



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



L'AZIONE ANTIMICROBICA DEGLI OLI ESSENZIALI IN VITRO E IN VIVO

Carmela Ligotti – IZSPLV

S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti

22 novembre 2023

Salumi Liberi - La riduzione dei conservanti nei prodotti di salumeria



OBIETTIVI



- ✓ Valutazione dell'**attività antibatterica** di **antiossidanti alternativi** nei prodotti di salumeria
- ✓ Valutare, dove e se possibile, una completa eliminazione dei nitriti e nitrati nel **rispetto** dei **criteri di igiene e sicurezza alimentare**



NORMATIVA DI RIFERIMENTO

REGOLAMENTO (CE) N. 1333/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO

del 16 dicembre 2008

relativo agli additivi alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 354 del 31.12.2008, pag. 16)



Gazzetta ufficiale
dell'Unione europea

IT
Serie L

2023/2108

9.10.2023

REGOLAMENTO (UE) 2023/2108 DELLA COMMISSIONE

del 6 ottobre 2023

che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio e l'allegato del regolamento (UE) n. 231/2012 della Commissione per quanto riguarda gli additivi alimentari nitriti (E 249-250) e nitrati (E 251-252)

(Testo rilevante ai fini del SEE)



- Ridurre l'esposizione di consumatori e consumatrici alle nitrosammine, sostanze cancerogene che si formano nell'organismo a partire dai nitriti;
- Mantenere l'effetto protettivo contro batteri patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Clostridium botulinum*.



Nitriti

150 mg/kg



80 mg/kg

Nitrati

150 mg/kg



90 mg/kg



Gazzetta ufficiale
dell'Unione europea

IT
Serie L

2023/2108

9.10.2023

REGOLAMENTO (UE) 2023/2108 DELLA COMMISSIONE
del 6 ottobre 2023

che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio e l'allegato del regolamento (UE) n. 231/2012 della Commissione per quanto riguarda gli additivi alimentari nitriti (E 249-250) e nitrati (E 251-252)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

h) la categoria 08.3.1 (Prodotti a base di carne non sottoposti a trattamento termico) è così modificata:

i) le voci relative a E 249-250 (Nitriti) ed E 251-252 (Nitrati) sono sostituite dalle seguenti:

«E 249-250	Nitriti	150	(7)	Periodo di applicazione: fino al 9 ottobre 2025
E 249-250	Nitriti	80	(XC) (XD)	Periodo di applicazione: dal 9 ottobre 2025
E 251-252	Nitrati	150	(7)	Periodo di applicazione: fino al 9 ottobre 2025
E 251-252	Nitrati	90	(XA) (XE)	Periodo di applicazione: dal 9 ottobre 2025
E 251-252	Nitrati	110	(XA) (XF)	Solo grandi tagli di prima scelta di bacon e salsicce essiccate senza aggiunta di nitriti Periodo di applicazione: dal 9 ottobre 2025»



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



Gazzetta ufficiale
dell'Unione europea

IT
Serie L

2023/2108

9.10.2023

REGOLAMENTO (UE) 2023/2108 DELLA COMMISSIONE

del 6 ottobre 2023

che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio e l'allegato del regolamento (UE) n. 231/2012 della Commissione per quanto riguarda gli additivi alimentari nitriti (E 249-250) e nitrati (E 251-252)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

Altri limiti sono stati fissati per svariate tipologie di prodotti tradizionali,
con riduzioni che in media si attestano intorno al 40%.

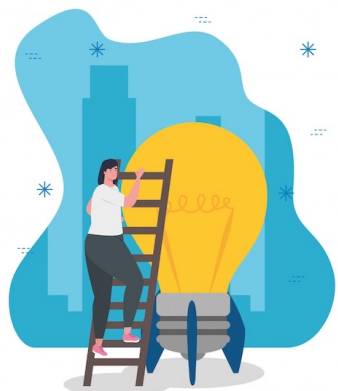


Le aziende avranno due anni di tempo per adeguarsi alla normativa

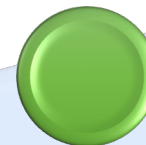


istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



Attività in vivo



**PRODUZIONE
SPERIMENTALE**

Attività in vivo



**PROVE
PRELIMINARI**

Attività in vivo



PRODUZIONE PILOTA

Attività in vitro



**METODO DELLE
MICRODILUIZIONI
IN BRODO**

ATTIVITÀ IN VITRO - METODO DELLA MICRODILUIZIONE IN BRODO



OBIETTIVO: verificare potenziale inibente degli estratti nei confronti di microrganismi patogeni e batteri lattici

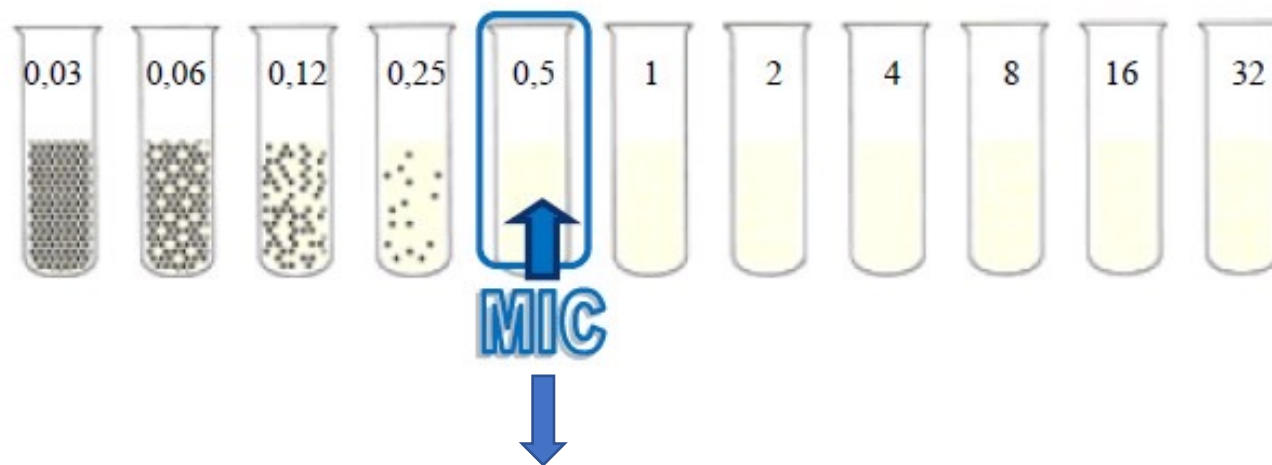


MATERIALI e METODI

- **Estratti:** timo, salvia, chiodi di garofano, noce moscata
- **Batteri patogeni:** *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes**
- **Batteri lattici:** *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus curvatus* e *Staphylococcus xylosus*



- **METODO DELLA MICRODILUIZIONE IN BRODO:** metodo quantitativo per determinare la Minima Concentrazione Inibente (MIC) dei 4 estratti in substrato colturale liquido.



Definita come la più bassa concentrazione di sostanza/estratto in grado di inibire in vitro la crescita microbica

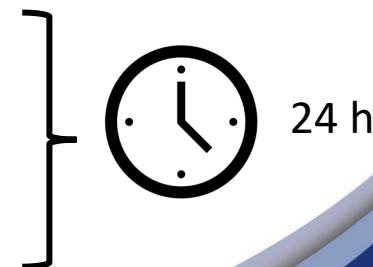
Ciascun estratto è stato solubilizzato con Tween 80 e diluito in acqua (rapporto finale 1:1)

Procedura:



- Piastra 96 pozzetti;
- 100 μ L sospensione batterica: 0,5 McFarland;
- Diluizioni scalari 1:2 di ciascun estratto in brodo di coltura Mueller Hinton Broth (MHB);
- Controllo + e – eseguiti in doppio;

- Incubazione:
 - ✓ 35°C aerobiosi (*S. aureus* e *L. monocytogenes*)
 - ✓ 35° C microaerofilia (*Staphylococcus xylosus*)
 - ✓ 35°C anaerobiosi (*C. sporogenes*)
 - ✓ 30°C microaerofilia (*Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus curvatus*)



CEPPO BATTERICO	MIC (%V/V ESTRATTO)			
	TIMO	SALVIA	CHIODI DI GAROFANO	NOCE MOSCATA
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78%	0.097%	0,048%	50%
<i>Listeria monocytogenes</i>	6.2%	0.195%	0,78%	n.e.
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.39%	0.024%	0,195%	0,195%
<i>Lactobacillus lactis</i>	> 25%	0.195%	0,39%	6,25%
<i>Lactobacillus curvatus</i>	> 25%	> 25%	1,56%	n.e.
<i>Staphylococcus xylosus</i>	n.e.	0.048%	0,195%	n.e.

- n.e. = prova non eseguita in base ai risultati preliminari delle prove qualitative eseguite presso UNITO DISAFA



Selezionati per prove in vivo TIMO e SALVIA

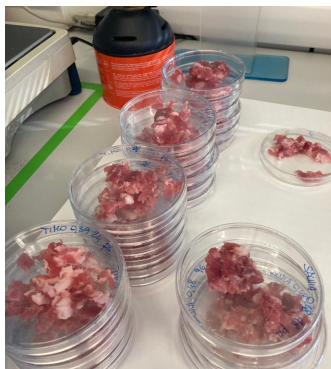


- ✓ Efficacia su tutti i microrganismi patogeni;
- ✓ TIMO: Nessuna/scarsa efficacia su starter;
- ✓ SALVIA: Inibisce parzialmente *L.curvatus*, *L.lactis* e *S.xylosus*.

ATTIVITÀ IN VIVO - PRODUZIONE PILOTA



OBIETTIVO: verifica dell'efficacia del potenziale inibente degli estratti selezionati con il metodo delle microdiluizioni in brodo



Polpette da 10 g



NO SOTTOVUOTO

1° LOTTO DI ANALISI (03/11/2021 al 12/11/2021)

SOTTOVUOTO

2° LOTTO DI ANALISI (20/12/2021 al 28/01/2022)



TEMPERATURA INCUBAZIONE 23° C



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Estratti testati	<i>L.monocytogenes</i>		<i>C.sporogenes</i>			<i>S.aureus</i>			
TIMO	6,25%	3,2% (MIC)	1,56%	0,39%	0,195% (MIC)	0,097%	0,78%	0,39% (MIC)	0,195%
SALVIA	0,195%	0,097% (MIC)	0,048%	0,024%	0,012% (MIC)	0,006%	0,097%	0,048% (MIC)	0,024%

Le concentrazioni degli estratti testate corrispondevano alla MIC rilevata durante le prove in vitro di ogni microrganismo e la concentrazione subito maggiore e inferiore rispetto alla MIC.



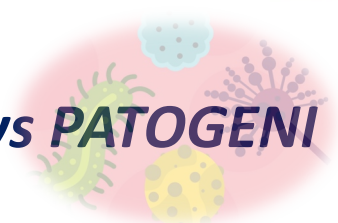
Ceppi batterici	Inoculo (UFC/g)
<i>L. monocytogenes</i>	10^5
<i>S. aureus</i>	10^5
<i>C. sporogenes</i>	10^7
<i>L. curvatus</i>	10^7
<i>S. xylosum</i>	10^5

TIMING
Tempo zero
24 h
48 h
96 h
120 h (per i batteri lattici)



TEMPERATURA INCUBAZIONE 23° C

ESTRATTO TIMO vs PATOGENI

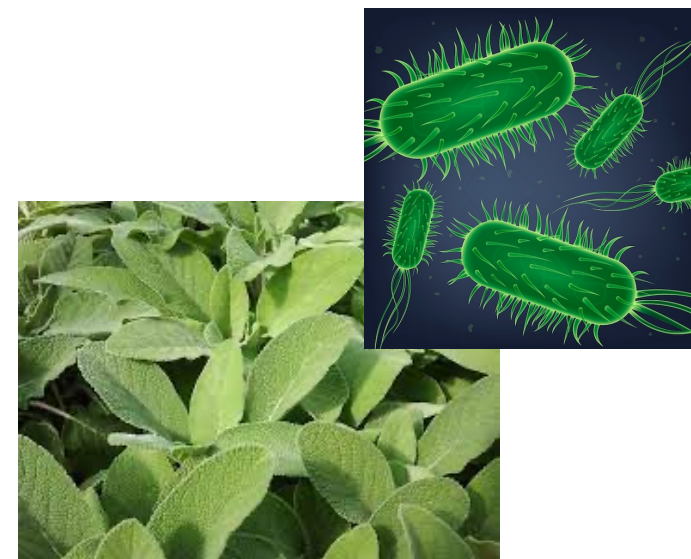


L. MONOCYTOGENES	ORA INCUBAZIONE	UFC/g	S.AUREUS	ORA INCUBAZIONE	UFC/g	C. SPOROGENES	ORA INCUBAZIONE	UFC/g
T0	/	330.000	T0	/	48.000	T0	/	10.000
CONTROLLO	24	24.000.000	CONTROLLO	24	130.000	CONTROLLO	24	1.000
CONTROLLO	48	25.000.000	CONTROLLO	48	122.000	CONTROLLO	48	2.600.000
CONTROLLO	96	20.000.000	CONTROLLO	96	550.000	CONTROLLO	96	24.000.000
TIMO 6,25%	24	4.000.000	TIMO 0,78%	24	140.000	TIMO 0,39%	24	<1000
TIMO 6,25%	48	3.700.000	TIMO 0,78%	48	140.000	TIMO 0,39%	48	2.000.000
TIMO 6,25%	96	5.000.000	TIMO 0,78%	96	430.000	TIMO 0,39%	96	17.000.000
TIMO 3,2%	24	7.700.000	TIMO 0,39%	24	320.000	TIMO 0,195%	24	<1000
TIMO 3,2%	48	10.000.000	TIMO 0,39%	48	83.000	TIMO 0,195%	48	3.300.000
TIMO 3,2%	96	6.100.000	TIMO 0,39%	96	120.000	TIMO 0,195%	96	12.000.000
TIMO 1,56%	24	122.000.000	TIMO 0,195%	24	160.000	TIMO 0,097%	24	<1000
TIMO 1,56%	48	15.000.000	TIMO 0,195%	48	100.000	TIMO 0,097%	48	2.500.000
TIMO 1,56%	96	13.000.000	TIMO 0,195%	96	160.000	TIMO 0,097%	96	14.000.000



ESTRATTO SALVIA vs PATOGENI

S. AUREUS	ORA INCUBAZIONE	UFC/g
T0	/	33.000
CONTROLLO	24	4.100.000
CONTROLLO	48	110.000.000
CONTROLLO	96	470.000.000
SALVIA 0,097%	24	5.400.000
SALVIA 0,097%	48	150.000.000
SALVIA 0,097%	96	540.000.000
SALVIA 0,048%	24	2.100.000
SALVIA 0,048%	48	140.000.000
SALVIA 0,048%	96	330.000.000
SALVIA 0,024%	24	1.600.000
SALVIA 0,024%	48	310.000.000
SALVIA 0,024%	96	340.000.000



ESTRATTO TIMO vs BATTERI LATTICI

Batteri lattici	ORA INCUBAZIONE	UFC/g
T0	/	23.000
CONTROLLO	24	16.000.000
CONTROLLO	48	23.000.000
CONTROLLO	120	37.000.000
TIMO 6,25%	24	29.000.000
TIMO 6,25%	48	350.000.000
TIMO 6,25%	120	>49.000.000
TIMO 3,2%	24	60.000.000
TIMO 3,2%	48	180.000.000
TIMO 3,2%	120	>49.000.000
TIMO 1,56%	24	100.000.000
TIMO 1,56%	48	64.000.000
TIMO 1,56%	120	>49.000.000



ATTIVITÀ IN VIVO: PROVE PRELIMINARI



OBIETTIVO : Selezionare l'estratto di timo al 3,2% per verificare l'efficacia del potenziale inibente sui microrganismi

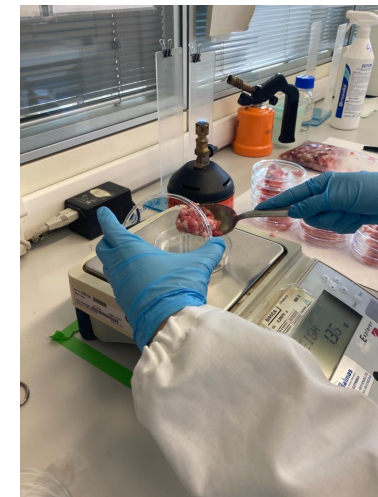
RICETTA 1: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + TIMO 3,2% + Nitriti 80 mg/kg + microrganismo patogeno + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 2: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + TIMO 3,2% + Nitriti 40 mg/kg + microrganismo patogeno + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 3: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + microrganismo patogeno + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 4: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 5: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + TIMO 3,2% + microrganismo patogeno + *L. curvatus* e *S. xylosus*



LISTERIA MONOCYTOGENES



Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) +
TIMO 3,2% + Nitriti 40 mg/kg +
L. monocytogenes (10^5) + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 2	TIMING	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)	pH
1	T0	15.000	5,85
2	T0	17.000	
1	24	25.000	5,9
2	24	19.000	
1	48	13.000	5,36
2	48	7.000	
1	96	17.000	5
2	96	15.000	

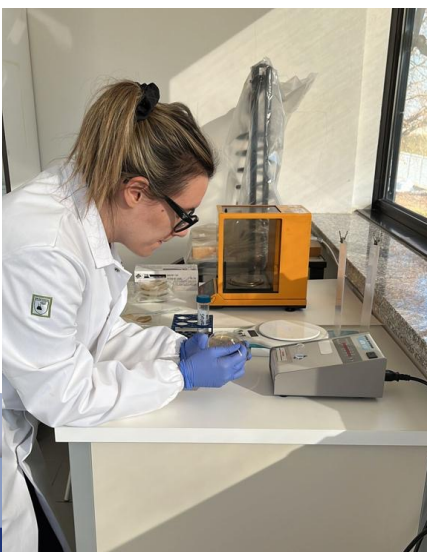
STAPHYLOCOCCUS AUREUS



Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) +
TIMO 3,2% + Nitriti 40 mg/kg +
S.aureus (10^5) + *L. curvatus* e *S. xylosus*

RICETTA 2	TIMING	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	pH
1	T0	110.000	5,8
2	T0	72.000	
1	24	96.000	5,41
2	24	92.000	
1	48	70.000	4,92
2	48	80.000	
1	96	39.000	4,89
2	96	27.000	

ATTIVITÀ IN VIVO - PRODUZIONE SPERIMENTALE



Ricetta 1: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + **3,2% di estratto di timo** + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter commerciali + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

Ricetta 2: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + Starter DISAFA + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

Ricetta 3: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

Ricetta 4: Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura bioprotettiva DISAFA+ *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*



Listeria monocytogenes

RICETTA 1:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero + 3,2% di estratto di timo + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter commerciali + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

TIMING	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)
T0	10.000
T7	7.600
T15	5.100
T21	4.500

RICETTA 2:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + Starter DISAFA + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

TIMING	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)
T0	46.000
T7	4.300
T15	3.300
T21	1.400

RICETTA 3:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

TIMING	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)
T0	89.000
T7	4.200
T15	4.100
T21	3.900

RICETTA 4:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura bioprotettiva DISAFA+ *L.monocytogenes* + *C.sporogenes* + *S.aureus*

TIMING	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)
T0	14.000
T7	5.100
T15	4.700
T21	2.100





Staphylococcus aureus

RICETTA 1:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero + **3,2% di estratto di timo** + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter commerciali + L. monocytogenes + C. sporogenes + S.aureus

RICETTA 2:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + Starter DISAFA + L. monocytogenes + C. sporogenes + S. aureus

RICETTA 3:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + L. monocytogenes + C. sporogenes + S. aureus

RICETTA 4:

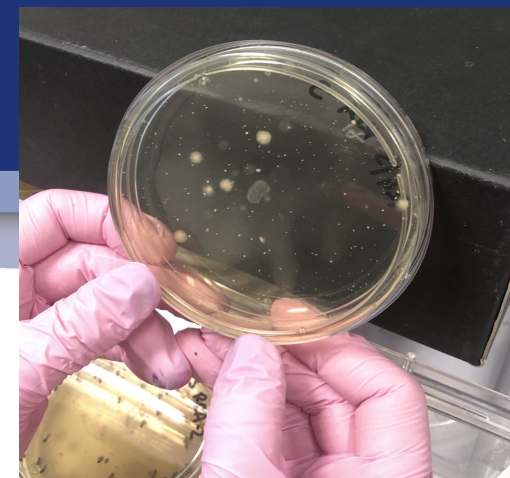
Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura bioprotettiva DISAFA+ L. monocytogenes + C. sporogenes + S. aureus

TIMING	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
T0	200.000
T7	N.a.
T15	N.a.
T21	20.000

TIMING	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
T0	56.000
T7	2.000
T15	24.000
T21	10.000

TIMING	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
T0	18.000
T7	N.a.
T15	20.000
T21	120.000

TIMING	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
T0	15.000
T7	N.a.
T15	90.000
T21	510.000



Clostridium sporogenes

RICETTA 1:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero + 3,2% di estratto di timo + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter commerciali + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 2:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + Starter DISAFA + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 3:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 4:

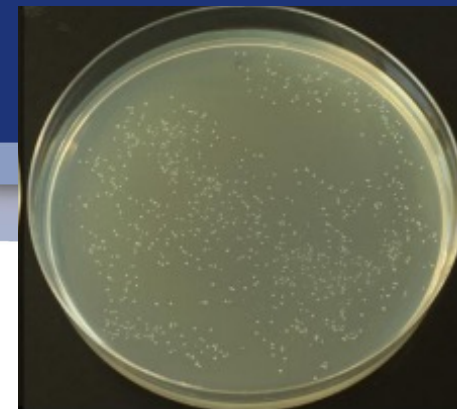
Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura bioprotettiva DISAFA+ L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

TIMING	<i>C. sporogenes</i> (UFC/g)
T0	<10
T7	<10
T15	<10
T21	<10

TIMING	<i>C. sporogenes</i> (UFC/g)
T0	<10
T7	<10
T15	<10
T21	<10

TIMING	<i>C. sporogenes</i> (UFC/g)
T0	<10
T7	<10
T15	<10
T21	<10

TIMING	<i>C. sporogenes</i> (UFC/g)
T0	<10
T7	<10
T15	<10
T21	<10



Batteri lattici

RICETTA 1:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero + 3,2% di estratto di timo + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter commerciali + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 2:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + Starter DISAFA + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 3:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

RICETTA 4:

Impasto base (carne, sale, pepe, zucchero) + Nitrati 40 mg/kg + nitriti 20 mg/kg + starter DISAFA + coltura bioprotettiva DISAFA+ L.monocytogenes + C.sporogenes + S.aureus

TIMING	Batteri lattici (UFC/g)
T0	9.200
T7	550.000.000
T15	600.000.000
T21	510.000.000

TIMING	Batteri lattici (UFC/g)
T0	1.100.000
T7	20.000.000
T15	130.000.000
T21	62.000.000

TIMING	Batteri lattici (UFC/g)
T0	220.000
T7	5.300.000
T15	320.000.000
T21	13.000.000

TIMING	Batteri lattici (UFC/g)
T0	150.000
T7	420.000.000
T15	180.000.000
T21	70.000.000



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

PER CONCLUDERE...





istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



**METODO DELLE
MICRODILUZIONI IN
BRODO**

**PROVE
PRELIMINARI CON
LE POLPETTE**

**PRODUZIONI
IMPIANTI PILOTA**

ESTRATTO DI TIMO

- ✓ Efficacia dimostrata sui microrganismi patogeni;
- ✓ Nessuna influenza sugli starter.



ESTRATTI BOTANICI ED OLI ESSENZIALI

IN SOSTITUZIONE

**DI NITRITI E NITRATI
NEI PRODOTTI DI SALUMERIA**



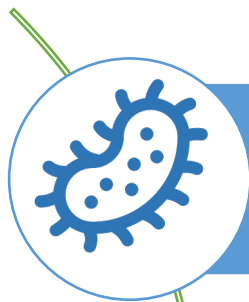
**PROPRIETÀ
ORGANOLETTICHE**

**SICUREZZA
MICROBIOLOGICA**



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



L'estratto di timo risulta essere il più performante, soprattutto nei confronti di *L.monocytogenes* e *S.aureus*.



La quantità di nitriti e nitrati aggiunti nelle varie produzioni risultano essere **INFERIORI** rispetto ai nuovi limiti dettati dal Regolamento (UE) 2023/2108.



L'approccio sinergico tra estratti botanici e nitriti deve essere sfruttato al fine di ridurre in modo significativo la quantità di additivi utilizzati nei prodotti di salumeria.





**GRAZIE A TUTTI
PER L'ATTENZIONE**



istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



J. Altara

Via Bologna, 148 - 10154 Torino - IT - Tel. +39 01126861

Pec: izsto@legalmail.it - web: www.izsplv.it