



**REGIONE  
PIEMONTE**

**FEASR - Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale**  
*l'Europa investe nelle zone rurali*

## **Programma di sviluppo rurale 2014-2020**

Misura 16 – Innovazione e Cooperazione  
Operazione 16.1.1 Costituzione, Gestione e Operatività  
dei Gruppi Operativi del Pei-Agri

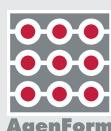
# **Salumi Liberi**

*Progetto per la riduzione dei nitrati/nitriti nei prodotti di salumeria e nel prosciutto cotto*

Costo complessivo: € 567.321,85  
Contributo pubblico concesso: € 453.857,48  
di cui quota FEASR: €195.703,35



[www.regione.piemonte.it/svilupporurale](http://www.regione.piemonte.it/svilupporurale)





## **Progetto SALUMI LIBERI**

### **Review parametri microbiologici**

#### **Introduzione - DISAFA**

La fermentazione e stagionatura della carne è utilizzata da decenni per migliorare la qualità, la sicurezza e la conservazione di tali prodotti per mezzo dell'aggiunta di vari ingredienti e additivi quali sale, nitrito, nitrato, fosfato, ecc..

Il nitrito, in particolare, è un additivo fondamentale che aiuta lo sviluppo del colore e del sapore, oltre che ad inibire la crescita di microorganismi indesiderati nel prodotto finale. Il nitrito agisce infatti inibendo la crescita dei principali batteri patogeni e alteranti durante la conservazione dei prodotti carnei tra cui *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*. È riportata una sua efficacia anche nei confronti di *Clostridium sporogenes*, specie con caratteristiche simili al *Clostridium botulinum*, mentre una più blanda inibizione di crescita è riportata per le seguenti specie: *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. È stato riportato che l'effetto antimicrobico del nitrito è più efficace nei batteri anaerobi gram-positivi che nei batteri aerobi gram-negativi.

Il nitrito, utilizzato nei prodotti a base di carne, può provenire da fonti sintetiche o naturali. Oggigiorno il nitrito sintetico è ampiamente utilizzato durante la stagionatura in quanto è relativamente più economico. Tuttavia, le crescenti preoccupazioni circa l'uso di additivi sintetici hanno portato ad un aumento delle richieste dei consumatori di utilizzare fonti di nitrito naturale. Il nitrito naturale è generalmente prodotto riducendo il nitrato nelle verdure in nitrito usando batteri nitrato-riduttori. Attualmente, i nitriti (E 249 ed E 250) e i nitrati (E 251 ed E 252) sono autorizzati come additivi alimentari nell'Unione europea (UE) ai livelli massimi consentiti (MPL) che vanno da 50 a 180 mg/kg in 18 categorie alimentari per i nitriti, mentre i nitrati vanno da 10 a 500 mg/kg in 24 categorie alimentari secondo l'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 modificato dal regolamento (UE) 2015/647 sugli additivi alimentari.

Anche se i nitriti sono ampiamente utilizzati nell'industria della carne, sono classificati dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro come agenti potenzialmente cancerogeni a causa della loro capacità di reagire con le ammine nel tratto gastrointestinale, con conseguente formazione di N-nitrosammine. Diversi studi hanno infatti indicato che l'assunzione di nitriti dovrebbe essere limitata, per tale motivo la domanda da parte dei consumatori di prodotti a base di carne con una ridotta concentrazione di nitriti è sempre più elevata.

Pertanto, le industrie produttrici di prodotti carnei sono continuamente alla ricerca di nuovi approcci, più sani e sicuri, per la conservazione dei loro prodotti. Nel tentativo di trovare valide alternative per la conservazione degli alimenti fermentati, diversi autori suggeriscono l'uso combinato di livelli più bassi di nitriti con altri composti o microorganismi selezionati, in modo tale che le proprietà antimicrobiche possano essere garantite senza alterare le qualità sensoriali del prodotto. Tramite una stretta collaborazione delle aziende produttrici con la comunità scientifica si sta analizzando in dettaglio la biosicurezza degli approcci sopracitati.

Un approccio efficace, e sempre più studiato, per la produzione di prodotti carnei fermentati è lo sfruttamento del potenziale bioprotettivo di popolazioni batteriche selezionate applicate in combinazione a quantità ridotte di nitriti. Tale approccio permette di ottenere sia una riduzione della carica di patogeni sia di mantenere i noti effetti positivi dei nitriti, come il colore brillante.

### **Bioprotezione**

La bioprotezione negli alimenti può essere descritta come l'uso di popolazioni microbiche per inibire o sopprimere la crescita di altri microrganismi bersaglio, fornendo una maggiore qualità, sicurezza e durata di conservazione degli alimenti. L'effetto bioprotettivo delle colture selezionate avviene attraverso la competizione o la produzione di antimicrobici, come ad esempio batteriocine, sostanze inibitorie simili alle batteriocine (BLIS), acidi organici, perossido di idrogeno, etanolo, ecc..

Le colture bioprotettive sono di solito parte del microbiota naturale della matrice alimentare, ciò implica il vantaggio di minimizzare i possibili effetti negativi sulle caratteristiche sensoriali, fisiche e chimiche del prodotto. Numerose ricerche scientifiche hanno infatti dimostrato che la microflora autoctona presente in diversi prodotti tradizionali, oltre a migliorare le caratteristiche tecnologiche e sensoriali finali, possiede un'attività di inibizione verso i batteri alteranti e/o patogeni. Nel caso di prodotti a base di carne il microbiota autoctono può aumentare la shelf-life del prodotto in diversi modi, come ad esempio tramite la competizione con altri batteri, abbassamento del pH e dell'attività dell'acqua, nonché tramite la produzione di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) e batteriocine.

L'uso di colture bioprotettive per promuovere la biosicurezza nella carne è stato ampiamente studiato, concentrandosi principalmente sui batteri lattici indigeni (LAB). Essi hanno infatti dimostrato un'elevata attività antimicrobica *in vitro* contro un ampio spettro di patogeni alimentari e sono generalmente riconosciuti come "Generally Recognized as Safe" (GRAS). È importante però sottolineare che molti ceppi di LAB producono batteriocine attive nei confronti di agenti patogeni o alimentari *in vitro*, ma non *in situ*, in una matrice di carne.

La loro elevata presenza nelle matrici di partenza (carne cruda) e nei prodotti finali (carne fermentata) e la loro elevata biodiversità ne dimostrano il grande potenziale come agenti di biocontrollo e il loro possibile impiego in formulazioni di colture starter. I ceppi di LAB hanno inoltre dimostrato in numerosi studi scientifici anche un'elevata contribuzione nello sviluppo di buone caratteristiche sensoriali e di

promozione della salute. I generi di batteri lattici comunemente usati come colture bioprotettive sono *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Pediococcus*.

Il principale meccanismo di antagonismo sviluppato da questi microorganismi è quello mediato dalle batteriocine, composti peptidici con la capacità di inibire la crescita di uno specifico agente microbico. Le batteriocine costituiscono un gruppo diversificato di proteine antibatteriche che possono inibire la crescita e lo sviluppo di batteri indesiderati attraverso vari meccanismi quali l'inibizione della sintesi della parete cellulare, la permeabilizzazione della membrana cellulare o l'inibizione dell'attività enzimatica.

Le batteriocine mostrano un'attività inibitoria contro i batteri Gram-positivi, in particolare *L. monocytogenes*, tuttavia potrebbero anche essere efficaci contro i batteri Gram-negativi quando combinati con altri composti che agiscono sullo strato esterno della parete cellulare. L'applicazione di queste molecole nei salumi è consentito in tre diverse modalità: inoculo diretto di ceppi di LAB batteriocinogeni come starter o colture protettive, applicazione diretta di batteriocine "cell free supernatante" (CFS) come additivo alimentare e incorporazione di totalmente o parzialmente di batteriocine purificate in diverse formulazioni commerciali. L'impiego diretto della coltura batterica porta il vantaggio di un possibile impatto positivo sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finale.

Le batteriocine sono classificate come "additivo alimentare" e legiferato dalle norme che riguardano questi composti. Per essere approvati, i prodotti protettivi devono soddisfare diversi criteri. In primo luogo, i prodotti devono essere caratterizzati e identificati; devono seguire una valutazione della sicurezza ed essere caratterizzati dal punto di vista funzionale. Dopo di che vengono impiegati test in laboratorio e su scala pilota per dimostrare la loro efficacia nel prodotto. In caso positivo seguirà una convalida su larga scala nell'industria alimentare. Attualmente, le batteriocine sono generalmente considerate conservanti alimentari naturali sicuri ed efficaci. Al momento solo nisina e pediocina PA1/AcH sono approvati per l'uso nella conservazione degli alimenti. Ad esempio, la nisina, una batteriocina a basso peso molecolare prodotta da alcuni ceppi di *Lactococcus lactis*, è usata come conservante alimentare da più di 30 anni. I risultati riportati in letteratura suggeriscono infatti la nisina come una valida alternativa al nitrito, può essere infatti impiegata nella carne stagionata senza compromettere gli aspetti di sicurezza.

Ulteriori studi sono stati condotti indagando l'attività bioconservativa di ceppi LAB già precedentemente caratterizzati appartenenti alle specie *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus delbrueckii* nei confronti di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.. Tali studi sono stati condotti in un modello di salsiccia secca fermentata senza nitrito e con metà (75 mg/kg) o massima (150 mg/kg) quantità di nitrito consentita (considerando le quantità massime consentite in Europa Fino a maggio 2018). I risultati hanno mostrato che l'aggiunta di specifici ceppi di *L. plantarum* come coltura protettiva nelle salsicce senza nitriti contaminate artificialmente con patogeni è in grado di ridurre significativamente la carica patogena dopo 4 e 6 giorni dall'inizio della fermentazione. Lo stesso risultato è stato riportato nei confronti di *Listeria* inoculando la carne con *L. plantarum* in combinazione ad una quantità dimezzata di nitrito (75 mg/kg).

Invece, ceppi di *Latilactobacillus sakei* e *Latilactobacillus curvatus* sono noti produttori di sakacine, batteriocine che mostrano elevate attività inibitorie nei confronti di *L. monocytogenes* sia su prodotti carnei cotti che crudi.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi con l'obiettivo di indagare il potenziale ruolo della microflora autoctona come agenti di bioprotezione, determinando il loro spettro di attività antimicrobica nei confronti di diversi agenti di deterioramento degli alimenti e di microrganismi patogeni. In tali lavori i ceppi produttori di batteriocine vengono identificati con metodi molecolari mirando l'attenzione a determinanti geni che codificano le proteine antimicrobiche. L'impiego diretto di questi ceppi potrebbe essere un valido metodo per preservare la qualità degli alimenti. Ulteriori studi devono però essere condotti per capire quali sono i migliori ceppi produttori di batteriocine da impiegare, da soli o in combinazione, per l'applicazione come starter o co-starter nelle produzioni alimentari.

### **Challenge test in salumi a basso contenuto di nitriti e nitrati – IZSPLV**

A seguito delle sempre maggiori richieste da parte dei consumatori di prodotti naturali, contenenti bassi o nulli livelli di additivi, sempre più aziende alimentari si sono impegnate nello sviluppo di salumi a ridotto contenuto di nitriti e nitrati o contenenti ingredienti alternativi naturali che abbiano proprietà antiossidanti, stabilizzanti del colore e che permettano di ottenere alimenti con gli aromi caratteristici dei prodotti tradizionali.

La sicurezza di tali prodotti dal punto di vista microbiologico è un prerequisito imprescindibile: i nitriti e nitrati svolgono infatti un'azione protettiva nei confronti di microrganismi patogeni quali, tra gli altri, *C. botulinum* e *L. monocytogenes*. Gli effetti della loro riduzione o sostituzione devono essere valutati tramite prove in vivo, in cui lotti di salami fermentati contenenti concentrazioni ridotte di nitriti e nitrati e/o ingredienti alternativi con azione antibatterica vengono sottoposti ad analisi di laboratorio.

Alcuni studi si limitano ad osservare l'effetto sulle caratteristiche organolettiche e a ricercare microrganismi patogeni e non, quali *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, stafilococchi coagulasi positivi, *C. botulinum* (solfito riduttori) e *Salmonella* spp., a fine stagionatura. Aquilani et al. (2018) hanno prodotto, ad esempio, salami di cinta senese aggiungendo estratto di semi d'uva e di castagna in sostituzione dei nitriti; come controllo è stato previsto un lotto con 30 ppm di nitrito. L'estratto di semi d'uva e di castagna hanno mostrato un'attività antiossidante leggermente inferiore rispetto a quella dei nitriti/nitrati, mentre il profilo volatile ha dato risultati simili per tutti i prodotti. L'accettabilità generale del prodotto non è stata modificata dalla sostituzione dei nitriti/nitrati, eccetto per una modifica del colore nei prodotti con ingredienti sostitutivi. Higuero et al. (2020) hanno invece valutato gli effetti della rimozione o riduzione dei livelli di nitriti e nitrati in filetti di carne stagionata (Iberian cured loins) sui parametri fisico-chimici, sul colore, sulla presenza di nitropigmenti, sull'ossidazione di grassi e proteine. In particolare, sono stati prodotti lotti con 150/150 mg/kg, 75/75 mg/kg, 37.5/37.5 mg/kg e 0/0 mg/kg di nitriti/nitrati. Durante la stagionatura si è registrato un aumento dell'ossidazione lipidica che è risultata più elevata per il lotto senza nitriti/nitrati, mentre l'ossidazione proteica è stata osservata anche a concentrazioni di 75/75 e 37.5/37.5 ppm. Il colore dei lotti

senza nitriti/nitrati è stato influenzato negativamente, mentre quello dei prodotti con 37.5 ppm non ha subito effetti. In entrambi gli studi, al termine della stagionatura sono state determinate le caratteristiche microbiologiche dei prodotti: nel primo studio non è stata rilevata la presenza di *E. coli*, *L. monocytogenes*, stafilococchi coagulasi positivi e *Salmonella* spp. mentre nel secondo *L. monocytogenes* era assente. Higuero et al. (2020) non hanno riscontrato nessuna influenza da parte dei nitriti/nitrati sulle cariche di mesofili e lieviti e muffe, mentre Aquilani et al. (2018) hanno riportato la presenza di cariche pari a  $2 \log_{10}$  UFC/g di clostridi solfito riduttori nei due lotti con ingredienti sostitutivi, mentre erano assenti in quelli con nitriti/nitrati. Un ulteriore studio ha osservato un effetto inibitorio sulla carica di enterobatteri esercitato sia da parte dei batteri lattici aggiunti come starter ( $6 \log_{10}$  UFC/g) sia da parte di nitriti e nitrati (75/60 e 150/125 mg/kg) (Cardinali et al., 2018). Anche Hospital et al. (2012) hanno documentato cariche conteggiabili di enterobatteri, comprese tra 1 e  $2 \log_{10}$  UFC/g nei lotti a concentrazione ridotta o privi di nitriti/nitrati, mentre erano assenti con le massime concentrazioni.

Altri autori hanno eseguito veri e propri challenge test in cui microrganismi patogeni o loro surrogati sono stati inoculati a concentrazione nota nei prodotti da testare, contenenti basse concentrazioni di nitriti/nitrati e/o ingredienti alternativi naturali. In questo modo è possibile osservare l'impatto che i vari ingredienti e additivi hanno sulla concentrazione dei microorganismi a fine stagionatura o vita commerciale e valutarne la sicurezza dal punto di vista microbiologico.

Christieans et al. (2018), ad esempio, hanno valutato l'effetto della riduzione del contenuto di nitrati o nitriti/nitrati sul comportamento di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. inoculate in salami fermentati tradizionali francesi prodotti con 250, 200, 150 ppm di nitrati e 120/120 e 80/80 ppm di nitriti/nitrati. L'impasto è stato inoculato con *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* a una concentrazione iniziale di  $2-3 \log_{10}$  UFC/g e insaccato in budello naturale (30-40 mm diametro). I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nonostante la riduzione dei nitriti e nitrati, sia per la flora lattica che per i cocchi catalasi positivi non c'erano differenze significative tra i vari lotti ( $p > 0.05$ ). Entrambi i patogeni, invece, sono stati influenzati dalla presenza di nitriti e nitrati in combinazione: l'aggiunta di nitrito ha inibito la crescita di *Salmonella* e *Listeria* nelle fasi iniziali, mentre la sola presenza di nitrato, nonostante le caratteristiche intrinseche del prodotto, non ha prodotto lo stesso effetto, a causa della lenta conversione del nitrato in nitrito. Una riduzione del 47% della concentrazione massima consentita di nitrito (80 ppm) ha fatto osservare lo stesso effetto ottenuto con i valori maggiori.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Hospital et al. (2014) in un lavoro in cui i salami, inoculati con *Salmonella* Typhimurium, sono stati prodotti con 150/150 ppm di nitriti/nitrati, con una riduzione del 25% e del 50% e con 0/0 ppm. Durante i primi giorni, nonostante i valori di pH e  $a_w$  iniziali fossero tali da promuovere la crescita di *Salmonella*, le concentrazioni inferiori di nitriti/nitrati si sono rivelate efficaci nell'inibire la crescita del microorganismo. Al contrario, nel lotto di controllo si è registrato un lieve aumento della carica fino al 12° giorno di stagionatura, nonostante pH e  $a_w$  avessero raggiunto valori pari a 5.2 e 0.94. Patarata et al. (2020), oltre all'effetto di concentrazioni inferiori di nitriti e nitrati, hanno valutato anche la possibile influenza dell'aggiunta di vino e vino e aglio in combinazione. La carica di *Salmonella* è

diminuita di 5-6 log<sub>10</sub> UFC/g sia nei prodotti con nitriti/nitrati che in quelli con il vino o vino e aglio, mentre nel controllo che conteneva solo il sale si è verificata una riduzione di 4 log<sub>10</sub> UFC/g. In questo caso la riduzione di a<sub>w</sub>, dopo 7 giorni di stagionatura, sembrerebbe aver avuto il sopravvento nell'inibizione di *Salmonella* in quanto le differenze tra i vari prodotti successivamente si sono attenuate, tuttavia erano ancora evidenti tra il controllo e il salame prodotto con nitriti e nitrati e con il vino.

Per quanto riguarda *Listeria*, Hospital et al. (2012) in uno studio che utilizzava *Listeria innocua* come surrogato di *L. monocytogenes*, nel lotto con la concentrazione massima di nitriti/nitrati (150/150 ppm) è stata riscontrata una carica finale inferiore di 1.5 e 2 log<sub>10</sub> UFC/g rispetto a quella dei lotti a contenuto ridotto (riduzione del 25 e 50%) e senza nitriti/nitrati, rispettivamente. Il comportamento di *L. monocytogenes* è stato studiato anche nel prosciutto cotto e in un prodotto simile alla mortadella (Bologna style sausage) entrambi preaffettati, inoculati con il patogeno (carica 10<sup>3</sup> UFC/g) e contenenti 178, 79 o 40 ppm di nitrito. Nel prosciutto cotto si è verificato un aumento di 2 log<sub>10</sub> dopo 10 giorni a 7°C a tutte le concentrazioni di nitrito mentre nella mortadella non è stata registrata crescita nei lotti con 178 e 79 ppm, ma un aumento di un fattore 5 con 40 ppm dopo uno stoccaggio di 32 gg a 7°C (Stegeman et al., 2007).

Un altro importante patogeno che rappresenta un pericolo per la sicurezza dei prodotti a base di carne è *C. botulinum*. Sono stati eseguiti vari lavori per valutare la sicurezza di diversi tipi di prodotti a base di carne a ridotto contenuto di nitriti e nitrati inoculati con il microrganismo patogeno o con *C. sporogenes* come surrogato. Le affinità tra le due specie sono elevate e si assume che il loro comportamento sia molto simile.

Hospital et al. (2016) hanno svolto uno studio di tossinogenesi utilizzando due tipi di salami fermentati spagnoli (salchichón e fuet), inoculati con spore di *C. botulinum* Group I (proteolitico) e *C. botulinum* Group II (non proteolitico), prodotti con 150/150 ppm di nitriti/nitrati e con una loro riduzione del 25%, del 50% e del 100%. La tossina botulinica non è stata rilevata in nessun campione, inclusi i controlli senza nitriti/nitrati. Nonostante le caratteristiche intrinseche del prodotto fossero tali da permettere la germinazione delle spore durante i primi 8-12 giorni della stagionatura, la combinazione di acidità, a<sub>w</sub> e temperatura di incubazione ha inibito in modo efficace la produzione della tossina, indipendentemente dagli additivi utilizzati. Tuttavia, gli autori sottolineano che i nitriti/nitrati potrebbero avere un'azione su altri patogeni, come dimostrato dai lavori descritti in precedenza, o che potrebbero svolgere la loro azione su *C. botulinum* in caso altri parametri non fossero sufficienti per inibirne la crescita. Un altro studio è andato a rilevare la produzione della tossina botulinica nel prosciutto crudo e luncheon meat (carne cotta pressata, di solito in lattina) prodotti con 0, 50 e 85 ppm di nitrito, affettati e mantenuti in atmosfera protettiva modificata per 5 settimane a 7, 10 e 15°C. L'aumento della carica del microrganismo è stato più precoce nei campioni mantenuti a 15°C e nei prodotti senza nitriti; analogamente la produzione della tossina si è verificata nei campioni senza nitriti dopo 6 settimane nella carne magra e dopo 8-12 settimane nei prodotti più grassi e dopo 12 settimane in quelli contenenti 54 ppm di nitriti. I prodotti con 80 ppm di nitriti si sono rivelati stabili fino a 65 giorni.

Due lavori hanno valutato la crescita di *C. sporogenes* in salami fermentati a ridotto contenuto di nitriti e/o nitrati e prodotti con l'aggiunta di alcuni ingredienti alternativi quali vino e aglio (Patarata et al., 2020) e nisina, acidi organici, oli essenziali di cannella a diverse concentrazioni (Ghabraie et al., 2016). Patarata et al. (2020) hanno descritto una costante diminuzione della carica del microorganismo durante la stagionatura, arrivando al di sotto del limite di rilevabilità dopo 15 giorni, quando il prodotto presentava valori di  $a_w$  pari a 0.91. Le conte sono risultate lievemente più elevate nei campioni di controllo, ma tali differenze non sono risultate statisticamente significative. Ghabraie et al. (2016) invece hanno osservato la crescita del microorganismo quando nel salame erano presenti unicamente i nitriti a concentrazione ridotta (100 ppm), senza l'aggiunta di altri ingredienti. La combinazione di nitriti (100 ppm) con elevate concentrazioni di acidi organici e oli essenziali di cannella hanno mostrato la capacità di ridurre più efficacemente la carica rispetto al controllo (riduzione maggiore di 1  $\log_{10}$  UFC/g).

Infine, Oliveira et al. (2011) hanno valutato l'effetto antimicrobico nei confronti di *Clostridium perfringens* (carica inoculata  $10^7 \log_{10}$  UFC/g) dell'olio essenziale di santoreggia in mortadella prodotta con diverse concentrazioni di nitrito (0, 100, 200 ppm). Nel lotto senza nitrito e senza olio essenziale durante il primo giorno di stoccaggio la popolazione di *C. perfringens* è aumentata, raggiungendo  $8.95 \log_{10}$  CFU/g, per poi arrivare a  $4.83 \log_{10}$  CFU/g alla fine del periodo di stoccaggio (25°C per 30 giorni). I campioni senza nitriti con l'olio essenziale alla concentrazione inferiore non hanno fatto registrare un incremento iniziale, mentre in quelli con le concentrazioni superiori le cariche hanno subito una diminuzione iniziale. I campioni con i nitriti presentavano cariche significativamente inferiori rispetto al controllo senza additivi. I lotti contenenti nitrito e olio essenziali hanno fatto osservare un effetto sinergico tra i due ingredienti in quanto la riduzione della carica era superiore rispetto a quella dei prodotti con i singoli ingredienti.

L'analisi dei lavori disponibili in letteratura ha permesso di individuare una certa concordanza tra gli studi disponibili, sembrerebbe infatti che una concentrazione di 80 ppm sia da considerare sicura dal punto di vista microbiologico e che l'aggiunta di ingredienti alternativi ad azione antibatterica possa permettere di produrre salumi con concentrazioni ancora inferiori, sfruttando il sinergismo con altri ingredienti di origine naturale ad azione antibatterica.

## **Bibliografia DISAFA**

- Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S., & Jo, C. (2015). Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science and Technology*, 45(1), 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.008>
- Da Costa, R. J., Voloski, F. L. S., Mondadori, R. G., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>
- Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L. (2010).



Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1151–1159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.008>

Danielski, G. M., Evangelista, A. G., Luciano, F. B., & de Macedo, R. E. F. (2020). Non-conventional cultures and metabolism-derived compounds for bioprotection of meat and meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1835818>

EFSA. (2017). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017. *EFSA Journal*, 15(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4884>

Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International journal of food microbiology*, 279, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038>

Fraqueza, M. J., Laranjo, M., Elias, M., & Patarata, L. (2021). Microbiological hazards associated with salt and nitrite reduction in cured meat products: control strategies based on antimicrobial effect of natural ingredients and protective microbiota. *Current Opinion in Food Science*, 38, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.027>

Higuero, N., Moreno, I., Lavado, G., Vidal-Aragón, M. C., & Cava, R. (2020). Reduction of nitrate and nitrite in Iberian dry cured loins and its effects during drying process. *Meat Science*, 163, 108062. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108062>

IARC (2010). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/index.php>.

Jo, K., Lee, S., Yong, H. I., Choi, Y. S., & Jung, S. (2020). Nitrite sources for cured meat products. *Lwt*, 129, 109583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109583>

Lee, S., Lee, H., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y., Oh, H., Choi, K-H., & Yoon, Y. (2018). Microbiological safety of processed meat products formulated with low nitrite concentration - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(8), 1073–1077. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0675>

Nikodinoska, I., Baffoni, L., Di Gioia, D., Manso, B., García-Sánchez, L., Melero, B., & Rovira, J. (2019). Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product. *Lwt*, 101, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.022>

Raybaudi-Massilia, R., Mosqueda-Melgar, J., Rosales-Oballos, Y., Citti de Petricone, R., Frágenas, N. N., Zambrano-Durán, A., Sayago, K., Lara, M., & Urbina, G. (2019). New alternative to reduce sodium chloride in meat products: Sensory and microbiological evaluation. *Lwt*, 108, 253–260.

## **Bibliografia IZSPLV**

- Aquilani, C., Sirtori, F., Flores, M., Bozzi, R., Lebret, B., Pugliese, C., 2018. Effect of natural antioxidants from grape seed and chestnut in combination with hydroxytyrosol, as sodium nitrite substitutes in Cinta Senese dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 145, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.019>
- Cardinali, F., Milanović, V., Osimani, A., Aquilanti, L., Taccari, M., Garofalo, C., Polverigiani, S., Clementi, F., Franciosi, E., Tuohy, K., Mercuri, M.L., Altissimi, M.S., Haouet, M.N., 2018. Microbial dynamics of model Fabriano-like fermented sausages as affected by starter cultures, nitrates and nitrites. *Int. J. Food Microbiol.* 278, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.032>
- Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., Gregori, T., 2018. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. *Meat Sci.* 137, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.028>
- Ghabraie, M., Vu, K.D., Tnani, S., Lacroix, M., 2016. Antibacterial effects of 16 formulations and irradiation against *Clostridium sporogenes* in a sausage model. *Food Control* 63, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.019>
- Higuero, N., Moreno, I., Lavado, G., Vidal-Aragón, M.C., Cava, R., 2020. Reduction of nitrate and nitrite in Iberian dry cured loins and its effects during drying process. *Meat Sci.* 163, 108062. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108062>
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Res. Int.* 62, 410–415. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.055>
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.032>
- Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernández, M., 2016. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 218, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.009>
- Oliveira, T.L.C.D., Soares, R. de A., Ramos, E.M., Cardoso, M. das G., Alves, E., Piccoli, R.H., 2011. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>
- Patarata, L., Martins, S., Silva, J.A., Fraqueza, M.J., 2020. Red Wine and Garlic as a Possible Alternative to Minimize the Use of Nitrite for Controlling *Clostridium Sporogenes* and *Salmonella* in a Cured Sausage: Safety and Sensory Implications. *Foods Basel Switz.* 9. <https://doi.org/10.3390/foods9020206>

Stegeman, D., Hulstein, J., Verkleij, T.J., Stekelenburg, F.K., 2007. Reducing the amount of nitrites in the production of pasteurized organic meat products: experiments on industrial scale.