

*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna

Dipartimento di Scienze degli Alimenti

Dottorato di ricerca in Biotecnologie degli Alimenti

XX Ciclo

Attività antagonistica di batteri lattici  
isolati da salami verso muffe e lieviti

Tesi di dottorato

*Dottorando:*

**Simone Carri**

*Tutor: Chiar.mo Prof.*

**Luigi Grazia**

*Coordinatore: Chiar. mo Prof.*

**Giuseppe Losi**

I salumi.....	5
Definizione e classificazione dei salumi .....	5
Classificazione salumi.....	5
I salami.....	8
Aspetti tecno-microbiologici .....	11
Impasto come mezzo nutritivo .....	11
Caratteristiche microbiologiche della carne fresca .....	13
Fermentazione spontanea nei salami.....	15
I Batteri tipici degli insaccati crudi fermentati .....	18
Genere <i>Lactobacillus</i> .....	19
Genere <i>Pediococcus</i> .....	21
Genere <i>Leuconostoc</i> .....	21
Genere <i>Lactococcus</i> .....	22
Genere <i>Enterococcus</i> .....	22
Famiglie <i>Micrococcaceae</i> e <i>Staphylococcaceae</i> .....	22
Classificazione .....	24
Genere <i>Lactobacillus</i> .....	24
Genere <i>Leuconostoc</i> .....	28
Genere <i>Pediococcus</i> .....	29
Genere <i>Lactococcus</i> .....	30
Genere <i>Enterococcus</i> .....	31
Genere <i>Kocuria</i> .....	31
Genere <i>Staphylococcus</i> .....	33
Funghi .....	35
Muffe .....	35
Genere <i>Penicillium</i> .....	35
Lieviti .....	39
<i>Debaryomyces hansenii</i> .....	42
Culture starter dei salami .....	44
Batteri lattici.....	44
<i>Micrococcaceae</i> e <i>Staphylococcaceae</i> .....	45
Muffe.....	46

Le muffe bianche .....	46
Lieviti .....	48
Relazioni microbiche .....	49
Azioni concatenate .....	49
Interazione tra microrganismi .....	50
Interazioni nulle.....	50
Interazioni positive .....	51
Commensalismo .....	51
Mutualismo o sinergismo .....	52
Interazioni negative .....	52
Competizione .....	53
Predazione .....	53
Antagonismo o amensalismo .....	54
Composti antimicrobici .....	54
Batteriocine .....	55
Composti antifungini.....	55
PARTE SPERIMENTALE.....	59
Introduzione .....	60
Materiali e Metodi.....	61
Microrganismi .....	61
Determinazione dell'attività inibente .....	62
Determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze inibenti.....	62
Determinazione dell'acido fenil-lattico tramite HPLC.....	63
Acquisizione immagini .....	64
Risultati e discussione.....	64
Spettro dell'attività inibente in fase fermentativa .....	64
Attività inibente in fase tardiva .....	67
Caratteristiche chimico-fisiche del composto prodotto in fase precoce.....	68
Caratteristiche chimico fisiche del composto prodotto in fase post-fermentativa ...	71
Conclusioni .....	75
Bibliografia: .....	77

Dottorato di ricerca in Biotecnologie degli Alimenti:  
*Attività antagonistica di batteri lattici isolati da salami verso muffe e lieviti*

## **I salumi**

### **Definizione e classificazione dei salumi**

Il termine salume serve per definire prodotti alimentari a base di carne trattati e conservati per mezzo della salagione (Zambonelli *et al.*, 1992).

L'animale la cui carne viene spesso impiegata per la produzione dei salumi è il suino ma, da sole o miscelate con quelle suine sono usate anche carni bovine, equine, ovine e di specie avicole (polli, oche, tacchini). La parte grassa, quando viene aggiunta come nel caso dei prodotti con carne tritata, è sempre di origine suina perché più sapida e idonea sotto tutti i punti di vista; infatti il grasso suino si presenta bianco, sodo, ed estremamente fragrante. Tutti i salumi, comunque preparati, hanno in comune l'operazione della salagione la cui funzione fondamentale è quella di assicurare la conservabilità di alimenti per loro natura molto deteriorabili a causa dell'elevato contenuto in acqua. I vari tipi di salume sono ottenuti generalmente da parti anatomiche ben precise della carcassa.

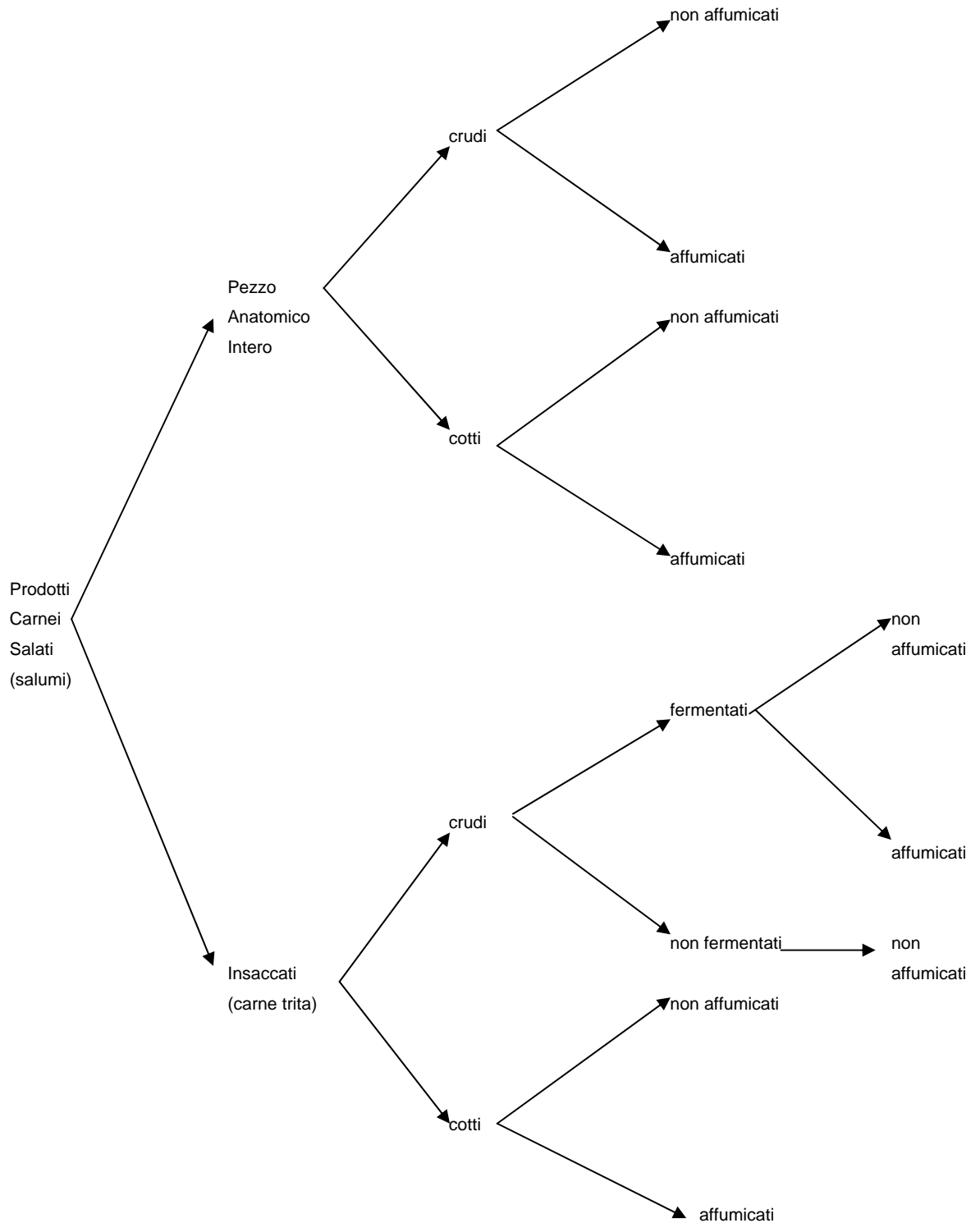
La carcassa è costituita fondamentalmente dallo scheletro, dai tendini, dai tessuti muscolare, adiposo, connettivo e dai vasi sanguigni. I rapporti dei principali componenti variano in funzione dell'età dell'animale, razza e tipo di alimentazione.

Le carcasse, divise in mezzene, vengono sottoposte alla sezionatura, cioè all'operazione mediante la quale si separano le parti destinate ai diversi tipi di lavorazione (Zambonelli *et al.*, 1992). Alcuni salumi sono prodotti con pezzi anatomici interi a volte provvisti sia della base scheletrica sia della cotenna (prosciutto, spalla) altre volte costituiti solamente dal tessuto muscolare e dal tessuto adiposo presente tra i fasci muscolari o adiacente ai fasci muscolari (lonza, coppa, pancetta, speck, etc). Altri salumi invece sono costituiti da carne tritata ed insaccata in budelli.

### **Classificazione salumi**

La classificazione dei salumi si può riassumere sulla base di quanto riportato in figura 1.

**Figura 1: Classificazione salumi**



La tabella 1 riporta un elenco dei salumi più conosciuti e le relative caratteristiche salienti.

**Tabella 1: Caratteristiche tecnologiche dei principali salumi**

	Crudi	Cotti	Affumicati	Pezzo anatomico	Fermentati	Insaccati
<b>Bacon</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Coppa</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Cotechino</b>	+	-	-	-	-	+
<b>Culatello</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Finocchiona</b>	+	-	-	-	+	+
<b>Prosciutto di Norcia</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Prosciutto di Parma</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Prosciutto di Praga</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Prosciutto di San Daniele</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Prosciutto di Westfalia</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Prosciutto Toscano</b>	+	-	-	+	-	-
<b>Salame Felino</b>	+	-	-	-	+	+
<b>Salame Milano</b>	+	-	-	-	+	+
<b>Salame Ungherese</b>	+	-	+	-	+	+
<b>Salsiccia</b>	+	-	-	-	-	+
<b>Speck</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Zampone</b>	+	-	-	-	-	+
<b>Mortadella</b>	-	+	-	-	-	+
<b>Prosciutto cotto affumicato</b>	-	+	+	+	-	-
<b>Prosciutto e spalla cotta</b>	-	+	-	+	-	-
<b>Salame cotto affumicato</b>	-	+	+	-	-	+
<b>Wurstel</b>	-	+	+	-	-	+
<b>Arista o lombata arrosto</b>	+	+	-	+	-	-

I salumi sono prodotti alimentari tradizionali di tutte le parti del mondo ed ogni paese ha i propri, con differenze che riguardano la specie animale che fornisce la carne, gli aromi aggiunti, il tipo di preparazione ed eventualmente l'involucro. In Italia essi sono particolarmente numerosi e sono spesso caratteristici delle abitudini alimentari regionali. Secondo Manetti e Tosonotti (1984) i salumi prodotti in Italia possono essere ricondotti a 5 tradizioni fondamentali, tali da consentire una classificazione geografica:

- Germanica Mitteleuropea, che comprende Valle d'Aosta e Trentino-Alto Adige.
- Celtica, comprende Liguria, Piemonte, Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna.

- Etrusco-Latina, comprendente Toscana, Umbria, Marche, Lazio, Abruzzo e Molise.
- Greca, comprendente Campania, Basilicata, Calabria, Puglia e Sicilia.
- Punico-Fenicia, limitata alla sola Sardegna.

Tuttavia, attualmente, la concentrazione della produzione, l'apertura dei mercati e la standardizzazione delle norme e delle tecnologie comportano un appiattimento della qualità (augurabilmente a livello elevato) e in particolare delle caratteristiche organolettiche, ostacolando la diffusione dei salumi tipici regionali (Zambonelli *et al.*, 1992).

## I salami

I salami sono il prodotto della fermentazione lattica di impasti di carne e grasso tritati, salati, trattati con differenti spezie, insaccati in budelli naturali o ricostituiti, con eventuale aggiunta di zucchero (Lücke, 1997), il loro consumo avviene solo previa stagionatura (Zambonelli *et al.*, 1992; Ordonez *et al.*, 1999).

Nel processo tecnologico di produzione e di trasformazione del salame, (tab. 2) gli ingredienti aggiunti hanno una fondamentale importanza per un ottimo sviluppo dei microrganismi favorevoli a scapito di quelli patogeni o alteranti e per una corretta maturazione.

**Tabella 2: Componenti dell'impasto medio di salami**

Carne suina e/o bovina	50 - 98 %
Grasso suino tagliato a cubetti e miscelato alla carne magra	2 - 50 %
Na Cl	2.4 - 4.0 %
Nitriti e/o Nitrati per Kg	150 mg
Zuccheri: glucosio o saccarosio,	0.2 - 1.0 %
lattosio come latte o siero di latte in polvere	1.0 - 2.0 %
Spezie: pepe in grani o macinato, aglio, semi di finocchio, peperone, ecc.	A seconda della tipologia

La tecnica di produzione dei salami comprende le seguenti fasi (Zambonelli *et al.*, 1992, Cenci-Coga *et al.*, 2008):



1. **Preparazione della materia prima:** dopo la macellazione e la fase successiva di sezionatura, la carne subisce una refrigerazione a 0-2°C.
2. **Tritatura e Miscelazione:** i tagli magri, semi grassi e grassi vengono tritati con calibro variabile a seconda della grana che si vuole ottenere. La miscelazione o impasto è di fondamentale importanza per l'omogeneizzazione del sale, nitrati, nitriti (Siu e Henshall, 1998), spezie ed eventuale aggiunta degli starter batterici alla materia prima.
3. **Insacco:** l' impasto dopo miscelatura viene insaccato in budelli naturali o artificiali. I motivi per cui si scelgono l'uno o l'altro sono di natura tecnologica e microbiologica; gli artificiali si preferiscono per la regolarità del loro calibro, la quantità di grasso, l'assenza di odori sgradevoli e di flora microbica. Il budello svolge un compito necessario per i successivi periodi di stufatura, asciugatura e stagionatura, favorendo l'anaerobiosi, limitando le perdite di umidità e fungendo da barriera naturale contro eventuali patogeni.
4. **Stagionatura:** la stagionatura è il periodo di tempo nel quale avvengono una serie di trasformazioni fisiche, chimiche, biologiche e microbiologiche che conferiranno le caratteristiche organolettiche tipiche all'insaccato. La fase di stagionatura si può suddividere in 3 sottofasi: stufatura, asciugatura e stagionatura in senso stretto.

**STUFATURA:** I salami sono posti a temperatura di 18-26°C per riscaldare uniformemente l'impasto; l'umidità relativa compresa tra 90-94 % UR. La durata varia in funzione della sezione e dimensioni del salame. Raggiunta la temperatura desiderata inizia lo sviluppo dei microrganismi utili.

**ASCIUGATURA:** fase nella quale si sottrae al prodotto l'umidità in eccesso e si stimola lo sviluppo della popolazione microbica virtuosa. La temperatura scende a 16-12°C e l'umidità all' 75-90 % UR

Questa fase è molto critica perché il pH deve scendere a valori di 4,7 - 5,3, necessari per l'azione inibente nei confronti di sviluppi microbici indesiderati.

Già al 3° giorno inizia lo sviluppo delle muffe di superficie, fenomeno conosciuto con il termine “impiumatura”, sviluppo gradito in alcune tipologie di salami, sgradito in altre, nel qual caso si procede con affumicature o lavaggi. STAGIONATURA IN SENSO STRETTO: in questo periodo avvengono le principali modificazioni biochimiche. Le condizioni di temperatura (11-12°C) e l’umidità del 70-75% UR, favoriscono una lenta ma costante asciugatura. Durante tale periodo si ottengono i principali processi fermentativi sostenuti da batteri lattici, muffe e micrococchi. Questi ultimi garantiscono la parziale idrolisi di grassi e proteine contribuendo all’arricchimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto.

## **5. Maturazione dei salami:**

La maturazione non deve essere confusa con la stagionatura e quindi limitata ad un periodo determinato, ma può estendersi dalla stufatura fino al consumo (da 15 a 180 giorni). L’effetto dell’attività combinata dei processi chimici, fisici, biochimici e microbiologici serve a garantire la riuscita del prodotto. L’umidità del prodotto scende gradualmente da valori iniziali del 50-70% a quelli finali del 27-45%.

La perdita di umidità e la relativa diminuzione della  $a_w$  si traducono in una ulteriore concentrazione del cloruro di sodio che accentua la sua funzione selettiva ed inibente.

In questo intervallo di tempo è importante non avere brusche variazioni di umidità ambientale che possono provocare la formazione di croste superficiali con accumulo di umidità al centro del prodotto.

Il pH, per effetto dei batteri lattici, scende dapprima a livelli di 4,7-5,3 rispetto a quelli iniziali di 5,6-5,8 (Aymerich *et al.*, 2003, Cenci-Coga *et al.*, 2008) per poi risalire di qualche decimo nella seconda fase della maturazione in conseguenza allo sviluppo delle muffe. L’attività delle muffe non si limita tuttavia al metabolismo dell’acido lattico, ma favorisce anche l’idrolisi delle proteine e dei lipidi (Philipp e Pedersen, 1988, Ludemann *et al.*, 2004).

## Aspetti tecno-microbiologici

### Impasto come mezzo nutritivo

Nella tabella 2 è illustrata la composizione dell'impasto e le quantità dei suoi elementi. L'impasto può rappresentare un terreno di sviluppo ottimale. Il substrato è rappresentato da due porzioni, una grassa e una magra la cui base nutritiva per la crescita e la moltiplicazione è sostanzialmente fornita dalla porzione magra (tabella 3), impiegata nella misura del 50-98%.

**Tabella 3: Composizione chimica di un tipico muscolo di mammifero dopo *rigor mortis*, ma prima delle alterazioni postmortali (da Lawrie, 1983)**

Componenti:	Peso	Umido %
Acqua		75,0
Proteine		19,0
- miofibrillari		11,5
miosina	6,5	
astina	2,5	
tropomiosine	1,5	
proponine C, I e T	0,4	
actine $\alpha$ e $\beta$	0,4	
proteina M. ecc.	0,2	
- sarcoplasmatiche		5,5
gliceraldeide fosfato deidrogenasi	1,2	
aldolasi	0,6	
creatine chinasi	0,5	
altri enzimi glicolitici	2,2	
mioglobina	0,2	
emoglobina ed altre proteine extracellulari non specifiche	0,6	
- tessuto connettivo ed orfanelli		2,0
collagene	1,0	
elastina	0,05	
mitocondriali ecc.	0,95	

*continua...*

...segue tabella 3

<b>Componenti:</b>	<b>Peso</b>	<b>Umido %</b>
Lipidi		2,5
Carboidrati		1,20
acido lattico	0,90	
glucosio-6-fosfato	0,15	
glicogeno	0,10	
glucosio, tracce di composti della glicolisi	0,05	
Varie sostanze non proteiche solubili		2,3
- azotate		1,65
creatina	0,55	
inosina monofosfato	0,30	
di- e tri- fosfopiridina	0,30	
nucleotidi	0,10	
aminoacidi	0,35	
carnosina ed anserina	0,35	
- inorganiche		0,65
fosforo totale solubile	0,20	
potassio	0,35	
sodio	0,05	
magnesio	0,02	
calcio, zinco, metalli in traccia	0,23	
Vitamine		tracce

Lo sviluppo microbico è influenzato dalla quantità di zuccheri presenti nella carne, o eventualmente aggiunti, dal sale e, in maniera negativa dalle spezie (Conventry e Hockey, 1993).

## **Caratteristiche microbiologiche della carne fresca**

Le masse muscolari dell'animale vivo e in perfette condizioni di salute sono sterili, sterilità che viene perduta al momento stesso della macellazione.

Ingram (1949) ha proposto di suddividere la flora batterica presente nelle carni in due gruppi:

- Batteri intrinseci, presenti nei tessuti profondi di animali sani. Questi batteri trovano la loro origine nell'intestino degli animali e raggiungono i tessuti prima o dopo la loro morte lungo le vie interne, quando l'abbattimento dell'animale e le successive operazioni di dissanguamento e di eviscerazione non siano condotte correttamente (Gill e Jones, 1992, Boers *et al.*, 1992).
- Batteri estrinseci, presenti soltanto sulle parti superficiali. Essi rappresentano la maggioranza dei batteri della carne e derivano dall'ambiente (Zambonelli *et al.*, 1992, Prendergast *et al.*, 2004, Pearce *et al.*, 2006), Narnvar e Warriner, (2006) sostiene che questo rappresenta la principale fonte di inquinamento, soprattutto di *Enterobacteriaceae*.

Le vie di contaminazione sono molteplici ed è per questo che è assolutamente necessario seguire precise norme igieniche di prevenzione e di contenimento della carica microbica durante la macellazione e le successive fasi di sezionatura della carcassa e di preparazione degli insaccati (Davies e Board, 1998).

In letteratura i valori numerici, riferiti alla contaminazione superficiale di carni al termine della eviscerazione e sezionatura della carcassa, sono  $\geq 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, ed in differenti realtà e tecnologie fino al 4,2-4,5 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup> (Bolton *et al.*, 2002, Zweifel *et al.*, 2008).

La carica microbica tende a salire durante le fasi di triturazione delle carni per la preparazione degli insaccati crudi poiché si aumenta considerevolmente la superficie disponibile.

L'aggiunta di spezie e la successiva manipolazione portano ad un ulteriore incremento del numero di microrganismi. Pertanto le operazioni legate alla macellazione degli animali e il successivo trattamento delle carni, se non condotte nel rispetto delle buone prassi di lavorazione dei carni, possono dar luogo a contaminazioni microbiche in

grado di compromettere sia la conservabilità che la qualità della carne e la salute del consumatore.

I più importanti fattori che influenzano la moltiplicazione microbica delle carni sono:

- 1) tipo di substrato carneo;
- 2)  $a_w$ ;
- 3) temperatura;
- 4) pH;
- 5) disponibilità di fonti di energia e di carbonio;
- 6) presenza di sostanze inibenti;
- 7) presenza o assenza di ossigeno;
- 8) tipo, numero e interrelazioni delle diverse popolazioni microbiche contaminanti.

Uno studio di Parisi e Giaccone (1983) ha permesso agli Autori di isolare ed identificare nelle carni i microrganismi riportati in tabella 4 (Sarra e Levoni, 1996).

**Tabella 4: Elenco dei microrganismi presenti sulla carne**

<b>BATTERI</b>		
<i>Pseudomonas</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Kurthia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Leuconostoc</i>	
<b>LIEVITI</b>		
<i>Saccharomyces</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Debaryomices</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Candida</i>
<i>Hansenula</i>		
<b>MUFFE</b>		
<i>Penicillium</i>	<i>Geotrichum</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Monilia</i>	<i>Mucor</i>	<i>Sporotrichum</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Thamnidium</i>		

## **Fermentazione spontanea nei salami**

In un recente articolo che l'autore condivide, qui è in parte riportato, la fermentazione spontanea dei salami è così illustrata.

“Subito dopo la triturazione e l'insacco della carne, le cellule microbiche uniformemente distribuite nell'impasto hanno la possibilità di moltiplicarsi.

Come già detto, il sale costituisce un fattore di forte selezione ed inibisce tutte quelle specie microbiche che non ne tollerano la presenza. Fra i gruppi microbici più sensibili sono da ricordare i batteri putrefacenti quali le *Pseudomonadaceae* e le *Enterobacteriaceae*, i batteri sporigeni aerobi del genere *Bacillus*, molti sporigeni anaerobi del genere *Clostridium* (ma non tutti) ed altri (Comi *et al.*, 2005; Chevallier *et al.*, 2006).

Fra i batteri alotolleranti, i primi che cominciano a svilupparsi vigorosamente sono quelli riferibili alle famiglie *Micrococcaceae* e *Staphylococcaceae*, molto numerosi perché provenienti dalla pelle e dalle mucose degli animali. Le specie appartenenti alle *Micrococcaceae* sono aerobie obbligate rappresentate con maggiore frequenza da *Kocuria rosea* e *K. varians* (Coppola *et al.*, 1997; Coppola *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2007). Lo sviluppo di queste specie si arresta contemporaneamente con l'esaurimento dell'ossigeno; sono in grado di utilizzare sia lo zucchero che altri composti quali lattati, piruvati, succinati, ecc.

Le specie appartenenti alla famiglia *Staphylococcaceae* (principalmente *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus*), aerobie o anaerobie facoltative, sono in grado di svilupparsi anche all'interno del substrato ed in anaerobiosi producono acido lattico (Nychas e Arkoudelos, 1990; Coppola *et al.*, 1997; Coppola *et al.*, 2000; Di Maria *et al.*, 2002; Papamanoli *et al.*, 2002; Mauriello *et al.*, 2004).

Questi batteri sono considerati utili perché, essendo fortemente lipolitici, contribuiscono positivamente al processo di maturazione dei prodotti (Cantoni *et al.*, 1967; Selgas *et al.*, 1993; Casaburi *et al.*, 2005).

Quasi contemporaneamente alle *Micrococcaceae* e alle *Staphylococcaceae*, ma più lentamente perché all'inizio meno numerosi, sviluppano i batteri lattici omofermentanti eterofermentanti facoltativi od eterofermentativi, tutti mesofili (Coppola *et al.*, 1998; Samelis, 1998; Papamanoli *et al.*, 2003; Comi *et al.*, 2005). I

batteri lattici esauriscono gli zuccheri e abbassano il valore del pH portandolo a livello di 5,3 o meno (in funzione delle quantità di zuccheri aggiunti); in questo modo proteggono il prodotto dalla possibilità di sviluppo di batteri sensibili all'acidità del mezzo.

Le specie che si riscontrano possono essere numerose e riferibili a diversi generi; quelle più frequenti sono lattobacilli riferibili alle specie *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* (omofermentativi eterofermentanti facoltativi), *L. brevis* e *L. buchneri* (eterofermentativi) (Grazia *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 1998; Rebecchi *et al.*, 1998; Aymerich *et al.*, 2003; Papamanoli *et al.*, 2003).

Oltre ai micrococchi e ai batteri lattici ora ricordati, nella fase fermentativa possono moltiplicarsi anche altre specie la cui azione non è univoca; alcuni batteri lattici omofermentativi quali i pediococchi ed eterofermentativi quali *Leuconostoc* possono affiancarsi agli altri senza sconvolgere i risultati (Santos *et al.*, 1998; Papamanoli *et al.*, 2003). Poco graditi sono invece gli enterococchi (*Enterococcus faecalis* ed *E. faecium*) la cui azione non è dissimile a quella dei lattici omofermentativi, ma con la prerogativa di conferire un gusto sgradevole al prodotto (Hugas, 2003; Martin *et al.*, 2005).

Non è da escludere che, nelle primissime fasi, possano moltiplicarsi anche *Staphylococcus aureus* (Atanassova *et al.*, 2001), il più frequente agente di tossinfezioni alimentari, il cui habitat primario è la mucosa nasale dell'uomo, e *Listeria monocytogenes*, molto diffuso in natura e in grado di contaminare numerose materie prime alimentari (Junttila *et al.*, 1989; Borch *et al.*, 1996; Salvat *et al.*, 1998) nonché agente di una insidiosa malattia dell'uomo, nota col nome di listeriosi.

Entrambi, sia *S. aureus* che *L. monocytogenes*, sono aerobi e trovano un limite alla loro attività nella mancanza di ossigeno che si viene presto a determinare all'interno dell'impasto, ma non nella parte superficiale o prossima alla superficie.

Batteri fortemente alteranti, quale *Brochothrix thermosphacta* (Cocolin *et al.*, 2001; Capita *et al.*, 2006) o fortemente tossigeni, quale *Clostridium botulinum*, hanno la possibilità di moltiplicarsi anche in assenza di ossigeno e di zuccheri, ma sono fortemente ostacolati od inibiti da valori di pH inferiori a 5,2; lo sviluppo di *C. botulinum* è inoltre del tutto inibito dai nitriti la cui funzione più importante è proprio questa (Hauschild *et al.*, 1982; Roberts e Gibson, 1986).



Oltre che nell'impasto, un intenso sviluppo di microrganismi si verifica anche sul budello e al suo interno; si tratta prevalentemente di funghi rappresentati da un lievito, *Debaryomyces hansenii* (Capriotti, 1954; Dalton, 1984) e da numerose muffe più spesso riferibili al genere *Penicillium*.

*D. hansenii* è uno dei pochissimi lieviti capaci di tollerare il sale, è privo di attività fermentativa e la sua moltiplicazione può aver luogo soltanto sopra o sotto il budello. Secondo alcuni Autori esso svolge alcune importanti funzioni tra cui quella di facilitare il distacco della pelle dal prodotto una volta affettato (Capriotti, 1954; Lücke e Heckelmann, 1987). Più recenti studi hanno evidenziato l'attività lipolitica di *Debaryomyces hansenii* sul grasso suino (Saldanha-da-Gama *et al.*, 1997), l'attività proteolitica sulle proteine sarcoplasmatiche (Santos *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002) e sono state purificate e caratterizzate alcune sue esopeptidasi (Bolumar *et al.*, 2003).

Di maggiore interesse è invece lo sviluppo delle muffe che avviene sul budello. I conidi presenti nell'atmosfera si depositano sul budello dove immediatamente germinano dando origine a micelio; questo comincia a diventare visibile dopo 4-6 giorni e rapidamente ne invade tutta la superficie. Più spesso si tratta di rappresentanti del genere *Penicillium*, con prevalenza di *P.cyclopium* e frequente presenza di *P. verrucosum*, *P.chrysogenum*, *P. nalgiovense* ed altri il cui micelio penetra nell'impasto (Dragoni e Cantoni, 1979; Grazia *et al.*, 1986; Andersen *et al.*, 1996).

Le muffe svolgono importanti funzioni: regolatrici dell'umidità del prodotto impedendo la formazione di crosta (Grazia *et al.*, 1986; Singh e Dincho, 1994); utilizzando per il loro sviluppo l'acido lattico prodotto dai batteri lattici svolgono azione disacidificante, idrolizzano le proteine liberando composti azotati semplici (Rodriguez *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002) e conferiscono infine un particolare aspetto esteriore al prodotto che, nel caso di muffe a micelio bianco, è molto gradito.

Quando il processo di maturazione è piuttosto avanzato, si creano le condizioni che favoriscono anche lo sviluppo di muffe del genere *Aspergillus*. Gli aspergilli, infatti, sono xerofili e trovano condizioni adatte alla loro moltiplicazione quando l'umidità del prodotto è diminuita, non sono graditi perché rientrano nel gruppo di muffe che formano le micotossine più pericolose: principalmente aflatossine e ocratossine (Nunez *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1996; Bailly *et al.*, 2004)". (da Coloretti *et al.*, 2007).

## I Batteri tipici degli insaccati crudi fermentati

Nella carne dei salami, dopo la tritatura, sono presenti diversi microrganismi appartenenti a differenti gruppi microbici.

L'aggiunta di cloruro di sodio svolge una forte azione selettiva, favorendo la crescita dei soli batteri alotolleranti che possono essere suddivisi in tre categorie:

- Batteri alteranti (tabella 5): Sono batteri che con il loro metabolismo principale o conseguentemente alle attività litiche producono sostanze maleodoranti ed indesiderate, che possono condizionare la commerciabilità del prodotto (Coloretti *et al.*, 2007b).

**Tabella 5: Elenco dei batteri alteranti isolati da salami**

Specie	Autore
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Capita <i>et al.</i> , 2006
<i>Citrobacter braakii</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrobacter freundii</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Citrobacter youngae</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Enterobacter cloacae</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Enterococcus faecalis</i>	Martin <i>et al.</i> , 2005
<i>Enterococcus faecium</i>	Martin <i>et al.</i> , 2005
<i>Escherichia coli</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Hafnia alvei</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Klebsiella terrigena</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Kluyvera</i> spp.	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Proteus mirabilis</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Proteus vulgaris</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Providencia alcalifaciens</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Providencia stuartii</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas</i> spp.	Gounadaki <i>et al.</i> , 2008
<i>Rahnella aquatilis</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Serratia liquefaciens</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Serratia</i> spp.	Coloretti <i>et al.</i> , 2007b

- Batteri patogeni (tabella 6): sono i batteri in grado di produrre tossine che colpiscono l'apparato gastrointestinale.

**Tabella 6: Elenco dei batteri patogeni isolati da salami**

<b>Specie</b>	<b>Autore</b>
<i>Bacillus cereus</i>	Kanatt <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium botulinum</i>	Cintas <i>et al.</i> , 1998
<i>Clostridium perfringes</i>	Cintas <i>et al.</i> , 1998
<i>Listeria monocytogens</i>	Cintas <i>et al.</i> , 1998
<i>Salmonella arizonae</i>	Garcia Fontan <i>et al.</i> , 2007
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Marazza e Crespi, 1963
<i>Salmonella spp.</i>	Cengi-Coga <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella typhimurium</i>	Pontello <i>et al.</i> , 1998
<i>Staphylococcus aureus</i>	Atanassova <i>et al.</i> , 2001

- Batteri utili: sono i Batteri lattici appartenenti ai generi, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e per finire i generi *Kokuria* e *Staphylococcus* (Papa *et al.*, 1990; Papamanoli *et al.*, 2003). Le loro caratteristiche tecnologiche sono precisate nei paragrafi a seguire.

### **Genere *Lactobacillus***

Costituiscono la flora microbica predominante in tutti i tipi di insaccati, anche con differenti carni (Aquilanti *et al.*, 2007, Todorov *et al.*, 2007, ), studi di Samelis *et al.*, 1998, Cenci-Coga *et al.*, (2007) illustrano cariche microbiche fino a  $10^6$ - $10^8$  nei giorni successivi all'insacco. Caratteristica principale di questo gruppo di batteri è la loro capacità di utilizzare zuccheri semplici (solo alcuni possono utilizzare il lattosio e oligosaccaridi diversi) per produrre:

- Solo acido lattico D ed L in proporzioni quasi equivalenti se sono omofermentanti
- Acido lattico e piccole quantità di acido acetico a partire da pentosi per eterofermentanti facoltativi
- Acido lattico, acido acetico ed anidride carbonica in proporzioni uguali da parte degli eterofermentanti obbligati

I batteri lattici non possiedono grande attività proteolitica né lipolitica, tuttavia nella fase di maturazione dell'insaccato, in concomitanza con la lisi delle cellule batteriche, specifiche attività proteolitiche avrebbero un ruolo nell'aromatizzazione (Baruzzi *et al.*, 2006). I batteri lattici possono, però, deamminare gli amminoacidi e produrre piccole quantità di etanolo, acetoino, diacetile, acidi volatili, ed alcoli diversi anch'essi molto importanti per l'aroma e il sapore del prodotto (Alvarez-Martin *et al.*, 2008) purtroppo possono anche decarbossilare gli amminoacidi producendo ammine (Halasz *et al.*, 1994, Shalaby, 1996, Silla Santos, 1996).

Attraverso l'acidificazione del substrato, con i prodotti del loro metabolismo, svolgono un'efficiente azione di controllo sui batteri patogeni e su quelli putrefacenti, infatti i Batteri lattici producono H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in grado di inibire *Staphylococcus aureus* (Otero e Nadar-Marcia, 2006).

Questa attività di controllo può essere anche determinata dalla produzione di batteriocine inibitrici di *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* come dimostrato da lavori di Campanini *et al.*, 1993 Hugas *et al.*, 1995, Pidcock *et al.*, 2001, Dicks *et al.*, 2004, Todorov *et al.*, 2007. Innumerevoli lavori sull'argomento evidenziano la presenza specifica negli insaccati di: *L. plantarum*, *L. pseudoplantarum*, *L. farciminis*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. carnis*, *L. divergens*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. alimentarius*, *L. reuteri*, *L. viridiscens*, *L. halotolerans*, *L. bavaricus* ma prevalenti risultano *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum* (Coppola *et al.*, 2000, Aquilanti *et al.*, 2007, Silvestri *et al.*, 2007)

All'interno della specie di batteri lattici isolate da salami è possibile trovare differenze di varietà come dimostrato da studi di Coppola *et al.*, (2000) e Coloretto *et al.*, (2007a).

Nella selezione di ceppi da usare come starter in Italia e nei paesi mediterranei si prediligono gli omofermentanti acido-sensibili che portano ad un pH di fine stagionatura di 5,6-6,0 (Sarra e Levoni, 1996, Aquilanti *et al.*, 2007, Silvestri *et al.*, 2007), questo criterio di selezione è discutibile poiché la quantità di acido prodotto dai batteri lattici omofermentanti è direttamente proporzionale alla quantità di zucchero fermentato, pertanto i batteri consigliati dagli autori (Sarra e Levoni 1996) dovrebbero quanto meno possedere un'elevata energia fermentativa (basso tempo di generazione) tale da consentire una rapida e completa colonizzazione del substrato. Per la produzione del salame italiano tradizionale infatti, oltre alla scelta di specifici ceppi, si

usa una ridotta quantità di zucchero e si stagiona a temperature basse in modo che il pH anche a fine asciugatura non scenda al di sotto del valore di 5,2-5,3. Ciò consente agli Stafilococchi e alle muffe migliori possibilità di sviluppo e di attività durante la lenta maturazione dell'insaccato, per ottenere prodotti di buona qualità sensoriale, graditi al consumatore (Zambonelli *et al.*, 1992).

### **Genere *Pediococcus***

Presente nella trasformazione delle carni dei salami di Napoli e quelli greci (Samelis *et al.*, 1994; Coppola *et al.*, 2000).

Una biomassa costituita da cellule di *Pediococcus cerevisiae* liofilizzate costituiva la prima coltura starter messa in commercio negli USA. *P. acidilactici* infatti, per l'alta temperatura ottimale di sviluppo e per il forte potere acidificante è generalmente utilizzato per gli insaccati di concezione statunitense ad impasto acido prossimo a pH  $\leq 5$ ; questa specie è inoltre in grado di produrre batteriocine (Nieto-Lozano *et al.*, 2006).

*P. pentosaceus* ha un buon sviluppo anche a temperature inferiori rispetto al precedente (15-26,7°C) (Lücke, 1994, Raccach e Tilley, 2006). Il suo sviluppo può essere stimolato da sali di Mn, Mg, Ca, Zn, glicerofosfato e gluconato.

Per ceppi appartenente a queste specie, autori come Berry *et al.*, 1990 hanno mostrato una produzione di batteriocine attive e capaci di inibire microrganismi indesiderati come *Listeria monocytogenes* (Aymerich *et al.*, 1998, Nieto-Lozano *et al.*, 2006).

### **Genere *Leuconostoc***

E' un genere che può essere sporadicamente isolato (Papamanoli *et al.*, 2003) o presente nella flora lattica nativa dei prodotti carnei, fino a ricoprire quote del 10% dei batteri lattici totali (Samelis *et al.*, 1994).

Una specie frequentemente isolata è *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, ad esempio nei salami tipo Napoli, (Coppola *et al.*, 2000) o in prodotti carnei (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004).

Molti autori suggeriscono l'uso di questo genere, in particolare di *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuc. carnosum* per la preservazione di alimenti, di carni sotto vuoto (Kelly *et al.*, 1996; Budde *et al.*, 2003; Metargis *et al.*, 2003), ma soprattutto per la

capacità di produrre batteriocine attive contro *Listeria monocytogens* (Drosinos *et al.*, 2006).

### **Genere *Lactococcus***

I ceppi delle specie appartenenti a questo genere sono raramente isolabili, anche se alcuni autori (Rantsiou *et al.*, 2005, Najjari *et al.*, 2008) hanno isolato le specie *Lactococcus lactis* e *Lc. garvieae*, quest'ultimo peraltro agente di mastiti bovini.

Recenti lavori suggeriscono l'uso di *Lactococcus lactis* questo genere nella produzione di salami italiani nostrani, in grado di permanere nel substrato fino a 20 giorni dall'inoculo con cariche tra  $10^8$ - $10^9$  UFC/g. Insieme con i lactobacilli, possono costituire una popolazione in grado di inibire i batteri patogeni (Coffey *et al.*, 1998; Cengi-Coga *et al.*, 2008).

Alcuni ceppi di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sono risultati infatti attivi contro *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Kelly *et al.*, 1996, Coffey *et al.*, 1998).

A tutt'oggi non ne è autorizzato l'impiego in Italia, ma non esistono motivi che ne ostacolano l'impiego futuro.

### **Genere *Enterococcus***

I microrganismi appartenenti a questo genere sono presenti in bassa carica nelle prime ore dell'insacco, ma permangono per tutta la stagionatura con cariche attorno alla  $10^5$  UFC /g (Samelis *et al.*, 1994, 1998).

Anche se per molti autori il genere è considerato indesiderato e tecnologicamente negativo, può fornire ceppi appartenenti alla specie *Enterococcus faecium* in grado di produrre batteriocine capaci di inibire la crescita di ulteriori batteri patogeni ed indesiderati nelle fermentazioni naturali dei salami (Herranz *et al.*, 2001).

### **Famiglie *Micrococcaceae* e *Staphylococcaceae***

Hanno metabolismo ossidativo o fermentativo. Molte specie sono cromogene e alcune possono produrre potenti tossine.

Nella famiglia si trovano specie virtuose impiegate come starter per la fermentazione di alcuni alimenti (salami) ma anche *Staphylococcus aureus*, la specie tossigena responsabile del più alto numero di tossinfezioni alimentari.

Del genere *Micrococcus* bisogna puntualizzare che nell'ultima classificazione del *Bergey's Manual* sono stati corretti le denominazioni delle specie ed attribuito un genere differente come descritto successivamente nella classificazione. Nei salumi la specie utilizzata come coltura starter è *Kocuria varians*, che sostituisce *Micrococcus varians*.

La presenza del genere *Staphylococcus* (*S. xilosus* e *S. carnosus*) è predominante sul genere *Micrococcus* (Papamanoli *et al.*, 2002).

Poiché le *Micrococcaceae* hanno una rilevante attività lipolitica e proteolitica, esse danno un sensibile apporto alla formazione dell'aroma e del sapore del prodotto stagionato.

Dalle analisi effettuate sulla presenza e quantità di acidi grassi liberi volatili e non volatili risulta un evidente parallelismo tra numero di microorganismi lipolitici e prodotti di demolizione dei lipidi. L'attività enzimatica di lipolisi che continua anche dopo la lisi delle cellule batteriche, prosegue fino alla produzione di aldeidi e chetoni.

Gli acidi grassi specie a corta catena ed i composti carbonilici sono fondamentali nella produzione dell'aroma (Mauriello *et al.*, 2004, Cocolin *et al.*, 2007).

Anche nei salumi è stato dimostrato che gli acidi grassi liberi esercitano un'azione letale su molti microorganismi e in modo particolare su *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

Tremonte (2004) ha studiato l'azione di stimolo e di inibizione di *Kocuria varians* verso *St. xilosus* e il ruolo sull'attività proteolitica.

Negli insaccati si manifestano anche trasformazioni a carico dei protidi.

- Le *Micrococcaceae* intervengono in fenomeni di demolizione delle proteine. Pertanto i micrococchi sono responsabili delle peculiari caratteristiche degli insaccati ed in particolare dell'espressione dell'aroma del gusto del prodotto.
- Rilevante e tipica è l'attività nitrato riduttasica operata dalle *Micrococcaceae*, essa porta alla riduzione dei nitrati in nitriti e pertanto determina: una buona fissazione del colore
- Favoriscono l'azione dei nitriti sul controllo dei clostridi e delle *Enterococcaceae*

- L'azione di stimolo o inibizione verso ceppi di *Staphylococcus xilosus* (

## Classificazione

Nei prossimi paragrafi verrà illustrata la classificazione dei gruppi microbici di maggiore interesse tecnologico per la produzione di insaccati fermentati.

Per quanto riguarda i batteri, si fa riferimento al Bergey' Manual of Systematic Bacteriology (Garrit *et al.*, 1984). Secondo questa classificazione i generi dei microrganismi che interessano gli insaccati fermentati sono classificati come riportato in tabella 7.

**Tabella 7: Classificazione dei generi di interesse tecnologico**

Sottoregno	Phylum	Classe	Ordine	Famiglia	Genere		
<i>Bacteria</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>		<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>		
				<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>		
				<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>		
					<i>Lactobacillales</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
						<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Pediococcus</i>
						<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>

### Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus*, secondo la classificazione più aggiornata e riportata nell'introduzione all'ultima edizione del Bergey's Manual (Garrity *et al.*, 2005) appartiene alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, Ordine *Lactobacillales*, Classe *Bacilli* del Phylum *Firmicutes*.

Sono microrganismi Gram-positivi, anaerobi o anaerobi facoltativi, catalasi negativi, asporigeni, immobili, salvo alcune eccezioni.

Le cellule sono di forma regolare, allungate, sottili, possono essere avvolte, corte e ricurve, formano lunghe catene. Sono microrganismi eterofermentanti e omofermentanti, microaerofili, con punti di temperature variabili, il valore di pH ottimale è tra 5,5-6,2.



Il genere comprende differenti specie suddivise in 3 gruppi:

- 1) Lattobacilli omofermentanti: usano come fonte di energia la fermentazione degli esosi, sono in grado di produrre acido lattico, mentre i pentosi non sono fermentati (tabella 8).
- 2) Lattobacilli omofermentanti, eterofermentanti facoltativamente: sono batteri lattici che in certe condizioni producono anche l'acido lattico, acido acetico, etanolo e acido formico. Fermentano anche pentosi con formazione di acido lattico e acido acetico (tabella 9).
- 3) Lactobacilli eterofermentanti obbligati; questi batteri lattici fermentano gli esosi producendo acido lattico, acido acetico, etanolo e anidride carbonica. Fermentano i pentosi come il 2° gruppo (tabella 10).

**Tabella 8: Classificazione dei batteri omofermentanti del genere *Lactobacillus* (DSMZ, 2008).**

<i>L. acidiphisis</i>	<i>L. kefiranofaciensis</i> subsp. <i>kefiranofaciensis</i>
<i>L. algidus</i>	<i>L. kefiranofaciensis</i> subsp. <i>kefirgranum</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. kitasatonis</i>
<i>L. amylotrophicus</i>	<i>L. mali</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. manihotivorans</i>
<i>L. animalis</i>	<i>L. mindensis</i>
<i>L. apotemi</i>	<i>L. nagelii</i>
<i>L. aviarius</i>	<i>L. nantensis</i>
<i>L. camelliae</i>	<i>L. pantheris</i>
<i>L. coleohominis</i>	<i>L. pennini</i>
<i>L. concavus</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
<i>L. crustorum</i>	<i>L. ruminis</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. saerimaneri</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. satsumensis</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. sharpea</i>
<i>L. formicalis</i>	<i>L. sobrius</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. suntoryeus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. thainlandensis</i>
<i>L. ghanensis</i>	<i>L. ultunensis</i>
<i>L. hayakitensis</i>	<i>L. versmoldensis</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. vini</i>
<i>L. iners</i>	<i>L. vitulinus</i>
<i>L. kalixensis</i>	

**Tabella 9: Classificazione dei batteri eterofermentanti facoltativi del genere *Lactobacillus* (DSMZ, 2008).**

<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. kimchii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lindneri</i>
<i>L. agilis</i>	<i>L. murinus</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. paracasei</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
<i>L. composti</i>	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. paralimentarius</i>
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	<i>L. paraplantarum</i>
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>L. perolens</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	<i>L. sakei</i>
<i>L. fuchuensis</i>	<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>
<i>L. hebinensis</i>	<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
<i>L. homohiochii</i>	<i>L. zeae</i>

**Tabella 10: Classificazione dei batteri eterofermentanti obbligati del genere *Lactobacillus* (DSMZ, 2008).**

<i>L. acidifarinae</i>	<i>L. mucosae</i>
<i>L. antri</i>	<i>L. namurensis</i>
<i>L. bifermetas</i>	<i>L. oligofermentas</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. oris</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. parabrevis</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. parabuchneri</i>
<i>L. confusus</i>	<i>L. paracollinoides</i>
<i>L. diolivoronas</i>	<i>L. paraferraginis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. pentosus</i>
<i>L. ferraginis</i>	<i>L. pontis</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. psitacci</i>
<i>L. frumenti</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. gastricus</i>	<i>L. rogosae</i>
<i>L. halotolerans</i>	<i>L. rossii</i>
<i>L. hammesii</i>	<i>L. sanfranciscensis</i>
<i>L. hilgardi</i>	<i>L. secaliphilus</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>L. siliginis</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>L. spicheri</i>
<i>L. ingluviei</i>	<i>L. suebicus</i>
<i>L. kefiri</i>	<i>L. thermotolerans</i>
<i>L. kunkeei</i>	<i>L. vaccinostercus</i>
<i>L. malefermentas</i>	<i>L. zymae</i>
<i>L. minor</i>	

### **Genere *Leuconostoc***

I batteri appartenenti al genere *Leuconostoc* appartengono alla famiglia delle *Leuconostocaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Le cellule sono sferiche e spesso lenticolari soprattutto quando crescono in substrati agarizzati, si presentano singolarmente in catenelle. Sono Gram positivi, non mobili, non sporigeni e facoltativamente anaerobi.

Le colonie sono piccole, meno di 1 mm di diametro, tondeggianti, lisce, grigio-bianche. Il brodo colturale è generalmente torbido ma se si originano catene particolarmente lunghe esse tendono a precipitare.

La temperatura ideale è di 20-30°C e perché possano sviluppare è necessario un intervallo di temperatura che va da 5 a 30°C.

Lo sviluppo di questi batteri è strettamente legato alla presenza nel mezzo di alcuni aminoacidi, quali acido nicotico, tiamina, biotina ed acido pantotenico od altri acidi derivati.

Il loro sviluppo dipende dalla disponibilità di carboidrati fermentescibili. Nel corredo enzimatico l'1-6 difosfofruttosio aldolasi è assente, mentre è presente la 6 glucosiofosfato deidrogenasi che, dal glucosio, origina anidride carbonica e D-ribulosio 5 fosfato. La xilulosio-5-fosfato fosfo-chetolasi determina la produzione di etanolo e D-(-)-acido lattico.

Il malato può essere utilizzato e convertito in L-(+)-lattato.

L'arginina non è idrolizzata ed il latte non è generalmente acidificato.

**Tabella 11: Classificazione del genere *Leuconostoc***

<i>Leuc. holzapfelii</i>	<i>Leuc. inhae</i>
<i>Leuc. carnosum</i>	<i>Leuc. kimchii</i>
<i>Leuc. citreum</i>	<i>Leuc. lactis</i>
<i>Leuc. durionis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>
<i>Leuc. fallax</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp <i>cremoris</i>
<i>Leuc. ficulneum</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp <i>dextranicum</i>
<i>Leuc. fructosum</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
<i>Leuc. gasicomitatum</i>	<i>Leuc. pseudoficulneum</i>
<i>Leuc. gelidum</i>	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>

## **Genere *Pediococcus***

I pediococchi appartengono alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Questi batteri hanno un metabolismo omofermentativo e producono, a partire dagli esosi, acido lattico DL o L(+), a seconda delle specie.

Le cellule sono sferiche, mai allungate, raramente isolate e non formano mai catene. Si dividono alternativamente in due piani perpendicolari, che determinano la formazione di tetradi; tutte le specie sviluppano bene a 30° C, ma la loro temperatura ideale di crescita è compresa tra 25 e 40° C, a seconda della specie.

Sono esigenti in fattori di crescita e aminoacidi e richiedono terreni particolarmente ricchi. La loro scarsa attività proteolitica e la generale incapacità di fermentare il lattosio, li rendono incapaci di coagulare il latte.

Al genere appartengono specie con contenuto G+C tra il 35 ed il 44%; non possiedono catalasi, ma possono dare una reazione positiva per la presenza di una pseudocatalasi nelle specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*. La sensibilità alla temperatura, al pH e alla concentrazione in NaCl, permettono di identificare facilmente le specie. Le specie appartenenti a questo non genere non sono patogene per le piante e gli animali, se non in individui immunodepressi, dove possono diventare patogeni opportunisti.

**Tabella 12: Classificazione del genere *Pediococcus***

<i>P. acidilactici</i>	<i>P. inopinatus</i>
<i>P. pellicola</i>	<i>P. parvulus</i>
<i>P. clusonii</i>	<i>P. pentosaceus</i>
<i>P. damnococcus</i>	<i>P. siamensis</i>
<i>P. dextrinicus</i>	<i>P. stilesii</i>
<i>P. ethanolidurans</i>	

### **Genere *Lactococcus***

Il genere è ascritto alla famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Questi batteri di forma coccica, sono disposti in catene di lunghezza variabile, hanno un metabolismo omofermentativo e producono esclusivamente L(+) acido lattico. Si distinguono per la presenza, nel loro sviluppo, dell'antigene del gruppo N, per il carattere debolmente  $\alpha$ -emolitico e non  $\beta$ -emolitico, per la temperatura minima di crescita inferiore o uguale a 10°C e quella ottimale vicina a 30°C, per la termosensibilità e l'incapacità di crescere in presenza del 6,5% di NaCl e a pH di 9,6.

**Tabella 13: Classificazione del genere *Lactococcus***

<i>Lc. garvieae</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. piscium</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lc. plantarum</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	<i>Lc. raffinolactis</i>

## **Genere *Enterococcus***

Il genere è classificato nella famiglia *Enterococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Gli enterococchi hanno un metabolismo omofermentativo e producono L(+) acido lattico. Si possono generalmente distinguere dagli altri batteri lattici a forma di cocco per la presenza dell'antigene del gruppo D e per la loro capacità di crescere a 10 e 45°C, in presenza del 6,5 % di NaCl o del 40% di bile e a pH 9,6. Alcune specie, tra le nuove identificate, tuttavia, non possiedono tutte queste caratteristiche. Gli enterococchi sono ospiti normali del tratto intestinale degli animali a sangue caldo, ma sono anche presenti sulle piante e tra gli insetti. Molte specie possono avere un carattere patogeno.

**Tabella 14: Classificazione del genere *Enterococcus***

<i>E. aquimanrinus</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>
<i>E. asini</i>	<i>E. hermanniensis</i>
<i>E. avium</i>	<i>E. hirae</i>
<i>E. caccae</i>	<i>E. italicus</i>
<i>E. camelliae</i>	<i>E. meladoratus</i>
<i>E. canintestini</i>	<i>E. moroviensis</i>
<i>E. canis</i>	<i>E. munditii</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. pallens</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. phoenicicola</i>
<i>E. columbae</i>	<i>E. pseudoavium</i>
<i>E. devriesei</i>	<i>E. raffinosus</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. ratti</i>
<i>E. durans</i>	<i>E. saccharolyticus</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. silesiacus</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. sulfureus</i>
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. termitis</i>
<i>E. gilvis</i>	<i>E. villorum</i>

## **Genere *Kocuria***

Sono cocchi aerobi stretti con metabolismo ossidativo: Il glucosio è ossidato ad acetato o scisso completamente in CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Sono coagulasi, fosfatasi e termonucleasi negativi, hanno una temperatura ottimale di sviluppo compresa tra i 25 e i 30°C.

Ovviamente questi ceppi sono assolutamente privi di patogenicità e non sono tossigenici.

Recentemente Stackebradt *et al.* (1995) hanno dimostrato che nell'ambito del genere *Micrococcus* esiste notevole variabilità, di conseguenza lo ha riassetato con nuovi generi e nuove classificazioni; e le attribuzioni dei nuovi generi sono riportate in tabella 15 e 16.



**Tabella 15: Classificazione dei differenti generi assestati (NCBI, 2008).**

Genere	Famiglia	Subordine	Ordine
<i>Kytococcus</i>	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	<i>Actinomycetales</i>
<i>Nesterenkonia</i>	<i>Micrococccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	<b>Sottoclasse</b> <i>Actinobacteridae</i>
<i>Kocuria</i>	<i>Micrococccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	<b>Classe</b> <i>Actinobacteria</i>
<i>Dermacoccus</i>	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	<b>Phylum</b> <i>Actinobacteria</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococccaceae</i>	<i>Micrococchineae</i>	

**Tabella 16: Nuova classificazione con la dissezione del genere *Micrococcus* (NCBI, 2008)**

Vecchia classificazione	Nuova Classificazione
<i>Micrococcus agilis</i>	<i>Arthrobacter agilis</i>
<i>Micrococcus antarcticus</i>	Invariato
<i>Micrococcus flavus</i>	Invariato
<i>Micrococcus halobius</i>	<i>Nesterenkonia halobia</i>
<i>Micrococcus kristinae</i>	<i>Kocuria kristinae</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	Invariato
<i>Micrococcus lylae</i>	Invariato
<i>Micrococcus nishinomiyaensis</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>
<i>Micrococcus roseus</i>	<i>Kocuria rosea</i>
<i>Micrococcus sedentarius</i>	<i>Kytococcus sedentarius</i>
<i>Micrococcus varians</i>	<i>Kocuria varians</i>

## **Genere *Staphylococcus***

Gli stafilococchi sono un genere della famiglia delle *Staphylococcaceae*, ordine *Bacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

Morfologicamente paragonabili all'ex-genere *Micrococcus* si differenziano da questi per essere anaerobi facoltativi e per la capacità di produrre acidi dal glucosio in condizioni anaerobiche.

Questo genere riveste una grandissima importanza nella batteriologia alimentare comprendendo alcune specie responsabili di gravi fenomeni tossinfettivi, in relazione alla loro capacità di produrre enterotossine termoresistenti.

Schematicamente gli stafilococchi, in base alla presenza o meno di coagulasi e di termonucleasi, possono essere suddivisi in patogeni, tossigeni e virtuosi.

**Tabella 17: Classificazione del genere *Staphylococcus***

<i>S. arlettae</i>	<i>S. kloosii</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. lungdunensis</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. lutrae</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. pasturi</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. carnosus</i>	<i>S. piscifermentas</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>S. pseudointermidius</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>S. pulvereri</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>S. condimenti</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>
<i>S. fleuretti</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. simile</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>cromogenes</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. xilosus</i>

## **Funghi**

Fino a pochi anni fa il regno dei Funghi veniva suddiviso in queste quattro divisioni (Kurtzman e Fell, 1998):

1. *Mastigomycota*
2. *Zigomycota*
3. *Ascomycota*
4. *Basidiomycota*

Attualmente questo regno è oggetto di una continua revisione sistematica; attualmente è suddiviso in 7 differenti Phylum (NCBI, 2008):

- *Blastocladiomycota*
- *Chytridiomycota*
- *Ascomycota*
- *Basidiomycota*
- *Glomeromycota*
- *Microsporidia*
- *Neocallimastigomycota*

## **Muffe**

Con il termine “muffe” si intendono dei funghi che non formano vistosi corpi fruttiferi, che sviluppano sulla superficie di numerosi alimenti formando corpi costituiti da intrecci di ife, da cui si innalzano ife singole che nel complesso costituiscono il micelio aereo. Alle estremità di queste ife si trovano i conidiofori, differenti per forma nei vari generi, che portano i conidi o conidiospore (Zambonelli *et al.*, 2001).

Le muffe sono distribuite in tutte le divisioni e sottodivisioni degli *Eumycetes* e sono accomunate da un metabolismo strettamente aerobio nonché da inequivocabili caratteristiche morfologiche tipiche di questo regno.

## **Genere *Penicillium***

Il micelio di queste muffe è ialino, ramificato, e settato, I conidiofori sono eretti con apice ramificato. Le muffe di questo genere sviluppano rapidamente e sono capaci di utilizzare molti composti ternari tranne la cellulosa, la lignina e la cheratina e composti

azotati organici o inorganici . La temperatura ottimale è intorno ai 25°C, poche specie sono in grado di sviluppare oltre i 37°C. Il pH influenza poco il loro sviluppo, tollerano infatti valori compresi tra 3,0 e 8,0.

**Tabella 18: Muffe isolate da salami**

Specie	Salame	Autore
<i>Alternaria alternata</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Aspergillus candidus</i>	italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Aspergillus flavus</i>	italiani	Bullerman <i>et al.</i> , 1969
<i>Aspergillus parasiticus</i>	italiani	Bullerman <i>et al.</i> , 1969
<i>Aspergillus spp.</i>		Lücke, 1997
<i>Aspergillus versicolor</i>		Andersen, 1995
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Cladosporium herbarum</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Davidiella tassiana</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Epicoccum nigrum</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Eurotium herbariorum</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Fusarium oxysporum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Mucor racemosus</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Mucor spp.</i>	Spagnoli	Selgas <i>et al.</i> , 1995
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium camemberti</i>	Italiani	Dragoni e Cantoni, 1979
<i>Penicillium candidus</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium comune</i>	Italiani	Dragoni e Cantoni, 1979
<i>Penicillium corylophilum</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium crysogenum</i>	argentini	Ludeman <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium cyclopium</i>	Italiani	Andersen, 1995
<i>Penicillium dierckxii</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium expansum</i>	spagnoli	Leistener e Ayres, 1967
<i>Penicillium griseofolium</i>	argentini	Ludemann <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium hirsutum</i>	Italiani	Silvestri <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium implicatum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium italicum</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium janthinellum</i>	spagnoli	Ciegler <i>et al.</i> , 1972
<i>Penicillium miczynskii</i>	spagnoli	Leistener e Ayres, 1967
<i>Penicillium nalgiovense</i>	argentini	Ludeman <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium olsonii</i>	italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium roqueforti</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986

....continua

...segue tabella 18

Specie	Salame	Autore
<i>Penicillium simplicissimum</i>	spagnoli	Leistener e Ayres, 1967
<i>Penicillium solitum</i>	argentini	Ludemann <i>et al.</i> , 2004
<i>Penicillium variabile</i>	Italiani	Grazie <i>et al.</i> , 1986
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Ungheresi	Jirkovski e Galgosky, 1966
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> var. <i>alba</i>	Ungheresi	Jirkovski e Galgosky, 1966
<i>Trichoderma koningii</i>	Italiani	Marziano <i>et al.</i> , 2000
<i>Wallemia sebi</i>	Italiani	Grazia <i>et al.</i> , 1986

**Tabella 19: Appartenenza dei generi isolati da Salami al phylum degli Ascomycota (NCBI, 2008).**

Genere	Famiglia	Ordine	Sottoclasse	Classe	Subphylum
<i>Cladosporium</i>	<i>Davidiellaceae</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Dothideomycetidae</i>	<i>Dothideomycetes</i>	<i>Pezizomycotina</i>
<i>Davidiella</i>	<i>Davidiellaceae</i>				
<i>Aspergillus</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Eurotiomycetidae</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	
<i>Aureobasidium</i>	<i>Trichocomaceae</i>				
<i>Eurotium</i>	<i>Trichocomaceae</i>				
<i>Penicillium</i>	<i>Trichocomaceae</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreomycetidae</i>	<i>Sordariomycetes</i>	
<i>Fusarium</i>					
<i>Trichoderma</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Microascales</i>	<i>Pleosporomycetidae</i>	<i>Dothideomycetes</i>	
<i>Scopulariopsis</i>					
<i>Alternaria</i>	<i>Pleosporaceae</i>	<i>Pleosporales</i>	<i>Pleosporomycetidae</i>	<i>Dothideomycetes</i>	
<i>Epicoccum</i>	<i>Leptosphaeriaceae</i>				

## **Lieviti**

Secondo di Flegel (1977) “...i lieviti sono funghi unicellulari che si moltiplicano per gemmazione o per scissione”. Con questa definizione viene data solo importanza tassonomica le caratteristiche morfologiche, non prendendo in considerazione quelle fisiologiche, in riguardo alla capacità fermentativa degli zuccheri e della produzione di alcool etilico. Non tutti i lieviti sono infatti dotati di metabolismo fermentativo, ma parecchi possiedono solo il metabolismo respiratorio.

I lieviti possono moltiplicarsi e di conseguenza insediarsi, solo se nel mezzo trovano alcuni gruppi di composti:

- Composti del carbonio: zuccheri a 6 atomi di carbonio (esosi), dai disaccaridi ai trisaccaridi; l’inulina è fermentata solo da alcune specie.
- Composti ternari quali l’acido acetico, l’acido lattico, l’alcool etilico, l’alcool metilico e i pentosi.
- Composti dell’azoto, tra i più importanti l’ammoniaca, i singoli aminoacidi o miscele di aminoacidi ed i peptidi, non le proteine che rappresentano il loro limite per la mancanza degli enzimi esolitici proteolitici.
- Elementi minerali come fosforo, zolfo, potassio, magnesio, calcio ed altri di minor importanza.
- Fattori di accrescimento come le vitamine in generale.

Questi microrganismi hanno comportamenti molto diversi nei confronti degli zuccheri e dei composti quaternari.

Tutti infatti possiedono la capacità di fermentare glucosio, fruttosio e mannosio, ma per quanto riguarda galattosio, saccarosio, maltosio, lattosio, melibiosio e raffiniosio possiedono caratteristiche molto eterogenee.

Ultima caratteristica che li accomuna è la acidofilia, potendo sviluppare fino a pH 2.7 e trovando le condizioni ideali di crescita a pH 4-4.5.

Appartengono al regno *Eumicotes*, in base alla modalità di riproduzione (sessuata o asessuata).

Secondo la classificazione di Kurtzman e Fell del 1998, i lieviti vengono ripartiti tra le classi Ascomiceti e Basidiomiceti, comprendendo circa 700 specie, diversamente dalle circa 500 comprese nella classificazione di Kreger-van Rij del 1984. Nella classificazione di Kurtzman e Fell, il gruppo dei lieviti asporigeni raccolti nella classe

Dottorato di ricerca in Biotecnologie degli Alimenti:  
*Attività antagonistica di batteri lattici isolati da salami verso muffe e lieviti*

dei Deuteromiceti è stato inserito in parte tra gli Ascomiceti ed in parte tra i Basidiomiceti.



**Tabella 20: Elenco delle specie di lieviti isolate da salami**

Specie	Autore	Specie	Autore
<i>Bullera alba</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Leucosporidium capsuligenum</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Bullera tsugae</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Leucosporidium scottii</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida albicans</i>	Zivanovic e Ristic,1974	<i>Lypomyces</i> spp.	Gardini <i>et al.</i> ,2001
<i>Candida austomarina</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005	<i>Pichia angusta</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida brumptii</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Pichia anomala</i>	Zivanovic e Ristic,1974
<i>Candida fermentati</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005	<i>Pichia canadensis</i>	Aboukheir e Kilbertus,1974
<i>Candida guilliermondii</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Pichia farinose</i>	Zivanovic, Ristic,1974
<i>Candida incommunis</i>	Coppola <i>et al.</i> ,2000	<i>Pichia guilliermondii</i>	Villani <i>et al.</i> ,2007
<i>Candida incommunis</i>	Coppola <i>et al.</i> ,2001	<i>Pichia haplophila</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Candida inconspicua</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Pichia membranaefaciens</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida intermedia</i>	Encinas <i>et al.</i> ,2000	<i>Pichia vini</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida krisii</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005	<i>Rhodotorula foliorum</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida mesenterica</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida parapsilosis</i>	Comi e Cantoni,1980	<i>Rhodotorula graminis</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>C. parapsilosis</i> var. <i>intermedia</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Rhodotorula marina</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida pelliculosa</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Rhodotorula minuta</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Candida psychrophila</i>	Silvestri <i>et al.</i> ,2007	<i>Rhodotorula mucillaginosa</i>	Gardini <i>et al.</i> ,2001
<i>Candida ravauti</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Saccharomyces barnetti</i>	Silvestri <i>et al.</i> ,2007
<i>Candida reukaufii</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aquilani <i>et al.</i> ,2007
<i>Candida rugosa</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Gardini <i>et al.</i> ,2001
<i>Candida sake</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Candida tropicalis</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005	<i>Sporobolomyces roseus</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Candida tropicalis</i>	Zivanovic e Ristic,1974	<i>Stephanoascus ciferrii</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Candida versatilis</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Torulasporea globosa</i>	Comi e Cantoni,1980
<i>Candida vini</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Torulopsis etchellsii</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Candida zeylanoides</i>	Villani <i>et al.</i> ,2007	<i>Torulopsis inconspicua</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Cryptococcus albidus</i>	O. Abunyewa <i>et al.</i> ,2000	<i>Torulopsis pinus</i>	Leistener e Bem,1970
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Trichosporon beigelii</i>	O. Abunyewa <i>et al.</i> ,2000
<i>Cryptococcus humicola</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Trichosporon brassicae</i>	Aquilani <i>et al.</i> ,2007
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Comi e Cantoni,1980
<i>Cryptococcus macerans</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Trichosporon ovoides</i>	Encinas <i>et al.</i> ,2000
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Coppola <i>et al.</i> ,2000	<i>Trichosporon pullulans</i>	Coppola <i>et al.</i> ,2000
<i>Debaryomyces maramus</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984	<i>Trichosporon terrestre</i>	Coppola <i>et al.</i> ,2000
<i>Debaryomyces occidentalis</i>	O. Abunyewa <i>et al.</i> ,2000	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>	Dalton <i>et al.</i> ,1984
<i>Debaryomyces vanrijae</i>	O. Abunyewa <i>et al.</i> ,2000	<i>Williopsis saturnus</i>	Rantsiou <i>et al.</i> ,2005
<i>Guehomyces pullulans</i>	Leistener e Bem,1970	<i>Yarrowia lipolitica</i>	Gardini <i>et al.</i> ,2001
		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Aboukheir e Kilbertus,1974

### ***Debaryomyces hansenii***

*Debaryomyces hansenii* presenta cellule di forma sferica o leggermente ovale, singole, in paia o in corte catene, in genere non forma pseudomiceli. Nei terreni solidi sviluppa producendo colonie biancastre, giallastre o brune, brillanti, mentre in terreni liquidi dà origine alla formazione di una pellicola secca.

La sporificazione è preceduta da coniugazione delle cellule madri con le proprie gemme, il che conferisce agli aschi un aspetto inconfondibile, contenenti generalmente una singola spora. La maggior parte dei ceppi di *Debaryomyces hansenii* si presenta aploide, raramente diploide (Kreger van Rij e Veenhuis, 1975; Van der Walt *et al.*, 1977).

E' un lievito alotollerante, capace di sviluppare ad una concentrazione salina del 24%, considerando che lo sviluppo di *Saccharomyces cerevisiae* è inibito ad una concentrazione salina del 10% circa.

Presenta due tipi di DNA plasmidiale lineare, da uno di questi due filamenti dipende l'alta pressione osmotica (Gunge *et al.*, 1993; Cong *et al.*, 1994). L'attività fermentativa è assente oppure presente in una parte dei ceppi, anche se in maniera blanda, verso alcuni zuccheri quali glucosio, fruttosio, mannosio, galattosio, saccarosio e maltosio.

Lo sviluppo aerobico è molto rapido e vigoroso e avviene per assimilazione di esosi e loro disaccaridi e trisaccaridi, assimilando anche i pentosi, alcoli e numerosi acidi.

Crio- ed osmo-tolleranza gli permettono di svolgere un ruolo fondamentale in numerosi processi agro alimentari, difatti è la specie più comune ritrovata in ogni tipo di formaggio (Fleet, 1990), potendo sviluppare anche in salamoia, (Seiler e Busse, 1991). Data la capacità di sviluppare in presenza di sale ed a bassa temperatura e di metabolizzare l'acido lattico e l'acido citrico, è uno dei lieviti più frequentemente associato ai cibi freddi (Guerzoni *et al.*, 1993). *Debaryomyces hansenii* è considerato non patogeno; la letteratura riporta un solo caso di infezione alle ossa (Wong *et al.*, 1982) associato a questo lievito ed altrettanti casi clinici furono identificati come *Debaryomyces hansenii* e la sua forma imperfetta, ex *Candida famata*, in infezioni superficiali (Nishikawa *et al.*, 1996).

La forma asporigena di *Debaryomyces hansenii* è capace di produrre riboflavina (vitamina B2) e, alcuni ceppi mutanti vengono utilizzati per la produzione industriale di questa vitamina.

**Tabella 21: Appartenenza dei generi di lieviti nei due principali phyla (NCBI, 2008).**

Genere	Phylum	Genere	Phylum
<i>Candida</i>	Ascomycota	<i>Bullera</i>	Basidiomycota
<i>Debaryomyces</i>		<i>Cryptococcus</i>	
<i>Lypomyces</i>		<i>Guehomyces</i>	
<i>Pichia</i>		<i>Leucosporidium</i>	
<i>Saccharomyces</i>		<i>Rhodotorula</i>	
<i>Schizosaccharomyces</i>		<i>Sporidiobolus</i>	
<i>Stephanoascus</i>		<i>Sporobolomyces</i>	
<i>Torulaspora</i>		<i>Trichosporon</i>	
<i>Torulopsis</i>			
<i>Wickerhamiella</i>			
<i>Williopsis</i>			
<i>Yarrowia</i>			
<i>Zygosaccharomyces</i>			

## **Culture starter dei salami**

### **Batteri lattici**

Un processo di selezione di batteri lattici idonei per la fermentazione dei salami deve preliminarmente tener conto della specie nell'ambito della quale condurre il lavoro. Il primo quesito riguarda il tipo di fermentazione che si ritiene più adatto: omo-fermentazione lattica o etero-fermentazione lattica.

La scelta dei ricercatori è caduta sugli omofermentativi perché sono quelli che più spesso si riscontrano nei salami fermentati naturalmente e perché danno le fermentazioni lattiche più pulite (col minor numero di altri composti oltre all'acido lattico). Molto importante è anche il comportamento verso la temperatura, perché la stagionatura dei salami viene condotta a livelli inferiori a 20°C, quindi piuttosto bassi. La selezione va dunque eseguita con batteri lattici omofermentativi e mesofili: tali sono tutte le specie dei generi *Pediococcus* e *Lactococcus* e molte specie del genere *Lactobacillus*.

Fra queste, quelle considerate più idonee sono *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei* e *L. curvatus*. Ad esempio *L. plantarum* è un batterio lattico molto diffuso e frequente in natura, dotato di notevole vigore fermentativo ed è, probabilmente, per questo motivo che la sua presenza è spesso dominante in alimenti fermentati fra cui anche alcuni tipi di salami, inoltre molti ceppi sono in grado di inibire lo sviluppo di *Listeria monocytogens* (Campanini *et al.*, 1993).

Un tentativo di classificazione dei caratteri, che interessano i batteri lattici per i salami è esposto nella tabella 22. In questa tabella, sotto la voce altri caratteri, sono elencati quelli, che direttamente o indirettamente, sono in grado di agire sulle caratteristiche sensoriali dei prodotti maturi; i ceppi che producono composti ad azione antifungina sono interessanti per quei salami nei quali l'ammuffimento del budello non è voluto, con tutte le conseguenze che ne derivano. Molto interessante è senza dubbio la capacità autolitica che nei diversi ceppi si manifesta più o meno precocemente; si tratta di un carattere il cui studio è attualmente in fase di approfondimento e le cui conseguenze sono oggi note soltanto in parte.

**Tabella 22: Classificazione dei caratteri di selezione per i lattobacilli (Coloretti *et al.*, 2007b).**

Caratteri di specie	Caratteri di ceppo	
	Caratteri tecnologici (competitività)	Altri caratteri
Fermentazione omolattica	Vigore fermentativo	Produzione di antifungini in fermentazione
Sviluppo a temperatura <20°C	Potere acidogeno	Capacità autolitica
Fermentazione del galattosio Alotolleranza >6% di NaCl	Sviluppo a bassi valori di pH (<4,0)	Produzione post-fermentativa di antifungini Azione proteolitica post-fermentativa
Resistenza ai nitriti		Azione lipolitica post-fermentativa Assenza di produzione di amine Assenza di resistenza agli antibiotici

### ***Micrococcaceae e Staphylococcaceae***

Come riferito in precedenza, i microrganismi afferenti a queste famiglie giocano un ruolo importante nella riduzione dei nitrati, nella formazione e protezione del colore, nella riduzione dell'irrancidimento (catalasi), nella proteolisi e lipolisi, e nell'ossidazione delle amine e riduzione dell'acidità (Nychas e Arkoudelos, 1990; Martin *et al.*, 2007).

Queste due famiglie ascrivono due generi, *Kocuria* e *Staphylococcus* che, a loro volta, comprendono specie all'interno delle quali selezionare i ceppi da impiegare come starter nella produzione di salami e nel confezionamento dei salumi a pezzo anatomico intero. Chi voglia selezionare nell'ambito di questi due generi, deve aver ben chiaro a quale tipo di salame lo starter è destinato.

Le specie *Kocuria rosea* e *Kocuria varians* possono fornire ceppi che per loro natura sviluppano in ambienti ricchi di ossigeno e sono perciò utili nella produzione di salsicce stagionate di piccolo calibro, soppressate ed eventualmente nella produzione di salumi a pezzo anatomico intero con involucri, quali bresaola, coppa e culatello (Sarra *et al.*, 2004). Possono inoltre stimolare alcuni ceppi di *Staphylococcus xylosus* (Tremonte *et al.*, 2007) particolarmente idonei come colture starter.

La selezione nell'ambito del genere *Staphylococcus* riguarda le specie coagulanti negative, normalmente presenti nei prodotti carnei, quali *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. simulans* (decreto del Ministero della Sanità del 28 dicembre 1994, articolo 1, comma

1). Nell'ambito di queste specie sono reperibili ceppi in grado di sviluppare in ambiente anaerobico, in grado quindi di sostituirsi ai ceppi di *Kocuria*, quando le condizioni si fanno più stringenti. Gli starter prodotti con questi ceppi sono consigliati per la produzione di tutti i salami, in particolare quelli di medio e grosso calibro. In tabella 23 sono riportati i caratteri che interessano la selezione di stafilococchi e micrococchi.

**Tabella 23: Classificazione dei caratteri di selezione per stafilococchi e micrococchi (Coloretti et al., 2007b).**

Caratteri di specie	Caratteri di ceppo	
	Caratteri tecnologici (competitività)	Altri caratteri
Sviluppo a temperatura <20°C	Vigore fermentativo	Attività proteolitica sulle proteine sarcoplasmatiche
Alotolleranza >7,5% di NaCl	Livello di riduzione da nitrati a nitriti	Attività lipolitica
Resistenza ai nitriti		Capacità ossidasica
Riduzione da nitrati a nitriti		Degradazione delle amine
Coagulasi negativa ( <i>Staphylococcus</i> )		Produzione di catalasi
Anaerobiosi facoltativa ( <i>Staphylococcus</i> )		
Aerobiosi stretta ( <i>Kocuria</i> )		

## Muffe

La selezione delle muffe per i salami è condotta nel genere *Penicillium*, molte specie del quale sviluppano normalmente sul budello. Nella pratica corrente, le specie che si riscontrano con maggiore frequenza sono *Penicillium verrucosum* e *P. chrysogenum* con micelio verde (Grazia et al., 1986). Uno dei requisiti più graditi è la capacità di formazione di micelio bianco perché questo conferisce al prodotto il migliore aspetto esteriore. Il carattere di maggiore importanza è, tuttavia, quello che riguarda le micotossine che non devono essere prodotte (Cole e Cox, 1981). In definitiva, le muffe selezionate per i salami devono essere specie del genere *Penicillium* con micelio bianco e prive della capacità di formare micotossine.

### Le muffe bianche

Le specie del genere *Penicillium* che sviluppano formando micelio bianco e la cui presenza è stata riscontrata sul budello di salami in stagionatura sono *Penicillium*

*candidum*, *P. nalgiovense*, *P. gladioli*. *P. gladioli* conferisce ai salami maturi il migliore aspetto esteriore (bianco-grigio molto bello) ma ha l'inconveniente di essere patogeno per il gladiolo: questo è un motivo sufficiente per escluderlo da ogni tipo di selezione. Le altre due specie, *P. candidum* (noto anche come *P. camemberti*) e *P. nalgiovense* sono quelle che più spesso si trovano rispettivamente sulla crosta dei formaggi o sui budelli dei salami.

*P. candidum* è largamente impiegato per la produzione di formaggi a crosta fiorita (Camembert, Brie, Caprice de Dieu) e dà risultati molto buoni da tutti i punti di vista. Esso viene prodotto industrialmente e alcuni ceppi che lo rappresentano sono reperibili in commercio, sotto forma di conidi in busta.

*P. nalgiovense* è la specie che, a giudizio di Autori tedeschi che ne hanno fatto oggetto di studio (Mintzlaff e Leistner, 1972; Fink-Gremmels e Leistner, 1990; Sunesen e Stahnke, 2003), è più idonea per l'ammuffimento dei salami.

Esso sviluppa bene formando un micelio bianco compatto ed uniforme che conferisce un ottimo aspetto esteriore al prodotto maturo.

In definitiva, attualmente la selezione di muffe viene eseguita sulle due specie ora citate ma, nella pratica il più impiegato è *P. candidum* perché di più facile reperibilità (Sunesen e Stahnke, 2003).

Le muffe del genere *Penicillium* producono micotossine che non sono così nocive come le aflatossine e le ocratossine (Ciegler *et al.*, 1972; Alperden *et al.*, 1973a; Cantoni *et al.*, 2007), ma sono ugualmente poco desiderate (peraltro, alcuni penicilli producono ocratossina).

È accertato che la capacità di produrre micotossine è carattere di ceppo, cosicché all'interno delle singole specie c'è, da questo punto di vista, una grande variabilità di comportamento.

*Penicillium verrucosum*, per esempio, ha la capacità di produrne addirittura tredici; i ceppi che le producono tutte sono però molto pochi, mentre sono numerosi quelli che ne producono da sei a sette; poco frequenti sono i ceppi che non ne producono nessuna.

La selezione nell'ambito dei penicilli a micelio bianco consiste fondamentalmente nella ricerca di quei ceppi che appartengono allo sparuto gruppo dei non produttori. Questa operazione va eseguita seguendo precisi controlli analitici che prevedono la determinazione non soltanto delle micotossine note ma anche di quelle eventualmente

ancora sconosciute; i controlli in questione vengono eseguiti con metodi biologici che non identificano i composti tossici ma ne segnalano la presenza, qualunque sia la loro natura e la loro origine.

## **Lieviti**

La selezione nell'ambito dei lieviti da impiegare in salumificio va condotta nell'ambito della specie *Debaryomyces hansenii*, attualmente riconosciuta come unica specie i cui ceppi possono venire impiegati come starter.

L'impiego di *Debaryomyces hansenii* è tuttavia poco diffuso nella produzione di salami fermentati mentre è più diffuso nella produzione di salsicce e nel trattamento di salumi a pezzo anatomico intero con involucro. I ceppi vengono selezionati sempre per l'energia fermentativa alle temperature tecnologiche, per la capacità di stabilizzare il colore e i grassi (Lücke e Hechelmann, 1987; Grazia *et al.*, 1989; Sorensen, 1997) e per la proprietà di produrre aromi e altri composti volatili (Gehlen *et al.*, 1991; Olesen e Stahnke, 2000; Martin *et al.*, 2003).



## **Relazioni microbiche**

### **Azioni concatenate**

Secondo quanto riportato da Tremonte (2004), “le attività metaboliche di specie differenti appartenenti alle *Micrococcaceae*, ai batteri lattici o ai lieviti, partecipando alla definizione dei principali processi biochimici, risultano determinanti durante il processo di maturazione degli insaccati fermentanti.

Le caratteristiche del prodotto finito sono il risultato di azioni complesse, difficilmente attribuibili ad un solo microrganismo e spesso fortemente condizionate da influenze reciproche tra i vari ceppi (Narvhus e Gadaga, 2003).

La coesistenza di differenti ceppi microbici nello stesso ambiente, determinano l’amplificazione o la riduzione di alcuni caratteri espressivi dei singoli individui, diventa la ragione del successo di processi fermentativi condotti sia da colture naturali sia selezionate (Giraffa, 2004).

Molto spesso i rapporti che si instaurano tra differenti ceppi sono poco chiari, oscuri o addirittura trascurati; tuttavia rappresentano una quota tangibile, forse l’unica, del grosso patrimonio dell’unicità, della tradizione e della biodiversità delle produzioni alimentari. Tale affermazione, dal carattere poco concreto, può trovare conforto nella conclusione che potrebbe scaturire da una semplice riflessione. E’ opinione diffusa che l’eccelsa ed esclusiva qualità degli alimenti fermentati, soprattutto di quelli tradizionali, sia da legare ad un insieme di fattori tra i quali giocano un ruolo decisivo i cosiddetti “microrganismo autoctoni”, i microrganismi propri di quella’area geografica o in quell’ambiente di produzione. Affermazione che potrebbe apparire piuttosto bizzarra se si considera che la maggior parte dei microrganismi isolati da uno starter naturale, pur se differenti, sono quasi sempre banali o hanno caratteristiche negative (Zambonelli *et al.*, 2001; Cocolin *et al.*, 2007).

Pertanto solo l’eterogeneità microbica può essere responsabile di un ruolo positivo nella definizione del processo fermentativo. I differenti ceppi o le differenti specie operano in competizione tra di loro impedendo ai singoli ceppi di esprimere nella totalità le eventuali caratteristiche negative o amplificando alcuni caratteri positivi del singolo ceppo.

## **Interazione tra microrganismi**

La popolazione microbica degli insaccati fermentati è caratterizzata da una discreta eterogeneità sia di specie, sia di generi (Coppola *et al.*, 1995, 1997, 1998; Hammes e Hertel, 1998; Papamanoli *et al.*, 2002, 2003).

I ceppi riferibili ai batteri lattici ed alla famiglia delle *Micrococcaceae* sono i principali responsabili del processo produttivo, insieme ad essi, tuttavia, possono coesistere microrganismi di secondario interesse tecnologico o addirittura microrganismi alteranti o potenzialmente patogeni.

E' lecito ipotizzare, che tra i differenti ceppi appartenenti a generi o specie differenti, o anche tra ceppi differenti della stessa specie, si possono instaurare complessi rapporti di interazione; tali rapporti nella maggior parte dei casi, come appare dalla letteratura (Marshall, 1987; Vijoen, 2001; Narvhus 2003) sono in grado di produrre azione di stimolo o di inibizione sulla crescita di uno o di entrambi i ceppi che interessati dal rapporto di associazione. Narvhus e Gadaga (2003) sostengono che due microrganismi nello stesso ambiente possono interagire per la competizione per lo stesso nutriente di crescita, oppure possono interagire in virtù della produzione di un metabolita, primario o secondario, in grado di inibire o promuovere la crescita dell'altro.

Partendo da tale presupposto, i potenziali e complessi rapporti di interazione tra differenti microrganismi possono essere schematizzati e classificati in tre tipologie di interazioni: positive, negative o nulle".

**Tabella 24: Elenco e capacità delle differenti relazioni microbiche.**

<b>Relazione microbica</b>	<b>Attività positiva</b>	<b>Attività negativa</b>
Interazioni nulle		
Competizione		X
Commensalismo	X	
Mutualismo o Sinergismo	X	
Predazione		X
Antagonismo o Amensalismo		X

### **Interazioni nulle**

E' la prima delle interazioni possibile in natura tra due popolazioni, tuttavia attualmente rappresentata, al tempo stesso, una perdita di interazione. Questo

fenomeno può accadere con maggiore probabilità e semplicità qualora ci sia una bassa densità della popolazione, che determina una maggiore difficoltà di contatto tra gli individui delle popolazioni, piuttosto che ad alte intensità di popolazioni microbiche che facilita il contatto e quindi l'eventuale interazione (Nandy *et al.*, 2007).

Talvolta, basse densità di popolazioni e la formazione di fasi stazionarie possono indurre la formazione di nicchie temporali e spaziali separate in uno stesso ambiente, facilitando la coesistenza di molte popolazioni senza competere per la stessa fonte o risorsa dell'ambiente. La via metabolica dell'uno non interferisce né influenza positivamente la crescita o le attività metaboliche dell'altro (Tremante, 2004).

### **Interazioni positive**

Le interazioni positive che si instaurano tra due popolazioni biologiche aumentano la capacità e l'abilità delle popolazioni di interagire per la sopravvivenza della comunità in un particolare ambiente; talvolta, favoriscono la coesistenza di popolazioni che singolarmente non potrebbero esistere.

Lo sviluppo di interazioni positive permette ai microrganismi di utilizzare le risorse disponibili, in rapporto alle concentrazioni dei singoli elementi, in maniera più efficace rispetto alla possibilità dimostrata da una sola popolazione microbica in crescita separata.

### **Commensalismo**

E' una forma di interazione simbiotica non obbligatoria fra due o più esseri viventi in cui uno approfitta del nutrimento o degli scarti dell'altro senza procurare nessuna alterazione allo sviluppo del secondo microrganismo.

Ceppi di *Lactococcus cremoris* e *Lactobacillus rhamnosus* impiegati nella trasformazione di formaggi freschi possono convivere ottenendo una buona acidificazione del mezzo, migliorando quindi la qualità del prodotto (Grettapanche *et al.*, 2007).

Nella stessa maturazione del formaggio Camembert, *Penicillium camembertii* e *Geotrichum candidum* mostrano una relazione nella crescita che favorisce la maturazione del formaggio, soprattutto la qualità organolettica del prodotto (Aziza e Amrane, 2006).

## **Mutualismo o sinergismo**

Il mutualismo è una interazione biologica tra individui o due differenti specie, dove entrambe individualmente traggono attività benefica, per esempio incrementando la sopravvivenza, oppure producendo sostanze che soli non sono in grado di produrre .

Classica tipologia di sinergia microbica nel campo degli alimenti è quella presente nello yogurt, dove la produzione dell'acido lattico e la degradazione proteica sono amplificate dallo sviluppo contemporaneo di batteri lattici appartenenti alle specie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

Il lattobacillo è in grado di liberare aminoacidi che favoriscono la crescita dello streptococco che a sua volta, producendo formiato stimola la crescita del primo (Bottazzi, 1993, Bury *et al.*, 1998). Altro esempio è il caso del kefir dove è presente una stretta relazione tra lieviti e batteri (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006).

Lee *et al.*, (2004) hanno dimostrato come il trattamento del fieno con *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* coincida con l'incremento dei batteri cellulolitici del rumine.

## **Interazioni negative**

Le interazioni negative possono manifestarsi nella eliminazione o nella soppressione di una popolazione, che non è bene adatta in quel determinato ambiente, a favore dell'altra.

In comunità stabili le interazioni negative garantiscono il mantenimento di un equilibrio tra le popolazioni di una comunità biologica.

Le interazioni negative funzionano come un meccanismo di regolazione retroattivo limitando la densità delle popolazioni che si traduce in un vantaggio per l'intera popolazione in quanto previene un eccesso di individui ed il conseguente esaurimento delle risorse dell'habitat.

Spesso le interazioni negative che si instaurano tra i differenti microrganismi assumono un effetto positivo nei processi fermentativi, promuovendo la sicurezza sanitaria del prodotto o assicurando la mancanza di microrganismi indesiderati.

Al fine di garantire e migliorare le qualità e la sicurezza microbiologica degli alimenti o di determinati substrati, l'attenzione è sempre più focalizzata verso un approccio,

definito nel suo complesso con il termine di “bioconservazione”, che implica l’impiego di batteri o di prodotti del loro metabolismo in grado di controllare la crescita di microrganismi indesiderati.

## **Competizione**

La crescita o la presenza di un microrganismo preclude lo sviluppo di un secondo, un tipico esempio è mostrato dagli studi di Reyes *et al.*, (2004), dove *Pichia guilliermondii*, per competizione di spazio e nutrienti, impedisce lo sviluppo di funghi patogeni nella fase di post raccolta. Un simile esempio, riguarda *Serratia marcescens*, che compete con *Aspergillus niger* nel terreno per nutriente come il carbonio per velocità di assimilazione (Rosenzweig e Stotzky, 1980)

La competizione, come illustrato da Mellefont *et al.*, (2008), può essere determinata dal differente rapporto numerico nel mezzo di due differenti microrganismi come *Listeria monocytogens* ed *Escherichia coli*, infatti *Escherichia coli* non sempre è inibito dal primo quando la carica microbica è inferiore, questo lascia supporre che fino a quando non c’è la competizione diretta per i nutrienti entrambi possono convivere senza conflitti.

Altri studi dimostrano come la competizione possa essere espressa come forma di barriera fisica nei confronti di microrganismi indesiderati, ceppi di *Lactobacillus* selezionati possono creare “biofilm” che impediscono l’attecchimento di microrganismi patogeni (Gueimonde *et al.*, 2006).

## **Predazione**

E’ un fenomeno difficile da attribuire al mondo microbico, soprattutto unicellulare, ma alcuni microrganismi in fase di stress in concomitanza con la competizione per la mancanza di nutrimenti possono portare a morte i diretti rivali nel substrato per procurarsi il nutrimento.

Infatti, studi di Nandy *et al.*, (2007) hanno dimostrato il meccanismo di predazione da parte di *Bacillus subtilis* nei confronti di *E. coli* ed altri contendenti tali come *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter lwoffii* in situazioni di scarsità di nutrienti.

## **Antagonismo o amensalismo**

Questa relazione batterica, è definita da molti autori come l'attività che un microrganismo possiede nel impedire o diminuire lo sviluppo di un altro, senza però trarne né vantaggio né svantaggio.

In realtà, quanto detto sopra, è la definizione di amensalismo quella più chiara, però molti autori preferiscono esprimere il termine antagonismo, racchiudendo in questo fenomeno tutti i meccanismi che un microrganismo deve sviluppare per prendere il sopravvento su un substrato (Masih *et al.*, 2001, Reyes *et al.*, 2004).

Il fenomeno dell'antagonismo è conosciuto dalla scoperta che ha rivoluzionato la medicina mondiale, ovvero la penicillina, e rimarcato dagli studi di Ordín nel 1952, che sottolineava la relazione di muffe del genere *Penicillium* nei confronti di batteri fitopatogeni.

I primi fenomeni conosciuti di antagonismo batterico sono citati in lontani lavori del 1929, dove Lewis, (1929) studiò la relazione tra la formazione delle spore batteriche del terreno e lo sviluppo di *Pseudomonas fluorescens*.

## **Composti antimicrobici**

Con tale termine si identificano uno svariato numero di composti capaci di inibire o indurre alla morte cellulare un microbo.

Possono essere una moltitudine i composti antimicrobici, ma in questo lavoro ci si concentra sui composti secondari prodotti dai microbi stessi per distinguendoli dai prodotti principali del metabolismo microbico, quali acido lattico, acetico od enzimi attivi.

Fino all'ultimo ventennio del secolo scorso gli studi su questi tipi di composti erano pochi e riguardavano quasi esclusivamente il campo medico. Ma, grazie anche ai progressi delle tecniche analitiche (Armaforte *et al.*, 2006), si sono potute determinare le modalità di produzione e le caratteristiche chimico-fisiche dei metaboliti prodotti da microrganismi di interesse biotecnologico e non solamente medico. .

I principali argomenti affrontati in queste ricerche hanno riguardato due aspetti principali: batteriocine e composti antifungini.

## **Batteriocine**

“Le batteriocine sono complessi di natura proteica biologicamente attive, sintetizzate ribosomalmente ed in grado di esercitare attività battericida nei confronti di altre specie batteriche, ma non nei confronti del microrganismo produttore. La conservazione biologica degli alimenti attraverso l’impiego di colture starter e colture di batteri produttori di batteriocine in combinazione con altre tecnologie di conservazione, può rappresentare per le industrie alimentari un modo efficace per poter fronteggiare le nuove tendenze alimentari espresse dai consumatori e allo stesso tempo garantire la dovuta qualità e sicurezza dei prodotti commercializzati (Montville *et al.*, 1995; Hammes e Hertel 1998)” (Tremonte, 2004).

Dagli anni 60, negli studi di Kageyama e Egami (1962), per la prima volta compare nel mondo della microbiologia il termine batteriocina, con l’identificazione della Pyocina una sostanza prodotta da *Pseudomonas aeruginosa*.

Negli anni a seguire molti studiosi ritrovano ed identificano uguali sostanze in differenti ceppi, *Bacillus thuringiensis* produceva Thuricina, una batteriocina attiva contro batteri gram positivi (Krieg, 1970), *Streptococcus mutans* e *sanguis* (Yamamoto *et al.*, 1975), *Bacillus megaterium* produceva Megacin A (Riabchenko e Rostas, 1983). Negli anni a seguire Andersson (1986) osservò l’inibizione dello *Staphylococcus aureus* da parte di un ceppo di *Lactobacillus plantarum* capace di produrre una sostanza proteica dal peso di 100KDa.

Così, partendo dagli studi di Andersson (1986), si è cominciata la ricerca di queste sostanze in differenti ceppi di batteri lattici, caratterizzando ulteriormente tali composti.

## **Composti antifungini**

In questo paragrafo si vogliono presentare i lavori che si sono focalizzati e susseguiti da più di mezzo secolo a questa parte per lo studio dei composti antifungini prodotti da batteri.

I funghi rimangono infatti tuttora fonte di preoccupazione all’intero campo di prodotti fermentati (Hassan e Bullerman, 2008).

Nella letteratura i primi studi sull'attività antifungina si possono far risalire a Michener e Snell del 1949, nel quale si citava l'attività antimicrobica di acidi volatili prodotti da *Bacillus subtilis* nei confronti di svariate muffe,

Lavori di Tesic e Lukic nel 1966 e Lukic *et al.*, e 1972, hanno riguardato fenomeni di antagonismo tra batteri del gruppo *Actinomycetes* in particolare *Actinomyces coeruleus* e muffe patogene nello stoccaggio del tabacco.

Con gli anni ottanta cominciò l'approfondita ricerca dei composti antifungini prodotti da batteri lattici, il lavoro di Collins e Hardt (1980) mostrarono l'inibizione di *Candida albicans* da parte di *Lactobacillus acidophilus*, sostenendo la medesima tesi dei prodotti antifungini di Guillot (1958).

Ma i primi studi riguardanti l'antagonismo fungino da parte di batteri lattici nei confronti di muffe sono stati effettuati da El-Gendy e Marth nel 1981, dove si osservava che *Lactobacillus casei* inibiva la produzione di aflatossine da parte di *Aspergillus parasiticus* in insilati.

Gli studi Batish *et al.*, (1989, 1990b) descrissero l'attività antifungina deputata da composti proteici prodotti da *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Batish *et al.*, 1990a).

Allo stesso modo Suzuki *et al.*, (1991) hanno determinato l'attività antifungina di un ceppo di *Leuconostoc mesenteroides* isolato da formaggio, senza tuttavia determinare l'identità dei composti coinvolti.

Gourama e Boullerman (1995) e successivamente Gourama, (1997) determinarono che metaboliti di basso peso molecolare e termostabili, prodotti da *Lactobacillus lactis* e *casei* subsp. *pseudoplantarum*, erano in grado di inibire lo sviluppo e la produzione di aflatossine da *Aspergillus flavus*.

Studi successivi hanno potuto identificare questi composti come acidi grassi a corta catena prodotti da *Lactobacillus sanfranciscensis*, in grado di inibire le muffe responsabili delle alterazioni dei prodotti da forno (Corsetti *et al.*, 1998).

Approfonditi studi di Niku-Paavola *et al.*, (1999) hanno determinato l'attività antifungina di diversi acidi organici a basso peso molecolare (acido benzoico, metil-idantino, lattone dell'acido mevalonico) che, prodotti dal ceppo di *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076, agiscono in sinergia con l'acido lattico.



Ad differenti composti di natura proteica sono state attribuite attività antifungine (Okkers *et al.*, 1999, Messens e De Vuyst 2002), o dipeptidi (Magnusson e Schnürer, 2001; Ström *et al.*, 2002).

Negli ultimi anni è stato caratterizzato un ceppo di *Lactobacillus plantarum* in grado di controllare lo sviluppo fungino nelle paste acide (Lavermicocca *et al.*, 2000). Secondo questi Autori l'acido fenil-lattico e l'acido 4-idrossi-fenil-lattico prodotti dal ceppo *Lactobacillus plantarum* 21B (Lavermicocca *et al.*, 2003), sono in grado di inibire la crescita delle muffe nel pane ottenuto dopo fermentazione con questo ceppo.

Studi successivi di Magnusson e Schnürer nel 2001 hanno permesso di determinare l'attività inibente di un composto di natura proteica con peso molecolare di 4 kDa prodotto da *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* ceppo Si3 (Magnusson *et al.*, 2003).

Sempre dal *Lactobacillus plantarum* è possibile osservare la produzione dell'acido fenilattico, responsabile di attività antifungina (Ström *et al.*, 2002, Magnusson *et al.*, 2003). Sempre da *Lactobacillus plantarum* possono essere prodotti acidi grassi a corta catena di 10 carboni idrossilati (Sjögren *et al.*, 2003, Broberg *et al.*, 2007).

*Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis* *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* producono sostanze antifungine attive a valori di pH bassi (De Muynck *et al.*, 2004).

Coloretti *et al.*, (2007) hanno identificato una doppia attività antifungina in *Lactobacillus plantarum* isolato da salami capace di produrre sostanze attive in fase precoce e sostanze di natura proteica dopo l'avvenuta autolisi.

A discapito dei precedenti i lavori Vermeulen *et al.*, (2006) e Gänzle *et al.*, (2007) dimostrarono la produzione in piccole quantità del Acido fenilattico (PLA) in piccole dosi (max. 0.04mM) da parte di *Lactobacillus sanfranciscensis* in paste acide.

Specie <i>Lactobacillus</i>	Sostanza antifungina		Autore
	Identità	Natura composto	
<i>L. acidophilus</i>	?	?	Collins e Hardt, 1980
<i>L. casei</i>	?	?	El-Gendy e Marth, 1981
<i>L. acidophilus</i>	?	Proteica	Batish <i>et al.</i> , 1989
<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	?	Proteica	Batish <i>et al.</i> , 1990a
<i>Leuc. mesenteroides</i>	< 1000 Da	?	Suzuki <i>et al.</i> , 1991
<i>L. lactis</i>	< 1000 Da	?	Gourama e Boullerman, 1995
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	?	Proteica	Gourama e Boullerman, 1997
<i>L. sanfranciscensis</i>	Acido acetico, caproico, formico, propionico, butirrico e <i>n</i> -valerico	Acidica	Corsetti <i>et al.</i> , 1998
<i>L. plantarum</i>	Acidi benzoico e mevalonico, metil-idantoina	Acidica	Niku-Paavola <i>et al.</i> , 1999
<i>L. plantarum</i>	Acido fenilattico e 3-OH-fenilattico	Acidica	Lavermicocca <i>et al.</i> , 2000
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	±3000Da	Proteica	Magnusson e Schnürer, 2001
<i>L. plantarum</i>	Ciclo Phe-Pro e Phetrans-4-OH-Pro	Proteica	Ström <i>et al.</i> , 2002
<i>L. plantarum</i>	Acido fenilattico e idrossi-fenilattico	Acidica	Lavermicocca <i>et al.</i> , 2003
<i>L. plantarum</i>	Acidi 3-(R)-OH-10C, 3-OH-5-12C, 3-(R)-OH-14C.	Acidica	Sjögren <i>et al.</i> , 2003
<i>L. acidophilus</i>	Acidi pH non dipendenti	Acidica	De Muyneck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. amylovorus</i>	Sostanze pH dipendenti	?	De Muyneck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	Sostanze pH dipendenti	?	De Muyneck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. brevis</i>	Sostanze pH dipendenti	?	De Muyneck <i>et al.</i> , 2004
<i>L. sanfranciscensis</i>	Acido fenilattico, ?	Acidica, ?	Vermeulen <i>et al.</i> , 2006
<i>L. plantarum</i>	Acido fenilattico	Acidica	Coloretti <i>et al.</i> , 2007

# **PARTE SPERIMENTALE**

## Introduzione

Durante la maturazione dei salami un ruolo molto importante è svolto dai microrganismi, cioè da batteri e funghi, i primi rappresentati da micrococchi e batteri lattici, i secondi da muffe generalmente del genere *Penicillium*. I due gruppi di microrganismi sviluppano in parti distinte del prodotto ed in momenti differenti: i batteri all'interno dell'impasto e durante la prima fase della stagionatura, le muffe e alcuni lieviti sulla superficie del budello nella fase finale della stagionatura. Per questo motivo, si potrebbe pensare che i due gruppi microbici non abbiano la possibilità di interferire fra di loro, né positivamente né negativamente. Tuttavia, Chiavari *et al.*, (1998) hanno segnalato un caso di inibizione delle muffe che gli Autori hanno attribuito allo sviluppo nell'impasto di un ceppo di *Lactobacillus plantarum* usato come coltura starter.

L'azione di batteri lattici verso i funghi è stata dimostrata per primi da El-Gendy e Marth (1981) i quali hanno accertato che *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* produce molecole a basso p.m. capaci di inibire *Aspergillus parasiticus*. Successivamente diversi studi hanno determinato la natura peptidica dei composti antifungini prodotti da *Lactobacillus acidophilus* (Batish *et al.*, 1990b) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* (Magnusson e Schnurer, 2001) e da *Lactobacillus plantarum* (Ström *et al.*, 2002). Oltre a composti di origine proteica Gourama e Boullerman, (1995a) Corsetti *et al.*, (1998), hanno dimostrato la produzione di una miscela di acidi grassi a corta catena dalla specie *Lactobacillus sanfrancisco*. Niku-Paavola *et al.*, (1999) hanno riconosciuto la sintesi dal *Lactobacillus plantarum* di una miscela complessa di sostanze, tra cui l'acido benzoico, la metilglutammato, il mevalonolattone dotate di attività antifungina additiva. Recenti studi di Lavermicocca *et al.*, (2000) affermano che l'attività inibente del *Lactobacillus plantarum* è da attribuirsi agli acidi organici fenil-lattico e il 4-idrossifenil-lattico.

Il ruolo delle muffe nella maturazione dei salami generalmente è considerato positivo perché sviluppando in superficie si pongono come barriera fisica all'introduzione di microrganismi indesiderati, mentre le loro ife penetrando nell'impasto regolano il flusso di acqua dall'interno verso l'esterno. Il metabolismo fungino riporta il pH a valori di 5,6-5,7 e gli enzimi esocellulari contribuiscono nella formazione dell'aroma (Grazia, *et*

*al.*, 1986). I lieviti sono rappresentati principalmente da *Debaryomyces hansenii* (Capriotti, 1954) ed hanno azione positiva perché favoriscono l'anaerobiosi, la stabilizzazione del colore e la pelabilità della fetta (Comi e Cantoni, 1980, 1983), oltre a contribuire alla formazione dell'aroma e del gusto del prodotto con fenomeni di lipolisi (Saldanha-da-Gama *et al.*, 1997) e proteolisi (Martin *et al.*, 2002).

Sulla base di quanto noto, il presente lavoro è stato eseguito allo scopo di stabilire se l'attività inibitrice verso le muffe ed i lieviti possa essere considerato carattere di selezione dei batteri lattici usati come starter per i salami e se l'inibizione sia dovuta a composti che si formano in fase fermentativa o post-fermentativa. Sono state prese in esame le specie più frequenti nei salami maturati naturalmente e cioè *Lactobacillus plantarum* e *L. sakei* (Coppola *et al.*, 1998) e le muffe che più spesso si trovano sui budelli (Grazia *et al.*, 1986).

## **Materiali e Metodi**

### **Microrganismi**

Sono stati impiegati 65 ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* isolati da salami di diversa origine e facenti parte della collezione DIPROVAL; questi ceppi sono contrassegnati con la sigla VLT seguita dal numero di registrazione. Sono stati impiegati alcuni ceppi della collezione DSMZ, fra i quali anche i ceppi tipo *L. plantarum* DSMZ 20174<sup>T</sup> e *L. brevis* DSMZ 20054<sup>T</sup>.

L'attività inibente dei ceppi di *Lactobacillus* è stata determinata nei confronti di specie di muffe e di lieviti che più spesso si trovano associati ai batteri lattici in alimenti fermentati: *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *Penicillium nalgiovense*, *P. varrucosum*, *P. camamberti*, *P. roqueforti*, *P. chrysogenum*; *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus* var. *uvarum* (*S. uvarum*), *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Debaryomyces hansenii*. Di alcuni di questi funghi si è impiegato il ceppo tipo (dalla collezione DSMZ) oppure ceppi isolati da alimenti fermentati.

I batteri lattici sono stati conservati a 4°C in infissione in MRS Agar (OXOID) e trapiantati mensilmente; le muffe e lieviti sono stati conservati in Sabouraud agar (OXOID) e anch'essi trapiantati mensilmente.

## **Determinazione dell'attività inibente**

L'attività inibente dei composti prodotti nella fase di sviluppo è stata determinata in piastra con la tecnica overlay proposta da Magnusson e Schnurer (2001). I ceppi di batteri lattici sono stati strisciati superficialmente per una lunghezza di 10mm, in piastre da 90 mm contenenti 25 mL di MRS agar. Le piastre sono state incubate in anaerobiosi a 30°C per 48 ore, e, dopo lo sviluppo dei batteri lattici, è stato aggiunto uno strato di 10 mL di Sabouraud (agar 7 g/L), precedentemente inoculato con 10<sup>5</sup> CFU/mL di colture di muffe o lieviti. Le piastre sono state incubate quindi in aerobiosi a 25°C e, dopo lo sviluppo fungino, sono stati valutati gli aloni di inibizione in corrispondenza delle aree di sviluppo dei batteri lattici. La capacità di inibizione è stata registrata come segue: -, nessuna inibizione, + alone di inibizione fino 8 mm dallo striscio, ++ alone compreso tra i 9 e i 15 mm; +++ alone superiore ai 15 mm

L'attività inibente dei composti prodotti in fase post-fermentativa è stata determinata modificando il protocollo indicato da Chiavari *et al.*, (1998) che avevano previsto l'impiego del metodo della diffusione in piastra proposto da Tagg *et al.*, 1976 per la determinazione delle batteriocine. In particolare i ceppi dei batteri lattici sono stati fatti sviluppare a 30°C e lasciati a sé per 30 giorni per favorirne l'autolisi, confermata per osservazione al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM). I brodi sono stati raccolti, centrifugati (5.000 rpm 10') per eliminare le cellule e microfiltrati con filtri da 0,22  $\mu$ m (Albet Jacks). I surnatanti sono stati concentrati per liofilizzazione e risospesi in tampone fosfato (50 mM, pH 7,0) con una concentrazione di 15 volte. 125  $\mu$ L dei concentrati così ottenuti sono stati immessi in pozzetti da 9 mm ricavati in piastre di Sabouraud (agar 7 g/L), precedentemente insemiante con un ceppo di *Penicillium nalgiovense* sensibile all'attività inibente (Chiavari *et al.*, 1998).

## **Determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche delle sostanze inibenti**

L'attività inibente del ceppo dotato di maggior attività è stata caratterizzata sia in fase precoce che in fase tardiva, in quest'ultimo caso a confronto con un ceppo privo di attività precoce. Sono stati caratterizzati quindi entrambi le miscele di composti, sia quelli prodotti infase precoce, ottenuti per fermentazione di 48 ore, sia per quelli tardivi, dopo 30 giorni. In entrambi i casi le colture sono state fatte sviluppare in 250 mL di

MRS in beute da 500 mL alla temperatura di 30°C. Il surnatante è stato raccolto per centrifugazione (5.000 RPM • 5'), sterilizzato per filtrazione a 0,22 µm, concentrato per liofilizzazione e ripreso con un volume di tampone fosfato (50 mM, pH 7,0) per una concentrazione finale di 15 volte.

L'attività inibente del concentrato è stata valutata con il metodo dei pozzetti come descritto in precedenza, sia prima che dopo i procedimenti consigliati a questo fine e descritti da vari Autori (Lavermicocca et al., 2000; Magnusson e Schnurer, 2001).

In particolare:

- per stabilire se il composto abbia struttura peptidica, il surnatante concentrato e tamponato a pH 7,5 con NaOH 4N, è stato sottoposto all'azione dei seguenti enzimi proteolitici: proteinase-K (Sigma), tripsyne (Sigma), e protease (Sigma) a 37° C per un'ora. Dopo la reazione enzimatica il concentrato è stato riportato a pH 3,5 con HCl
- la resistenza al calore è stata determinata sottoponendo il surnatante concentrato a differenti trattamenti termici: a 80 e 100°C • 10' e 60'.
- l'influenza del pH è stata accertata tramite la valutazione dell'attività inibente del concentrato a differenti valori di pH 3.0-3.5-4.0-4.5-5.0-6.0-7.0.
- sono state determinate le capacità estraenti dell'attività da parte di diversi solventi organici (butanolo, propanolo, acetato di etile, etere etilico e alcol amilico) con una estrazione quadrupla su 100 mL con rapporto solvente:surnatante 1:1 e successivo recupero in rotavapor a 50°C. Il residuo è stato recuperato con tampone fosfato (50 mM, pH 7,0) per una concentrazione finale di 15 volte.

### **Determinazione dell'acido fenil-lattico tramite HPLC**

La concentrazione in acido fenil-lattico nei surnatanti è stato valutato come proposto da Ström et al., (2002), secondo quanto modificato da Armaforte *et al.*, 2006.

L'HPLC è equipaggiata con una pompa binaria Waters 1525 con un detectors a lunghezza d'onda Waters 2487 settato a 210 nm, una colonna simmetry C-18 RP (150 mm × 4.6 mm, Waters, con pori di 5 µm) a temperatura ambiente, dotato di un software Breeze 3.30 SPA (Waters) per l'aquisizione.

Il surnatante è stato centrifugato a  $4400 \times g$  per 10 min., successivamente filtrato con un microfiltro con pori di  $0.22 \mu\text{m}$  ed iniettato in colonna con un volume di  $25 \mu\text{L}$ .

La programmata dell'HPLC per l'analisi dell'acido fenil-lattico è descritta in tabella 25.

**Tabella 25: Programmata metodo Armaforte *et al.*, 2006**

Tempo (min)	Acetonitrile (%)	Acqua (%)	Flusso (ml/min)
	25	75	1.0
3	25	75	1.0
4	50	50	1.0
6	50	50	1.0
8	100	0	1.3
12	100	0	1.3

### **Acquisizione immagini**

L'aspetto delle piastre e la misurazione degli aloni sono stati eseguiti dopo acquisizione digitale delle immagini con apparato Bio-Rad Gel-Doc 2000 e elaborazione con il pacchetto software Adobe Photoshop 6.0.

Le osservazioni e le fotografie al microscopio elettronico a Scansione (SEM) sono state eseguite con un apparecchio Hitachi 510 S. I campioni sono stati preparati con il metodo messo a punto da Bottazzi e Bianchi (1980).

## **Risultati e discussione**

### **Spettro dell'attività inibente in fase fermentativa**

I 65 ceppi di *Lactobacillus plantarum* sono stati testati per la loro azione antifungina in fase di sviluppo con la tecnica della doppio strato (overlay), impiegando come ceppi sensibili *Aspergillus candidus* DSM 814T a *Penicillium nalgiovense* MF BP3. Come mostrato in tabella 24, dei 65 ceppi testati, 55 sono risultati privi di qualunque azione inibitrice, così come i ceppi tipo. 7 hanno mostrato una spiccata capacità inibente, particolarmente intensa nel ceppo VLT01 ed hanno prodotto aloni nettamente marcati,



mentre altri 3 ceppi hanno mostrato una debole azione inibitrice. L'aspetto degli anelli di inibizione è illustrata in figura 1 che mostra l'alone provocato dal ceppo VLT01 (forte inibizione = +++), dal ceppo VLT (inibizione debole = +) e dal ceppo VLT32 (inibizione assente = 0).

**Tabella 26: Attività inibitrice dei 65 ceppi di *Lactobacillus plantarum* nei confronti dei ceppi tipo di *Aspergillus candidus* e *Penicillium nalgiovense*.**

Specie	Provenienza	<i>Aspergillus candidus</i> DSM 814 <sup>T</sup>	<i>Penicillium</i> <i>nalgiovense</i> MF BP3
54 ceppi		-	-
DSMZ 20174 <i>L. plantarum</i>	DSM	-	-
DSMZ 20054 <i>L. brevis</i>	DSM	-	-
LP118 <i>L. brevis</i>	salame	-	-
SL112 <i>L. mali</i>	salame artigianale	+	+
VLT73 <i>L. plantarum</i>	salame	+	+
VLT301 <i>L. plantarum</i>	salame	+	++
VLT304 <i>L. plantarum</i>	salame	+	++
VLT307 <i>L. plantarum</i>	salame	++	+
VLT308 <i>L. pentosus</i>	salame	++	+
VLT310 <i>L. pentosus</i>	salame	++	+
VLT451 <i>L. plantarum</i>	salame	++	+
VLT452 <i>L. plantarum</i>	salame	++	+
VLT459 <i>L. pentosus</i>	salame	++	+
VLT01 <i>L. plantarum</i>	salame	+++	+++

Il ceppo di *Lactobacillus plantarum* VLT01, il più attivo, è stato impiegato per effettuare uno screening sulla sensibilità di varie muffe e di lieviti. Sono stati impiegati anche i ceppi VLT 73 e VLT 304 dotati di attività intermedia ed il ceppo VLT 32 privo

di attività. Come mostrato in tabella 27, i ceppi VLT01, VLT73 e VLT304 si sono dimostrati attivi su tutte le muffe impiegate, in particolare su specie del genere *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ochraceus* e *A. candidus*) produttori le micotossine più pericolose e sulle specie del genere *Penicillium* che più spesso colonizzano i budelli dei salami e le croste di formaggi (*P. verrucosum* var. *cyclopium*, *P. nalgiovense*, *P. camemberti*, *P. roqueforti*). Il ceppo VLT32 non ha provocato alcuna inibizione, confermando così la sua inattività.

**Tabella 27: Azione inibitrice di quattro ceppi più rappresentativi di *L. plantarum* su varie specie di muffe.**

Muffa	Specie	Ceppo di <i>Lactobacillus plantarum</i> con azione inibitrice			
		forte	media	media	assente
		VLT01	VLT304	VLT73	VLT32
	<i>Geotrichum candidum</i>	+++	+++	+++	-
	<i>Aspergillus flavus</i>	++	+	++	-
	<i>Penicillium nalgiovense</i>	+++	++	+++	-
MF4	<i>Aspergillus spp</i>	+++	+	+	-
MF5	<i>Penicillium spp.</i>	+++	++	+++	-
MF11	<i>Munigliella spp</i>	+++	+++	+++	-
MF12	<i>Aspergillus spp.</i>	++	+	++	-
MF40	<i>Mucor spp</i>	+	+	+	-
MF80	<i>Penicillium spp</i>	+++	+	++	-
MF117	<i>Wallenia spp</i>	+++	+++	+++	-
MF128	<i>Eurotium spp</i>	+++	+++	+++	-
MF139	<i>Penicillium spp</i>	++	+	++	-

L'azione degli stessi ceppi di *L. plantarum* è stata testata anche nei confronti di alcuni lieviti di maggiore interesse tecnologico, e cioè su vari ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* e *Debaryomyces hansenii*. I risultati, esposti in tabella 28, hanno mostrato un differente comportamento dipendentemente dalla specie. I ceppi di *S. cerevisiae*, *S. uvarum* e *K.marxianus* var. *marxianus* sono insensibili all'azione di tutti i ceppi di *L. plantarum*, mentre *D. hansenii* si è dimostrato sensibile nella stessa misura delle muffe.

**Tabella 28: Azione inibitrice di quattro ceppi più rappresentativi di *L. plantarum* su varie specie di lieviti di interesse tecnologico.**

Ceppo	Specie	Ceppo di <i>Lactobacillus plantarum</i> con azione inibitrice			
		forte	media	media	assente
		VLT01	VLT304	VLT73	VLT32
6167	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
35G2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
10278	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
11204	<i>Saccharomyces uvarum</i>	-	-	-	-
12233	<i>Saccharomyces uvarum</i>	-	-	-	-
2A2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	-	-	-
L432	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	-	-	-
40C8	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	+	-
40C18	<i>Debaryomyces hansenii</i>	++	+	+	-
40C33	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	+	-
40C37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	+	-
40C39	<i>Debaryomyces hansenii</i>	++	+	+	-
40C42	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	++	+	-
40C67	<i>Debaryomyces hansenii</i>	++	++	++	-
40C93	<i>Debaryomyces hansenii</i>	++	+	++	-

### Attività inibente in fase tardiva

L'attività inibente in fase tardiva è stata determinata con la tecnica dei pozzetti sui concentrati dei surnatanti invecchiati 30 giorni impiegando i 4 ceppi menzionati nella prova precedente, cioè quelli dotati di differenti poteri di inibizione in fase precoce.

Dai risultati esposti in tabella 29 si vede come anche i ceppi non dotati di potere inibente in fase precoce, in fase tardiva dopo autolisi inibiscono lo sviluppo delle muffe in prossimità dei pozzetti. Al contrario delle muffe e dei lieviti del genere *Debaryomyces* i lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* si sono dimostrati indifferenti all'attività

I dati precedenti confermano i risultati ottenuti in precedenza da Chiavari *et al.*, 1998 che hanno dimostrato come l'attività inibente sia collegabile con composti rilasciati nel mezzo in seguito all'autolisi.

**Tabella 29: Azione inibitrice dei ceppi scelti in fase tardiva dopo autolisi**

	VLT01		VLT32	
	2 gg	30 gg	2 gg	30 gg
<i>Aspergillus candidus</i>	+++	+++	-	++
<i>Penicillium nalgiovense</i>	+++	+++	-	++

### **Caratteristiche chimico-fisiche del composto prodotto in fase precoce**

Il concentrato della fase precoce trattato con enzimi proteolitici non ha mostrato differenze significative rispetto al testimone non trattato. Questo sembra escludere che il composto abbia natura peptidica. Allo stesso modo i trattamenti termici non hanno influito in maniera significativa sugli aloni di inibizione che sono rimasti gli stessi anche dopo il trattamento. Il composto è invece risultato sensibile al valore del pH, i surnatanti liofilizzati delle colture hanno mostrato una attività antifungina ben marcata a pH acido, che tende ad attenuarsi a valori di pH prossimi alla neutralità (tab 30).

Il miglior recupero dell'attività inibente si è avuto con l'impiego del butanolo, con il 90% di attività nella fase organica concentrata, seguito dal propanolo, mentre gli altri tre solventi impiegati non sono stati in grado di estrarre nessuna frazione dell'attività.

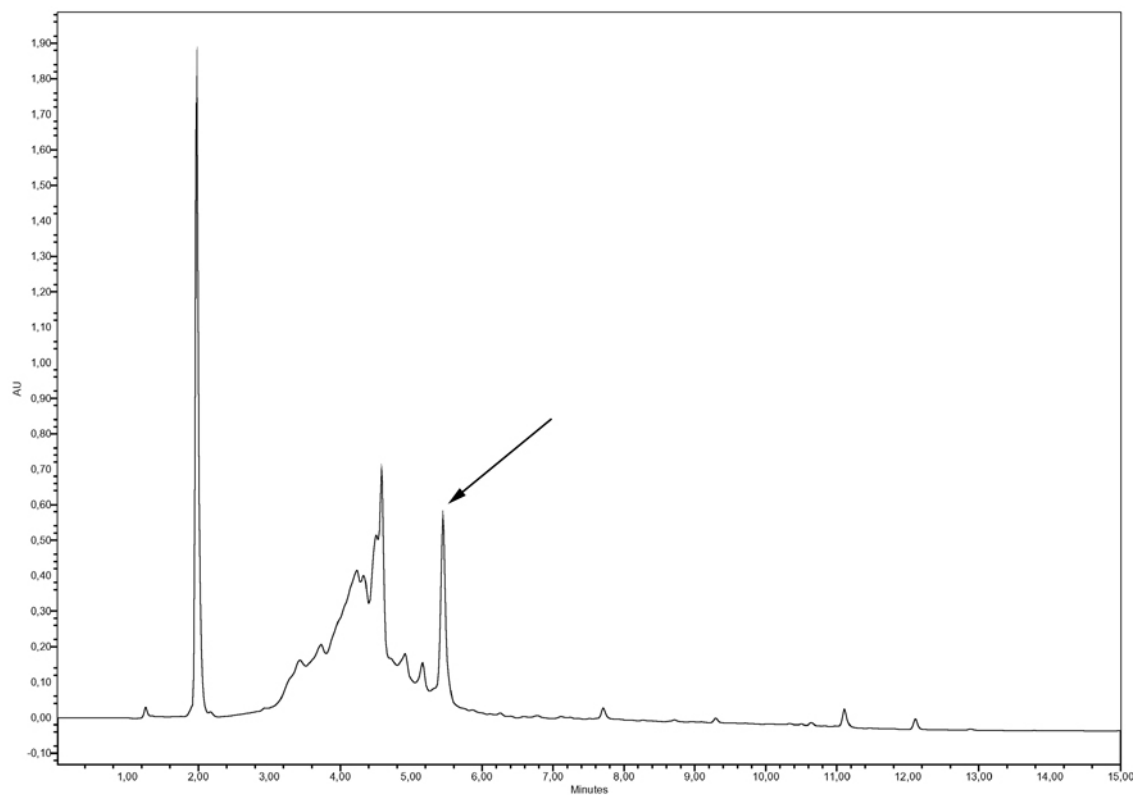
In figura 2-3 sono riportati i tracciati ottenuti in HPLC del ceppo VLT01 a confronto con il ceppo VLT32. Come si vede è stata determinata la concentrazione che per il primo ceppo ha raggiunto i 46,6 mg/L, mentre nel secondo non è stato rilevato.

I valori ottenuti sono in linea con quelli di Lavermicocca *et al.*, 2001 e 2003 e da Valerio *et al.*, 2004, che hanno imputato al fenil-lattico l'attività inibente di diverse specie del genere *Lactobacillus*.

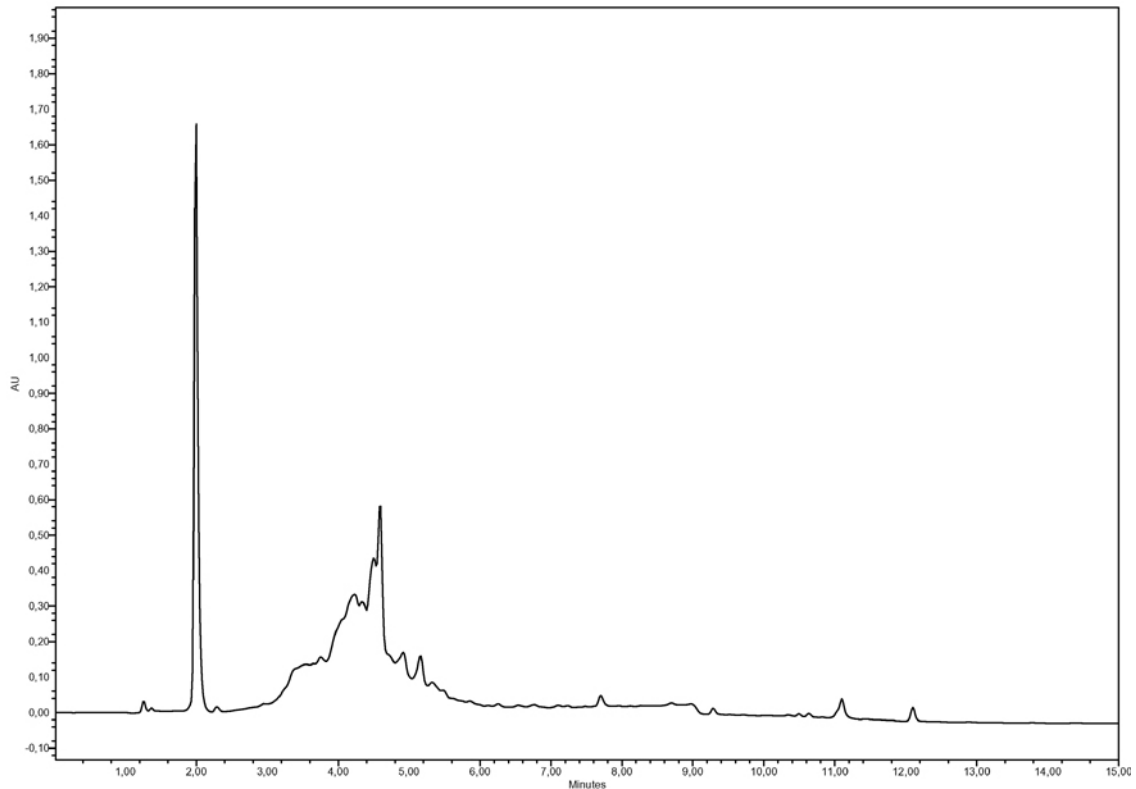
Al contrario di quanto descritto da Niku-Paavola *et al.*, (1999) nel surnatante analizzato non sono stati rilevati tre ulteriori composti organici responsabili di attività antifungina, quali il benzoic acid, il mevalonic acid e la methylidantoina.

**Tabella 30: Caratteristiche chimico-fisiche dei composti prodotti in fase precoce dal ceppo *L. plantarum* VLT01.**

<b>Trattamento</b>	<b>Attività (%)</b>
Concentrato 15 volte	100
pH:	
3,5	100
4,0	64
4,5	45
5,0	36
6,0	6
7,0	0
Trattamento con proteasi:	
Trypsine	98
Proteasi K	98
Proteinasi	99
Trattamento termico	
80° x 10'	100
100° x 10'	98
80° x 60'	98
100° x 60'	98



**Figura 2: Tracciato in HPLC del surnatante del ceppo *Lactobacillus plantarum* VLT01 dopo 48 ore di sviluppo (la freccia indica il picco identificato come Acido Fenilattico).**



**Figura 3: Tracciato in HPLC del surnatante del ceppo *Lactobacillus plantarum* VLT32 dopo 48 ore di sviluppo.**

### **Caratteristiche chimico fisiche del composto prodotto in fase post-fermentativa**

I surnatanti delle colture di batteri lattici sono stati studiati dopo un invecchiamento di 30 giorni, tempo questo sufficiente affinché l'autolisi delle cellule possa avvenire.

Nel ceppo VLT01, attivo precocemente, l'attività inibente si è mantenuta, ma ha mostrato differenze significative rispetto a quanto visto in precedenza. In particolare (tab. 31) l'attività è meno sensibile alle variazioni del pH rispetto a quella in fase precoce. I prodotti si sono dimostrati sensibili sia al trattamento termico che al trattamento con le proteasi.

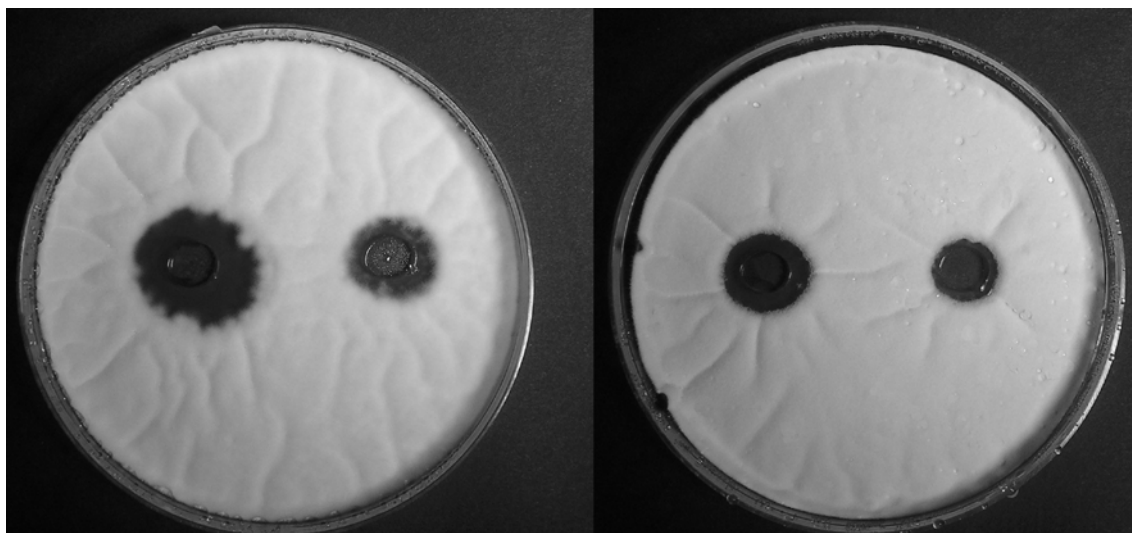
Le prove effettuate sui surnatanti invecchiati hanno evidenziato una sensibilità all'azione delle proteasi che hanno comportato l'attenuazione dell'intensità e del diametro degli aloni di inibizione relativi.

Nel caso dell'esposizione al calore dei surnatanti (80°C per 60') è stata determinata un'attività residua con un comportamento simile a quella della fase precoce e dipendente dal pH ed ancora imputabile all'acido fenil-lattico (fig. 4 A e C).

Nel caso del ceppo VLT32, l'attività inibente si è dimostrata totalmente sensibile al calore; è stato infatti sufficiente un trattamento termico a 80°C per 60' per inattivare completamente l'attività inibente (fig. 4 B e D). I dati fin qui esposti permettono di affermare che la natura dei composti rilasciati dopo l'autolisi sia di tipo peptidico, come già evidenziato da Chiavari *et al.*,1998 che hanno dimostrato come l'autolisi sia responsabile della liberazione di composti biologicamente attivi, non visibili in fase precoce. Il ceppo VLT32 è infatti non attivo nella fase di sviluppo, ma produce surnatanti in grado di dare inibizione dopo invecchiamento.

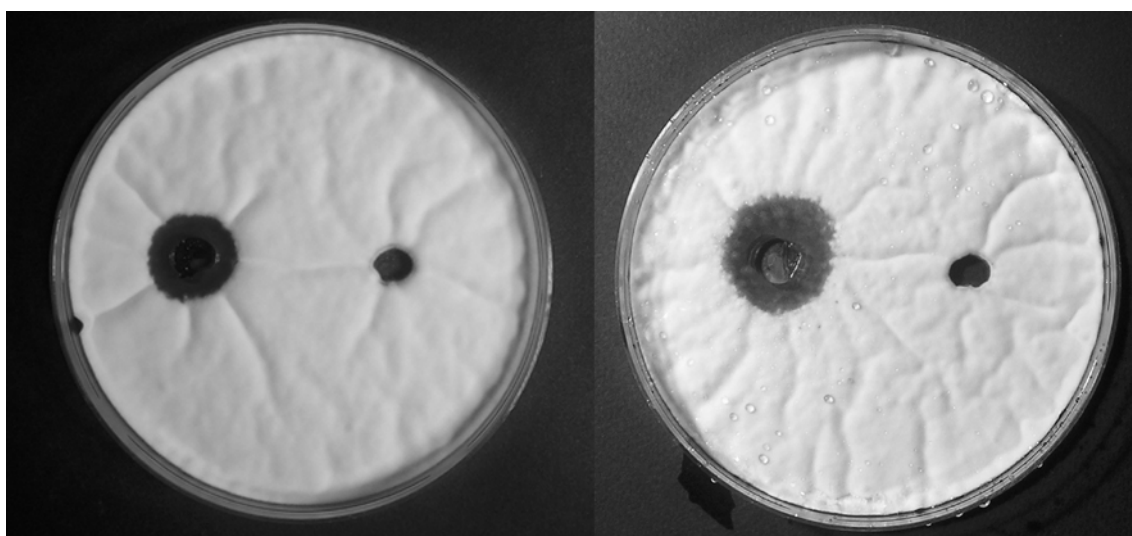


**Figura 4:** aspetto delle piastre ottenute con surnatanti invecchiati 30 gg trattati termicamente (80° x 60'). A: ceppo VLT01 a pH 3,5; B: VLT32 a pH 3,5; C: ceppo VLT01 a pH 7,5; D: VLT32 a pH 7,5. Per ciascuna piastra, nei pozzetti di sinistra il testimone non trattato, a destra il surnatante trattato termicamente.



A

B



C

D

**Tabella 31: Confronto tra le caratteristiche chimico-fisiche dei surnatanti prodotti in fase tardiva da parte di un ceppo attivo anche in fase precoce (VLT01) a confronto con un ceppo inattivo (VLT32).**

Trattamento	Attività (%)	
	VLT01	VLT32
Concentrato 15 volte	100	100
pH:		
3,5	100	100
5,0	49	100
7,0	26	100
Trattamento con proteasi K:		
Proteasi K	71	
Trattamento termico a pH 3,5		
80° x 10'	66	76
80° x 60'	34	36
Trattamento termico a pH 7,5		
80° x 10'	66	0
80° x 60'	34	0

## Conclusioni

I nostri risultati hanno confermato che *Lactobacillus plantarum* può esercitare una forte azione inibitrice verso i funghi. Questa azione è duplice e può essere dovuta a composti che si formano in fase fermentativa o a composti rilasciati in fase post-fermentativa.

L'azione inibitrice in fase di sviluppo è assente nella maggior parte dei ceppi mentre soltanto il 12-13% dei ceppi la presenta in misura rilevante. Il composto antifungino è risultato termoresistente, di natura non peptidica, facilmente estraibile con i comuni solventi e la sua attività dipendente dal pH. Esso è capace di inibire lo sviluppo di muffe dei generi *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*), *Penicillium* (*P. nalgiovense*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *P. camemberti*, *P. roqforti*, *P. chrysogenum*), *Geothricum*, *Alternaria* e *Wallemia*. E' attivo nei confronti dei lieviti del genere *Debaryomyces* (*D. hansenii*) ma non su lieviti dei generi *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*.

Il risultato più interessante ha riguardato la capacità di *Lactobacillus plantarum* VLT01 di produrre attività inibente sia in fase precoce che tardiva da parte del ceppo

L'azione inibitrice sulle muffe svolta in fase fermentativa e post-fermentativa da alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum* ha importanti risvolti tecnologici che interessano la produzione di diversi alimenti fermentati. Questo batterio lattico, infatti, è spesso usato come starter per la guida delle fermentazioni e il suo comportamento verso le muffe deve essere determinato come carattere di selezione e la scelta del ceppo cui affidare la fermentazione deve essere eseguita in funzione dei risultati che si vogliono ottenere.

In particolare:

1. I ceppi privi di azione inibitrice devono essere impiegati tutte le volte che l'intervento delle muffe dà risultati positivi, come nel caso di alcuni formaggi con crosta fiorita e di numerosi salami sui quali le muffe del genere *Penicillium* svolgono importante azione regolatrice dell'umidità del prodotto e concorrono positivamente al processo di maturazione (Grazia *et al.*, 1986). Anche il lievito *Debaryomyces hansenii* ha azione positiva perché favorisce l'anaerobiosi, la

stabilizzazione del colore e la pelabilità della fetta (Capriotti, 1954; Comi e Cantoni, 1980). Lo sviluppo di questi organismi non deve essere ostacolato.

2. I ceppi dotati di alta attività inibitrice possono essere impiegati come starter tutte le volte che si voglia impedire lo sviluppo delle muffe. E' questo il caso di alcuni salami (salame tipo Napoli ed altri) per i quali l'affumicamento del budello è spesso insufficiente allo scopo, di molti formaggi e dei foraggi insilati. Al riguardo è molto importante notare che l'azione inibitrice riguarda anche le muffe del genere *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*) che sono le maggiori produttrici di micotossine. Per quanto riguarda i foraggi insilati non solo è auspicabile un'azione contro le muffe, ma anche verso i lieviti responsabili dell'instabilità aerobica del fronte di scarico del silo e del foraggio in mangiatoia.

## Bibliografia:

- Aboukheir S., Kilbertus G.**, “Fréquence des levures dans les denrées alimentaires a base de viande”, *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 29, 539-547 (1974).
- Adholeya A., Paul B.**, “Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the gray mould disease of grapevine”, *FEMS Microbiology Letters*, 202, 2, 227-232 (2001)
- Alperden I., Mintzlaff H.J., Tauchmann F., Leistner L.**, “Untersuchungen über die Bildung des Mycotoxins Patulin in Rohwurst”, *Fleischwirtschaft*, 4, 566-568 (1973).
- Alvarez-Martín P., Bélén-Florez A., Hernandez-Barranci A., Mayo B.**, “Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation”, *Food Control*, 19, 1, 62-70 (2008).
- Andersen S.J.**, “Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages”, *Journal of Food Protection*, 58, 426-429 (1995).
- Andersson R.**, “Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplast of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*”, *International Journal of Food Microbiology*, 3, 3, 149-160 (1986).
- Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri G., Osimani A., Petruzzelli A., Clementi F.**, “The microbial ecology of the typical Italian Salami during its natural fermentation” *International Journal of Food Microbiology*, 120, 1-2, 136-145 (2007).
- Armaforte E., Carri S., Ferri G., Caboni M.F.**, “High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth”, *Journal of Chromatography A*, 1131, 1-2, 281-284 (2006).
- Atanassova V., Meindl A., Ring C.**, “Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham: a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR”, *International Journal of Food Microbiology*, 68, 105-113 (2001).
- Aymerich M. T., Hugas M., Monfort J.M.**, “Review: bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products”, *Food Science and Technology International*, 4, 141-158 (1998).
- Aymerich T., Martín B., Garriga M., Hugas M.**, “Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non-pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4583-4594 (2003).
- Aziza M., Amrane A.**, “Commensalism during submerged mixed culture of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* on glutamate and lactate”, *Process Biochemistry*, 41, 12, 2452-2457 (2006).
- Bailly J.D., Tabuc C., Quérim A., Guerre P.**, “Production and stability of Patulin, Ochratoxin A, Citrinin, and Cyclopiazonic acid on dry cured ham”, *Journal of Food Protection*, 68, 1516-1520 (2005).

- Baruzzi F., Matarante A., Caputo L., Morea M.,** “Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage”, *Meat Science*, 72, 2, 261-269 (2006).
- Batish V.K., Grover S., Lal R.,** “Screening lactic starter cultures for antifungal activity”, *Cultured Dairy Products Journal*, 24, 21-25, (1989).
- Batish V.K., Lal R., Chander H.,** “Effect of nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*”, *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 74-76, (1990a).
- Batish V.K., Lal R., Grover S.,** “Studies of environmental and nutritional factors on the production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R”, *Food Microbiology*, 7, 199-206 (1990b).
- Berry E.D., Liewen M.B., Mandingo R.W., Hutkins R.W.,** “Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage” *Journal Food Proteonomic*, 53, 194-197 (1990).
- Boers R.H., Dijkman K.E., Tersteeg M.H.G.,** “A rapid and simple methods for prepering pork with very low bacterial contamination”, *Meat Science*, 32, 2, 229-236 (1992).
- Bolton D.J., Pearce R.A., Sheridan J.J., Blair, I.S., McDowell D.A., Harrington D.,** “Washing and chilling as critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point (HACCP) system”, *Journal Applied Microbiology*, 92, 5, 893-902 (2002).
- Bolumar T., Sanz Y., Aristoy M.-C., Toldrà F.,** “Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *D. hansenii*”, *International Journal of Food Microbiology*, 86, 141-151 (2003).
- Borch E., Kant-Muermans M.L., Blixt Y.,** “Bacterial spoilage of meat and cured meat products”, *International Journal of Food Microbiology*, 33, 103-120 (1996).
- Bottazzi V., Bianchi F.,** “A note on Scanning Electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule”, *Journal Applied Bacteriology*, 48, 265-268 (1980).
- Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J.,** “Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage”, *Applied Environmental Microbiology*, 73, 17, 5547-5552 (2007).
- Budde B.B., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V., Koch A.G.,** “*Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments”, *International Journal of Food Microbiology*, 83, 2, 171-184 (2003).
- Bullerman L., B., Hartman P.A., Ayres J.C.,** “Aflatoxin production in meats II”, *Applied Microbiology*, 18, 5, 718-722 (1969).
- Bury D., Jelen P., Kimura K.,** “Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria”, *International Dairy Journal*, 8, 2, 149-151 (1998).
- Campanini M., Pedrazzoni I., Barbuti S., Baldini P.,** “Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria cultures”, *International Journal Food Microbiological*, 20, 169-175 (1993).

- Campanini M., Pedrazzoni I., Barbuti S., Baldini P.**, “Behaviour of *Listeria monocytogens* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic acid bacteria starter cultures”, *International Journal Food Microbiology*, 20, 3, 169-175 (1993).
- Cantoni C., Comi G., Chiesa L., Iacumin L.**, “Muffe e ocratossina A negli insaccati crudi stagionati”, *Industrie Alimentari*, 46, 16-19 (2007).
- Cantoni C., Molnar M.R., Renon P., Giolitti G.**, “Lipolytic micrococci in pork fat”, *Journal of Applied Bacteriology*, 30, 190-196 (1967).
- Capita R., Llorente-Marigomez S., Prieto M., Alonso-Calleja C.**, “Microbiological profiles, pH, and titratable acidity of chorizo and salchichon (two Spanish dry fermented sausages) manufactured with ostrich, deer, or pork meat”, *Journal of Food Protection*, 69, 1183-1189 (2006).
- Capriotti A.**, “Indagini microbiologiche sulle carni insaccate. Nota I: i lieviti”, *Archivio Veterinario Italiano*, 5, 113-117 (1954).
- Casaburi A., Blaiotta G., Mauriello G., Pepe O., Villani F.**, “Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages”, *Meat Science*, 71, 643-650 (2005).
- Cenci-Coga B.T., Ranucci D., Miraglia D., Ciuffi A.**, “Use of a starter cultures of dairy origin in the production of *Salame nostrano*, an Italian dry-cured sausage” *Meat science*, 78, 381-390 (2008).
- Cengi-Coga B.T., Ranucci D., Miraglia D., Cioffi A.**, “Use of starter cultures of dairy origin in the production of *salame nostrano*, an Italian dry-cured sausage”, *Meat Science*, 78, 4, 381-390 (2008).
- Chevallier I., Ammor S., Laguet A., Labayle S., Castanet V., Dufour E., Talon R.**, “Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage”, *Food Control*, 17, 446-453 (2006).
- Chiavari C., C. Zambonelli, M. Benevelli, S. Raineri, C. Montanari, L. Grazia**, “Antagonistic Action of Some Lactobacilli vs. Moulds. A preliminary Note”, *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 48, 161-168 (1998).
- Ciegler A., Mintzla A.J., Weisleder D., Leistner L.**, “Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (salami)”, *Applied Microbiology*, 24, 114-119 (1972).
- Cintas L.M., Casaus P., Fernandez F., Hernandez E.**, “Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A, and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria”, *Food Microbiology*, 15, 3, 289-298 (1998).
- Cocolin L., Diez A., Urso R., Rantsiou K., Comi G., Bergamaier I., Beimfohr C.**, Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods”, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 1-2, 100-109 (2006).
- Cocolin L., Diez A., Urso R., Rantsiou K., Comi G., Bergmaier I., Beimfohr C.**, “Optimization of conditions for profiling bacterial population in food by culture-indeperndent methods”, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 1-2, 100-109 (2007).
- Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G.**, “Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages”, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5113-5121 (2001).

- Coffey A., Ryan M., Ross R.P., Hill C., Arendt E., Schwarz G.,** “Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture”, *International Journal of Food Microbiology*, 43, 3, 231-235 (1998).
- Cole R.J., Cox R.H.,** “Handbook of toxic fungal metabolites” Academic Press (1981).
- Collins E.B., Hardt P.,** “Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*”, *Journal Dairy Science*, 63, 830-832 (1980).
- Coloretti F. Carri S., Armaforte E., Chiavari C., Grazia L., Zambonelli C.,** “Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami”, *FEMS microbiology*, 271, 2, 245-250 (2007a).
- Coloretti F. Grazia L., Zambonelli C.,** “Microrganismi nei salami e loro controllo”, *Industrie Alimentari*, 2007, 475, 1242-1251 (2007b).
- Comi G., Cantoni C.,** “I lieviti in insaccati crudi stagionati”, *Industrie Alimentari*, 19, 857-860 (1980).
- Comi G., Cantoni C.,** “Presenza di lieviti nei prosciutti crudi stagionati”, *Industrie Alimentari*, 22, 102-104 (1983).
- Comi G., Urso R., Iacumin L., Rantsiou K., Cattaneo P., Cantoni C., Coccolin L.,** “Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy”, *Meat Science*, 69, 381-392 (2005).
- Cong Y.S., Yarrow D., Li Y.Y., Fukuhara H.,** “Linear DNA plasmids from *P. etchellsii*, *D. hansenii* and *Wingea robertsiae*”, *Microbiology*, 140, 1327-35 (1994).
- Conventry M., J., Hickey M., W.,** “The effect of spices and manganese on meat starter culture activity”, *Meat Science*, 33, 3, 391-399 (1993).
- Coppola R., Giagnacovo B., Iorizzo M., Grazia L.,** “Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage”, *Food Microbiology*, 15, 347-353 (1998).
- Coppola R., Iorizzo M., Saotta R., Sorrentino E., Grazia L.,** “Characterization of Micrococci and Staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage”, *Food Microbiology*, 14, 47-53 (1997).
- Coppola R., Marconi E., Rossi F., Dall’aglio F.,** “Artistical production of Naples-type salami: chemical and microbiological aspects”, *International Journal Food Science*, 7, 57-72 (1995).
- Coppola S., Mauriello G., Aponte M., Moschetti G., Villani F.,** “Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage”, *Meat Science*, 56, 321-329 (2000).
- Corsetti A., M. Gobetti, J. Rossi, Damiani P.,** “Antimould activity of sourdoughs lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1”. *Applied Microbiol Biotechnonology*, 50, 253-256 (1998).
- Dalton H.K., Board R.G., Davenport R.R.,** “The yeast of British fresh sausage and minced beef”, *Antonie van Leeuwenhock*, 50, 227-248, (1984).
- Dalton H.K., Board R.G., Davenport R.R.,** “The yeast of British fresh sausage and minced beef”, *Antonie van Leeuwenhock*, 50, 227-248 (1984).



- Davies A., Board R.G.**, “The microbiology of meat and poultry”, Blackie Academic & Professional Press, Glasgow (UK) (1998).
- De Muynck C., Leroy A.I.J., De Maeseneire S., Arnaut F., Soetaert W., Vandamme E.J.**, “Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites” *Microbiological Research*, 159, 4, 339-246 (2004).
- Di Maria S., Basso A.L., Santoro E., Grazia L., Coppola R.**, “Monitoring of *Staphylococcus xylosum* DSM 20266 added as starter during fermentation and ripening of Soppressata molisana, a typical Italian sausage”, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 158-164 (2002).
- Dicks L.M.T., Mellett F.D., Hoffman L.C.**, “Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami”, *Meat science*, 66, 3, 703-708 (2004).
- Dragoni I., Cantoni C.**, “Le muffe negli insaccati crudi e stagionati”, *Industrie alimentari*, 18, 281-284 (1979).
- Drosinos E.H., Metargas M., Metaxopoulos J.**, “Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131”, *Meat Science*, 74, 4, 690-696 (2006).
- DSMZ**, “[www.dsmz.de/microorganisms/main.php?menu\\_id=2](http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?menu_id=2)”, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Germany, visitato il 10/02/2008.
- El-Gendy S.M., Marth E.H.**, “Growth of toxigenic and non-toxicogenic aspergilli and penicillia at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria”, *Archiv für Lebensmittel-Hygiene*, 31, 189-220 (1980).
- Encinas J.P., Lopez-Diaz M.T., Garcia-Lopez M.L., Otero A., Moreno B.**, “Yeast populations on Spanish fermented sausages”, *Meat Science*, 54, 3, 203-208 (2000).
- Fink-Gremmels J., Leistner L.**, “Toxicological evaluation of molds”, *Food Biotechnology*, 4, 579-584 (1990).
- Fleet G.H.**, “Yeasts in dairy products”, *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211 (1990).
- Flegel T.W.**, "Let's call a yeast a yeast". *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 945-951 (1977).
- Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R.F.**, “Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough”, *Food Microbiology*, 24, 2, 128-138 (2007).
- Garcia Fontan M.C., Lorenzo J.M., Martinez S., Franco I., Carballo J.**, “Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage”, *LWT-Food Science and Technology*, 40, 9, 1610-1622 (2007).
- Gardini F., Suzzi G., Lombardi A., Galgano F., Crudele M.A., Andrighetto C., Schirone M., Tofalo R.**, “A survey of yeast in traditional sausages of southern Italy”, *FEMS Yeast Research*, 1, 2, 161-167 (2001).
- Garrity G.M.**, “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Parts A, B & C; Three-Volume Set)”, published by Williams & Wilkins, (2005).

- Gehlen K.H., Meisel C., Fischer A., Hammes W.P.**, "Influence of the yeast *Debaryomyces hansenii* on dry sausage fermentation", Proceedings of the 37th International Congress of Meat science and technology, 1-6 settembre 1991, Kulmbach, Germania, 2, 871-878 (1991).
- Gill C.O., Jones T.**, "Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcass, Food Microbiology, 9, 4, 335-343 (1992).
- Giraffa G.**, "Studing the dynamics of microbial populations during food fermentation", FEMS Microbiology Reviews, 28, 2, 251-260 (2004).
- Gounadaki A.S., Skandamis P.N., Drosinos H., Nychas G.J.E.**, "Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages", Food Microbiology, 25, 2, 313-323 (2008).
- Gourama H. A. e Bullerman L. B.**, "Antimycotic and antiaflatoxic effect of lactic acid bacteria". Journal of Food Protection, 57, 1275-1280 (1995a).
- Gourama H. A. e Bullerman L. B.**, "Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species". Journal of Food Protection, 58, 1249-1256 (1995b).
- Gourama H.**, "Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species", Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 30, 3, 279-283 (1997).
- Gourama H., Bullerman L.B.**, "Anti-aflatoxic activity of *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*", International Journal of Food Microbiology, 34, 2, 131-143 (1997).
- Grattepanche F., Audet P., Lacroix C.**, "Milk fermented by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model", International Dairy Journal, 17, 2, 123-132 (2007).
- Grazia L., Rainieri S., Zambonelli C., Chiavari C.**, "Azione di lattobacilli omo- ed eterofermentanti sulla composizione e dell'ammuffimento dei salumi" Industrie Alimentari, 37, 850-855 (1998).
- Grazia L., Romano P., Bagni A., Roggiani D., Guglielmi G.**, "The role of moulds in the ripening process of salami", Food Microbiology, 9, 19-25 (1986).
- Grazia L., Suzzi G., Romano P., Giudici P.**, "The yeast of meat product", In: A. Martini, A. Vaughan Martini (Eds.), "Yeast as a main protagonist of biotechnology. Proceedings of the seventh international symposium on yeasts", Perugia, (Italia), 495-499 (1989).
- Gueimonde M., Jalonen L., He F., Hiramatsu M., Salminen S.**, "Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli", Food Research International, 39, 4, 467-471 (2006).
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Marchetti R.**, "Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods", International Journal of Food Microbiology, 17, 329-341 (1993).
- Guillot N.**, "Production by *Lactobacillus acidophilus* of a substance active against *Candida albicans*", Annales de l'Institut Pasteur, 95, 194, (1958).
- Gunge N., Fukuda K., Morikawa S., Murakami K., Takeda M., Miwa A.** "Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *D. hansenii*", Current Genetics, 23, 443-449 (1993).

- Halasz A., Barath A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W.**, “Biogenic amines and their production by microorganisms in food”, *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49, (1994).
- Hammes W.P., Hertel C.**, “New developments in meat starter cultures”, *Meat Science*, 49, 125-138 (1998).
- Hassan Y.I., Bullerman L.B.**, “Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture”, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 1, 112-115 (2008).
- Hauschild A.H.W., Hilsheimer R., Jarvis G., Raymond D.P.**, “Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulinum* in liver sausage”, *Journal of Food Protection*, 45, 500-506 (1982).
- Hemme D., Foucaud-Scheunemann C.**, “*Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods” *International Dairy Journal*, 14, 6, 467-494 (2004).
- Herranz C., Casaus P., Mukhopadhyay S., Martinez J.M., Rodriguez J.M., Nes I.F., Hernandez P.E., Cintas L.M.**, “Enterococcus faecium P21: strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A e enterocin B”, *Food Microbiology*, 18, 2, 115-131 (2001).
- Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T.**, “Functionality of enterococci in meat products”, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223-233 (2003).
- Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T., Monfort J.M.**, “Inhibition of *Listeria* in dry fermented food sausages by bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494” *Journal Applied Bacteriology*, 79, 322-330 (1995).
- Ingram M.** “Science in the imported meat industry”. *J. Royal Sanitary Institute*, 69, 35, (1949).
- Jirkosvki M., Galgoczy J.**, “Die untersuchung der schimmelpilzflora der ungarischen wintersalemi” *Fleischwirtschaft*, 46, 128-131 (1966).
- Junttila J., Hirn J., Hill P., Nurmi E.**, “Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage”, *Journal of Food Protection*, 52, 158-161 (1989).
- Kageyama M., Egami F.**, “On the purification and some properties of a Pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Life Sciences*, 1, 9, 471-476 (1962).
- Kanatt S.R., Chander R., Sharma A.**, “Chitosin glucose complex – A novel food preservative”, *Food Chemistry*, 106, 2, 521-528 (2008).
- Kelly W.J., Asmundson R.V., Huang C.M.**, “Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products”, *International Journal of Food Microbiology*, 33, 2-3, 209-218 (1996).
- Kreger-van Rij.** Delimitation of the yeasts. In: Kreger-van Rij N.J.W. (Ed.), “The yeast, A Taxonomy Study”, 3rd edition. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-16 (1984).
- Krieg A.**, “Thuricin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*”, *Journal of Invertebrate Pathology*, 15, 2, 291 (1970).
- Kurtzman C.P., Fell J.W.**, “Definitions and nomenclature of the yeast, In: The yeast : a taxonomic study”, Elsevier, Amsterdam, Nederland. Vol.1-5 (1998).

- Kurtzmann C.P., Fell J.W.**, "The Yeasts, A Taxonomic Study", 4th edn. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V. (1998).
- Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A.**, "Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products", *Applied Environmental Microbiology*, 69,1, 634-640 (2003).
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. Gobbetti M.**, "Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain21B", *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 9, 4084-4090 (2000).
- Lawrie R. A.**, "Scienza della carne", Edizione Italiana a cura di Ghizzolini R., EDAGRICOLE, Bologna (1983).
- Lee S.S., Choi C.K., Ahn B.H., Moon Y.H., Kim C.H., Ha J.K.**, "In vitro stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture", *Animal Feed Science and Technology*, 115, 3-4, 215-226 ( 2004).
- Leistener L., Bem Z.**, "Vorkommen und Bedeutung von Hefen bei Pokelfleischwaren", *Fleischwirtschaft*, 50, 350-351 (1970).
- Leistner L., Ayres J.C.**, "Schimmelpilze und fleischwaren", *Fleischwirtschaft*, 47, 1320-1326 (1967).
- Lewis I.M.**, "Bacterial antagonism with special reference to the effect of *Pseudomonas fluorescens* on spore forming bacteria of soil", *Journal Bacteriology*, 17, 2, 89-103 (1929).
- Lopitz-Oloa F., Rementeria A., Elguezal N., Garaizar J.**, "Kefir: a symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities", *Revista Iberoamericana de Micologia*, 23, 2, 67-74 (2006).
- Lücke F.K.**, "Fermented meat products", *Food Research International*, 27, 299-307 (1994).
- Lücke F.K.**, "Fermented sausages" in B.J.B. Wood, Editor, *Microbiology of fermented food*, Blackie Academic & Professional, London 441-483 (1997).
- Lücke F.K., Heckelmann H.**, "Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect", *Fleischwirtschaft*, 67, 307-314 (1987).
- Ludemann V., Pose G., Pollio M.L., Segura J.**, "Determination of growth characteristic and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami", *International Journal of Food Microbiology*, 96, 1, 13-18 (2004).
- Lukic A., Welty R.E., Lucas G.B.**, "Antifungal spectra of *Actinomycetes* isolated from tobacco", *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1, 4, 363-365 (1972).
- Magnusson J. Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.**, "Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria", *FEMS microbiology Letters*, 219, 1, 129-135 (2003).
- Magnusson J., Schnürer J.**, "*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound", *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1-5 (2001).
- Marazza V., Crespi A.**, "Osservazioni sulla sopravvivenza di *Salmonella choleraesuis* in insaccati naturalmente inquinati", *Atti Società Italiana Scienze Veterinarie*, 17, 537-541 (1963).

- Marshall V.M.E.**, “Fermented milks and their future trends: Microbiological aspects”, *Journal of Dairy Research*, 54, 559-574 (1987).
- Martin A., Asenzio M.A., Bermudez M.E., Cordoba M.G., Aranda E., Cordoba J.J.**, “Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins”, *Meat Science*, 62, 129-137 (2002).
- Martín A., Colín B., Aranda E., Benito M.J., Córdoba M.G.**, “Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages”, *Meat Science*, 75, 696-708 (2007).
- Martín B., Garriga M., Hugas M., Aymerich T.**, “Genetic diversity and safety aspects of enterococci from lightly fermented sausages”, *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1177-1190 (2005).
- Marziano F., Morra A., Nanni B., Fornataro D., Palazzo M., Matassino D.**, “Production of Napoli salami from some swine autochthonous genetic types. IV. Characteristics of the mycoflora”, *CIHEAM-Options Mediterraneennes*, 245-249 (2000).
- Masih E.I., Slezack-Deshaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C.**, “Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine”, *FEMS microbiology letters*, 202, 2, 227-232 (2001).
- Mauriello G., Casaburi A., Blaiotta G., Villani F.**, “Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy”, *Meat Science*, 67, 149-158 (2004).
- Mellefont L., A., McMeekin T.A., Ross T.**, “Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogens* growth in co-culture”, *International Journal of Food Microbiology*, 121, 2, 157-168. (2008).
- Messens W. De Vuyst L.**, “Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review”, *International Journal of Microbiology*, 72, 31-43 (2002).
- Metargos M., Drosinos E.H., Metaxopoulos J.**, “Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogens* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C”, *Food Microbiology*, 20, 2, 259-265 (2003).
- Michener H.D., Snell N.**, “Two antifungal substances from *Bacillus subtilis* cultures”, *Archives Biochemistry*, 22, 2, 208-214 (1949).
- Mintzlaff H.J., Leistner L.**, “Untersuchungen zur Selektion eines technologisch geeigneten und toxiologisch unbedenklichen Schimmelpilz-stammes für die Rohwurst-Herstellung”, *Zentralblatt für Veterinarmedizin Reihe B*, 19, 291-300 (1972).
- Montville T.J., Windkowski K., Ludescher R.D.**, “Model and mechanisms for bacteriocin action and application”, *International Dairy Journal*, 5, 8, 797-814 (1995).
- Najjari A., Ouzari H., Boudabous A., Zagorec M.**, “Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products” *International Journal of Food Microbiology*, 121, 3, 342-351 (2008).

- Namvar A., Warriner K.**, “Application of enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction to trace the fate of the generic *Escherichia coli* within a high capacity pork slaughter line”, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 2, 155-163 (2006).
- Nandy S.K., Bapat P.M., Venkatesh K.V.**, “Sporulating bacteria prefers predation to cannibalism in mixed cultures”, *FEBS letters*, 581, 1, 151-156 (2007).
- Narvhus J.A.**, “Historical and cultural aspects of traditional fermented milk”, *New Developments in Thecnology of Fermented Milk Products, Prociding of the IDF Symposium, Kolding, Denamerk* (2003).
- Narvhus J.A., Gadaga T.H.**, “The role of interaction between yeast and lactic acid bacteria in african fermented milks: a review”, *International Journal of Food Microbiology*, 86, 51-60 (2003).
- NCBI**, “[www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root)”, National Center for Biotechnology Information, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA, visitato il 10/02/2008.
- Nieto Lozano J.C., Reguera-Useurus J.I., Palaez-Martinez M.C., Hardisson de la Torre A.**, “Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat” *Meat Science*, 72, 1, 57-61 (2006).
- Niku-Paavola M.-L., Laitilia A., Mattila-sandholm T. Haikara A.**, “New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*”. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29-35 (1999).
- Nishikawa A., Tomomatsu H., Sugita T., Ikeda R., Shinoda T.**, “Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*”, *Journal of Medical Veterinary Mycology*, 34, 6, 411-419 (1996).
- Nunez F., Rodríguez M.M., Bermudez M.E., Còrdoba J.J., Asensio M.A.**, “Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham”, *International Journal of Food Microbiology*, 32, 185-197 (1996).
- Nychas G.J.E., Arkoudelos S.J.**, “Staphylococci. Their role in fermented sausages”, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 167S-188S, (1990).
- Nychas G.J.E., Arkoudelos S.J.**, “Staphylococci. Their role in fermented sausages”, *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 167-188, (1990).
- Okkers D.J., Dicks L.M.T., Silvester M., Joubert J.J., Odendaal H.J.**, “Characterization of pantocin TV 35b, a bactericin-like peptide isolate from *Lactobacillus pentosus* with fungistatic effect on *Candida albicans*”, *Journal Applied Microbiology*, 87,5, 726-734 (1999).
- Olesen P.T., Stahnke L.H.**, “The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces”, *Meat Science*, 56, 357-368 (2000).
- Ordin A.P.**, “Antagonism of soil fungi from the family *Penicillium* to phytopatogenic bacteria”, *Mikrobiologija*, 21, 2, 192-199 (1952).
- Ordonez J.A., Hierro E.M., Bruna J.M., de la Hoz L.**, “Changes in the components of dry fermented sausages during ripening”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329-367 (1999).

- Osei Abunyewa A.A., Laing E., Hugo A., Viljoen B.C.**, “The population change of yeast in commercial salami”, *Food Microbiology*, 17, 429-438 (2000).
- Otero M.C., Nader-Marcia E.**, “Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle”, *Animal Reproduction Science*, 96,1-2, 35-46 (2006).
- Papamanoli E., Kotzekidou P., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E.**, “Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage”, *Food Microbiology*, 19, 441-449 (2002).
- Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P.**, “Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties”, *Meat Science*, 65, 859- 867 (2003).
- Pearce R.A., Sheridan J.J., Bolton D.J.**, “Distribution of airborne microorganisms in commercial pork slaughter process”, *International Journal of Food Microbiology*, 107, 2, 186-191 (2006).
- Philipp S., Pedersen P.D.**, “Mould cultures for the food industry. A short review with special reference to the cheese and sausage production”, *Danish Dairy and food Industry-Worldwide*, 6, 8, 10-12, (1988).
- Pidcock K., Heard G.M., Henriksson A.**, “Application of non traditional meat starter cultures in production of Hungarian salami” *International Journal of Food Microbiology*, 76, 1-2, 75-81 (2001)
- Pontello M., Sodano L., Nastasi A., Mammina C., Astuti M., Domenichini M., Gerosa E., Montagna A.**, “A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* associated with salami consumption in Northern Italy”, *Epidemiology and Infection*, 120, 209-214 (1998).
- Prendergast D.M., Daly D.J., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair I.S.**, “The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs”, *Food Microbiology*, 21, 5, 589-596 (2004).
- Rantsiou K., Urso R., Iacumin L., Cantoni C., Cattaneo P., Comi G., Cocolin L.**, “Culture-dependent and –independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausage”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4, 1977-1986 (2005).
- Rebecchi A., Crivori S., Sarra P.G., Cocconcelli P.S.**, “Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation”, *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1043-1049 (1998).
- Reyes M.L.Q., Rohrbach K.G., Paull R.**, “Microbial antagonists control post harvest black rot of pineapple fruit”, *post harvest biology and technology*, 33, 2, 193-203. (2004).
- Riabchenko N.F., Rostas K.**, “Deletion mutants of megacinogenic plasmid pBM309 from *Bacillus megaterium*”, *Gene*, 25, 1, 67-70 (1983).
- Roberts T.A., Gibson A.M.**, “Chemical methods for controlling pathogens in processed meats”, *Food Technology*, 40, 163-171 (1986).
- Rodríguez M., Nunez F., Cordoba J.J., Nunez M.E., Asensio M.A.**, “Evaluation of proteolytic activity of microorganisms isolated from dry cured-ham”, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 905-912 (1998).

- Rosenzweig W.D., Stotzky G.**, “Influence of environmental factors on antagonism of fungi by bacteria in soil: nutrient levels”, *Applied Environmental Microbiology*, 39, 2, 354-360 (1980).
- Saldanha-da-Gama A., Molfeito-Ferreira M., Loureiro V.**, “Characterization of yeast associated with Portuguese pork-based products”, *International Journal of Food Microbiology*, 37, 201-207 (1997).
- Salvat G., Toquin M.T., Michel Y., Colin P.**, “Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France”, *International Journal of Food Microbiology*, 25, 75-81 (1995).
- Samelis J., Metaxopoulos J., Vlassi M., Pappa A.**, “Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study”, *International Journal of Food Microbiology*, 44, 69-82 (1998).
- Samelis J., Stavropoulos S., Kakouri A., Metaxopoulos J.**, “Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami”, *Meat Science*, 11, 6, 447-460 (1994).
- Santos E.M., Gonzalez-Fernandez C., Jaime I., Rovira J.**, “Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of chorizo” *International Journal of Food Microbiology*, 39, 123-128 (1998).
- Santos N.N., Santos-Mendoza R.C., Sanz Y., Boulmar T., Aristoy M.C., Toldrà F.**, “Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *D. hansenii*”, *International Journal of Food Microbiology*, 68, 99-206 (2001).
- Sarra P.G., Levoni D.** Caratteristiche di ceppi di *Micrococcaceae* isolati da salumi italiani. Atti del convegno “Il ruolo degli starters nella produzione dei salumi”. CREMONA, 6-7 APRILE, (1996).
- Sarra P.G., Zacconi C., Scolari G.**, “Characterization of specific microflora involved in “culatello” ripening”, *Annals of Microbiology*, 54, 49-58 (2004).
- Seiler H., Busse M.**, “The yeast of cheese brines” *International Journal of Food Microbiology*, 11, 289-304 (1991).
- Selgas D., García L., García de Fernando G., Ordóñez J.A.**, “Lipolytic and proteolytic activity of micrococci isolated from dry-fermented sausages”, *Fleischwirtschaft*, 73, 1164-1166 (1993).
- Selgas M.D., Trigueros G., Casas C., Ordonez J.A., Garcia M.L.**, “Potential Technological interest of a *Mucor* strain to be used in dry fermented sausage production” *Food Research International*, 28, 1, 77-82 (1995).
- Shalaby A.R.**, “Significance of biogenic amines to food safety and human health”, *Food Research International*, 29, 7, 675-690 (1996).
- Silla Santos M.H.**, “Biogenic amines: their importance in foods”, *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231 (1996).
- Silvestri G., Santarelli S., Aquilanti L., Beccaceci A., Osimani A., Tonucci F., Clementi F.**, “Investigation of the microbial ecology of Ciasculo, a traditional Italian Salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE”, *Meat Science* 77, 3, 413-423 (2007).
- Singh B.J., Dincho D.**, “Molds as protective cultures for raw dry sausages”, *Journal of Food Protection*, 57, 928-930 (1994).



- Siu D.C. Henshall A.**, “Ion chromatographic determination of nitrate and nitrite in meat products”, *Journal Chromatography A*, 804, 1-2, 157-160 (1998).
- Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L.**, “Antifungal 3-hidroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14”, *Applied Environmental Microbiology*, 69, 12, 7554-7557 (2003).
- Sorensen B.B.**, “Lipolysis of pork fat by the meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions”, *International Journal of Food Microbiology*, 34, 187-193 (1997).
- Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiack O., Schumann P.**, “Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kokuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Chon 1872 gen. emend.”, *International Journal Systematic Bacteriology*, (1995).
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J.**, “*Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid”, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9, 4322-4327 (2002).
- Sunesen L.O., Stahnke L.H.**, “Mould starter cultures for dry sausages – selection, application and effects”, *Meat Science*, 65, 935-948 (2003).
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W.**, “Bacteriocins of gram-positive bacteria”. *Bacteriological Review*, 40, 3, 722–756 (1976).
- Tesic Z., Lukic A.M.**, “*Actinomyces coeruleus* Baldacci, producer of an antibiotic of large antifungal spectrum”, *Mikrobiolgiia*, 3, 183-193 (1966).
- Todorov S.D., Koep K.S.C., Van Reenen C.A., Hoffman L.C., Slinde E., Dicks L.M.T.**, “Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenics strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*”, *Meat Science*, 77, 3, 405-412 (2007).
- Tremonte P.** “Sinergismo ed antagonismo tra ceppi di interesse alimentare” - Tesi di dottorato, Università del Molise (2004).
- Tremonte P., Succi M., Reale A., Di Renzo T., Sorrentino E., Coppola R.** “Interactions between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats”. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 743-51 (2007).
- Valerio F., Lavermicocca P., Pasacale M., Visconti A.**, “Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation”, *FEMS microbiology letters*, 233, 289-295 (2004).
- Van der Walt, J.P., Taylor M.B., Liebenberg N.V.**, “Ploidy, ascus formation and ricombinations in *Torulaspora (D. hansenii)*”, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 43, 205-18 (1977).
- Vermeulen N., Gänzle M.G., Vogel R.F.**, “Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451 and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468”, *Journal of Agricultural and Chemistry*, 54, 11, 3832-3839 (2006).
- Vijoen B.C.**, “The interaction between yeast and bacteria in dairy environments”, *International Journal of Food Microbioligy*, 69, 37-44 (2001).

**Villani F., Casaburi A., Pennacchia C., Filosa L., Russo F., Ercolini D.,** “Microbial ecology of the soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, and vitro and situ selection of autochthones starter cultures”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73,17, 5453-5463 (2007).

**Wong B., Kiehn T.E., Edwards F., Bernard E.M., Marcove R.C., De Harven E., Armstrong D.,** “Bone infections caused by *D. hansenii* in a normal host: a case report”, *Journal of Clinical Microbiology*, 16, 3, 545-548 (1982).

**Yamamoto T., Imai S., Nisizawa T., Araya S.,** “Production of, and susceptibility to, bacteriocin-like substances in oral streptococci” *Archives of Oral Biology*, 20, 1-2, 389-391 (1975).

**Zambonelli C., Papa F., Romano P., Suzzi G., Grazia G.** “Microbiologia dei salumi”. EDAGRICOLE Bologna, (1992).

**Zambonelli C., Tini V., Giudici P., Grazia L.,** “Microbiologia degli alimenti fermentati” EdAgricole, Bologna (2001).

**Zivanovic R., Ristic D.,** “Nalaz kvasaca u canjoj kobasici u toku tehnoloskog procesa”, *Technologija Mesa*, 15, 51-52 (1974).

**Zweifel C., Fischer R., Stephan R.,** “Microbiological contamination of pig and cattle carcasses in different small-scale Swiss abattoirs”, *Meat science*, 78, 3, 225-231 (2008).