

# BIO.MI.MA. Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali

## **Progetto BIO.MI.MA.**

Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali

### GRUPPO DI LAVORO

#### **ASSAM**

Paola Staffolani

Ambra Micheletti

Emilio Romagnoli

#### **UNIVPM**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali – D3A

Francesca Clementi

Andrea Osimani

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente - DiSVA

Maurizio Ciani

Francesca Comitini

Foto: Ambra Micheletti e Andrea Osimani

Stampa: Ideostampa srl

## SOMMARIO

Bio.Mi.Ma. Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali

*Emilio Romagnoli, Paola Staffolani*

La Biodiversità microbica nel Pecorino dei Sibillini

*Francesca Comitini*

La Biodiversità microbica nel Ciauscolo IGP

*Andrea Osimani*

**Bio.Mi.Ma.**  
**Biodiversità Microbica delle Marche**  
**nei processi di trasformazione delle produzioni**  
**regionali tradizionali**

L'ASSAM – Agenzia di Servizi del Settore agroalimentare delle Marche, è stata individuata come soggetto attuatore della L.R. 12/2003 per la tutela delle risorse genetiche animali e vegetali del territorio marchigiano e con questo ruolo gestisce il Repertorio regionale e la Rete di conservazione e sicurezza anche attraverso collaborazioni e sinergie con università, enti di ricerca, orti botanici e banche del germoplasma. Con il progetto Bio.Mi.Ma. si è iniziato ad esplorare anche il settore della biodiversità microbica nei processi di trasformazione di alcune produzioni regionali tradizionali. Il progetto è realizzato con la collaborazione di UNIVPM e alcune aziende produttrici ed è finanziato con i fondi MiPAAF, attraverso la Legge 194/2015 “Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare”. L'attività è stata caratterizzata da due fasi: la prima si è focalizzata su una ricognizione e catalogazione del materiale bibliografico e delle collezioni microbiche presenti presso le Università delle Marche, provenienti da attività già svolte in ambito della Biodiversità microbica. La seconda fase si è basata sul campionamento presso le aziende agricole e di trasformazione di alcuni prodotti tradizionali quali Pecorino dei Sibillini e Ciauscolo IGP, al fine di individuare la biodiversità microbica presente nei prodotti esaminati. Il materiale campionato è stato analizzato presso i laboratori del DiSVA (Dipartimento di Scienze della Vita e

dell'Ambiente) per il Pecorino dei Sibillini e il laboratorio del D3A (Dipartimento delle Scienze Agrarie, Agroalimentari e Ambientali) per il Ciauscolo IGP. I risultati di tali analisi sono stati riportati nelle pagine successive del presente opuscolo e possono essere anche consultati in modo più approfondito sul sito dell'ASSAM, sezione Progetti. Questa prima esplorazione, sia pure limitata a due matrici e ad una zona molto ristretta, ha evidenziato come l'aspetto microbico possa avere un peso rilevante nella caratterizzazione delle due produzioni esaminate. L'individuazione e l'isolamento di ceppi microbici autoctoni può così ampliare una base genetica in continua evoluzione e in stretta connessione con l'ambiente.

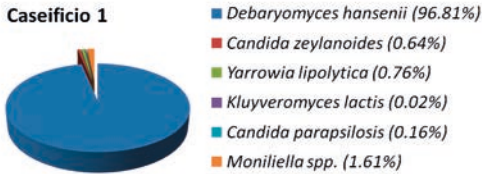
## La Biodiversità Microbica nel Pecorino dei Sibillini

Dal Monte Sibilla con i suoi 2173 metri di altezza, prende il nome il Parco Nazionale dei Sibillini. La produzione casearia tipica di queste zone è il pecorino dei Sibillini che nasce dallo stretto legame fra la civiltà pastorale e il territorio. Per questa produzione si utilizza sia latte pastorizzato che latte crudo e poi stagionata in ambiente naturale. In questo contesto è stata avviata un'attività di ricerca, finalizzata allo studio della biodiversità microbica relativa alla produzione di formaggio di tipo pecorino, che ha visto coinvolte alcune aziende agrarie ubicate nell'area del sisma nel 2016, nei monti Sibillini. In tutti i caseifici sono stati effettuati campionamenti sia negli ambienti di lavorazione che nei formaggi a vari stadi di maturazione, laddove possibile. Per ogni caseificio è stato anche un campionamento diretto dell'aria mediante l'utilizzo di filtrazione collegato a una piastra sterile. La presente attività ha avuto lo scopo di: i) stimare la presenza di lieviti e batteri (sia lattici che enterici, questi ultimi come indice di contaminazione fecale) in formaggi di tipo pecorino a latte crudo in particolar modo nelle aziende che non usano inoculi commerciali; ii) ottenere informazioni riguardo la presenza di lieviti, batteri e muffe negli ambienti di lavorazione e stagionatura dei formaggi, nonché nelle celle di conservazione; iii) caratterizzare i lieviti identificati per rendere noti i principali tratti fenotipico/fisiologici caratterizzanti il loro ruolo durante la maturazione dei formaggi; iv) creare una ceppoteca al fine di avere crioconservati nel tempo i ceppi di lievito.

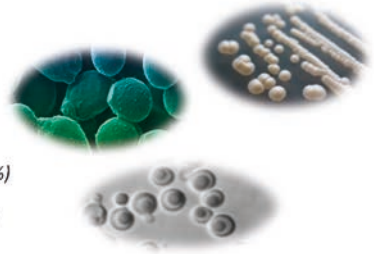


Tutti i campioni prelevati son stati conservati a 4°C sino all'arrivo in laboratorio, dove sono state svolte le analisi che hanno permesso di identificare e quantizzare principalmente gruppi microbici come lieviti e batteri lattici omo ed etero fermentanti. Di seguito sono riportate le specie di lievito rilevate:

**Caseificio 1**



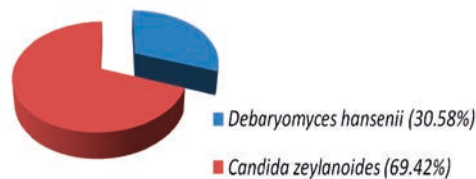
## Lieviti



**Caseificio 2**



**Caseificio 3**



**Caseificio 4**



Le varie specie di lievito rilevate sono coinvolte nel metabolismo di proteine, aminoacidi e lipidi che insieme al rilascio di composti aromatici, specie-specifici, influenzano consistenza, odore e sapore del pecorino.

Le analisi effettuate in laboratorio hanno permesso di identificare i seguenti generi di lievito:

***Debaryomyces hansenii***: uno dei lieviti più frequentemente presente nel formaggio, assimila l'acido lattico, rilascia ammoniaca durante il metabolismo proteolitico e produce vitamine.

***Yarrowia lipolytica***: possiede attività proteolitica e lipolitica con rilevante influenza sull'aroma del formaggio. Rilascia solfiti durante il metabolismo proteolitico.



***Candida zeylanoides***: possiede attività lipolitica e assimila il citrato.

***Kluyveromyces lactis***: assimila e fermenta il lattosio, assimila il lattato e degrada la caseina.



***Moniliella spp.***: muffa con attività proteolitica e lipolitica, influenza le caratteristiche organolettiche del formaggio. Può produrre micotossine.





Per quanto riguarda i batteri, che sono per lo più batteri lattici, si avrà:

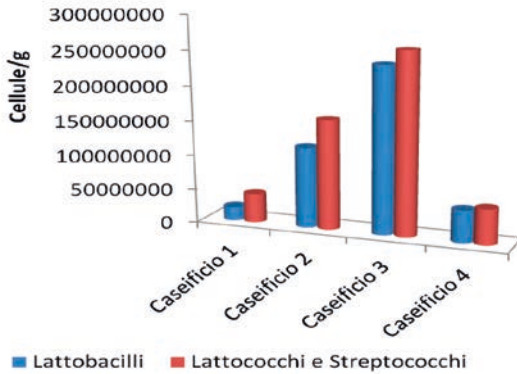
**Batteri**



**Lattobacilli**



**Lattococchi**



- Fermentazione lattica
- Produzione di enzimi
- Produzione di composti secondari

**INDISPENSABILI PER**

**Maturazione del prodotto, texture e caratteristiche organolettiche - nutrizionali**

Le analisi microbiologiche di ambienti e formaggi correlati ai caseifici, hanno portato all'individuazione di 92 ceppi di lievito appartenenti a generi e specie affini a tali matrici. Le analisi condotte hanno permesso di rilevare una presenza costante di tali lieviti nei caseifici, sia negli ambienti che nei formaggi, seppure con una relativamente alta variabilità tra i vari caseifici. Da una analisi generale si può dedurre che la presenza dei lieviti nei formaggi tende ad aumentare con l'aumentare della stagionatura, sintomo evidente della loro alta capacità di colonizzare matrici ad alto grado di alofilia e ridotto contenuto di acqua. Probabilmente in queste condizioni (formaggi stagionati più di 6 mesi), tali lieviti riescono a svolgere attività metaboliche quali proteolitica, lipolitica ed esterasica, che contribuiscono attivamente a definire le caratteristiche aromatiche sensoriali del prodotto finito. Maggiore complessità microbiologica, maggiore complessità organolettica.

## La Biodiversità Microbica nel Ciauscolo IGP

Le salsicce fermentate vengono prodotte mediante stagionatura di carni (suine o bovine) fermentate, salate, essiccate e, in alcuni casi, affumicate.

Nell'Italia centrale viene prodotta una vasta gamma di specialità culinarie basate sulla fermentazione della carne suina tra le quali il salame *Ciauscolo* rappresenta una prelibatezza alimentare indiscussa con caratteristiche sensoriali uniche.

Il nome *Ciauscolo*, noto anche come *Ciavuscolo*, deriva dalle parole "*ciabusculum*" o "*cibusculum*" che in latino venivano usate per descrivere un piccolo pezzo di



cibo o snack che i contadini avrebbero mangiato in piccole quantità durante le pause di lavoro e tra i pasti principali.

Il salame *Ciauscolo* ha ottenuto lo status di Indicazione Geografica Protetta (IGP), in conformità al Regolamento (CE) n. 729/2009 della Commissione del 10 agosto 2009. Secondo il disciplinare di produzione, il *Ciauscolo* può essere prodotto in alcune zone selezionate situate in quattro (Ancona, Ascoli Piceno, Fermo e Macerata) delle cinque province marchigiane. Il *Ciauscolo* si presenta come un prodotto morbido, omogeneo, con pasta rosata e spalmabile. Il gusto mai acido, sapido e delicato, all'odore risulta delicato, aromatico, tipico, deciso e speziato.

Per l'ottenimento di questa prelibatezza culinaria i micror-

ganismi quali, batteri lattici, stafilococchi coagulasi negativi muffe e lieviti, svolgono un ruolo fondamentale per la caratterizzazione del sapore, del colore e per conferire stabilità al prodotto finale.

Il presente studio ha avuto quindi un triplice intento:

- i) studiare la BIODIVERSITÀ di due produzioni di *Ciauscolo* durante la maturazione;
- ii) ottenere informazioni sulle dinamiche microbiche nella produzione del salame *Ciauscolo*;
- iii) promuovere la valorizzazione del *Ciauscolo* per la futura selezione di colture microbiche autoctone potenzialmente utilizzabili come starter dai produttori locali.



I campioni di *Ciauscolo* sottoposti ad analisi microbiologiche sono stati prodotti da n. 2 salumifici operanti nella provincia di Macerata che realizzano prodotti comparabili sia per quanto riguarda le caratteristiche merceologiche che tecnologiche.

I prodotti del primo salumificio (A) sono stati realizzati senza l'utilizzo di nitrati/nitriti e colture starter, mentre i prodotti dal se-

condo salumificio (B) sono stati realizzati con l'uso di nitrati/nitriti e colture starter.

Per ciascun salumificio sono stati analizzati n. 2 lotti di Ciauscolo campionati durante la produzione e, precisamente, al giorno di produzione (T0) e dopo 5 (T1), 10 (T2) e 20 (T3) giorni.

Le analisi microbiologiche dei campioni hanno permesso di stabilire la sicurezza di tutti i prodotti analizzati nei quali sono

risultati assenti i patogeni alimentari quali *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*

Anche le conte vitali dei microrganismi indicatori di igiene, quali le Enterobacteriaceae, hanno mostrato valori trascurabili, testimoniando elevati standard igienici raggiunti da entrambi i salumifici durante la produzione e maturazione dei salami.

Le conte vitali dei batteri lattici sono risultate conformi a quelle descritte nel disciplinare di produzione del *Ciauscolo*.

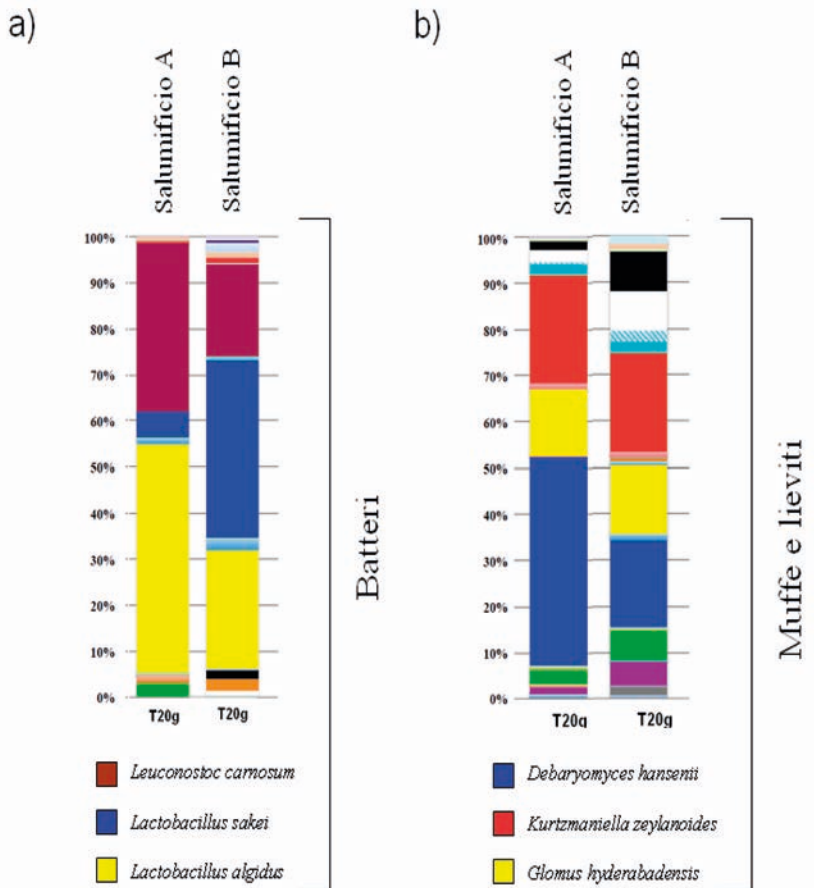
L'analisi metagenomica del microbiota ha mostrato la presenza di alcune specie microbiche “chiave” che hanno dominato la fermentazione del *Ciauscolo* fino a fine maturazione.

Infatti, nei prodotti finiti di entrambi i salumifici (a 20 giorni di maturazione) è stata evidenziata la presenza di *Lactobacillus algidus*, *Leuconostoc carnosum* e *Lactobacillus sakei* con differenti abbondanze relative (Figura 1). Inoltre, *Debaryomyces hansenii*, *Kurtzmaniella zeylanoides* e *Glomus hyderabadensis* sono risultate le specie eumicetiche dominanti (Figura 1).

Il presente studio rappresenta il primo studio sulla BIODIVERSITÀ MICROBICA del *Ciauscolo* realizzato utilizzando un approccio polifasico tramite conte vitali e metodi biomolecolari di analisi di nuova generazione, quale il sequenziamento Illumina.

Tale studio ha quindi permesso di far supporre la presenza di un microbiota tipico del *Ciauscolo* che tuttavia deve essere ulteriormente approfondito con ricerche più estese.





**Figura 1.** Abbondanze relative (%) di batteri (**pannello a**) e muffe e lieviti (**pannello b**) rilevati tramite sequenziamento metagenomico (Illumina) nei campioni di *Ciauscolo* analizzati a 20 giorni di maturazione

Si ringraziano per la collaborazione al  
Progetto Bio.Mi.Ma.:

**Azienda agraria “Campugiani Carni”  
di Campugiani Sandro**  
Loro Piceno

**Salumificio Vitali di Vitali Giuseppe & C. snc**  
San Ginesio

**Società agricola Angeli s.s.**  
Pieve Torina

**Azienda agraria Edoardo Batassa**  
Gualdo

**Azienda agraria Enrico Beccerica**  
Gualdo

**Azienda agraria Marchese Marino**  
Monte San Martino

**Società agricola Pastorello di Cupi**  
Visso

**Società agricola Lai s.s.**  
San Ginesio

Progetto finanziato con Legge n. 194/2015 “Disposizioni per la tutela e la valorizzazione della biodiversità di interesse agricolo e alimentare “ - art. 10 “Fondo per la tutela della biodiversità di interesse agricolo e alimentare” - MiPAAF

