

Risultati Approccio Microbiologico

Riduzione nitriti/nitrati nei prodotti di salumeria

IRENE FRANCIOSA PH.D.



Analisi microbiologiche di quattro salami a fermentazione spontanea (senza utilizzo di colture starter commerciali) selezionati da AgenForm.

Analisi effettuate:

TARGET	MEZZO DI COLTURA
Conta Aerobica Totale	Plate Count Agar (PCA)
Batteri Lattici	De Man–Rogosa–Sharpe agar (MRS)
Stafilococchi coagulasi positivi	Mannitol salt agar (MSA)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose (VRBG)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird-Parker Agar (BP)
Lieviti e Funghi filamentosi	Estratto di malto addizionato di Tetraciclina (AMT)
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX)

Risultati analisi microbiologiche:

Tipologia di salame	PCA	MRS	MSA	VRBGA	BP	AMT	TBX
1. Maiale	8.57±0.4	8.19±0.08	3.79±0.01	2.78±0.00	2.3±0.00	4.21±0.04	<1
2. Maiale	8.17±0.4	7.35±0.2	6.53±0.01	4.27±0.003	<1	4.83±0.03	<1
3. Capra	8.41±0.01	8.56±0.07	7.83±0.05	3.60±0.01	<1	5.82±0.00	2.92±0.1
4. Maiale	8.05±0.08	8.25±0.05	6.10±0.002	2.15±0.2	<1	4.95±0.00	<1

Unità di Misura = Log UFC/g ± Deviazione Standard

Ricerca microrganismi produttori di batteriocine

Sfruttare le diversità naturali dei salumi locali fermentati spontaneamente per selezionare microrganismi positivi in grado di produrre sostanze antimicrobiche di interesse.

Microbiota autoctono



Microorganismi patogeni target

*Salmonella enterica, Staphilococcus aureus,
Listeria monocytogenes, Escherichia coli,
Clostridium sporigenus*



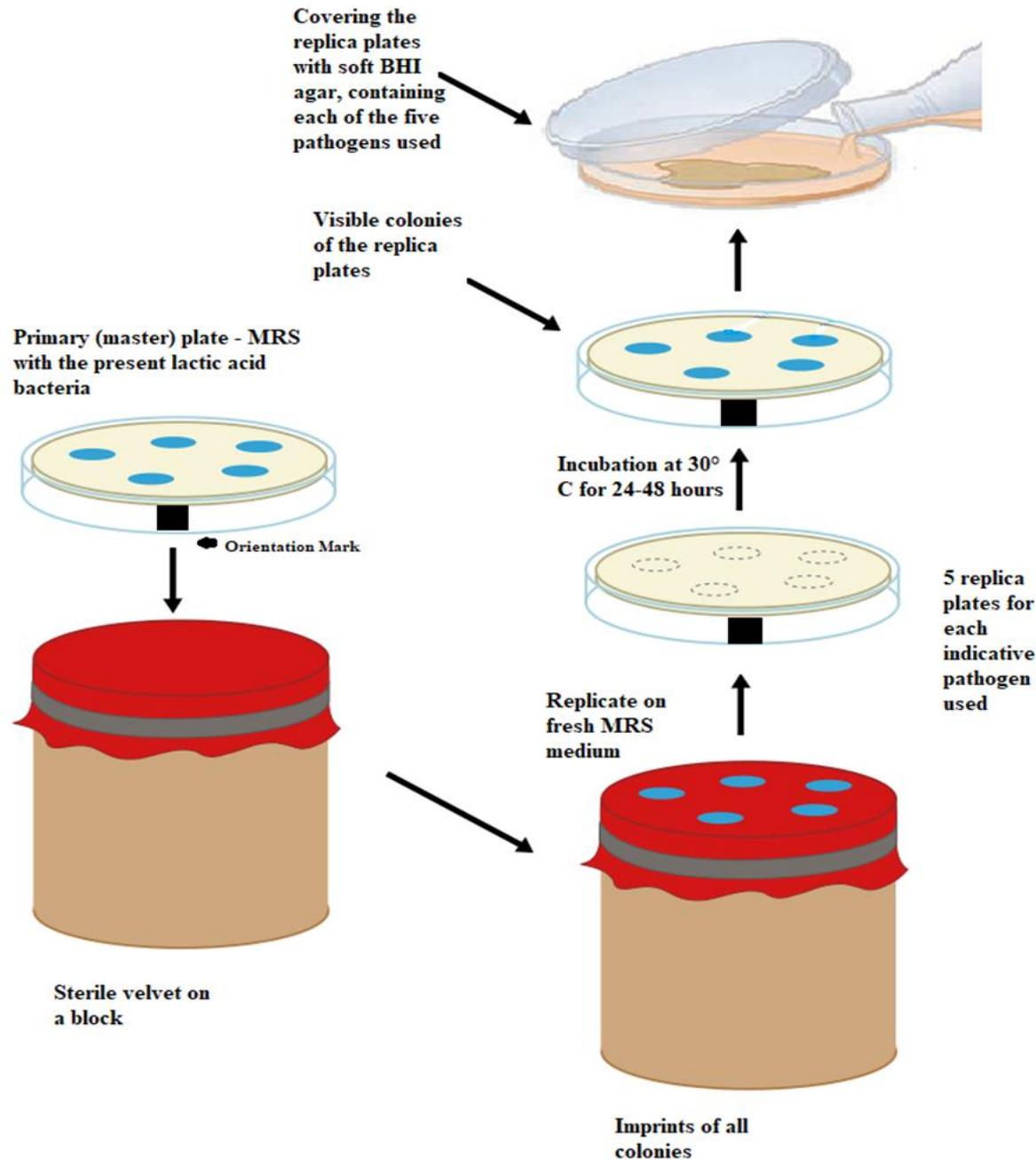
Clostridium sporogenes come
surrogato di *Clostridium botulinum*

Replica plating per screening dell'attività inibente

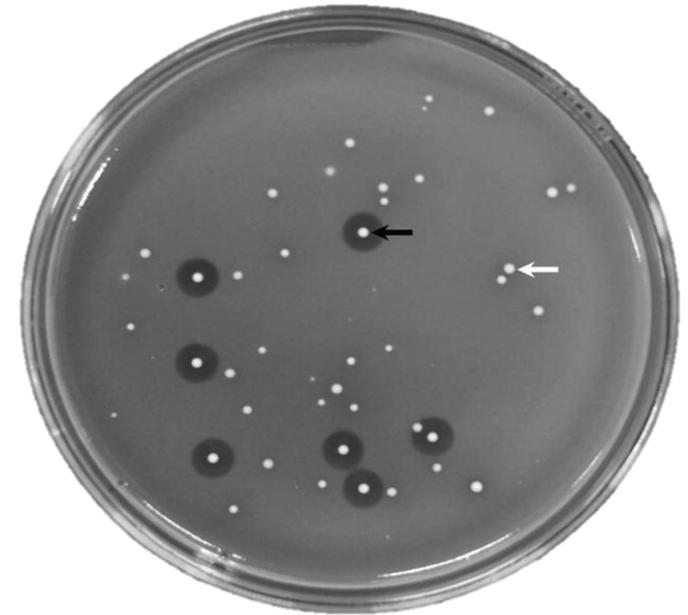
La metodica scelta per poter effettuare lo screening di un elevato numero di colonie contemporaneamente è stata la tecnica del replica plates.

La tecnica della piastratura delle repliche (in inglese replica plating) è stata sviluppata nel 1952 da Joshua e Esther Lederberg. Attraverso questa tecnica si possono ottenere un numero variabile di capsule Petri contenenti un terreno di coltura solido (di solito agar agar) su cui sono fatte crescere colonie batteriche: le colonie hanno su tutte le piastre la stessa disposizione spaziale.

In questo modo si hanno tante piastre cloni, tutte identiche tra loro.

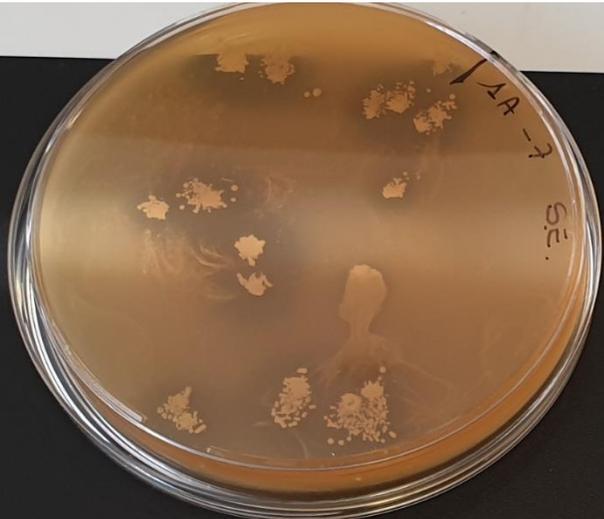


1. *L. monocytogenes*
2. *E. coli*
3. *S. enterica*
4. *S. aureus*
5. *C. sporigenus*

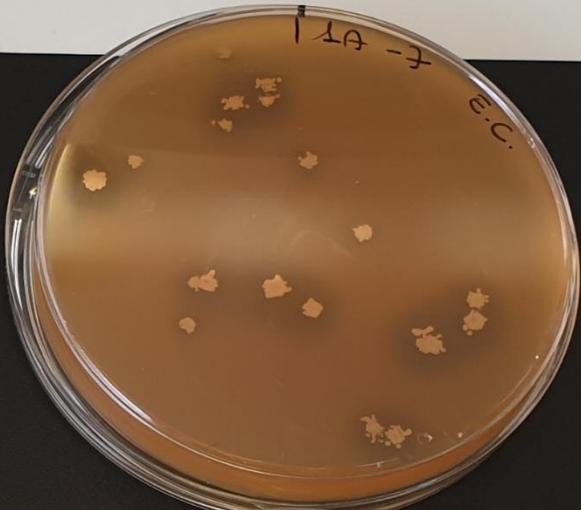


32 ceppi di Batteri Lattici selezionati

Salmonella enterica



Escherichia coli



Listeria monocytogenes



Staphilococcus aureus



***Agar well* diffusion per conferma dell'attività inibente**

Il test è stato allestito utilizzando piastre di BHI nelle quali è stato incluso il microorganismo target (10^6 CFU/mL) e lasciato solidificare, dopodiché sono stati realizzati dei pozzetti del diametro di 0.8 cm utilizzando un foratappi in acciaio sterile.

Successivamente ogni pozzetto è stato riempito con 50 μ L di sospensione di batterica (crescita overnight) dei ceppi di batteri lattici selezionati per il potenziale bioprotettivo.

La prova è stata effettuata in doppio per ognuno dei 5 batteri target per testare ciascun ceppo potenzialmente bioprotettore selezionato.

I ceppi selezionati sono stati analizzati nel dettaglio per poter verificare che la natura di tale meccanismo di antagonismo fosse proteica e quindi attribuibile alla produzione di batteriocine attive nei confronti di almeno uno dei patogeni alimentari target.



Lettura dei risultati:

Una volta allestite, le piastre sono state incubate a 37°C per 12 ore.

Al termine dell'incubazione le piastre sono state analizzate per valutare la presenza di un alone di inibizione attorno al pozzetto.

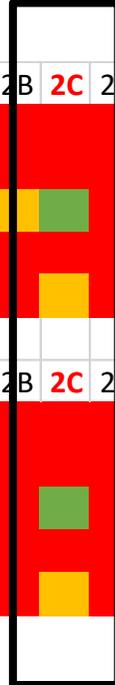


Screening ceppi LAB selezionati

		1A_A	1A_B	1B_A	1B_B	1C_B	1D_A	1D_B	1E_B	1F_A	1F_B	1G_A	1G_B	1H_B	1I_A	1I_B	1L_A	1L_B	4A	4B	4C	4D	4E	2A	2B	2C	2D	2E	3A	3B	3C	3D	3E			
Brodo Grezzo	SE	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red		
	SA	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Red																
	LM	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow									
	EC	Red																																		
	CS	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow										
		1A_A	1A_B	1B_A	1B_B	1C_A	1D_A	1D_B	1E_B	1F_A	1F_B	1G_A	1G_B	1H_B	1I_A	1I_B	1L_A	1L_B	4A	4B	4C	4D	4E	2A	2B	2C	2D	2E	3A	3B	3C	3D	3E			
Brodo Neutralizzato	SE	Red	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red																		
	SA	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Red																									
	LM	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Yellow	Green	Red																
	EC	Red																																		
	CS	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow																	



- SE *S. enterica*
- SA *S. aureus*
- LM *L. monocytogenes*
- EC *E. coli*
- CS *C. sporigenus*



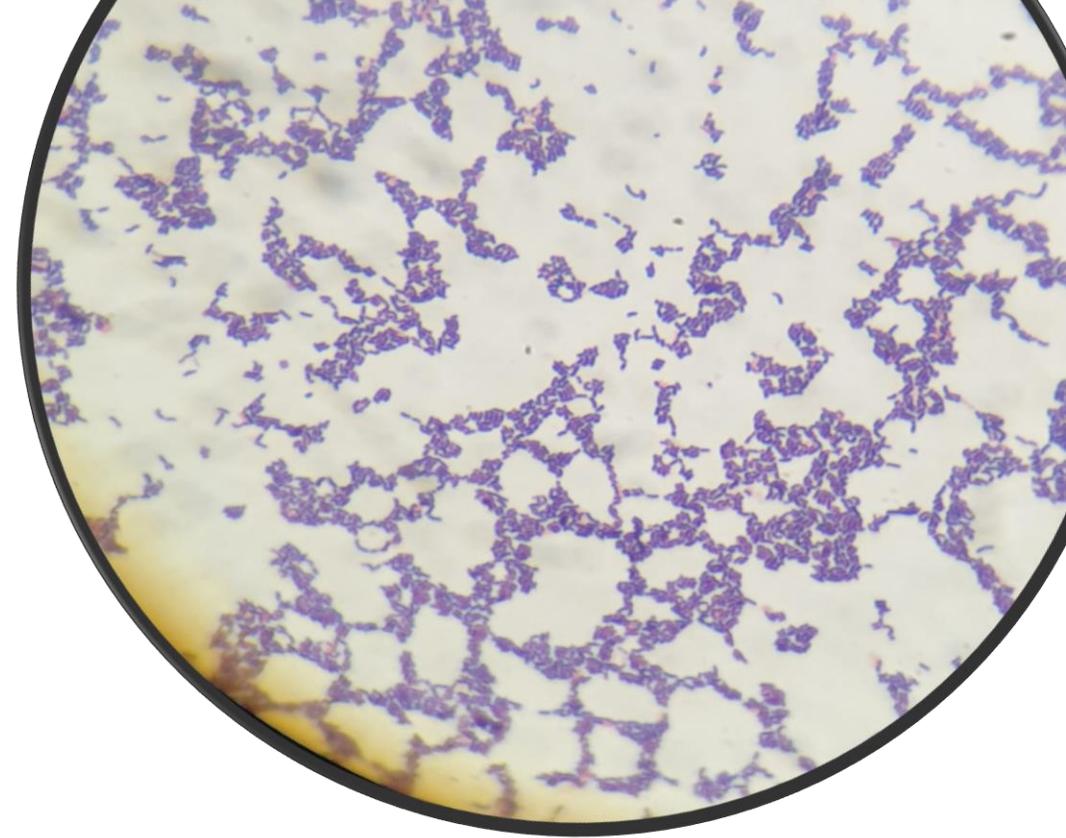
Tramite le analisi effettuata *in vitro*, il ceppo che ha mostrato la più interessante azione antagonista nei confronti microorganismi target è stato:

Latilactobacillus curvatus 2C.



Esso ha infatti mostrato *in vitro* una spiccata attività inibitoria nei confronti di *L. monocytogenes* e meno marcata, ma presente, nei confronti di *C. sporigenes*.

Il suo impiego nei successivi challenge test è stato previsto in combinazione con un ceppo di *Staphilococcus xylosus* (appartenente alla collezione TUC dell'università degli studi di Torino) in modo da garantire allo stesso tempo sia l'effetto bioprotettivo che una corretta fermentazione del prodotto.



SCHEDA SALUMI CRUDI MACINATI



PRODOTTO _____ Campione n° _____ gg maturazione _____

Assaggiatore _____ data ____/____/____ ora _____

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	NOTE
ESAME ESTERNO												
ESAME VISIVO DELLA FETTA												
ESAME OLFATTIVO	Odori											
	Intensità											
ESAME GUSTO-OLFATTIVO	Sapore											
	Aroma											
	Persistenza											
STRUTTURA	Consistenza											
	Masticabilità											
EQUILIBRIO GUSTO OLFATTIVO												
PUNTEGGIO TOTALE IN /100												

VOCABOLARIO DI SUPPORTO

ESAME ESTERNO

- **Tattile:**
Consistenza al tatto
- **Visivo:**
Regolarità, colore del budello, piumatura

ESAME VISIVO DELLA FETTA

Colore magro, uniformità di colore, colore grasso, fessurazioni, occhiature, grana, quantità di grasso, distribuzione dei lardelli, presenza di tendini, compattezza dell'impasto, pelabilità

ESAME OLFATTIVO

- **Odori:**
Speziato, stagionato, carne fresca, difetti (*acetico, rancido, muffa, putrido, urina, stalla, ecc.*)
- **Intensità:**
Impatto olfattivo immediato (*odori positivi*)

ESAME GUSTO-OLFATTIVO

- **Sapore:**
Dolce, salato, acido, amaro, umami
- **Aromi:**
Speziato, pepato, carne fresca, difetti (*fermentato, rancido, muffa, putrido, urina, stalla, ecc.*)
- **Persistenza aromatica:**
Durata della percezione degli aromi

STRUTTURA

- **Consistenza:**
Slegato, gommosità, elasticità, coesione, asciutto
- **Masticabilità:**
Facilità e piacere alla masticazione, durezza, morbidezza, succosità, fibrosità, scioglievolezza del grasso

EQUILIBRIO GUSTO OLFATTIVO

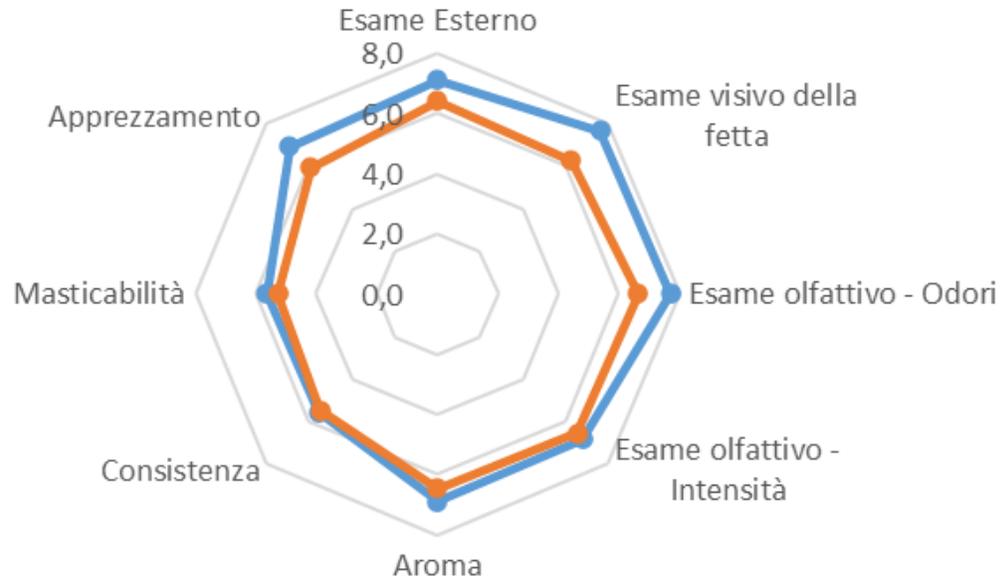
Giudizio complessivo del prodotto, considerando pregi e difetti.

5 Assaggiatori esperti
(AgenForm)

11 Potenziali consumatori
(DISAFA)

Assaggiatori consumatori DISAFA

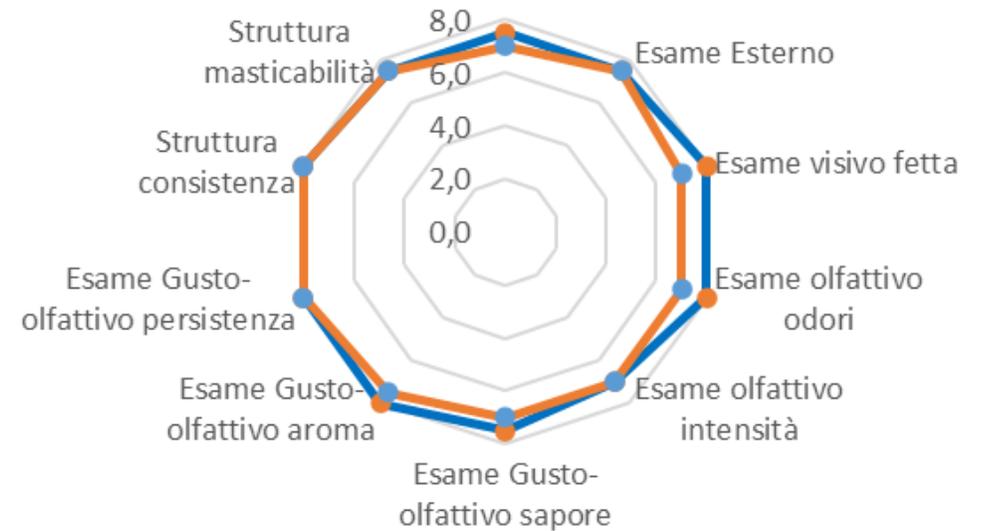
● Starter commerciale
 ● Starter selezionato *L. curvatus* 2C + *S. xylosus*



I risultati hanno mostrato che l'apprezzamento complessivo dei due prodotti, da parte di potenziali consumatori, è molto simile. Anche il panel tecnico ha riconosciuto caratteristiche sovrapponibili nei due prodotti.

Assaggiatori esperti AgenForm

● Starter commerciale
 ● Starter selezionato *L. curvatus* 2C e *S. xylosus*



	Brodo Grezzo						Brodo Neutralizzato				
	SE	SA	LM	EC	CS		SE	SA	LM	EC	CS
39FL2	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Green
41FL14	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Yellow
44SGLL8	Red	Red	Red	Red	Yellow		Red	Red	Red	Red	Yellow
49SGLL1	Red	Red	Red	Red	Yellow		Red	Red	Red	Red	Yellow
32FL2	Red	Red	Red	Red	Yellow		Red	Red	Red	Red	Yellow
32FL1	Red	Red	Red	Red	Red		Red	Red	Red	Red	Red
32FL3	Red	Red	Red	Red	Yellow		Red	Red	Red	Red	Yellow
40FL8	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Green
40FL 7	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Green
39FL1	Red	Red	Red	Red	Green		Red	Red	Red	Red	Yellow
39FL4	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Green
30FL3	Red	Red	Red	Red	Green		Red	Red	Red	Red	Green
44SGL L4	Red	Red	Red	Red	Green		Red	Red	Red	Red	Green
40 FL 11	Red	Red	Green	Red	Green		Red	Red	Green	Red	Green

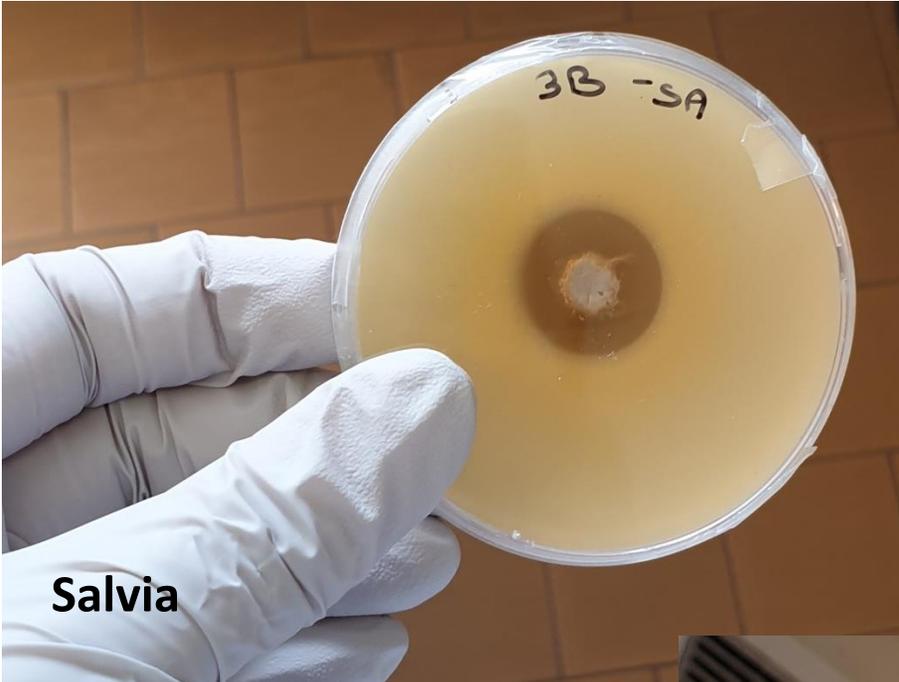
Ceppo bioprotettivo
proveniente dalla collezione

DISAFA:

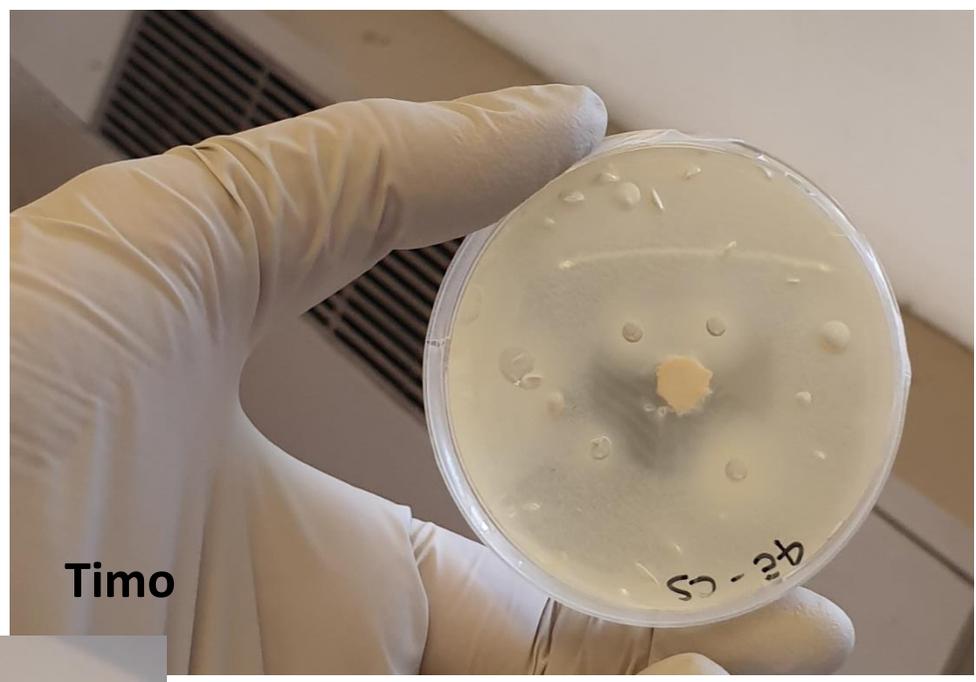
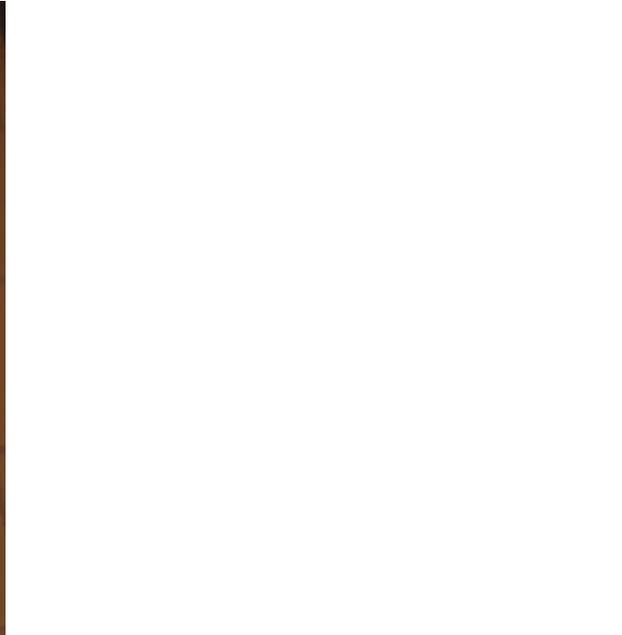
Lactococcus lactis 40FL 7

Screening preliminare ingredienti alternativi

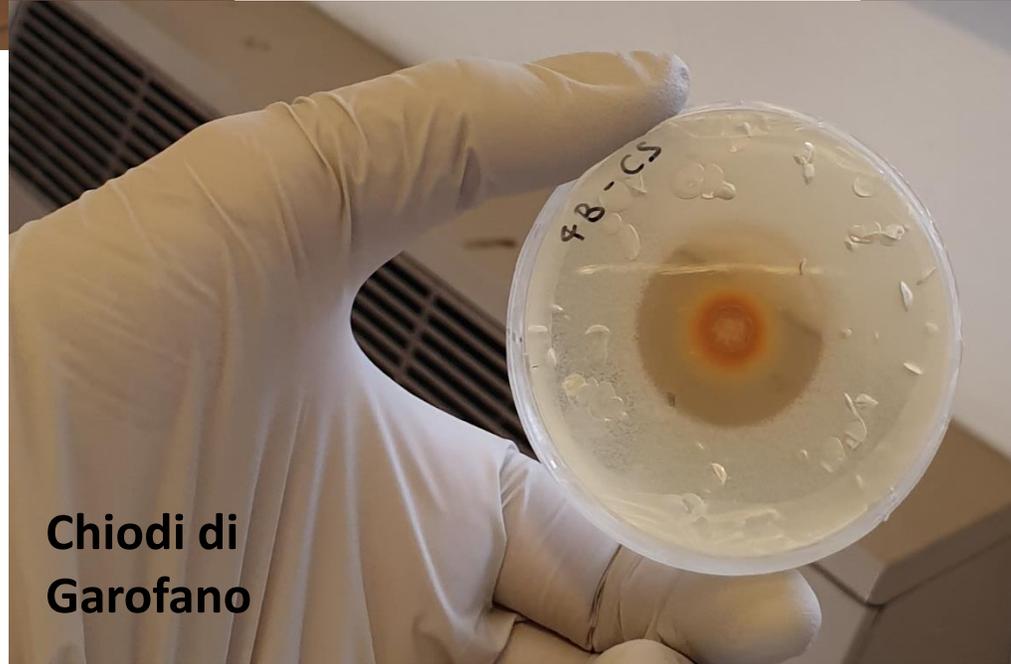
- Ingredienti antiossidanti naturali forniti da UNIUPO/CAMCOM:
 - Estratti botanici
 - Molecole
 - Oli essenziali
- Test *in vitro* per valutazione preliminare dell'attività antibatterica nei confronti dei cinque microorganismi target tramite metodica *agar well diffusion*
- Successiva valutazione Minima Concentrazione Inibente (MIC) degli ingredienti più interessanti da IZS



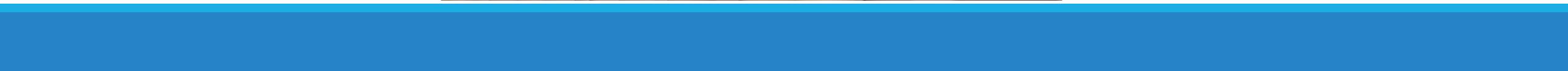
Salvia



Timo



Chiodi di
Garofano



Challenge test: ingredienti alternativi



Prima trance sono state saggiate 5 differenti ricette:

RICETTA 1	Carne, sale, pepe, destrosio + <u>TIMO 3,2%</u> + Nitriti 80 mg/kg + microrganismo patogeno + <i>L. curvatus</i> + <i>S. xylosus</i>
RICETTA 2	Carne, sale, pepe, destrosio + <u>TIMO 3,2%</u> + Nitriti 40 mg/kg + microrganismo patogeno + <i>L. curvatus</i> + <i>S. xylosus</i>
RICETTA 3	Carne, sale, pepe, destrosio + microrganismo patogeno + <i>L. curvatus</i> + <i>S. xylosus</i>
RICETTA 4	Carne, sale, pepe, destrosio + <i>L. curvatus</i> + <i>S. xylosus</i>
RICETTA 5	Carne, sale, pepe, destrosio + <u>TIMO 3,2%</u> + microrganismo patogeno + <i>L. curvatus</i> + <i>S. xylosus</i>

RICETTA 1	Carne, sale, pepe, destrosio + TIMO 3,2% + Nitriti 40 mg/kg + <u>nitriai</u> 20 mg/kg + starter commerciali + <u>L. monocytogenes</u> + <u>C. sporogenes</u> + <u>S. aureus</u>
RICETTA 2	Carne, sale, pepe, destrosio + Nitriti 40 mg/kg + nitrati 20 mg/kg + starter DISAFA + <u>L. monocytogenes</u> + <u>C. sporogenes</u> + <u>S. aureus</u>
RICETTA 3	Carne, sale, pepe, destrosio + Nitriti 40 mg/kg + nitrati 20 mg/kg + <u>L. monocytogenes</u> + <u>C. sporogenes</u> + <u>S. aureus</u>
RICETTA 4	Carne, sale, pepe, destrosio + Nitriti 40 mg/kg + nitrati 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura <u>bioprotettiva</u> DISAFA + <u>L. monocytogenes</u> + <u>C. sporogenes</u> + <u>S. aureus</u>
RICETTA 5	Carne, sale, pepe, destrosio + Nitriti 40 mg/kg + nitrati 20 mg/kg + starter commerciali
RICETTA 6	Carne, sale, pepe, destrosio + Nitriti 40 mg/kg + nitrati 20 mg/kg + starter commerciale + coltura <u>bioprotettiva</u> DISAFA