

INDUSTRIE ALIMENTARI



w w w . c e i a . n e t

Zona Ind. Viciomaggio 54 • 52041 AREZZO • T +39 0575 4181 • F +39 0575 418296 • qa-detectors@ceia-spa.com





Studio dell'evoluzione di *Listeria innocua* in cubetti di pancetta confezionati in atmosfera modificata e conservati a diverse temperature

Study of the evolution of Listeria innocua in cubes of bacon packaged in a modified atmosphere and preserved at various temperatures

• PAROLE CHIAVE

pancetta cubettata, *Listeria innocua*, sviluppo

• KEYWORDS

dry cured bacon, *Listeria innocua*, growth

• RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare il potenziale sviluppo di *Listeria innocua* intenzionalmente inoculata in pancetta cubettata confezionata in MAP e conservata a 4° e 8°C per 150 giorni e a 4°C per 50 giorni poi a 8°C fino alla fine della sua shelf-life (150 giorni). I dati hanno evidenziato che nonostante l'Aw (0,96-0,97) e il pH (5,8-6,1), la pancetta cubettata non supportava la crescita dei ceppi di *L. innocua* inoculati; anzi nel tempo e in base alle temperature di stoccaggio si osservava un sensibile decremento. Pertanto suggeriamo di inserire tale prodotto nella categoria 1,3 (Reg. CE 2073/05) tra i prodotti che non supportano la crescita di tale microrganismo.

• SUMMARY

The aim of this task was to study the potential growth of *L. innocua* intentionally inoculated in cubes of dry cured bacon packaged in MAP and preserved at different temperatures (4°C, 8°C, 4°C for 50 days and then at 8°C) until the end of their shelf-life (150 days). *L. innocua* did not grow in the bacon cubes, in fact an evident decrease was observed based on the storage time. Therefore we suggest to insert this product in the category 1,3 (Reg. CE 2073 705) among those products that do not support the growth of such organisms.

L. Iacumin¹ - F. Tocchetto¹
N. Bortolussi² - A. Sponchiado²
G. Comi^{1*}

¹Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università degli Studi di Udine, Via Sondrio 2/a, 33100 Udine

²Bechér S.p.a.,
Paderno di Ponzano Veneto - TV
*email: giuseppe.comi@uniud.it

Introduzione

La pancetta è un prodotto a base di carne, che ha rappresentato nei secoli la più importante fonte di sostentamento grazie al suo alto valore energetico. Viene attualmente prodotta in diverse forme e tipologie.

Infatti, dopo essere stata sezionata dalla carcassa, la pancetta è tagliata in diverse forme (6, 7), che cambiano a seconda della ricetta e della tecnologia di ogni zona di produzione; per esempio ha forma squadrata nel caso della pancetta tesa, che può essere con o senza cotenna; ha forma rotonda nel caso della pancetta arrotolata, che viene definita magretta per il colore tendente al rosso scuro, essendo magra, o coppata, ottenuta arrotolando insieme la parte della pancetta ad una coppa (3).

Tra le più note ricordiamo il "rigatino" toscano, fittamente striato di magro perché ricavato dalla parte molto muscolosa della pancia, e il "guanciale" laziale, piuttosto grasso, triangolare, ottenuto appunto dalla guancia e il "bacon", nella versione dei paesi anglosassoni, dal gusto dolce aromatico, ottenuta esponendo il salume per circa due giorni a fumo di legna di faggio, quercia o ginepro (8, 13). Recentemente per praticità e comodità viene commercializzata anche tagliata a dadini, pronta per essere utilizzata nella preparazione di molti sughi, come ad esempio quelli all'amatriciana e alla carbonara. Nella preparazione della pancetta destinata alla produzione dei cubetti, gli ingredienti, che vengono costantemente utilizzati sono sempre gli stessi utilizzati per la produzione della pancetta tradizionale.

In Italia, la pancetta, che viene impiegata proviene principalmente da allevamenti suinicoli locali o esteri, quali Paesi Bassi, Spagna e Germania. Il taglio viene salato a secco e/o a zangola utilizzando una concia costituita da sale marino, nitrato di potassio (E252), nitrito di sodio (E250), destrosio, ascorbato di sodio, aromi naturali (oli essenziali di aglio, cannella, coriandolo, noce moscata e pepe) e culture starter, costituite da *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosus*. Per garantire una corretta distribuzione della concia su tutta la superficie, la carne viene zangolata. La temperatura della carne in fase di lavorazione deve essere inferiore 12°C, al fine di evitare che il grasso fonda e garantisca un'elevata disponibilità d'acqua in modo che la solubilizzazione del sale sia rapida (6-8). Segue l'asciugatura, che rappresenta la fase in cui l'attività dell'acqua (Aw) inizia a diminuire in modo progressivo; l'abbassamento del pH, dovuto all'attività dei batteri lattici, modifica la struttura delle proteine, favorendo il rilascio dell'acqua dal prodotto (6, 7).

L'umidità e la temperatura all'interno della cella di asciugatura viene mantenuta costante per tutta la durata del trattamento, rispettivamente <55% e 23°-26°C. Le temperature utilizzate sono necessarie anche per lo sviluppo dello starter: Staphylococchi non patogeni e lattobacilli (6, 7). La durata del processo varia a seconda che sia stato raggiunto il calo-peso desiderato e va da almeno 24 ore fino ad un massimo di 4 giorni. Segue l'affumicatura. Questa, oltre a determinarne il sapore, l'odore e il colore, inibisce i batteri presenti sulla superficie del prodotto e l'ossidazione dei lipidi.

Si utilizza fumo liquido o ottenuto dalla combustione di legni non resinosi, di solito faggio, addizionati di bacche di ginepro. I composti, che si formano dalla combustione sono H₂O, CO, CO₂, alcoli, esteri, acidi carbossilici, idrocarburi e fenoli (9, 20). La concentrazione inibitoria di questi ultimi nei confronti di *Listeria monocytogenes* è nella gamma di 10-100 µg/g (14). La temperatura della cella di affumicatura viene mantenuta a 23°-26°C con un'umidità relativa <55%. Il fumo prodotto viene fatto agire lentamente e distribuito mediante ventilazione. Per ottenere tale effetto, deve essere convogliato nelle camere di affumicatura, attraverso apposite condutture dotate di dispositivi per l'abbattimento di polveri e impurità. Dopo l'affumicatura, la pancetta viene maturata per diverse settimane e poi congelata a -8°-10°C per il taglio a dadini (cubettatura); segue il confezionamento in vaschette di materiale plastico in Atmosfera Modificata (O₂ <0,1%, CO₂ 45%, N₂ 55%). Il prodotto è così pronto per il consumo e viene conservato a 4±2°C.

La tecnologia di produzione riduce e/o elimina il pericolo della presenza dei patogeni. Tuttavia, anche per questo prodotto è molto sentito il problema della contaminazione e/o presenza di *L. monocytogenes*, (1, 2, 4), nonostante la pancetta non si sia mai resa responsabile di listeriosi in seguito al suo consumo. La legislazione, a tal proposito, può applicare 2 diverse tipologie di criteri o limiti microbiologici. In caso della presenza in etichetta della dicitura "da consumarsi previa cottura" viene applicato il limite contemplato nell'Ordinanza Ministeriale 11/10/1978 - Limiti di cariche microbiche tollerabili in de-

terminate sostanze alimentari e bevande – Alimenti crudi non sottoposti a trattamento di riscaldamento (pubbl. in Suppl. Ord. Gazz. Uff. n. 346 del 13 dicembre 1978). Questo prevede la ricerca di tale microrganismo in 3 unità campionarie (U.C.) e il limite di 11/g in 1 U.C. e non oltre i 110/g in 2 U.C. Mentre nel caso che il prodotto venga commercializzato come pronto al consumo (ready to eat) viene applicato il limite contemplato nel Reg. CE 2073/2005 (10), che prevede l'assenza di *L. monocytogenes* in 5 U.C. di 25 g ciascuno (categoria 1.2 - Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali). Non può essere applicato il criterio <100 UFC/g perché non appartiene alla categoria di prodotti con $\text{pH} \leq 4,4$ o $\text{Aw} \leq 0,92$, con $\text{pH} \leq 5,0$ e $\text{Aw} \leq 0,94$ o di prodotti con un periodo di conservabilità inferiore ai 5 giorni.

Pertanto lo scopo del lavoro è stato quello di studiare l'eventuale sviluppo di *L. innocua*, intenzionalmente inoculata in cubetti di pancetta maturata, confezionata in MAP e conservata a diverse temperature di refrigerazione (4°C per 150 giorni) o di abuso termico (8°C per 150 giorni o 4°C per 50 giorni e poi 8°C per 100 giorni). Scopo addizionale è stato quello di valutare la possibilità di inserire tale prodotto nel criterio degli alimenti che non supportano la crescita di *L. monocytogenes* (categoria 1.3 - Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali) e quindi di quelli che ne ammettano una concentrazione massima di 100 UFC/g.

Materiali e metodi

Pancetta a cubetti, confezionata in vaschette del peso di 100 g ciascuna.

a) Preparazione della sospensione

L'inoculo era costituito da 3 ceppi di *Listeria innocua*, derivanti da Collezioni Internazionali e da Collezione del Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali dell'Università degli Studi di Udine (Di4a). In particolare sono stati utilizzati i seguenti ceppi: *Listeria innocua* NCTC 11298; ATCC 33090 e *Listeria innocua* di matrice carnea. Le singole sospensioni erano preparate con un'ansata di ogni ceppo di *L. innocua* addizionata ad acqua peptonata (Peptone 1 g; NaCl 30 g; H₂O distillata 1000 mL; %; Aw 0,97). Ai fini di valutare la carica di ogni sospensione, erano eseguite diluizioni delle stesse in acqua peptonata sterile e 0,1 mL di ogni diluizione era spatolata in piastre contenenti Palcam Agar Base (Oxoid, Italia). Le piastre erano incubate a 37°C per 48 ore e le colonie cresciute erano contate. Ogni sospensione conteneva mediamente circa 10^7 - 10^8 UFC/mL.

b) Preparazione dei campioni per il saggio

Per la preparazione dei campioni è stato preparato un mix (sospensione madre) con le sospensioni contenenti i diversi tipi di *L. innocua* in acqua peptonata (NaCl 3%; Aw 0,97; 10^7 UFC/g), che rappresentava la sospensione madre, poi inoculata in ragione di 1 mL nei cubetti di pancetta (valori finali – circa

10^5 UFC/g). Questi erano confezionati utilizzando vaschette con pellicola superiore (PET / PE / EVOH / PE) e inferiore (PVC / EVOH / PE) in MAP costituita da N₂ (55%) e CO₂ (45 %). Le confezioni erano portate in borse termiche con pannetti di ghiaccio presso il laboratorio Di4a dell'Università degli Studi di Udine. I campioni inoculati erano lasciati per 2 ore a temperatura ambiente per favorire l'adesione del microrganismo ai cubetti.

Quindi erano conservati a diverse temperature di refrigerazione a 4°C per 150 giorni o di abuso termico a 8°C per 150 giorni e a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C per 150 giorni ed analizzati ai giorni 0, 7, 14, 30, 35 e 150. La produzione dei cubetti e il confezionamento erano eseguiti presso la Ditta Bechère S.p.a. di Ponzano Veneto (TV).

c) Analisi chimico-fisiche

Controllo del calo-peso: effettuato al termine della fase di affumicatura. I dati ottenuti sono stati espressi in percentuale tenendo conto del peso iniziale della pancetta, prima delle fasi di lavorazione e, del peso finale dopo gli stadi di asciugatura e affumicatura. Il calcolo per ricavare il valore è stato il seguente: Calo peso % = (peso iniziale – peso finale)/peso iniziale x 100. Tale valore è strettamente correlato all'Aw ed è stato fissato come limite tra il 12 e il 15%. Determinazione dell'attività dell'acqua (Aw): eseguita ad ogni campionamento attraverso apparecchio AquaLab (Decagon, USA), che prima delle analisi è stato opportunamente tarato con soluzioni di Aw nota.

Determinazione del pH: effettuata utilizzando un elettrodo a vetro montato su pHmetro (Crison Basic 20, Italia).

d) Analisi microbiologiche

La pancetta cubettata di ogni confezione analizzata è stata diluita inizialmente con acqua peptonata (peptone 1 g; NaCl 7 g; H₂O distillata 1000 mL) in rapporto 1/1 in sacchetti di Stomacher. Dopo omogeneizzazione per 1-2 minuti in Stomacher (PBI, Italia) sono state allestite diluizioni decimali; i batteri lattici (LAB) sono stati ricercati per inclusione di 1 mL di ogni diluizione in terreno deMan Rogosa Sharpe (MRS, Oxoid, Italia): tecnica doppio strato. Dopo la solidificazione del terreno, le piastre sono state poste capovolte ed incubate a 30°C per 2 giorni; la conta batterica totale (CBT) è stata determinata mediante spatolamento di 0,1 mL di ogni diluizione in terreno PCA (Plate count Agar; Oxoid, Italia). Le piastre sono state poste a incubare alla temperatura di 30°C per 24-48 h; *Listeria innocua* è stata determinata mediante la metodica ISO 11290-2.

e) Analisi statistica

I dati ottenuti dalle analisi microbiologiche e chimico-fisiche dei campioni di pancetta cubettata sono stati confrontati attraverso l'analisi statistica: analisi della Varianza (One Way) e le medie sono state separate attraverso il test di Tukey's.

Risultati

Di seguito vengono riportati i dati ottenuti dalle analisi chimico-fisiche e microbiologiche, fatti sui campioni di pancetta inoculati e non inoculati a varie temperature e nei tempi prestabiliti.

Tabella 1 - Variazione dell'Aw in campioni di pancetta conservati a 4°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	0,98±0,01a	0,97±0,01a
7	0,98±0,01a	0,98±0,01a
14	0,97±0,01a	0,97±0,01a
30	0,97±0,01a	0,96±0,01a
35	0,97±0,01a	0,96±0,01a
150	0,97±0,01a	0,97±0,01a

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne, non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Caratteristiche chimico-fisiche dei dadini di pancetta

La pancetta è stata prodotta secondo la tecnologia utilizzata dalla Ditta Bechér di Ponzano Veneto (TV). La maturazione è stata ben eseguita. Il caso peso finale rientrava nei parametri ottimali di produzione ed era valutabile a livello di 13±1%.

Nelle **Tabb. 1-3** vengono riportati gli andamenti dell'Aw dei nostri campioni, rispettivamente alla temperatura di 4°, 8° e 4°C per un periodo di 50 giorni e poi conservati a 8°C fino al 150° giorno.

L'Aw durante tutto questo periodo di analisi si è mantenuta all'interno del range 0,96±0,01 e 0,98±0,01 in tutti i campioni. Nei campioni conservati a 4° e 8°C non

si osservava alcuna differenza significativa sia ai diversi tempi di analisi che tra i campioni inoculati e non ($p > 0,05$).

Viceversa si osservava una differenza significativa tra le Aw dei campioni trattati e non, conservati a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C fino alla fine della sperimentazione ($p < 0,05$). In particolare la significatività era maggiormente evidente tra i 14 e i 30 giorni di conservazione (**Tab. 3**). Si può ipotizzare che la temperatura di conservazione abbia prodotto una sensibile disidratazione dei campioni. Anche se non si può escludere una variabilità intrinseca di tale parametro nei campioni, che cambiavano di volta in volta al momento dell'analisi.

Tabella 2 - Variazione dell'Aw in campioni di pancetta conservati a 8°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	0,98±0,01a	0,97±0,01a
7	0,98±0,01a	0,97±0,01a
14	0,97±0,01a	0,97±0,01a
30	0,96±0,01ab	0,96±0,01a
35	0,96±0,01ab	0,96±0,01a
150	0,96±0,01ab	0,96±0,01a

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne, non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 3 - Variazione dell'Aw in campioni di pancetta conservati a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C fino a 150 giorni.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	0,98±0,01a	0,97±0,01a
7	0,98±0,01a	0,98±0,01a
14	0,98±0,01a	0,98±0,01a
30	0,96±0,01b	0,96±0,01b
35	0,96±0,01b	0,96±0,01b
150	0,96±0,01b	0,96±0,01b

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne, non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 4 - Variazione del pH in campioni di pancetta conservati a 4°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	5,8±0,1a	5,9±0,2a
7	5,9±0,1a	5,7±0,1a
14	5,7±0,1a	5,6±0,2a
30	5,5±0,1b	5,4±0,1b
35	5,5±0,1b	5,4±0,1b
150	5,0±0,1c	5,1±0,1c

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 5 - Variazione del pH in campioni di pancetta conservati a 8°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	5,8±0,1a	5,9±0,1a
7	5,9±0,1a	6,3±0,2b
14	5,6±0,3a	5,6±0,2a
30	5,4±0,1b	5,4±0,1c
35	5,4±0,1b	5,4±0,1c
150	5,3±0,1b	5,1±0,1d

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Nelle **Tabb. 4-6** vengono mostrati gli andamenti nel tempo del pH nei campioni di pancetta inoculati e non inoculati. A 35 giorni dalla produzione si può notare una diminuzione del pH sia nei

campioni inoculati che non; diminuzione correlata ad una crescita nel tempo dei LAB, che devono essere ritenuti i principali responsabili dell'acidificazione dei cubetti di pancetta.

In verità il pH inizialmente in alcuni casi sembra incrementare, ma poi diminuisce. È possibile che tale variazione dipenda dal campione analizzato, considerando che i cubetti utilizzati derivano da circa 100 pancette diverse, che sono state cubettate e miscelate in un tank prima del confezionamento nelle vaschette, diventando un unico lotto. Nel tempo la variazione del pH osservata è risultata significativa ($p < 0,05$).

In particolare la significatività è evidente tra i campioni conservati a 4° e 8°C fino a 14 giorni e quelli conservati oltre tale periodo e fino a 150 giorni. Nei campioni tenuti a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C (**Tab. 6**), la significatività è presente nei campioni non trattati fra i 14 e i restanti giorni di stoccaggio. Nei campioni trattati, invece, la variazione del pH non è significativa ($p > 0,05$) fino a 35 giorni a causa dell'ampia deviazione standard presente, poi diventa significativa.

Caratteristiche microbiologiche

L'analisi microbiologica ha permesso di constatare che nel corso delle analisi i batteri lattici presenti nei campioni sono cresciuti in modo consistente nel tempo, influenzando la crescita di *L. innocua*, che dopo un periodo a valori costanti è decresciuta.

Nel tempo, invece, abbiamo assistito a un decremento della CBT. Qui di seguito nelle tabelle 7-15, vengono mostrati gli andamenti della CBT, dei LAB e di *L. innocua*, alle varie temperature alle quali abbiamo condotto le analisi. Vengono sempre riportate le medie con le relative deviazioni standard.

La **Tab. 7** confronta le medie dei valori della CBT dei campioni inoculati e dei campioni non inoculati alla temperatura di 4°C.

Tabella 6 - Variazioni del pH in campioni di pancetta conservati a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C fino a 150 giorni.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,3±0,1a	6,5±0,2a
7	6,2±0,1a	6,3±0,2a
14	6,0±0,1a	6,7±0,1a
30	5,9±0,3a	5,9±0,1b
35	5,8±0,1a	5,8±0,1b
150	5,3±0,1b	5,1±0,1c

Legenda: Dati rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 7 - Andamento della conta batterica totale in campioni di pancetta conservati a 4°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	5,8±0,1a	5,9±0,2a
7	5,9±0,1a	5,7±0,1a
14	5,7±0,1a	5,6±0,2a
30	5,5±0,1b	5,4±0,1b
35	5,3±0,1b	5,2±0,1c
150	5,3±0,1b	5,1±0,1c

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 8 - Andamento dei batteri lattici in campioni di pancetta conservati a 4°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,8±0,2a	6,3±0,2a
7	6,7±0,1a	6,6±0,1b
14	6,7±0,2a	7,1±0,1c
30	7,4±0,1b	7,7±0,1d
35	7,3±0,1b	7,5±0,2d
150	8,3±0,1c	8,2±0,1e

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Come si osserva esiste una differenza significativa tra i valori osservati ($p < 0,05$). Tale differenza è evidente tra i 14 e i restanti giorni di stoccaggio (fino a 150 giorni).

La **Tab. 8** confronta le medie dei valori dei LAB dei campio-

ni inoculati e quelle dei campioni non inoculati alla temperatura di 4°C. Come si osserva esiste una differenza significativa nel tempo tra i valori osservati ($p < 0,05$). Come ci si aspettava i LAB sono cresciuti nel tempo e l'incremen-

to è a livello di circa 1,5 nei campioni inoculati e circa 1 log UFC/g nei campioni non inoculati e tale incremento è confermato dal decremento del pH.

La **Tab. 9** evidenzia l'andamento della popolazione di *Listeria innocua* inoculata in campioni conservati a 4°C. Come ci si aspettava, si osserva una stabilità dei va-

Tabella 9. Andamento di *Listeria innocua* in campioni di pancetta conservati a 4°C.

Tempo (giorno)	Campioni inoculati
0	6,0 ± 0,2a
7	6,0 ± 0,1a
14	6,0 ± 0,1a
30	5,8 ± 0,1b
35	5,7 ± 0,1b
150	5,6 ± 0,1bc

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

lori medi fino a 14 giorni, poi un decremento significativo ($p < 0,05$). Il decremento è valutabile a livello di 0,3 log UFC/g.

La **Tab. 10** confronta le medie dei valori della CBT dei campioni inoculati e quelle dei campioni non inoculati alla temperatura di 8°C. Come si osserva esiste una differenza significativa tra i valori osservati ($p < 0,05$). In realtà si osserva un incremento fino a 14 giorni poi a un decremento e a fine sperimentazione il valore della CBT si attesta a livelli di poco superiori ai 5 log UFC/g. L'incremento può essere dovuto a fattori intrinseci al campione.

Tabella 10 - Andamento della conta batterica totale in campioni di pancetta conservati a 8°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,7±0,1a	6,5±0,2a
7	7,4±0,1b	7,5±0,1b
14	7,7±0,5b	8,1±0,4c
30	5,8±0,2c	5,4±0,6d
35	5,6±0,1c	5,2±0,5d
150	5,2±0,1d	5,2±0,1d

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

Tabella 11 - Andamento dei batteri lattici in campioni di pancetta conservati a 8°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,8±0,2a	6,3±0,2a
7	7,6±0,1b	7,5±0,1b
14	8,6±0,2c	8,6±0,1c
30	8,8±0,2c	8,8±0,1d
35	8,6±0,1c	8,7±0,2d
150	8,5±0,1c	8,5±0,1d

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

La **Tab. 11** confronta le medie dei valori dei LAB dei campioni inoculati e quelle dei campioni non inoculati alla temperatura di 8°C. L'incremento è significativo in ogni punto di analisi ($p < 0,05$) ed è confermato dal decremento del pH.

La **Tab. 12** evidenzia l'andamento della popolazione di *L. innocua* inoculata. Come ci si aspettava a questa temperatura (8°C) si osserva una stabilità dei valori medi nel tempo. Non è osservato alcun decremento significativo ($p > 0,05$) se non a 35 giorni e soprattutto a 150 giorni.

La **Tab. 13** confronta le medie dei valori della CBT dei campioni inoculati e quelle dei campioni non inoculati e conservati alla tempe-

ratura di 4°C e poi a 8°C ($p < 0,05$). L'andamento è altalenante e a 14 giorni nei campioni inoculati si osserva un incremento della CBT, fino a oltre 8 log UFC/g, poi la CBT

Tabella 12 - Andamento di *Listeria innocua* in campioni di pancetta conservati a 8°C.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati
0	5,8±0,1a
7	5,7±0,1a
14	5,8±0,1a
30	5,7±0,1a
35	5,5±0,1ab
150	< 2 UFC/g c

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

decesce. Ci sentiamo di parlare di un reale incremento/decremento in quanto la carica microbica totale varia di oltre 1 log UFC/g.

La **Tab. 14** confronta le medie dei valori dei LAB dei campioni inoculati e quelle dei campioni non inoculati conservati alla temperatura di 4°C e poi a 8°C. Come si osserva esiste una differenza significativa dal confronto dei valori osservati a 0 e 7 giorni e dei valori a 14 e 30 giorni ($p < 0,05$) nei campioni inoculati, mentre nei campioni non inoculati la significatività è pre-

Tabella 13 - Andamento della conta batterica totale in campioni di pancetta conservati a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C fino a 150 giorni.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,7±0,1a	6,5±0,2a
7	6,6±0,3a	6,3±0,2a
14	7,9±0,9b	6,1±0,1b
30	5,7±0,1c	5,0±0,2c
35	5,5±0,1d	5,0±0,1c
150	5,4±0,1d	5,0±0,1c

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

sente già a 7 giorni ($p < 0,05$). I LAB raggiungono livelli superiori agli 8 log UFC/g e si tratta senza dubbio di una variazione reale, confermata dal decremento del pH.

La Tab. 15 evidenzia l'andamento della popolazione di *L. innocua* inoculata in campioni tenuti 10 giorni a 4°C e poi conservati a 8°C fino a fine shelf-life. Si osserva un decremento continuo nel tempo che si accentua fra i 35 e i 150 giorni di stoccaggio. Infatti il decremento risulta reale e indipendente dalla variazione del campione ($p < 0,05$) ed è a livello di quasi 6 log UFC/g.

Discussione

La pancetta è un salume, che può contenere *L. monocytogenes* al momento della sua commercializzazione. La tecnologia di produzione, infatti, non prevede trattamenti termici o sanificanti a fine produzione e conseguentemente può veicolare tale microrganismo. Grisenti *et al.* (13) hanno isolato da pancetta preaffettata e confezionata in MAP *L. monocytogenes* in 5 campioni sui 24 analizzati (21%) e *L. innocua* in 4 campioni (17%). Tuttavia la concentrazione di entrambe le specie è sempre risultata inferiore al limite minimo di rilevamento (10 UFC/g). Recentemente Comi *et al.* (2017, dati non pubblicati) hanno isolato *L. monocytogenes* in soli 3 tranci di pancetta confezionati sottovuoto dei 60 analizzati (5%). Anche in questo caso la concentrazione era sempre inferiore a 2 UFC/g (limite soglia del metodo applicato). A tutt'ora sono stati evidenziati pochi casi di prevalenza di *L. monocytogenes* in pancetta stagionata, mentre più numerosi sono i

Tabella 14 - Andamento dei batteri lattici in campioni di pancetta conservati a 4°C per 50 giorni e poi a 8°C fino a 150 giorni.

Tempo (giorni)	Campioni inoculati	Campioni non inoculati
0	6,8±0,2a	6,3±0,2a
7	6,7±0,1a	6,6±0,1b
14	8,9±0,1b	8,9±0,1c
30	8,8±0,2b	9,0±0,1c
35	8,7±0,1b	8,9±0,1c
150	8,0±0,1c	8,2±0,1d

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

dati riguardanti la sua incidenza in bacon (2). Da questi studi è emerso che il processo produttivo della pancetta non garantisce l'assenza dei patogeni nel prodotto finito, e che, comunque, è anche possibile una ricontaminazione post-processo dovuta alle operazioni di affettamento e confezionamento in vaschette (6, 7, 12, 19). Inoltre gli stessi parametri chimico-fisici osservati nei cubetti studiati e confrontati con quelli riportati dalla letteratura evidenziano che la pancetta potrebbe supportare sia la presenza che la crescita di tale

microrganismo. I valori di A_w sono compresi tra 0,96 e 0,98 e quelli di pH tra 5,4 e 6,3. Infatti come già osservato anche da Grisenti *et al.* (13), i valori di A_w delle pancette possono presentare un'ampia variabilità. Tali autori hanno osservato che le pancette studiate presentavano livelli di A_w distribuiti tra 0,88 e 0,96 con una maggior numerosità compresa fra 0,92 e 0,96. Nel nostro caso la variabilità dell' A_w era più contenuta e mai inferiore a $0,96 \pm 1$. Conseguentemente, in base al Reg. CE 2073/05, ai valori osservati e a quelli descritti anche da altri autori (13), la pancetta deve essere inserita nella categoria alimentare di "substrato idoneo all'accrescimento di *L. monocytogenes*" e quindi il criterio applicato è assenza in 5 U.C. di 25 g cadauna.

La CBT dei cubetti era costituita interamente da Staphylococchi e LAB derivanti dallo starter aggiunto; microrganismi isolati anche da altri autori in sperimentazioni analoghe. Infatti questi avevano osservato che le principali popolazioni microbiche erano costituite da LAB e Staphylococchi, che i microrganismi indesiderati, quali *Brochotrix thermosphacta* (5), *Staphylococcus aureus* e Enterobacteriaceae, era-

Tabella 15 - Andamento di *Listeria innocua* in campioni di pancetta conservati a

Tempo (giorni)	Campioni inoculati
0	5,8±0,1a
7	5,8±0,1a
14	5,5±0,2b
30	5,4±0,1b
35	5,2±0,1b
150	<2 UFC/g c

Legenda: Dati log UFC/g rappresentano le medie ± le deviazioni standard; Le medie con le stesse lettere entro le colonne non sono significativamente diverse ($p < 0,05$).

no sempre inferiori al limite analitico di rilevamento e che *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* erano sempre assenti in 25 g (13). Del resto il potenziale ossidoriduttivo, prodotto dalla MAP, inibisce gli aerobi stretti; la temperatura di refrigerazione rallenta e/o blocca l'attività di aerobi/anaerobi facoltativi e il pH e l'Aw favoriscono lo sviluppo dei batteri microaerofili quali i LAB e gli Staphylococchi, che divengono così la popolazione predominante (5-7, 11, 15-18).

I cubetti di pancetta inoculati con *L. innocua* sono stati confezionati in MAP in vaschette di materiale plastico. Il livello di inoculo era di circa 5 log UFC/g. Tale concentrazione era intenzionalmente elevata per simulare un alto livello di ricontaminazione in fase di cubettatura e confezionamento. L'analisi per la ricerca di *L. innocua* era eseguita in tre confezioni ai giorni 0, 7, 14, 30, 35 e 150 per ogni temperatura stabilita e i risultati del suo andamento sono stati espressi come medie \pm le deviazioni standard. Durante i 150 giorni di shelf-life non si è registrato alcun aumento dei livelli di *L. innocua*; anzi si è notato una inattivazione variabile entro 0,4 log UFC/g per i campioni conservati a 4°C e oltre 5 log UFC/g per i campioni conservati a 8°C o a 4°C per 50 giorni e 8°C fino a 150 giorni. La refrigerazione sembra preservare il microrganismo, mentre l'incremento della temperatura di conservazione (8°C) risulta deleterio per *L. innocua*, perché favorisce lo sviluppo dei LAB e conseguentemente l'incremento dell'acidità. Dai dati emerge che a queste temperature tale microrganismo subisce una quasi totale inattivazione. Infatti la sua presenza, nonostante l'inoculo iniziale di oltre i 5 log UFC/g viene evidenziata solo attraverso cultura di arricchimento. Ciò è in contrasto con i dati di Gri-

senti *et al.* (13) che avevano osservato in fette di pancetta confezionata in MAP, una sensibile inattivazione, proporzionale alla temperatura d'incubazione. Infatti tali autori avevano evidenziato che in campioni incubati a 21°C per 60 giorni presentavano valori di *L. monocytogenes* inferiori al limite analitico di rilevamento, mentre a 8, 15 e 4°C riduzioni decimali rispettivamente di 0,79 e 1,11 e 0,43 UFC/g. Tali andamenti sono stati evidenziati anche in altri prodotti analoghi quali prosciutto crudo e bresaole affettati e artificialmente contaminati, in cui il grado di inattivazione è stato di circa 1 Log rispettivamente a 60 e 90 giorni di shelf-life a 4°C (11-13).

Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evince che i valori di Aw della pancetta in cubetti non sono mai inferiori a 0,95 e il pH non scende al di sotto delle 5,0 unità. La CBT è cresciuta solo in alcuni campioni, mentre i LAB sono cresciuti in maniera consistente. Tale crescita è correlabile a una diminuzione variabile della concentrazione del patogeno preso in considerazione. In tutte le prove eseguite non c'è stato alcun incremento del numero di colonie di *L. innocua*. È probabile che lo starter aggiunto per favorire la maturazione delle pancette, costituito da *Lactobacillus sakei* e *Staphylococcus xylosum*, abbia impedito lo sviluppo dei ceppi di *L. innocua* inoculata; anzi ne abbia favorito l'inattivazione. La presenza dello starter ancora vitale è dimostrata dall'incremento della popolazione dei LAB e in alcuni casi della CBT. Pertanto è plausibile che l'uso di colture starter e/o bio-protettive per la preparazione della pancetta a cubetti, così come di tutti i prodotti di salu-

meria maturati, possa contribuire a impedire la crescita di *L. innocua*/*L. monocytogenes*.

Pertanto alla luce dei dati ottenuti e nonostante il prodotto non abbia un $\text{pH} \leq 4,4$ o $\text{Aw} \leq 0,92$ o $\text{pH} \leq 5,0$ e $\text{Aw} \leq 0,94$, come cita il Regolamento CE 2073/2005 al quale facciamo riferimento, possiamo scientificamente affermare che i cubetti di pancetta prodotti non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*/*L. innocua*. Conseguentemente i cubetti di pancetta considerati possono agevolmente rientrare nella categoria 1.3 (Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali), dove è ammessa una concentrazione massima di *L. monocytogenes* di 100 UFC/g.

Bibliografia

- 1) AFSSA 2000. *Rapport de la Commission D'étude des Risques liés à Listeria monocytogenes*. Available at: <http://www.afssa.fr> (accessed 9 May 2006).
- 2) Angelidis S., Koutsoumanis K. "Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic retail market". *J. Food Protect.*; 69, 938-942, 2006.
- 3) ASSICA. Associazione industriale delle carni e dei salumi, <http://www.assica.it> Consultato il giorno 13/10/2017.
- 4) 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 starter cultures". *Int. Food Microbiol.*; 20, 169-175, 1993.
- 5) Cantoni C., Comi G. & Fagnani V. "Fattori di crescita per *Brochothrix thermospacta* nei prodotti carnei e derivati (lattato di sodio)". *Ind. Alim.*; 22, 357-361, 1983.

- 6) Comi G. & lacumin L. "Cenni di microbiologia degli alimenti" Manuale del Norcino (Il Purcitàr te tradizion furlane) a cura di lacumin L.; 7, 130-131, 2015.
- 7) Comi G. & lacumin L. "Il salame friulano: tecnologia di produzione, microbiologia e difetti" Manuale del Norcino (Il Purcitàr te tradizion furlane) a cura di lacumin L.; 9, 198-199, 2015.
- 8) Del Monte P., Manani U. & Monari M. "Industria dei salumi, igiene, tecnica, legislazione" Caledrini Edagricole; 15, 148-168, 1990.
- 9) EFSA Journal "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain". EFSA J.; 6 (8), 724-728, 2008.
- 10) Regolamento (CE) n. 2073/2005 (http://europa.eu.int/eurex/lex/LexUriServ/site/it/oj/2005/l_338/l_33820051222it00010026.pdf).
- 11) Frustoli M.A., Cigarini M., Garritani A., Garulli S., Bovis N., Schivazzappa C. & Barbuti S. Fate of *Listeria monocytogenes* during shelf-life of pre-sliced bresaola packaged under modified atmosphere. Ind. Conserve; 82 (4), 325-330, 2007.
- 12) Grisenti M.S., Lori D., Vicini L., Bovis N., Pedrelli T. & Barbuti S. "Andamento di *Listeria monocytogenes* durante la shelf-life di bresaola preaffettata e confezionata in atmosfera modificata". Ind. Conserve; 79 (3), 325-331, 2004.
- 13) Grisenti M.S., Cigarini M., Pedrelli T., Frustoli M.A. & Barbuti S. "Microbiologia e sicurezza sanitaria di pancetta stagionata" Ind. Conserve; 83, 13-18, 2008.
- 14) Hitzel A., Pöhlmann M., Schwagele F., Speer K. & Jira W. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phenolic substances in cold smoked sausages depending on smoking conditions using smouldering smoke". J. Food Res.; 1, 45-59, 2012.
- 15) Hugas M. & Monfort J.M. "Bacterial starter cultures for meat fermentation". Food Chem.; 59 (4), 547-554, 1997.
- 16) Lucke F.K., Hachelmann H. & Leistner L. "Fate of *Clostridium botulinum* in fermented sausages processed with or without nitrite. Proceedings of the 29th European Congress of Meat Research Workers, Salsomaggiore, 403-409, 1983.
- 17) Lucke F.K. "Fermented sausages" in Microbiology of Fermented Foods, 2nd ed., Wood B.J.B. Ed., Vol. 2, Blackie Academic and Professional, London, 441-483, 1998.
- 18) Lucke F.K. "Fermented Meat" in "The Microbiology Safety and Quality of Food", Chapter 19, Lund, B.M., Baird-Parker A.C. & Gould G.W. Eds. Aspen Publ., Gaithersburg, USA, 2000.
- 19) Ross T., Todd E. & Smith M. "Exposure Assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Preliminary Report" for Joint FAO/WHO Expert consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in foods, Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nation Report nr MRA 00/02, 242, 2000.
- 20) Singh L., Varshney J.G. & Agarwal T. "Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food". Food Chem.; 199, 768-781, 2016.

