono alla valutazione dell'effetto della miscela nei confronti degli altri due Gram-positivi indesiderati quali *C. sporogenes* e *B. thermosphacta*.

La crescita di *C. sporogenes* è fortemente inibita dalla presenza della miscela NC; tuttavia com'è possibile apprezzare dalla Figura 8.19 la sensibilità di tale microrganismo è fortemente influenzata dalla concentrazione della sostanza. La presenza della miscela alle più elevate concentrazioni (1%) determina un effetto quasi equivalente a quello espresso dai nitriti (NO₂). In tal caso la miscela rispetto ai nitriti ha fatto apprezzare un'azione inibente meno tempestiva, tuttavia consente di raggiungere il medesimo risultato di tali sali dopo 72 ore di incubazione. L'effetto determinato dalla miscela impiegata nella misura dello 0,5%, pur risultando lievemente più blando, si discosta di poco rispetto a quello prodotto dalla miscela impiegata all'1%. Infatti, eccetto per la fase iniziale, tale concentrazione, come si può apprezzare dalla Figura 8.19, ha determinato un andamento decrescente della popolazione di *C. sporogenes* caratterizzato da una pendenza non inferiore a quella caratterizzante l'andamento determinato dalla miscela impiegata alla concentrazione più elevata.

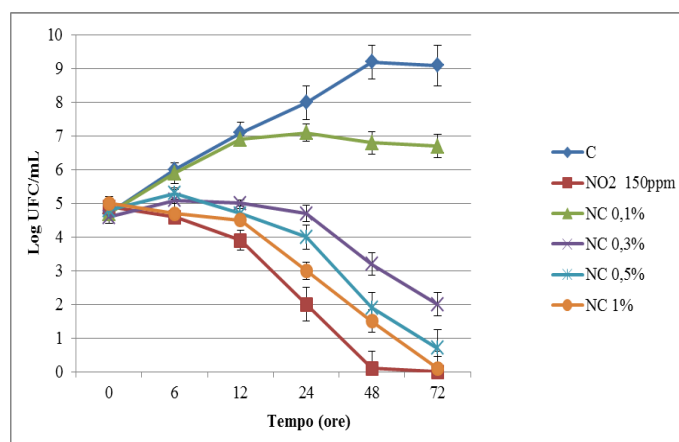


Figura 8.19 Crescita di *C. sporogenes* in presenza di nitriti (NO₂) e di miscela NC a differenti concentrazioni.

Condizione che in entrambi i casi ha consentito la riduzione dei livelli di carica di tale microrganismo di oltre quattro cicli logaritmici. La miscela impiegata nella concentrazione dello 0,3%, pur determinando un andamento decrescente di *C. sporogenes*, al termine del periodo d'incubazione ha prodotto una diminuzione dei livelli di carica di circa 3 cicli logaritmici; mentre nei casi precedenti il decremento è risultato essere superiore a 4 cicli logaritmici.

L'effetto inibente da parte della sostanza non ha assunto entità degna di nota nel caso in cui la miscela è stata impiegata nella misura dello 0,1%. In tal caso, infatti, l'andamento di *C. sporogenes* è più simile a quello evidenziato nel controllo.

L'attività inibente da parte della miscela NC è stata evidenziata anche nei confronti di *B. thermosphacta* (Figura 8.20). Impiegata nella misura dell'1% ha consentito, dopo 72 ore di incubazione, una riduzione della carica di tale microrganismo di circa 1 ciclo logaritmico. Riduzione sicuramente inferiore rispetto a quella prodotta dall'impiego dei nitriti (2 cicli logaritmici) ma sicuramente degna di nota.

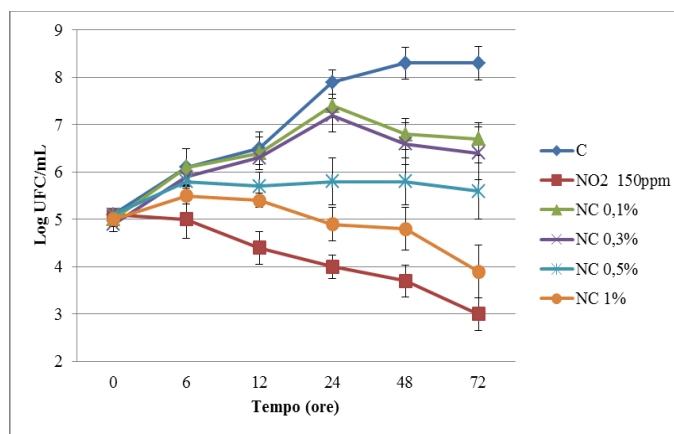


Figura 8.20 Crescita di *B. thermosphacta* in presenza di nitriti (NO_2) e di miscela NC a differenti concentrazioni.

L'impiego della miscela alle altre concentrazioni considerate ha determinato un sostanziale contenimento delle cariche di *B. thermosphacta* ma non una vera e propria inibizione. Contenimento che tuttavia è risultato più evidente qualora la miscela sia stata impiegata ad una concentrazione pari allo 0,5%.

Meritevole di attenzione è l'effetto determinato da parte della miscela nei confronti del Gram-negativo rappresentato dal ceppo di *P. fluorescens* (Figura 8.21). Pur se lievemente inferiore e meno tempestiva rispetto a quella fatta registrare da parte dei nitriti, l'azione prodotta dalla sostanza impiegata nella misura dello 0,5% e dell'1%, ha determinato una buona inibizione di *P. fluorescens* facendo apprezzare al termine del periodo di incubazione valori simili a quelli prodotti dall'impiego dei nitriti.

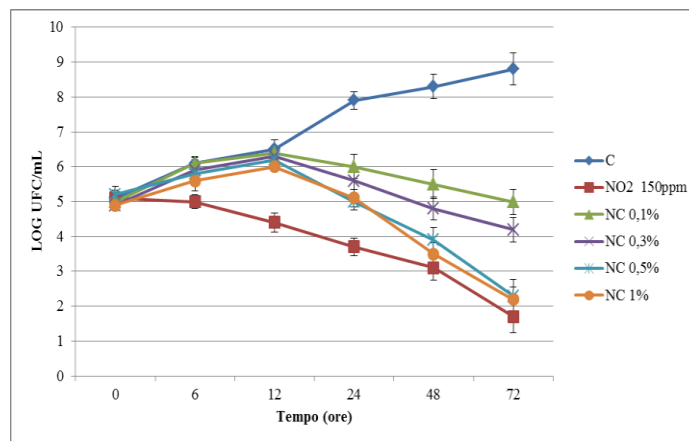


Figura 8.20 Crescita di *P. fluorescens* in presenza di nitriti (NO_2) e di miscela NC a differenti concentrazioni.

Meno pronunciato e poco tempestivo è apparso l'effetto inibitorio prodotto dalla sostanza utilizzata nella concentrazione dello 0,1% e 0,3%.

Nei confronti dei ceppi ascrivibili alle specie utili non è stato prodotto alcun effetto da parte della miscela. In particolare sia il ceppo tipo sia i differenti ceppi di *L. sakei* isolati da insaccati fermentati non hanno evidenziato alcuna sensibilità

nei confronti della sostanza. Addirittura in alcuni casi è stata apprezzata una crescita superiore rispetto a quella riscontrata in presenza dei nitriti. Assenza di sensibilità alla miscela è l'elemento caratterizzante anche i ceppi, sia ceppi tipo sia isolati da insaccati fermentati, ascrivibili a *S. xylosus* e a *K. varians*. Infatti, tali microrganismi, in presenza della miscela, indipendentemente dalle concentrazioni impiegate, hanno fatto apprezzare un andamento crescente sostanzialmente sovrapponibile a quello del controllo.

8.5 INDIVIDUAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI UTILIZZO E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA MISCELA *IN SITU*

La concentrazione della miscela da utilizzare nella preparazione di insaccati fermentati è stata individuata dall'integrazione dei risultati relativi all'azione inibente e all'efficacia prodotta da parte della miscela nei confronti dei differenti microrganismi indesiderati. Inoltre tale individuazione ha privilegiato i seguenti aspetti di cui deve essere in possesso la miscela:

- interferire il meno possibile sulla componente aromatica;
- incidere il meno possibile sui costi di produzione per l'azienda utilizzatrice.

Condizioni che, considerate nel loro insieme (Tabella 8.3) hanno condotto all'individuazione della concentrazione che al tempo stesso permetteva una buona inibizione nei confronti dei microrganismi indesiderati senza interferire sugli utili e nel contempo rispondeva alle esigenze di mercato e sensoriali.

Tabella 8.3 *Principali caratteristiche della miscela NC considerate per la scelta della concentrazione.*

Concentrazione della miscela	Inibizione indesiderati	Inibizione utili	Impatto economico	Impatto sensoriale
0,1%	Bassa	Assente	Basso	Assente
0,3%	Moderata	Assente	Basso	Assente
0,5%	Buona	Assente	Medio-Basso	Assente
1%	Ottima	Assente	Medio-Alto	Dubbio

**in verde sono riportati i caratteri auspicabili, *in rosso i caratteri indesiderati*

La concentrazione dello 0,5% risultava rispondere al meglio alla totalità delle esigenze considerate in maniera integrata. Pertanto la miscela di estratti naturali NC è stata utilizzata in concentrazione dello 0.5% per la produzione in scala pilota di insaccati carnei fermentati. La sua efficacia è stata valutata comparando i risultati chimico-fisici e microbiologici determinati dal suo impiego, singolo (NC) o in combinazione con i nitrati e nitriti (NC+NN) con quelli attribuibili all'aggiunta di nitrati e nitriti (NN).

8.5.1 EVOLUZIONE DEI PRINCIPALI PARAMETRI MICROBIOLOGICI

L'evoluzione dei microrganismi utili ed indesiderati nei differenti lotti offre utili informazioni in merito al livello di efficacia della miscela NC.

In generale appare evidente che i microrganismi di interesse tecnologico non sembrano essere influenzati né dalla presenza dei nitriti e nitrati né da quella della miscela di estratti naturali. Per quanto concerne i microrganismi indesiderati occorre innanzitutto constatare che le cariche di *Clostridium* spp. sono risultate irrilevabili per tutti i campioni durante l'intero periodo di stagionatura. Inoltre, relativamente agli altri microrganismi indesiderati la miscela impiegata singolarmente o in combinazione con i nitrati permette una inibizione

sostanzialmente simile o, in taluni casi, di poco inferiore a quella determinata dalla presenza dei nitrati e nitriti.

In dettaglio di seguito sono riportate le evoluzioni dei principali microbiologici utili e indesiderati nel processo che popolano l'insaccato fermentato.

I batteri lattici "LAB" hanno rappresentato il gruppo microbico maggiormente presente durante l'intero periodo di stagionatura e hanno mostrato un andamento sostanzialmente simile nella totalità dei lotti (Figura 8.21). I lotti preparati con l'impiego della miscela NC, come i restanti lotti, hanno evidenziato un'evoluzione positiva delle cariche dei LAB che, da un valore iniziale di circa 5,7 log UFC/g, si sono attestate ad un valore finale di circa 8,1 log UFC/g, facendo registrare un rapido incremento soprattutto nelle prime fasi.

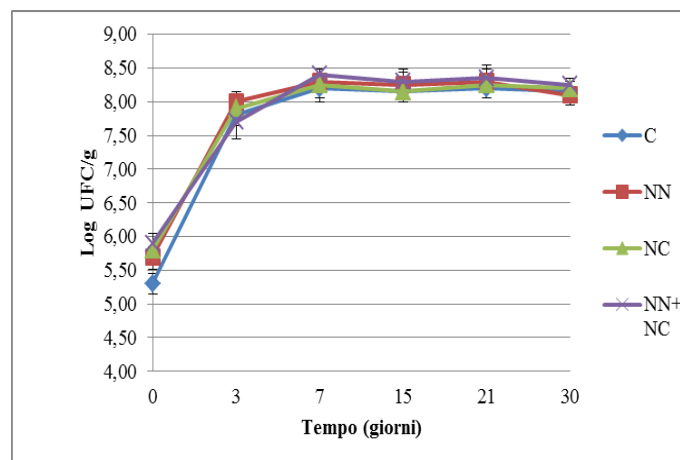


Figura 8.21 Andamento delle cariche nel tempo dei batteri lattici (LAB) durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Le cariche dei **micrococchi-stafilococchi "CNC"** (Figura 8.22), da un valore iniziale di circa 4 log/UFC/g, hanno mostrato in tutti i lotti un pronto incremento durante la prima fase di stagionatura, attestandosi al 15° giorno intorno a valori compresi tra 5 log UFC/g e 6 log UFC/g. Dopo il quindicesimo giorno di

stagionatura, si assiste ad un lieve decremento delle cariche per tutti i campioni indipendentemente dal lotto di provenienza. Tuttavia è degno di nota l'elemento di differenza che contraddistingue il lotto NN+NC, i campioni provenienti da tale lotto durante l'intero periodo di stagionatura hanno evidenziato livelli di carica costantemente maggiori rispetto a quelli riscontrati nei campioni provenienti dagli altri lotti.

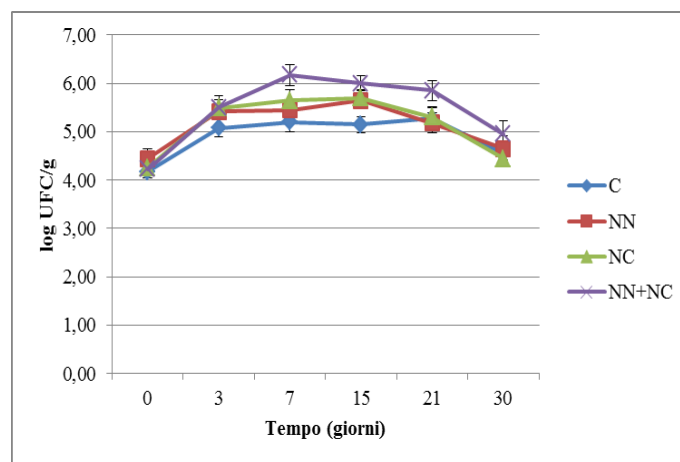


Figura 8.22 Andamento delle cariche nel tempo dei micrococchi-stafilococchi (CNC) durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Brochothrix thermosphacta in tutti i campioni ha fatto apprezzare un sensibile decremento durante l'intero periodo di maturazione (Figura 8.23). I livelli di carica da valori iniziali di circa 4,3 Log UFC/g si sono attestati al trentesimo giorno di maturazione intorno a valori compresi tra 1,2 e 1,4 log UFC/g. Pur mostrando un andamento simile, differiscono dagli altri, i campioni provenienti dal lotto di controllo, preparato senza l'aggiunta di nitrati/nitriti e di miscela NC. Questi ultimi, infatti, hanno mostrato, durante tutto il processo di maturazione, livelli di carica superiori rispetto a quelli riscontrati in tutti gli altri campioni.

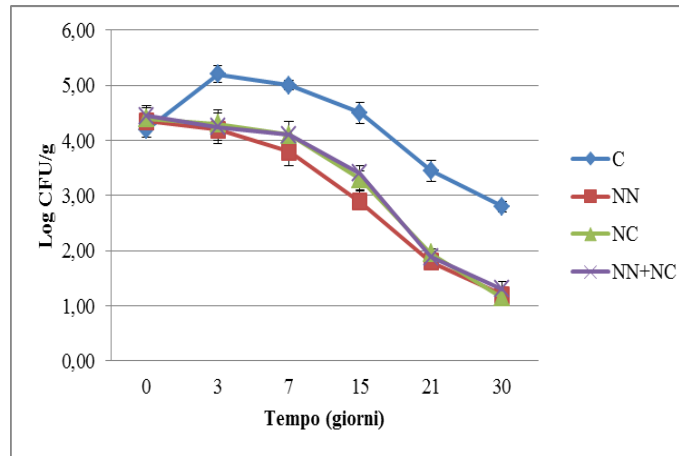


Figura 23 Andamento delle cariche nel tempo di *B. thermosphacta* durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

I dati relativi alla presenza di *Pseudomonas spp.* (Figura 8.24) hanno evidenziato differenze tra i campioni provenienti dai vari lotti. A fronte di una presenza ragguardevole di tali microrganismi all'inizio del periodo di stagionatura con valori di carica superiori a 7 Log UFC/g. Durante il periodo di maturazione si è assistito ad un decremento in grado di determinare un livello di cariche piuttosto contenuto al termine della maturazione compreso tra valori irrilevabili (lotto NN) e 3 log UFC/g (lotto C). I campioni del lotto di controllo, pur essendo caratterizzati da un andamento decrescente delle cariche di tali microrganismi, hanno fatto registrare, durante l'intero periodo di maturazione, livelli di carica sempre più elevati rispetto a quelli riscontrati negli altri lotti. I livelli di cariche più bassi sono stati riscontrati nel lotto preparato con l'impiego di nitrati e nitriti (lotto NN). Gli andamenti caratterizzanti i campioni provenienti dai lotti che prevedono l'impiego di miscela si collocano in una posizione intermedia tra l'andamento del lotto di controllo e del lotto NN.

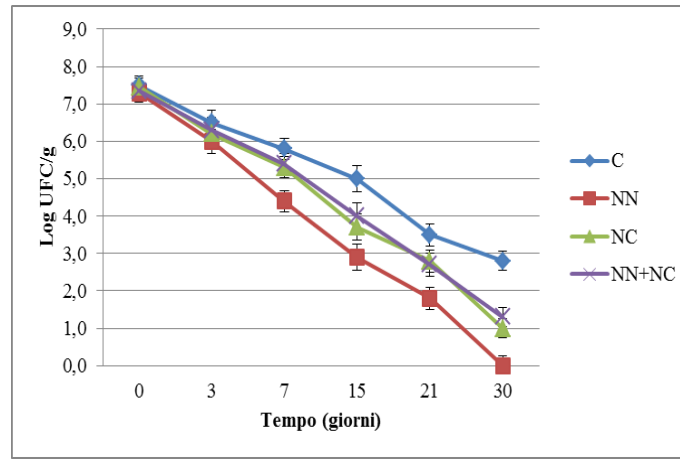


Figura 8.24 Andamento delle cariche nel tempo di *Pseudomonas* spp. durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Anche gli **enterobatteri** hanno evidenziato in tutti i campioni un andamento decrescente durante il periodo di maturazione (Figura 8.25). I livelli di carica, superiori a 3 log UFC/g al momento della preparazione, hanno fatto registrare un primo decremento già al terzo giorno di maturazione attestandosi intorno a valori compresi tra 2,5 e 2,7 log UFC/g. Il successivo periodo della maturazione è stato caratterizzato da un ulteriore decremento tale da far apprezzare al termine della maturazione livelli di carica irrilevanti. I quattro lotti, nonostante siano caratterizzati tutti da un andamento decrescente delle cariche, hanno fatto emergere sostanziali differenze tra loro. La riduzione degli enterobatteri è apparsa più pronunciata nei campioni provenienti dal lotto preparato con l'impiego di nitrati e nitriti (NN) che hanno evidenziato livelli di carica irrilevanti già al ventunesimo giorno. Al contrario i campioni del lotto di controllo (C) hanno fatto registrare livelli di cariche appena apprezzabili (circa 1 log UFC/g) anche al termine del periodo di maturazione. In una posizione intermedia si collocano i campioni provenienti dai lotti preparati con l'impiego di miscela e della

combinazione miscela/nitrati che, raggiungono valori di carica irrilevabili non dopo ventuno giorni ma al trentesimo giorno.

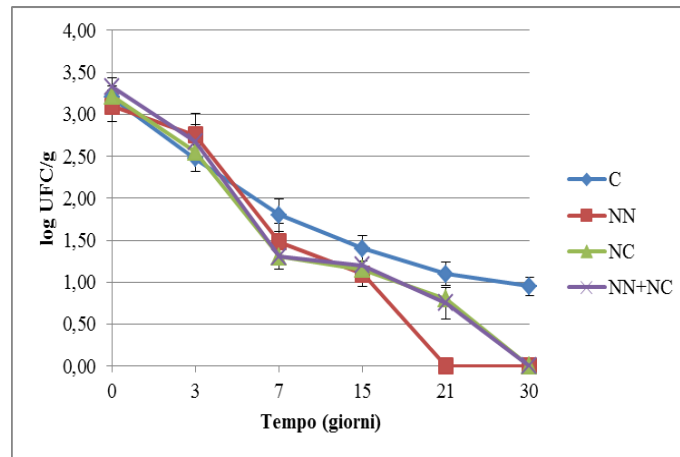


Figura 8.25 Andamento delle cariche nel tempo degli enterobatteri durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Simile a quello degli enterobatteri è stato anche l'andamento dei **coliformi totali** (Figura 8.26) che, rispetto ai precedenti, hanno mostrato livelli di cariche di poco inferiori durante l'intero periodo di maturazione. I campioni preparati con l'impiego di nitrati e nitriti hanno confermato un più tempestivo decremento delle cariche dei coliformi totali rispetto ai campioni provenienti dagli altri lotti. Tali campioni, infatti, sono stati caratterizzati dalla totale scomparsa dei coliformi totali al ventunesimo giorno di maturazione. Sia i campioni dei lotti preparati con la miscela, sia i campioni del lotto di controllo hanno fatto rilevare una lieve presenza di coliformi totali a fino al ventunesimo giorno di maturazione, manifestando cariche irrilevabili a fine stagionatura.

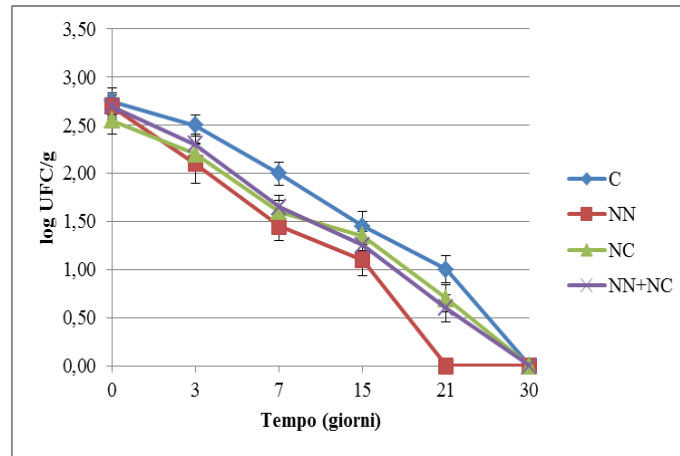


Figura 8.26 Andamento delle cariche nel tempo dei Coliformi totali durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Non sono emerse particolari differenze tra i vari lotti relativamente alle cariche degli **enterococchi** (Figura 8.27). In tutti i lotti, l'andamento è apparso sostanzialmente crescente durante i primi tre giorni, facendo poi registrare un andamento leggermente decrescente fino a fine maturazione, epoca alla quale è stato rilevato un valore di carica compreso tra 3,3 e 3,6 log UCF/g per tutti i lotti.

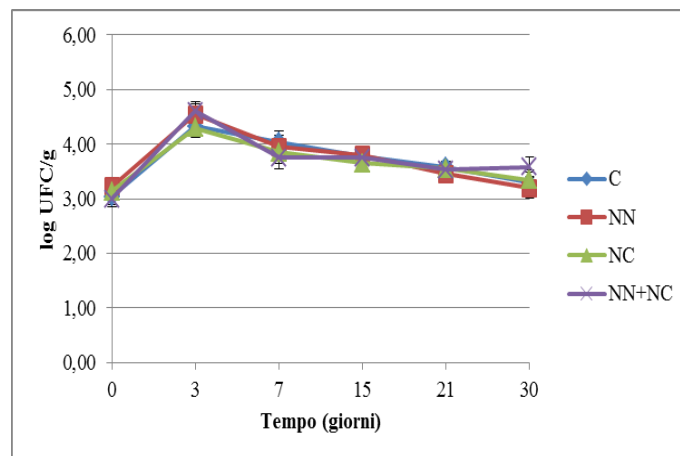


Figura 8.27 Andamento delle cariche nel tempo degli Enterococchi durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

Gli eumiceti, che presentavano una carica iniziale superiore a 5 log UFC/g al momento dell'insacco, non hanno fatto apprezzare differenze degne di nota per tutti i campioni dei lotti analizzati (figura 8.28). Infatti, si è assistito ad un generale decremento di circa due unità logaritmiche fino al settimo giorno di maturazione, successivamente i valori di carica si sono attestati su valori tendenzialmente costanti fino a fine stagionatura.

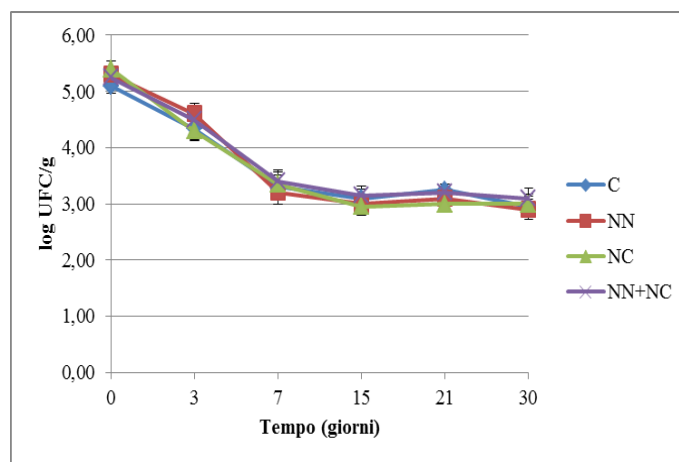


Figura 8.28 Andamento delle cariche nel tempo degli eumiceti durante la stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

8.5.2 EVOLUZIONE DEI PARAMETRI CHIMICO-FISICI E FISICI

CONCENTRAZIONE IDROGENIONICA

I valori di pH (Figura 8.29) rilevati in funzione del tempo, durante la maturazione degli insaccati fermentati, hanno esibito un andamento simile per tutti i campioni dei differenti lotti analizzati non facendo registrare sostanziali differenze. Durante la prima fase di stagionatura si è verificato un decremento del pH, che da valori di circa 5,7 si è attestato al 7° giorno di maturazione intorno a valori di circa 4,8 circa. Durante il successivo periodo di maturazione la totalità dei

campioni, indipendentemente dal lotto di provenienza, sono stati caratterizzati da un andamento costante del pH fino al termine della maturazione.

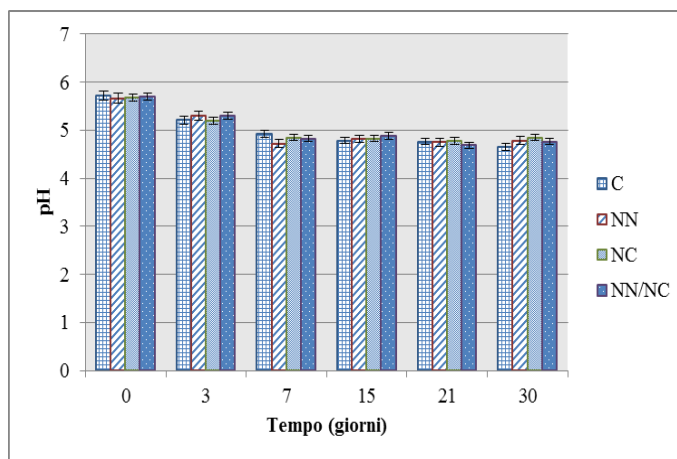


Figura 8.29 Andamento dei valori di concentrazione idrogenionica nel tempo durante il processo di stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

ATTIVITÀ DELL'ACQUA

Differenze tra i campioni provenienti dai vari lotti, pur se lievi, sono state registrate relativamente ai valori di attività dell'acqua (Figura 8.30). Tutti i campioni, eccetto quelli prodotti con l'impiego di nitrati (lotto NN), hanno mostrato un andamento decrescente fino alla fine del periodo di stagionatura facendo registrare valori di circa 0,970 a inizio maturazione e valori di circa 0,850 a al trentesimo giorno. Differente è stato l'andamento dei campioni del lotto NN, per i quali, è stato rilevato un decremento più repentino nella prima metà del periodo di maturazione, mantenendosi costantemente su valori più bassi rispetto a tutti gli altri campioni. Alla fine del processo di stagionatura, tali campioni, presentavano un valore di A_w pari a 0,840, mediamente inferiori di 0,015 unità rispetto agli altri campioni.

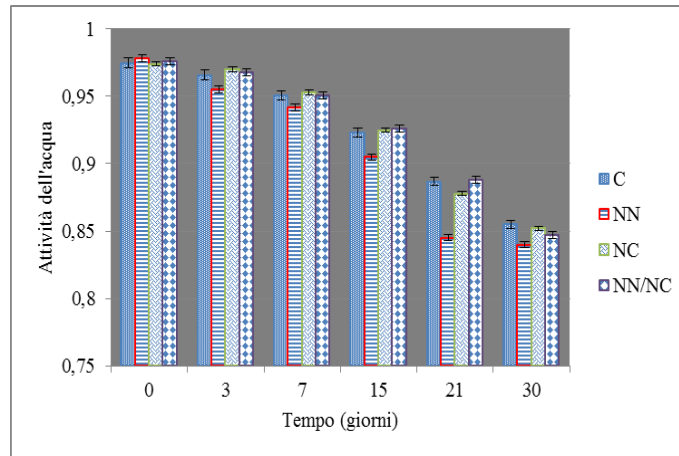


Figura 8.30 Andamento dei valori di attività dell'acqua nel tempo durante il processo di stagionatura dei lotti di insaccati fermentati preparati in scala pilota.

ANALISI COLORIMETRICA

La valutazione dei parametri L^* , a^* , b^* (**Tabella 8.4**), rispettivamente indici della luminosità, del rosso e del giallo, offre un quadro oggettivo del colore caratterizzante i campioni dei differenti lotti. L'indice della luminosità durante il periodo di maturazione si è attestato in tutti i campioni intorno a valori superiori a 40. Relativamente a tale parametro non sono state evidenziate sostanziali differenze tra i differenti campioni. La medesima situazione è stata evidenziata anche dall'evoluzione del parametro b^* che in tutti i campioni ha fatto apprezzare un andamento sostanzialmente costante durante il periodo di maturazione.

Mentre sono emerse differenze di maggiore entità tra i vari campioni dall'analisi dei valori del parametro a^* , indice del colore rosso. I valori più bassi sono stati evidenziati dai campioni del controllo che sin dal quindicesimo giorno hanno fatto apprezzare un decadimento di tale indice. Al contrario, i campioni provenienti dal lotto preparato con l'impiego di nitrati sono stati caratterizzati dai valori più alti. In una posizione intermedia si collocano i campioni provenienti dai lotti preparati con la miscela NC (lotto NC) e con la combinazione miscela NC/nitrati (lotto NC+NN).

Tabella 8.4 Valori $L^*a^*b^*$ (C.I.E.) determinati sulla superficie degli insaccati fermentati provenienti dai differenti lotti di insaccati fermentati prodotti in scala pilota.

	C	NN	NC	NC+NN
Tempo (giorni)	L^*			
0	45,02 (\pm 1,49)	44,87 (\pm 1,37)	46,93 (\pm 0,78)	45,74 (\pm 0,98)
3	44,85 (\pm 0,93)	45,56 (\pm 1,05)	47,82 (\pm 1,24)	48,32 (\pm 0,87)
7	45,52 (\pm 0,96)	44,72 (\pm 1,15)	47,35 (\pm 0,65)	47,66 (\pm 1,10)
15	43,14 (\pm 1,22)	47,66 (\pm 0,95)	46,82 (\pm 0,98)	47,49 (\pm 0,75)
21	42,82 (\pm 1,11)	45,56 (\pm 0,88)	47,02 (\pm 0,76)	46,10 (\pm 0,88)
30	42,55 (\pm 0,41)	46,20 (\pm 0,76)	46,87 (\pm 0,86)	46,70 (\pm 0,55)
	a^*			
0	11,85 (\pm 0,77)	10,74 (\pm 0,88)	11,35 (\pm 0,41)	11,12 (\pm 0,33)
3	10,03 (\pm 0,33)	11,96 (\pm 0,38)	11,42 (\pm 0,76)	11,72 (\pm 0,56)
7	8,42 (\pm 1,15)	12,45 (\pm 0,55)	10,43 (\pm 0,65)	10,32 (\pm 0,45)
15	7,53 (\pm 0,45)	13,95 (\pm 0,23)	10,55 (\pm 0,61)	10,15 (\pm 0,78)
21	7,15 (\pm 0,88)	15,68 (\pm 0,66)	10,10 (\pm 0,33)	9,85 (\pm 0,53)
30	6,75 (\pm 0,76)	16,55 (\pm 1,10)	9,61 (\pm 0,77)	9,95 (\pm 0,25)
	b^*			
0	11,20 (\pm 0,47)	10,85 (\pm 0,33)	11,44 (\pm 0,87)	11,75 (\pm 0,78)
3	10,83 (\pm 0,63)	11,03 (\pm 0,73)	11,03 (\pm 0,64)	11,13 (\pm 0,55)
7	11,22 (\pm 1,15)	10,42 (\pm 0,95)	11,42 (\pm 0,51)	11,32 (\pm 0,55)
15	10,56 (\pm 0,77)	11,33 (\pm 0,47)	11,53 (\pm 0,35)	12,10 (\pm 0,95)
21	9,45 (\pm 0,44)	12,65 (\pm 0,88)	11,75 (\pm 0,28)	11,88 (\pm 0,38)
30	9,14 (\pm 0,36)	12,75 (\pm 0,76)	11,87 (\pm 0,66)	10,75 (\pm 0,46)

* i valori riportati rappresentano la media di tre determinazioni

ANALISI SENSORIALE

I risultati derivanti dal test di accettabilità condotto sui campioni provenienti dai differenti lotti sono riportati nella figura 8.31. I dati evidenziano che, sia relativamente ai caratteri trigemino-olfattivi e visivi sia relativamente ai caratteri strutturali, i campioni provenienti dal lotto di controllo, rispetto a quelli provenienti dagli altri lotti, hanno fatto registrare un minore gradimento da parte dei consumatori. Gli attributi dell'odore, dell'aroma e del retrogusto nonché i sapori di base (dolce, salato, acido, amaro) hanno fatto registrare una minore

apprezzamento nei campioni del controllo. Gli stessi attributi, sia per i campioni provenienti dai lotti preparati con l'aggiunta di nitrati sia per quelli provenienti dai lotti che prevedono l'impiego della miscela, si sono uniformemente posizionati intorno a valori più elevati che indicano un giudizio decisamente più positivo.

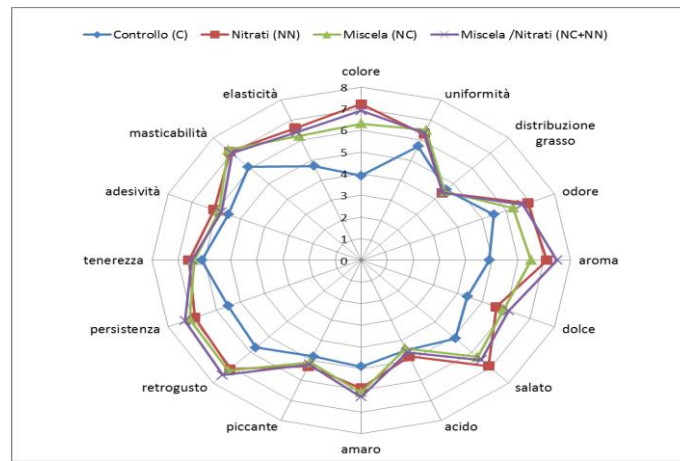


Figura 8.31 Attributi sensoriali caratterizzanti i campioni provenienti dai differenti lotti di insaccati fermentati.

Anche in merito agli attributi strutturali, quali masticabilità, elasticità e adesività, i campioni provenienti dai lotti NN, NC e NC+NN hanno evidenziato valori simili e costantemente più elevati rispetto a quelli fatti riscontrare dai campioni provenienti dal lotto del controllo. Infine l'attributo relativo al colore ha fatto registrare i valori decisamente più bassi per i campioni del lotto del controllo, mentre i valori più elevati sono stati riscontrati per i campioni provenienti dai lotti preparati con l'impiego dei nitrati e nitriti (NN) e da quelli preparati con nitrati e nitriti in combinazione con la miscela. I campioni provenienti dal lotto preparato con l'impiego della sola miscela di estratti naturali (NC) hanno fatto apprezzare, in merito a tale attributo, valori di poco inferiori rispetto a quelli registrati per i lotti NN+NC e NN.

CAPITOLO 9

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati emerge che gli estratti vegetali sono in possesso di importanti e spiccate attività ad azione antimicrobica. Condizione che, come già premesso nello stato dell'arte, appare particolarmente promettente per offrire una valida risposta alle nuove frontiere della qualità sempre più indirizzate all'individuazione di fattori di biocontrollo e alla riduzione di additivi chimici nella preparazione degli alimenti. Tuttavia, come si evince dai risultati precedentemente esposti, affinché tale prospettiva possa divenire una reale applicazione finalizzata alla riduzione o alla eliminazione degli additivi chimici in un ambiente complesso come gli insaccati fermentati, è necessario che gli estratti naturali siano individuati e selezionati sulla base del loro spettro di azione, della loro efficacia nonché sulla base della loro capacità di indurre una situazione di stress selettiva e permanente. E' infatti fondamentale che gli estratti naturali da impiegare nella preparazione degli insaccati fermentati abbiano uno spettro esteso ma allo stesso tempo fortemente specifico. L'azione inibente deve essere rivolta nei confronti dei microrganismi indesiderati senza contrastare la crescita dei virtuosi. Relativamente all'inibizione dei microrganismi indesiderati e nell'ottica di impiegare gli estratti naturali in alternativa a nitrati e nitriti, fondamentali sono

i risultati che descrivono l'azione nei confronti di *C. sporognes*⁴. Dati che verosimilmente possono essere assimilati come l'azione nei confronti di *C. botulinum*¹, microrganismo che desta importanti preoccupazioni e che allo stato attuale è inibito, in maniera accertata, solo dai nitrati e nitriti.

Da non trascurare sono i risultati in merito all'efficacia è importante, infatti, che gli estratti abbiano un'azione inibente anche a concentrazioni relativamente basse in modo da poter essere utilizzati in quantità tali da non apportare modifiche all'aspetto sensoriale e non aggravare i costi di produzione per le aziende di trasformazione. Infine è indubbio che l'effetto inibente rappresenti, nei confronti dei microrganismi indesiderati, una situazione di stress permanente tale da determinare l'inibizione completa del microrganismo senza lasciare spazio a possibili forme di adattamento.

L'insieme di tali azioni deve essere, non solo ben evidente in ambienti “*in vitro*” opportunamente progettati, ma deve permanere nelle più complesse situazioni riscontrabili “*in situ*” e in particolare all'interno dell'impasto che costituisce l'insaccato fermentato. In merito a tale aspetto, informazioni esaurienti e di particolare interesse, sono emerse dallo studio della variazione dell'espressione proteica dei microrganismi in presenza degli estratti inibenti. Condizioni di stress permanenti corrispondono nella totalità dei casi all'incapacità da parte dei microrganismi di esprimere proteine che evidentemente sono indispensabili per la vita cellulare; d'altro canto situazioni di stress reversibile, corrispondono alla

⁴ Nella presente attività di dottorato l'attenzione è stata rivolta nei confronti di *C. sporognes*, microrganismo di più agevole utilizzo in laboratorio in quanto non patogeno e che come evidenziato dalla letteratura è in possesso di caratteristiche ecologiche del tutto simile a quelle di *C. botulinum*.

capacità di reagire da parte del microrganismo con l'espressione di una o più proteine di neo-formazione.

I risultati che sono emersi dal presente lavoro di tesi di dottorato, hanno permesso di indagare sulla totalità di tali esigenze permettendo l'individuazione di tre differenti estratti in possesso di interessanti potenzialità. Nei paragrafi di seguito riportati sono commentati l'insieme dei dati che hanno condotto a tali conoscenze e ai risultati di interesse sul piano scientifico e applicativo.

9.1 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E SPETTRO D'AZIONE *IN VITRO*

I risultati, ottenuti dall'analisi dei dati riguardanti lo studio dell'attività antimicrobica mediante la tecnica dell'Agar Well Diffusion Assay, hanno offerto importanti informazioni in merito all'entità dell'azione inibente e allo spettro d'azione esibiti dagli estratti naturali nei confronti dei microrganismi, utili e indesiderati, comunemente rinvenibili nei prodotti carnei fermentati. I dati ottenuti concordano con quanto descritto in bibliografia (Tajkarimi et al., 2010); i batteri Gram-positivi sono tendenzialmente più sensibili all'azione antimicrobica espressa dagli estratti naturali. Tutti gli otto estratti testati hanno mostrato di esibire, seppur con differente intensità, un'azione inibente verso almeno due dei ceppi oggetto dello studio. Tale evidenza permette di affermare quindi che, le matrici naturali, rappresentano un inestimabile patrimonio da cui attingere potenziali antimicrobici naturali da utilizzare potenzialmente in sostituzione dei comuni additivi chimici per la produzione e/o la conservazione di alimenti di diversa origine. Tuttavia solo la conoscenza in maniera estesa e puntuale

dell'esatto spettro d'azione esibito dall'estratto naturale può offrire chiare informazioni in merito ai suoi possibili campi di applicazione nell'industria alimentare. Infatti, restando nell'ambito dei prodotti carnei, la comprensione delle azioni nei confronti dei differenti microrganismi, utili, dannosi e pericolosi, può chiarire l'attitudine dell'estratto ad essere impiegato in prodotti carnei fermentati o per la conservazione di altre tipologie di prodotti carnei, per i quali, non è fondamentale l'instaurarsi di un corretto processo fermentativo. Come già ampiamente descritto in precedenza nello stato dell'arte, per i prodotti carnei fermentati, è fondamentale la presenza e il corretto sviluppo della popolazione microbica virtuosa. Quindi, qualora, come nel presente caso si voglia individuare estratti naturali alternativi per la preparazione di insaccati fermentati è necessario che tali estratti esibiscano una attività antimicrobica selettiva esclusivamente nei confronti dei microrganismi indesiderati (dannosi e pericolosi) e che non influenzino in maniera negativa il metabolismo di quelli utili.

I risultati dei test “*in vitro*” riguardanti tale aspetto hanno consentito di individuare alcuni estratti in possesso di tale peculiare caratteristica. La metà degli estratti testati, *Carica papaya*, Propolis, *Malpighia punicifolia*, e *Raphanus niger*, non ha nessuno effetto sui microrganismi di interesse tecnologico e mostra attività inibente nei confronti dei microrganismi indesiderati ed in particolare tutti sono attivi nei confronti di *C. sporogenes* che, come già esposto in precedenza, può essere assimilato sulla base delle caratteristiche ecologiche a *C. botulinum*. Questi risultati preliminari potrebbero far supporre che tali estratti sono validamente candidabili all'utilizzo nella preparazione di prodotti carnei fermentati. Non essendo disponibili in letteratura dati riguardanti gli estratti

precedentemente citati, non è possibile confortare i dati ottenuti nel presente lavoro con quelli di altri Autori. Gli altri estratti oggetto dello studio (*Citrus compositum*, *Medicago composita*, *Rosmarinus officinalis* e *Spirulina pacifica*) evidenziano uno spettro di azione che coinvolge non solo i microrganismi indesiderati ma anche quelli utili per la preparazione degli insaccati carnei fermentati. Dato che ipotizza in maniera dubbiosa un loro eventuale utilizzo nella preparazione di insaccati fermentati in quanto potrebbero compromettere il processo fermentativo e alterare i principali caratteri qualitativi. Tuttavia il loro effetto antimicrobico potrebbe essere sfruttato, in alternativa, per il controllo della popolazione microbica alterativa degli alimenti freschi a facilmente deperibili come suggerito recentemente da alcuni Autori (Lanciotti et al., 2004; Burt, 2004; Zhou et al., 2010).

I risultati appena discussi⁵ mostrano dati interessanti riguardo gli otto estratti saggiati ma forniscono solo informazioni preliminari per una loro potenziale applicazione in campo alimentare. Infatti, la puntuale attitudine di utilizzo dell'estratto può essere stabilita in maniera chiara solo sulla base di informazioni che necessitano di ulteriori approfondimenti inerenti soprattutto l'efficacia, le concentrazioni da utilizzare, nonché la natura della loro azione inibente. Inoltre non meno importanti sono le informazioni in merito alla loro efficacia " *in vitro* " e " *in vivo* ", gli effetti sui caratteri sensoriali e l'influenza sul colore degli insaccati fermentati. Pertanto i dati ottenuti con la tecnica dell'Agar Well Diffusion Assay hanno permesso di definire l'intensità dell'attività antimicrobica e lo spettro d'azione espressi " *in vitro* " di alcuni estratti naturali ma

⁵ Le considerazioni in merito a tali dati sono riferiti ai risultati ottenuti dalla valutazione dell'attività inibente condotta mediante la tecnica dell'Agar Well Diffusion Assay

rappresentano solo un primo passo verso l’individuazione di additivi naturali che potrebbero sostituire totalmente o in parte i comuni additivi chimici impiegati.

9.2 EFFICACIA ESPRESSA *IN VITRO*

I risultati derivanti dalla valutazione dell’attività inibente degli estratti impiegati a differenti concentrazioni in brodo di carne⁶ opportunamente inoculato con i singoli microrganismi offrono importanti informazioni in merito alla conferma dello spettro e dell’azione inibente, all’efficacia nonché alle concentrazioni ottimali. La conferma dello spettro e dell’attività inibente non è cosa da trascurare, oltretutto, come descritto da alcuni Autori, non sempre l’inibizione dei composti rilevata mediante test “*in vitro*” che prevedono l’impiego di substrati di crescita solidi (Agar Well Diffusion Assay) trovano conferma nei saggi che utilizzano mezzi nutritivi liquidi (Dorman e Deans, 2000; Miller et al., 2003).

Nel presente lavoro, dall’analisi dei risultati ottenuti, è emersa la conferma quasi completa dei dati ottenuti e descritti nel precedente paragrafo. Tuttavia le informazioni derivanti da questi ultimi risultati se da un lato confermano e arricchiscono i risultati dell’attività antimicrobica valutata in piastra, dall’altro aprono nuove prospettive che in parte confutano le preliminari considerazioni formulate nel precedente paragrafo. Infatti, taluni estratti naturali, considerati idonei all’impiego nella preparazione di prodotti carnei fermentati, alla luce dei nuovi risultati sono stati nuovamente considerati. Mentre estratti naturali

⁶ Il brodo di carne, costituito prevalentemente dall’estratto sarcoplasmatico del muscolo suino (*Longissimus dorsi*) è stato scelto in quanto meglio può simulare l’ambiente complesso dell’insaccato fermentato.

considerati non idonei alla preparazione degli insaccati fermentati possono essere rivestiti di un nuovo interesse. Quest’ultima situazione accomuna gli estratti di *Citrus compositum* e di *Rosmarinus officinalis* che sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi condotte in substrato solido, esibendo un ampio spettro d’azione esteso anche ai microrganismi utili, erano stati esclusi da un eventuale impiego nella preparazione degli insaccati fermentati. I dati derivanti dalle analisi condotte in liquido, invece, evidenziano che tali estratti mostrano una buona efficacia inibente anche a basse concentrazioni ed, inoltre, a queste concentrazioni, l’azione inibente è rivolta esclusivamente nei confronti dei microrganismi ritenuti indesiderati. Dati che impongono una necessaria riconsiderazione di tali estratti. Infatti, i caratteri appena esposti suggerirebbero che essi possono essere utilizzati nella preparazione di insaccati fermentati in concentrazioni relativamente basse. Situazione quest’ultima di non poco conto se si considera che, per ragioni sia concernenti l’eventuale impatto dell’estratto sull’aroma del prodotto finale sia per ragioni puramente economiche legate ai costi di produzione, è da prediligere l’individuazione di un estratto efficace alle più basse concentrazioni di utilizzo. D’altro canto per altri estratti naturali quali *Raphanus niger*, Propolis e *Carica papaya*, considerati meritevoli di attenzione per la preparazione di insaccati fermentati, alla luce dei risultati derivanti dalle valutazioni in brodo di carne, emerge che essi esibiscono attività inibente solo se impiegati in concentrazioni elevate. Alle concentrazioni medie e basse, infatti, mostrano scarsa attività inibente se non nulla. Costatazioni che determinano un drastico ridimensionamento dell’interesse nei confronti di tali estratti.

Mentre, anche alla luce dell'analisi dei nuovi risultati, l'interesse appare confermato per l'estratto di *M. puniceifolia* che a tutte le concentrazioni testate inibisce esclusivamente lo sviluppo dei microrganismi indesiderati senza influenzare il metabolismo di quelli di interesse tecnologico. Il suo effetto inibente interessa non solo batteri Gram-positivi, *C. sporogenes* a *B. thermosphacta*, ma anche Gram-negativi, *P. fluorescens*, mostrando uno spettro d'azione più ampio e una maggiore efficacia rispetto agli altri estratti.

L'analisi dei risultati conferma anche il disinteresse per gli altri due estratti di *Raphanus niger* e *Spirulina pacifica* che a tutte le concentrazioni di utilizzo confermano il loro spettro di azione inibente sia verso i microrganismi utili sia verso quelli indesiderati.

9.3 EFFETTO DEGLI ESTRATTI NATURALI SULL'ESPRESSIONE PROTEICA

L'attenta analisi dei profili elettroforetici e degli elettroferogrammi inerenti gli estratti proteici relativi ai microrganismi coltivati in presenza e in assenza dei composti naturali, ha consentito di ottenere informazioni in merito all'effetto degli estratti naturali sull'espressione proteica dei microrganismi. Informazioni che hanno consentito di comprendere in maniera più esauriente la natura dell'effetto inibente o limitante prodotto dagli estratti sulla crescita microbica dei microrganismi.

Inoltre tali dati offrono delucidazioni in merito alla comprensione della risposta dei microrganismi alla presenza di tali sostanze in termini di suscettibilità e di resistenza.

I dati relativi agli elettroferogrammi e ai profili proteici hanno sottolineato apprezzabili differenze tra loro indicando che i microrganismi, in presenza di una condizione di stress, quale la presenza di composti naturali ad attività antimicrobica, sono in grado di reagire modificando la loro espressione proteica. Attraverso l'integrazione e la comparazione dei dati ottenuti è stato possibile mettere in luce tre differenti meccanismi di risposta allo stress da parte dei microrganismi.

Nel primo caso, quando i batteri sono fortemente inibiti dalla presenza di estratti naturali, è possibile apprezzare la scomparsa di bande proteiche ad elevato peso molecolare, evidenza che dimostra la degradazione o non espressione di proteine non identificate ma che comunque sono indispensabili per il corretto funzionamento del sistema cellulare. Tali dati concordano in parte con i possibili meccanismi d'azione degli antimicrobici naturali evidenziati da Burt (2004) che indicano una possibile degradazione di alcune proteine coinvolte nel metabolismo energetico dei batteri in presenza di composti naturali ad attività antimicrobica.

Nel secondo caso, quando la crescita microbica risulta solo rallentata ma non completamente inibita, si ha la comparsa di bande proteiche di neo-sintesi, non presenti nel profilo relativo ai microrganismi coltivati in assenza di composti naturali, che indicano un possibile meccanismo di risposta attraverso l'espressione di proteine che conferiscono una resistenza o comunque la capacità di reagire ad una condizione di stress. In uno studio del 2007 Burt et al. hanno evidenziato la sintesi di proteine definite heat shock 60 in cellule di *E. coli* coltivate in presenza di composti naturali antimicrobici. Tali proteine vengono sintetizzate in condizioni di stress quali, elevate temperature, stress osmotici o

anche presenza di composti antimicrobici e possono contribuire in maniera significativa alla descrizione dei possibili meccanismi di risposta da parte dei microrganismi. Le proteine rilevate nel presente lavoro presentano un peso molecolare relativamente superiore alle proteine evidenziate nei precedenti studi, dato che potrebbe rivelarsi interessante, in quanto presuppone il coinvolgimento di proteine non identificate ma di altra natura rispetto a quelle fino ad ora isolate e descritte nei precedenti studi.

Nel terzo caso, cioè quando i batteri non sono inibiti dalla presenza di estratti naturali, non si evidenziano differenze, sia in termini qualitativi sia in termini quantitativi, tra gli elettroferogrammi e i profili elettroforetici, delle proteine cellulari dei batteri coltivati in presenza e in assenza degli estratti naturali. Quindi, per tali batteri, la presenza di sostanze naturali ad attività antimicrobica non rappresenta assolutamente una condizione di stress in quanto, questi ultimi, sono in grado di sviluppare come se si trovassero nelle condizioni ottimali di crescita e non modificano la loro espressione proteica. Tale evidenza, assume un carattere estremamente importante, soprattutto per la selezione di quei microrganismi di interesse tecnologico deputati allo svolgimento di peculiari attività che definiscono i principali caratteri qualitativi degli alimenti fermentati.

I microrganismi di interesse tecnologico fondamentali per i prodotti carni fermentati, rappresentati da batteri lattici e micrococchi-stafilococchi, in presenza di taluni estratti naturali, tra i quali per citarne alcuni *Malpighia punicifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Citrus compositum*, mostrano un profilo proteico del tutto normale e simile a quello degli stessi coltivati in assenza di composti naturali. Infatti, in tal caso non essendo inibiti riescono a sviluppare in maniera corretta e

ad esplicitare le peculiari azioni pro-tecnologiche fondamentali per la qualità finale degli insaccati fermentati.

9.4 FORMULAZIONE DELLA MISCELA

Sulla base delle considerazioni e delle differenti informazioni ottenute in merito a ciascun estratto, ampiamente esposte nei precedenti paragrafi, sono stati individuati alcuni estratti che meglio rispondono ai caratteri di cui dovrebbe essere in possesso un additivo naturale alternativo ai nitrati e ai nitriti nella preparazione degli insaccati fermentati. Nello specifico i tre estratti scelti provenienti da *Citrus compositum*, *Malpighia punicifolia* e *Rosmarinus officinalis* evidenziano differenti potenzialità tali da poter essere considerati quali ingredienti alternativi ai nitrati nitriti. Inoltre, l'analisi dei risultati fa emergere che i tre estratti esprimono in maniera differente capacità e attitudini tecnologiche. Costatazione che ha condotto alla formulazione di una miscela di estratti tale da esprimere le differenti e auspiccate azioni possedute da ciascun costituente. Quindi gli approcci utilizzati hanno consentito la messa a punto di una miscela di estratti naturali in possesso di una variegata attitudine tecnologica e pertanto particolarmente promettente nella preparazione di insaccati carni fermentati in sostituzione ai comuni additivi chimici.

Il livello di concentrazione dei tre estratti ed il rapporto tra di essi, come esposto anche nei paragrafi precedenti, non sono pubblicabili essendo oggetto di brevetto

europeo richiesto dal consorzio⁷ NOCHEMFOOD e in corso di approvazione. I dati relativi all'efficacia della miscela valutata “*in vitro*” hanno consentito di individuare la concentrazione ottimale da impiegare nella preparazione degli insaccati fermentati. In particolare, l'individuazione della concentrazione ottimale è stato il risultato emerso dall'integrazione dei differenti dati che sono emersi dalla valutazione dello spettro di azione e dall'efficacia alle differenti concentrazioni esibita dalla miscela di estratti naturali. Fondamentale nella descrizione dello spettro di azione è stata la valutazione dell'effetto inibente non solo nei confronti dei ceppi tipo ma anche rispetto a differenti ceppi di *L. sakei*, *K. varians* e *S. xylosus* isolati da insaccati fermentati che rappresentano la comunità microbica virtuosa dominante di un insaccato fermentato. Inoltre il processo di scelta si è confrontato con le esigenze di individuare la concentrazione che sia efficace e che allo stesso tempo abbia la minore incidenza sull'aspetto sensoriale e rappresenti un costo sostenibile per le aziende produttrici.

Le informazioni in merito alla validità della formulazione e della concentrazione della miscela sono state ottenute dalle prove condotte “*in situ*” su scala pilota esposte nel paragrafo successivo.

9.5 AZIONE *IN SITU* DELLA MISCELA DI ESTRATTI NATURALI

L'individuazione di un “additivo naturale” da impiegare in sostituzione a nitrati e nitriti deve necessariamente essere attuata attraverso una attenta valutazione dei

⁷ Consorzio costituito dai partner partecipati al progetto di ricerca NOCHEMFOOD (NOvel Vegetal-based Extracts Additives for CHEMical-Free FOOD)

suoi effetti “*situ*”, specialmente quando esso è destinato ad essere impiegato in un complesso e dinamico ecosistema microbico come quello di un insaccato fermentato. Infatti, l’efficacia antimicrobica dei composti naturali impiegati può risultare, sia qualitativamente sia quantitativamente, drasticamente ridotta nei sistemi alimentari a causa di una serie di fattori intrinseci ed estrinseci quali: pH, temperatura, composizione dell’alimento, presenza di sostanze che interferiscono con i composti naturali e presenza di enzimi che degradano tali composti (Delaquis et al., 2002; Burt, 2004; Brijesh et al., 2009). Sono quindi generalmente richieste maggiori concentrazioni di estratti per ottenere il medesimo effetto inibente nei prodotti alimentari rispetto a quelle richieste “*in vitro*”.

Tenendo conto delle prove “*in vitro*” condotte nel presente lavoro sulla miscela NC è stata scelta una concentrazione di impiego pari allo 0,5%, dose che è economicamente conveniente, esprime un’efficace attività antimicrobica e non altera i caratteri sensoriali del prodotto finito.

La miscela NC utilizzata nella preparazione di insaccati fermentati non ha prodotto nessun effetto nei confronti dei microrganismi utili confermando così i precedenti risultati ottenuti nelle prove condotte “*in vitro*”. Addirittura degno di nota è apparso il comportamento dei CNC, per i quali, potrebbe essere ipotizzabile una probabile azione di stimolo sulla crescita da parte dei composti naturali saggiati nei campioni preparati con la combinazione nitrati e miscela NC. Viene confermata l’azione della miscela NC “*in situ*” anche nei confronti dei principali microrganismi indesiderati per i quali in tutti i casi è stata osservata una ottimale riduzione delle cariche fino a fine maturazione. Infatti, si è verificata una riduzione fino a livelli irrilevabili per gli enterobatteri e i coliformi fecali a fine

maturazione, gli enterobatteri non sembrano essere influenzati dalla miscela NC ed infine, *B. thermosphacta* e *Pseudomonas* spp., hanno subito un decremento leggermente inferiore ma rilevante e degno di interesse rispetto ai campioni preparati impiegando i nitriti. La formulazione della miscela e il suo impiego “*in situ*” ad una concentrazione pari allo 0,5%, relativamente ai dati microbiologici, mostrano risultati interessanti ed incoraggianti che possono contribuire in maniera significativa alla produzione di alimenti fermentati senza l’impiego di additivi chimici.

Anche i dati relativi all’analisi sensoriale e all’analisi oggettiva del colore mostrano risultati interessanti in quanto hanno permesso di stabilire che, gli insaccati fermentati prodotti con l’impiego di miscela da sola e in combinazione con i nitrati, sono in possesso di caratteri fisici e sensoriali ottimali e graditi dal consumatore. L’aggiunta della miscela di estratti NC non altera in nessun modo i caratteri sensoriali del prodotto finito alla concentrazione testata e non influenza in maniera negativa l’evoluzione del colore degli insaccati. L’analisi e l’integrazione dei dati microbiologici, fisici e sensoriali consentono di affermare che la produzione di prodotti carnei fermentati senza l’impiego o a ridotto contenuto di composti chimici, è un intervento sempre più realizzabile. Intervento che prevede il corretto dosaggio e impiego di estratti naturali in possesso di un ottimale attività antimicrobica che potrebbe consentire l’ottenimento di alimenti sicuri dal punto di vista igienico-sanitario e sensorialmente ineccepibili.

9.6 Considerazioni conclusive

Alla luce dell'analisi integrata dei risultati emerge che gli estratti naturali sono in possesso di interessanti attività antimicrobiche. La puntuale conoscenza, conseguita anche attraverso l'applicazione di differenti metodi analitici, delle azioni espresse nei confronti dei differenti microrganismi utili ed indesiderati e della relativa efficacia, ha consentito l'individuazione di estratti in possesso di proprietà e attitudini conciliabili con il processo di preparazione degli insaccati fermentati e potenzialmente alternativi ai nitrati e ai nitriti. Di particolare interesse, sul futuro piano applicativo e soprattutto per quanto riguarda l'aspetto scientifico, sono le conoscenze in merito alle modalità di risposta dei microrganismi alla presenza e all'azione dei differenti estratti naturali.

Di rilievo in tale ambito sono apparsi gli studi relativi all'espressione proteica dei microrganismi coltivati in presenza e/o in assenza dei diversi estratti naturali. Conoscenze che hanno consentito di definire l'entità e la natura degli stress generati da parte degli estratti naturali nei confronti dei differenti microrganismi.

L'insieme delle nuove acquisizioni scientifiche ha consentito la messa a punto e la validazione di nuovi approcci tali da rendere possibile l'auspicata riduzione degli additivi chimici, in particolare di nitrati e nitriti, nella preparazione di prodotti carnei fermentati.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Alzamora S M, Salvatori D, Tapia S M, Lopez-Malo A, Welti-Chanes J, Fito P (2005) Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds. *J Food Eng* **67**: 205–214.
- Atterbury R J, Dillon E, Swift C, Connerton P L, Frost J A, Dodd C E, Rees C E, Connerton I F (2005) Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. *Appl Environ Microbiol* **71**:4885–4887.
- Baird-Parker A, Baillie M A H (1973) The inhibition of *Clostridium botulinum* by nitrite and sodium chloride. *Proc Int Symp Nitrite Meat Prod. Zeist* 77-90.
- Bajpai M, Pande A, Tewari S K, Prakash D (2005) Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. *Int J Food Sci Nutr* **56**: 287-291.
- Bajpai, V K, Rahman A, Dung N T, Huh M K ; Kang S C (2008) In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora*. *J Food Sci* **73**: 314–320.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils - Review. *Food Chem Toxicol* **46**: 446–475.
- Binkerd E F, Kolari O E (1975) The history and use of nitrate and nitrite in the curing of meat. *Food Cosmet Toxicol* **13**: 655.
- Bleasel N, Tate B, Rademaker M (2002) Allergic contact dermatitis following exposure to essential oils. *Aust J Dermatol* **43**: 211 – 213.
- Brower V (1999) Nutraceuticals: poised for healthy slice of the healthcare market. *Nat Biotechnol* **16**: 728-731.
- Brul S, Coote P (1999) Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms - Review. *Int J Food Microbiol* **50**: 1–17.
- Brüssow H and Kuttner E (2005) Phage ecology. In: Kutter E (ed.) *Bacteriophages: biology and application* 129–163.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- Review. *J Food Microbiol* **94**: 223-253.
- Burt S A, van der Zee R, Koets P, de Graaff A M, van Knapen F, Gaastra W (2007) Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *App Environ Microb* **73**: 4484–4490.
- Burt S A, Reinders R D (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* **36**:162–167.
- Carson C F and Riley T (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of the *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* **78**: 264-269.
- Carson C F, Mee B J, Riley T V (2002) Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents and Ch* **48**: 1914–1920.

- Castellano P, Belfiore C, Fadda S, Vignolo G (2008) A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bio-protective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Sci* **79**:483–499.
- Ceylan E and Fung D Y C (2004) Antimicrobial activity of spices. *J Rapid Meth Aut Mic* **12**: 1–55.
- Chen-yu L, Yi-Hsiang H, Ming-Tsang W, Pi-Chen P, Chi-Kung H, Li S, Xin X , Yi L, David C C (2009) Cured meat, vegetables, and bean-curd foods in relation to childhood acute leukaemia risk: A population based case-control study. *BMC Cancer* **9**:15.
- Chorianopoulos N G; Giaouris E D, Skandamis P N, Haroutounian S A, Nychas G J E (2008) Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid- base sanitizers. *J Appl Microbiol* **104**:1586–1869.
- Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas G J, Haroutounian S A (2004) Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and anti- bacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* **52**:8261–8267.
- Collins M D, Jones D, Farrow J A E, Kilpper-Balz R, Schleifer K H (1984) *Enterococcus avium* nom. rev., comb. Nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov. ; *E. gallinarum* comb. nov. ; *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 220-223.
- Comi G, Cittero B, Manzano M, Cantoni C, De Beroldi M (1992) Evaluation and characterization of Micrococcaceae strains in Italian dry sausage. *Fleischwirtsch* **72**: 1679-1683.
- Coppola R, Giagnacovo B, Iorizzo M, Grazia L (1998) Characterization of lactobacilli involved in the ripening of Soppresata Molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol* **15**:347-353.
- Coppola R, Iorizzo M, Giagnacovo B, Sorrentino A, Sorrentino E, Grazia L (1995a) La soppresata molisana: caratteristiche microbiologiche e tecnologiche. *Industrie Alimentari*, settembre, 851-854.
- Coppola R, Iorizzo M, Saotta R, Sorrentino E, Grazia L (1997) Characterization of Micrococci and Staphylococci isolated from Soppresata Molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol* **14**: 47-53.
- Coppola R, Marconi E, Rossi F, Dell’aglio F (1995b) Artistical production of Naples – type salami: chemical and microbiological aspects. *It J Food Sci* **7**: 57-72.
- Cordero M R, Zumalacarregui J M (2000) Characterization of Micrococcaceae isolated from salt used for Spanish dry cured ham. *Lett Appl Microbiol* **31**: 303-306.
- Davidson P M (2001) Chemical Preservatives and Naturally Antimicrobial Compounds *J Food Microbiol Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed; Doyle, M P, Beuchat, L R, Montville T J, Eds.; ASM Press:Washington, DC 593-628.
- Davidson P M, Naidu A S (2009) Phyto-Phenols. In *Natural Food Antimicrobial Systems* CRC Press: Boca Raton, FL, pp 265-294.
- De la Rosa M C, Mohino M R, Mohino M, Mosso M A (1990) Characteristics of micrococci and staphylococci isolated from semi-preserved meat products. *Food Microbiol* **7**: 207-215.

- De Vuyst L, Vandamme E J (1994) Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst L., Vandamme E.J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 91-142.
- Delaquis P J, Mazza G (1995) Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. *Food Technol*, **49** :73–84.
- Delaquis P J, Stanich K, Girard B, Mazza G (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *J Food Microbiol* **74**: 101-109.
- Demeyera D, Honikelb K, De Smeta S (2008) The World Cancer Research Fund report 2007: A challenge for the meat processing industry. Review. *Meat Sci* **80**: 953-959.
- Devriese L A, Ceyssens K, Rodrigues U M, Collins M D (1990) *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 247-252.
- Devriese L A, Pot B, (1995) The genus *Enterococcus*. In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, pp. 327-367.
- Devriese L A, Pot B, Collins M D (1993) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* **75**: 399-408.
- Di Maria S, Basso A L, Santoro E, Grazia L, Coppola R (2002) Monitoring of *Staphylococcus xylosus* DSM20266 added as starter during fermentation and ripening of Soppresata Molisana, a typical italian sausage. *J Appl Microbiol* **92**: 158-164.
- Dorman H J D and Deans S G (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* **88**: 308–316.
- Emmet M and Kloos W E (1975) Amino acids requirements of staphylococci isolated from human skin. *Can J Microbiol* **21**: 729.
- Fernandez-Diaz M J (1983) Olives. In: Rehm H.J., Reed G. (Eds.), *Biotechnology. Food and Feed Production by Microorganisms*, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 379-397.
- Fiorentin L, Vieira N D, Barioni W Jr. (2005) Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* **34**: 258–263.
- Franz C M A P, Stiles M E, Schleifer K H, Holzapfel W H (2003) Enterococci in food a conundrum for food safty. *Inte J Food Microbiol* **88**: 105-122.
- Fricke G, Hoyer H, Wermter R, Paulus H (1998) *Staphylococcus aureus* as an example of the influence of lipophilic components on the microbiological activity of aromatic extracts. *Arch. Lebensmit- teltechn* **49**: 107–111.
- Friedman M E, Alm W L (1962) Effect of glucose concentration in the growth medium on some activities of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **84**: 375-376.
- Fung D Y C, Taylor S, Kahan J (1977) Effects of butylated hydro-xyanisole (BHA) and butylated hydroxitoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *J Food Saf* **1**:39–51.
- Gardner G A (1981) *Brochotrix thermosphacta* (microbacterium thermosphacctum) in in the spoilage of meats: a rewiev. In: *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and*

- pathogenicity, ed da Roberts T A, Hobbs G, Christian, Skovgaard, 139-173, Acad. Press, London.
- Girardin H, Morris C E, Albagnac C, Nguyen C (2005) The Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 287–295.
- Goetz H, Kuschel M, Wulff T, Sauber C, Miller C, Fisher S, Woodward C (2004) Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *J Biochem Biophys Methods* **60**: 281-293.
- González-Molina E, Domínguez-Perles R, Morena D A, García-Viguera C (2010) Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health- A review. *J Pharmaceut Biomed* **51**: 327-345.
- Gonzlez B, Diez B (2002) The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of “Chorizo” a Spanish dry cured sausage. *Meat Sci* **67**: 295-298.
- Gram L, Ravna L, Rascha M, Bruhna J B, Christensenb A B, Givskovb M (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol* **78**: 79-97.
- Gray M L, Killinger A H (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**: 309.
- Greenberg R A (1973) Ascorbate and nitrosamine formation in cured meats. *Proc Int Symp Nitrite Meat Prod Zeist* 179-188.
- Gustafson J E, Liew Y C, Chew S, Markham J L, Bell H C, Wyllie S G , Warmington, J R (1998) Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **26**: 194-198.
- Gutierrez J, Rodriguez G, Barry-Ryan C, Bourke, P (2008) Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. *J. Food Prot* **71**:1846–1854.
- Hall S S (2003) Longevity research. In *Vivo Vitalis? Compounds Activate Life-Extending Genes*. *Science* **301**:1165.
- Hammes W P, Bantleon A, Min S (1990) Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol* **87**: 165-174.
- Hammes W P, Hertel C (1998) New Developments in meat Starter Cultures. *Meat Sci* **49**: 125-138.
- Hartl F U and Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**:1852–1858.
- Helander I M, Alakomi H L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid, E J, Gorris L G M, Von Wright A (1998) Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* **46**:3590–3595.
- Helander I M, Alakomi H L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm, T, Pol I, Smid E J, Gorris L G M, vonWright A (1998) Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* **46**: 3590–3595.
- Holley R A and Patel D (2005) Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* **22**:273-292.
- Holzappel W H, Geisen R, Schillinger U (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* **24**: 343-362.

- Hugas M, Garriga M, Aymerich M T (2003) Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* **88**: 223-233.
- Hugas M, Garriga M, Aymerich T, Monfort J M (1993) Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausage. *Int. J Food Microbiol* **18**: 107-113.
- Hugas M, Garriga M, Monfort, J M (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci* **62**: 359–371.
- Ibrahim S A, Salameh M M, Phetsomphou S, Yang H, Seo C W (2006) Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. *Food Chem* **99**:645–650.
- Ingram M (1976) The microbiological role of nitrite in meat products. In: *Microbiology in agriculture, fisheries and food ed da Skinner e Carr Academic Press, Londra, New York* 1-18.
- Juven B J, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H (1994) Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* **76**: 626–631.
- Kabara J J, Eklund T (1999) Organic Acids and Esters. In *Food Preservatives*; Russel, N. J., Gould, G. W., Eds Blackie & Son Ltd: Glasgow, Scotland **1**:44-71.
- Keddie R M, Jones D (1981) The genus *Brochotrix* (formerly *Microbacterium thermosphactum* McLean and Sulzbacher). In: *The Prokaryotes*, ed. da Starr 1838-1878, Springer Verlag, New York.
- Kessler R C, Davis R B, Foster D F (2001) Long term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the United States. *Ann Intern Med* **135(4)**: 344-351.
- Kim H Y, Lee Y J, Hong K H, Kwon Y K, Sim K C, Lee J Y, Cho H Y, Kim I S, Shin I S, Cho J S (2001) Isolation of antimicrobial substances from natural products and their preservative effects. *Food Sci Bioth* **10**: 59-71.
- Kim S, Fung D Y (2004) Antibacterial effect of water soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extract on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. *J Food Prot* **67**:1953–1956.
- Lambert R J W, Skandamis P N, Coote P J, Nychas G J E (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* **91**: 453–462.
- Lambert R J W, Skandamis P N, Coote P J, Nychas G J E (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* **91**: 453–462.
- Lee D U, Heinz V, Knorr D (2003) Effects of combination treatments of nisin and high-intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innov Food Sci Emerg Technol* **4**: 387–393.
- Li C, Louise C, Shi W, Adler J (1993) Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **175**:2229–2235.
- Lisazo G, Chasco J, Beriain M J (1999) Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichon, a Spanish dry fermented cured sausage. *Food Microbiol* **57**: 1683-1688.
- Lis-Balchin M, Deans S G, Eaglesham E (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Frag J* **13**:98–104.

- Lis-Balchin M, Hart S, Deans S G, Eaglesham E (1996) Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. *J Herb Spice Med Plant* **4**: 69– 86.
- Lis-Balchin M, Ochoka R. J, Deans S G, Asztemborska M, Hart S (1999) Differences in bioactivity between the Enantiomers of α -pinene. *J Ess Oil Res* **11**: 393– 397.
- Loessner M J, Kramer K, Ebel F, Scherer S (2002) C-terminal domains of *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases determine specific recognition and high affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* **44**: 335–349.
- López-Malo A, Alzamora S M, Guerrero S (2000) Natural Antimicrobials from Plants. In *Minimally Processed Fruits and Vegetables. Fundamentals Aspects and Applications*. Aspen Publishers: Gaithersburg M D 237-264.
- López-Malo A, Alzamora S M, Palou E (2005) Naturally Occurring Compounds: plant sources. In *Antimicrobials in Food*, 3rd ed.; CRC Press: New York 429-251.
- López-Malo A, Palou E (2008) Storage stability of pineapple slices preserved by combined methods. *Int J Food Sci Tech* **43**: 289–295.
- Lücke F K, Popp J, Kreuzer R (1986) Formation of H₂O₂ by lactobacilli isolated from fermented and pasteurized sliced sausages. *Chemie Microbiologie Technologie Lebensmittel* **10**: 78-81.
- Lueck E (1980) Nitrates. In: *Antimicrobial food additives*. Springer-Verlag, Berlino Heidelberg, New York 89.
- Luongo D, Giagnacovo B, Fiume I, Iorizzo M, Coppola R (2001) Volatile Compounds in “Soppressata Molisana” style salami fermented by *Lactobacillus sakei*. *Ital J Food Sci* **13**: 19-28.
- MacDonald B, Gray J I, Gibbins L N (1980b) Role of nitrite in cured meat flavour: antioxidant role of nitrite. *J Food Sci* **45**: 893.
- MacDonald B, Gray J I, Stanley D W, Usborne W R (1980a) Role of nitrite in cures meat flavour: sensory analysis. *J Food Sci* **45**: 885.
- Madeira S V F, A Matos F J, Leal-Cardoso J H, Criddle D N (2002) Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. *J Ethnopharmacol* **81**: 1– 4.
- Magnussen O M , Haugland A, Torstveit Hemmingsen A K, Johansen S, Nordtvedt T S (2008). Advances in superchilling of food-process characteristics and product quality. *Trends Food Sci Technol* **19**: 418–424.
- Mah T F C, O’Toole G A (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**:34–39.
- Manabe A, Nakayama S, Sakamoto K (1987). Effects of essential oils on erythrocytes and hepatocytes from rats and dipalitoyl phophatidyl choline-liposomes. *Japan J Pharmacol* **44**: 77–84.
- Mangena T, Muyima NYO (1999) Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosemarinus officinalis* on selected bacteria and yeast stains. *Lett Appl Microbiol* **28**: 291-296.
- Manolopoulou E, Sarantinopoulos P, Zoidou E, Aktypis A, Moschopoulou E, Kandarakis I G, Anifantakis E M (2003) Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol* **82**: 153-161.

- Marino M, Bersani C, Comi G (2002) Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compo-sitae. *Int J Food Microbiol* **67**:187–195.
- Martinez-Murcia A J, Collins M D (1991) *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* **64**: 69-74.
- Mason C A, Dunner J, Indra P, Colangelo T (1999) Heat-induced expression and chemically induced expression of the *Escherichia coli* stress protein HtpG are affected by the growth environment. *Appl Environ Microbiol* **65**:3433–3440.
- Matasyoh J C, Kiplimo J J, Karubiu N M, Hailstorks T P (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchonanthus camphorates*. *Food Chem.*, 101, 1183–1187.
- Mayhew M and Hartl F U (1996) Molecular chaperone proteins, p. 922–937. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed., vol. I. ASM Press, Washington, DC.
- Menrad K (2003) Market and marketing of functional foods in Europe. *J Food Eng* **56**.: 181-188.
- Miller D, Marangon F, Romano A, Alfonso E, Gonzalez S (2002) Evaluation of an Agar Well Diffusion Assay to Validate and Correlate In vitro Efficacy of Topical Antibacterial and Antifungal Preparations with Conventional Susceptibility Techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**: E-Abstract 1608.
- Mollet B and Rowland I (2002) Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Current opinion in Biotechnology* **13**: 483-485.
- Moreno Foulquié M R, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol –Review* **106**: 1-24.
- Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocitogenes* activity of essential oils component of confiners. *Food Contr* **13**:289-292.
- Murray M and Richard J A (1997) Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5°C. *J Food Protect* **60**: 1534–1540.
- Niva M (2007) All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented. *Finns Appetite* **48**: 384-393.
- Nychas G J E (1995) Natural antimicrobials from plants, in G.W. Gould, *new methods of food preservation* pp. 58-89 London: Blackie Academic Professional.
- Olaoye O, Idowu O A (2010) Features and functional properties of lactic acid bacteria used as biological preservatives of meat processing: A review article. *J Agric Technol* **6**: 449-460.
- Ouweland A C (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S and von Wright A Editors. *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker, New York, pp. 139–160.

- Papamanoli E, Kotzekidou P, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E (2002) Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausages. *Food Microbiol* **19**: 441-449
- Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetakis E, Kotzekidou P (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci* **65**: 859-867.
- Patel T L, Bartlett F M, Hamid J (1983) Extracellular heat resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. *J Food Protect* **46**: 90-94.
- Patrignani F, Iuccia L, Belletta N, Gardinia F, Guerzonza M E, Lanciotti R (2008) Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **123**: 1-8.
- Patterson M F (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *J Appl Microbiol* **98**: 1400-1409.
- Pawar D D, Malik S V S., Bhilegaonkar K N, Barbuddhe S B (2000) Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci* **56**: 215-219.
- Perigo J A, Roberts T A (1968) Inhibition of clostridia by nitrite. *J Food Technol* **3**: 91.
- Pina-Vaz C, Gonc A, Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L (2004) Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **18**:73-78.
- Quastel J H, Woolridge W R (1927) The effects of chemical and physical environment on resting bacteria. *Biochem J* **21**: 148.
- Rauha J P, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kahkonen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* **56**:3-12.
- Raya R R, Varey P, Oot R A, Dyen M R, Callaway T R, Edrington T S, Kutter E M, Brabban A D (2006) Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl Environ Microbiol* **72**:6405-6410.
- Roberfroid M B (2002) Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *Br J Nutr* **2**: 139-143.
- Roberts T A, Smart J L (1974) Inhibition of spore of *Clostridium* spp. by sodium nitrite. *J Appl Bacteriol* **37**: 261.
- Samelis J, Maurogenakis F, Metaxopoulos J (1994) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int J Food Microbiol* **23**: 179-196.
- Samelis J, Metaxopoulos J, Vlassi M, Pappa A (1998) Stability and safety of traditional Greek salami, a microbiological ecology study. *Int J Food Microbiol* **44**: 69-82.
- Sanz Y, Flores J, Toldrà F, Feria A (1997) Effect of preripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausage. *Food Microbiol* **14**: 575-582.
- Sanz Y, Toldrà F (1997a) Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus sake*. *J Agric. Food Chem* **45**: 1552-1558.

- Sanz Y, Toldrá F (1997b) Activities of aminopeptidases from *Lactobacillus sake* in models of curing ingredients and processing conditions for dry sausage. *J Food Sci* **62**: 1211- 1234.
- Schubring R (2009). 'Superchilling' an 'old' variant to prolong shelf life of fresh fish and meat quicked. *Fleischwirtschaft* **89**: 104–113.
- Schleifer K H and Kocur M (1973) Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. *Arch. Microbiol* **93**: 65.
- Sikkema J, de Bont J A M, Poolman B (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**: 201–222.
- Skandamis P, Tsigarida E, Nychas G J E (2002) The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiol* **19**:97–103.
- Skovgaard N, Morgen C A (1988) Detection of *Listeria* spp. In faeces from animals, in feeds and in raw foods of animal origin. *Int Food Microbiol* **6**: 229.
- Smid E J, Gorris L G M. (1999) In: Rahman, M.S. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker, New York, 285–308.
- Sneath P H A, Jones D (1986) Genus *Brochotrix*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. da Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G, 1249-1253, Williams & Wilkins, Baltimora.
- Soomro A H, Masud T, Anwaar K (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in Food preservation and Human Health- A Review. *Pakistan J. Nutr.* **1**: 20-24.
- Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alatomi H, Von Wright A (1999) Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem. Toxicol* **37**: 813–823.
- Stoicov, C, Saffari R, Houghton J M (2009) Green tea inhibits *Helicobacter* growth in vivo and in vitro. *Int J Antimicrob Agent* **33**: 473–478.
- Sumi Y (2009) Research and Technology Trends of Nutraceuticals. *Science and Technology Trends* **28**: 10-21.
- Summet G, Devesh C, Kritika M, Preeti S, Anroop N (2010) An overview of nutraceuticals: current scenario. *J Basic Clin Pharm* **1**: 55-62.
- Svec P, Devriese L A, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J (2001) *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* **151**: 1567-1574.
- Tajkarimi M M, Ibrahim S A, Cliverb D O (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food-A review. *Food Control* **21**: 1199-1218.
- Tassou C, Koutsoumanis K, Nychas GJE (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research Int* **33**:273-280.
- Tassou, C C, Koutsoumanis K, Nychas G J E (2000) Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Int* **33**: 273–280.
- Theodore T S and Schade A L (1965) Carbohydrate metabolisms of iron-rich and iron-poor *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **40**: 385.

- Tipaldi L (2009) Antimicrobial activity expressed by natural compounds. In Proc.s of the 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science and Technology, Oristano (Italy), 16-18 September, 2009, pp. 361-362.
- Tiwari B K, Valdramidis V P, O'Donnell C P, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen P J (2009) Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem* **57**: 5987-6000.
- Tremonte P, Sorrentino E, Succi M, Reale A, Maiorano G, Coppola R (2005) Shelf-life of fresh sausages stored under modified atmospheres. *J Food Prot* **68**:2686-2692.
- Tremonte P, Succi M, Reale A, Di Renzo T, Sorrentino E, Coppola R (2007) Interaction between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. *J Appl Microbiol* **103**: 743-751.
- Tuley de Silva K (1996) A manual on the essential oil industry, United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- U S D A (1982) Meat and poultry products: phosphates and sodium hydroxide. *Fed Register* **47**: 10779.
- Ultee A, Bennik M H, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1561–1568.
- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Bjorkroth K J, Franz C M , Foulquie Moreno M R, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel W H (2002) Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Env Microbiol* **68**: 1381-1391.
- Vancanneyt M, Zamfir M, Devriese L A, Lefebvre K, Engelbeen K, Vandemeulebroecke K, Amar M, De Vuyst L, Haesebrouck F, Swings J (2004) *Enterococcus saccherominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2175-2179.
- Viuda-Martos M, Fernandez-Lopez J, Sayas-Barbera E, Sendra E, Navarro C, Perez-Alvarez J A (2009) Citrus Co-Products as Technological Strategy to Reduce Residual Nitrite Content in Meat Products. **74**: 93-100.
- Wan J, Wilcock A, Coventry M J (1998) The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescence*. *J Appl Microbiol* **84**:152–158.
- Ward S M, Delaquis P J, Holley R A, Mazza G (1998) Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roasted beef by volatile horseradish distillates. *Food Res Int* **31**: 19–26.
- WHO (2002) World Health Organization Fact sheet 237, revised January, Geneva.
- Williams AM, Rodrigues U M, Collins M D (199 1) Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res Microbiol* **142**: 67-74.
- Yin M C, Cheng W S (2003) Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Sci* **63**: 23–28.
- Zaika L A (1988) Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J Food Saf* **9**: 97-118.
- Zaika L L and Kissinger J C (1984) Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *J Food Sci* **49**: 5-9.

- Zaika L L, Zell T E, Palumbo S A, Smith J L (1978) Effect of spices and salt on fermentation of Lebanon bologna-type sausage. *J Food Sci* **43**: 186-189.
- Zambonelli C (1992) *Microbiologia dei salumi* Ed Agricole Bologna.
- Zambonelli C, Tini V, Giudici P, Grazia L (2001) *Microbiologia degli alimenti fermentati*. Ed Agricole Bologna.
- Zambonelli C, Tini V, Giudici P, Grazia L (2001) *Microbiologia degli alimenti fermentati*. Ed Agricole Bologna.
- Zhou G H, Xu XL, Liu Y (2010) Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Sci* (Published on line).

PRODOTTI OTTENUTI DALL' ATTIVITÀ DI DOTTORATO

BREVETTI

- EUROPEAN PATENT NOCHEMFOOD VEGETAL MIXTURE (patent pending), patentee: DISTAAM-Università degli Studi del Molise (IT), ISA-CNR (IT), BIOMA (CH), CTIC (ES), CSIC (ES).

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SCIENTIFICHE E ATTI ESTESI IN *PROCEEDINGS* DI CONVEGNI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

- **Tipaldi L.**, Tremonte P., Reale A., Succi M., Di Renzo T., Pannella G., Coppola R. and Sorrentino E. (2011) Effects of natural compounds on Food-related Microorganisms. Accepted for 6th International CIGR Technical Symposium, Nantes (France) 18th-20th April 2011;
- **Tipaldi L.**, P. Tremonte, T. Di Renzo, A. Reale, M. Succi, G. Pannella, E. Sorrentino, R. Coppola (2011) Natural compounds to ensure quality of fermented meat products. Accepted for 4th Congress of the European Microbiologists FEMS 2011, Geneva, Switzerland June 26-30 2011
- Tremonte P, Reale A, Di Renzo T, **Tipaldi L**, Di Luccia L, Coppola R, Sorrentino E, Succi M (2010) Interactions between *Lactobacillus sakei* and CNC (*Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians*) and their influence on proteolytic activity. *Letters Applied Microbiology* 51(5):586-94;
- **Tipaldi L.** (2010). Natural Compounds: Effects on Food-related Microorganisms and Potential Use in Fermented Meats (oral communication). Atti del 15° Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology. Portici (Na), 15-17 settembre 2010 ISBN 978-88-95028-62-0;
- **Tipaldi L.** (2009). Antimicrobial activity expressed by natural compounds. Atti del 14° Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology. Oristano, 16-18 settembre 2009;
- Tremonte P., Reale A., Succi M., **Tipaldi L.**, Di Renzo T., Sorrentino E., Coppola R. (2008) Potenzialità d'uso di agenti antimicrobici di origine naturale nella preparazione di prodotti carnei. In atti Convegno QUALI cibi – Cibi di ieri e di domani: qualità e sicurezza tra tradizione e innovazione. Positano (SA), 28-30 Maggio 2008, 18-21. ISBN: 978-88-901055-5-5.