

**RELAZIONE FINALE DEL PROGETTO PER ATTIVITÀ DI RICERCA MICROBICA  
NELLE PRODUZIONI A BASE DI CARNE SUINA FERMENTATA PROVENIENTI DA  
AZIENDE AGRARIE UBICATE NELL'AREA DEL SISMA**

PROGETTO BIO.MI.MA "BIODIVERSITÀ MICROBICA DELLE MARCHE NEI PROCESSI  
DI TRASFORMAZIONE DELLE PRODUZIONI REGIONALI TRADIZIONALI" -  
CONVENZIONE TRA L'AGENZIA PER I SERVIZI NEL SETTORE AGROALIMENTARE  
DELLE MARCHE (ASSAM) E L'UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE -  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI (D3A)

Responsabile della Convenzione Prof. Andrea Osimani

L'arte della conservazione della carne risale all'antico Egitto. Inoltre, le culture antiche più rilevanti come quelle di Greci, Romani, Galli, Celti e Lucani svilupparono processi di fermentazione per preservare la carne durante i mesi invernali. La parola moderna "salame", che si riferisce a una salsiccia fermentata, probabilmente ha origine durante il Medioevo dal volgare latino "*salamen*" che deriva dalla parola "sale". Tra il XII e il XVII secolo, un gran numero di tipologie di salumi, principalmente basati sull'uso della carne suina, furono sviluppati nell'Italia centrale dove i produttori originari della città di Norcia diedero vita al termine "norcino".

Le salsicce fermentate vengono prodotte mediante stagionatura di carni (suine o bovine) fermentate, salate, essiccate e, in alcuni casi, affumicate. Le carni vengono prima tritate e poi addizionate di spezie ed erbe; l'impasto così ottenuto viene successivamente insaccata in budelli di animali (suini o bovini) e lasciata fermentare. In conformità con le diverse ricette o disciplinari di produzione, si possono anche aggiungere colture microbiche, conservanti (ad es. nitrato di sodio, nitrato di potassio, nitrito di sodio, nitrito di potassio) o zuccheri (ad esempio lattosio) per proteggere la salute dei consumatori da microrganismi patogeni (ad es. *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*) o per guidare la fermentazione e assicurarne la standardizzazione.

Durante la fermentazione, una serie di reazioni fisico-chimiche porta alla modificazione dell'impasto carneo fino ad ottenere una consistenza gelatinosa che è principalmente prodotta da complesse attività microbiologiche svolte dal microbiota ambientale (ad esempio proveniente dai tagli di carne o dall'ambiente) o dalle culture starter aggiunte.

Tra i microrganismi coinvolti nella produzione di salumi, i batteri lattici svolgono un ruolo cardine a causa dell'acidificazione dell'impasto carneo attraverso la produzione di acidi organici rappresentati principalmente dall'acido lattico. Lungo il processo di fermentazione, i cocchi coagulasi negativi (CCN) svolgono attività proteolitica e lipolitica contribuendo così a migliorare il sapore, il colore e la stabilità del prodotto finale. Infine, gli eumiceti presenti possono contribuire a definire il sapore, la consistenza e il colore del prodotto finito.

Le caratteristiche sensoriali uniche che differenziano fortemente l'ampia varietà di salumi fermentati disponibili localmente o a livello nazionale sono inoltre correlate agli ingredienti utilizzati e ai parametri di processo che sono legati ad antiche tradizioni profondamente radicate nel territorio di origine.

A conferma dell'antica tradizione di lavorazione della carne, nell'Italia centrale viene ancora 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 "*ciabuscolum*" o "*cibuscolum*" 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) dalle cinque province marchigiane (Italia centrale). I tagli di carne di maiale (ad es. Large White italiana, Landrace italiana, razze Duroc italiane) che possono essere utilizzati per produrre l'impasto carneo comprendono pancetta, spalla, prosciutto e lombata, inoltre, i seguenti ingredienti possono essere aggiunti in diverse concentrazioni: sale, pepe nero macinato, vino e aglio schiacciato. L'aggiunta di lattosio, destrosio, fruttosio e saccarosio è consentita nel rispetto dei limiti massimi stabiliti dalla legge. Tra gli additivi con funzioni conservanti e antiossidanti, è anche consentito l'uso di acido L-ascorbico (E300), ascorbato di sodio (E301), nitrato di potassio (E252). Infine, è espressamente vietato l'uso di farine di latte, caseinati e altri composti coloranti.

Per la produzione del Ciauscolo, la carne refrigerata viene macinata con una piastra di 2-3 mm e quindi miscelata con lardo, sale, pepe nero macinato, vino, aglio tritato e infine addizionata di additivi. La miscela viene quindi insaccata in budello di bovino o di maiale e posta a maturare per almeno 15 giorni. Il prodotto finale è caratterizzato dal 15% di proteine e da un contenuto di grassi compreso tra il 32% e il 42%. Il salame Ciauscolo, la cui lunghezza varia da 15 a 45 cm e il peso varia da 400 a 2500 g, risulta morbido, omogeneo, con pasta rosata e spalmabile. Il gusto è poco acido, sapido con sapore è speziato e aromatico.

Attualmente, nella letteratura scientifica, sono disponibili solo pochi studi sul microbiota del salame Ciauscolo. Pertanto, in linea con la recente evoluzione delle tecniche molecolari per lo studio della diversità microbica degli ecosistemi alimentari, questo studio è stato condotto applicato un

approccio polifasico basato su analisi coltura-dipendenti (conte vitali in piastra) e sequenziamento metagenomico di nuova generazione Illumina.

Il presente studio ha avuto quindi un duplice intento:

- i) studiare la **BIODIVERSITA'** 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.

## **Materiali e metodi**

### *Campionamento*

Al fine di disporre di campioni di Ciauscolo da sottoporre ad analisi microbiologiche, sono stati selezionati n. 6 salumifici della Regione Marche. A ciascuno di tali salumifici è stato sottoposto un questionario riguardante le caratteristiche tecnologiche e merceologiche dei Ciauscoli prodotti. Sulla base dei dati ottenuti sono quindi stati selezionati n. 2 salumifici (operanti nella provincia di Macerata) che producevano prodotti comparabili sia per quanto riguarda le caratteristiche merceologiche che tecnologiche. Il primo salumificio (A) è stato scelto in base all'assenza di nitrati/nitriti e colture starter utilizzati per la produzione dell'insaccato, mentre il secondo salumificio (B) è stato scelto in base alla presenza dei suddetti ingredienti/additivi.

Per ciascun produttore selezionato sono stati analizzati n. 2 lotti di produzione differenti (prelevati in doppio), campionati ai seguenti tempi:

- Giorno di produzione (T0)
- 5 giorni (T1)
- Media maturazione (10 giorni = T2)
- Fine maturazione (20 giorni = T3)

Su ciascun campione sono state eseguite misurazioni di pH,  $a_w$  e conte microbiche vitali per l'enumerazione di:

- Batteri lattici
- Cocchi coagulasi negativi (CCN)
- Eumiceti (muffe e lieviti)

- Enterobacteriaceae
- *Salmonella* spp. (presenza assenza)
- *Listeria monocytogenes* (presenza assenza)

Inoltre, aliquote di ciascun campione sono state sottoposte ad analisi molecolari in grado di fornire informazioni in merito alle dinamiche delle popolazioni microbiche coinvolte nel processo di fermentazione e maturazione del Ciauscolo. A tale scopo, l'RNA estratto dai campioni è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione (Illumina Sequencing).

#### *Analisi chimico-fisiche*

I valori di pH dei campioni di salame Ciauscolo sono stati determinati con un pHmetro dotato di un elettrodo solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italia) inserito direttamente nella matrice alimentare. Per ciascun campione, le misurazioni sono state eseguite in duplicato e i risultati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard.

L'attività dell'acqua ( $a_w$ ) è stata valutata secondo il metodo standard ISO 21807: 2004 utilizzando un apparecchio Aqualab 4TE (Meter Group, Pullman, USA).

#### *Conte microbiche*

Aliquote di 10 g di ciascun campione sono state addizionate a 90 ml di acqua sterile contenente 1 g/L di peptone batteriologico. La sospensione è stata omogeneizzata con il dispositivo Stomacher (400 Circulator, International PBI, Milano, Italia) per 2 minuti a 230 rpm. Sono state quindi allestite diluizioni seriali decimali per l'enumerazione dei seguenti microrganismi: i) batteri lattici (LAB) su MRS agar (addizionato di 250 mg/L di cicloesimide per prevenire la crescita di eumiceti) incubato a 37 °C per 48-72 ore; ii) cocchi coagulasi negativi enumerati su mezzo di crescita MSA con incubazione di 24-48 ore a 37 °C; iii) Enterobatteriacee enumerate su mezzo di crescita VRBGA con incubazione a 37 °C per 24 ore e iv) eumiceti enumerati su Rose Bengal Chloramphenicol Agar con incubazione a 25 °C per 72-96 ore.

I risultati delle conte vitali sono stati riportati come Log medio delle unità formanti colonia (ufc) per grammo di campione  $\pm$  deviazione standard espressa dei due replicati biologici e tre replicati tecnici come.

Infine, è stata valutata la presenza/assenza di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. attraverso il metodo ELFA (enzyme-linked fluorescent assay), conformemente ai metodi standard AFNOR BIO 12/11-03/04 e AFNOR BIO 12/16-09/05, rispettivamente.

#### *Estrazione di RNA e sintesi di cDNA*

1,5 mL di ciascun omogenato del campione (diluizione  $10^{-1}$ ) preparato come sopra descritto è stato centrifugato per 10 minuti a 16000 g; i pellet cellulari ottenuti sono stati protetti con una soluzione di stabilizzazione dell'RNA (Ambion, Foster City, California, USA) e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. L'RNA microbico totale è stato estratto dai pellet cellulari usando E.Z.N.A. Kit di RNA batterico (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Gli RNA estratti sono stati controllati per la presenza di DNA residuo mediante amplificazione via PCR con primer procariotici universali 27f e 1495r. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il kit di sintesi del cDNA SensiFAST per RT-qPCR (Bioline, Londra, Regno Unito) seguendo le istruzioni del produttore.

#### *Analisi metagenomica*

Per ogni campione, a partire dal cDNA precedentemente amplificato, è stata amplificata una sequenza di 464 nucleotidi della regione V3-V4 del gene 16S rRNA. Codici a barre univoci sono stati allegati al *forward primer* per facilitare il raggruppamento e la successiva differenziazione dei campioni. Per prevenire il sequenziamento preferenziale degli ampliconi più piccoli, gli ampliconi sono stati purificati utilizzando il kit Agencourt AMPure (Beckman Coulter) secondo le istruzioni del produttore. Successivamente, le concentrazioni di DNA degli ampliconi sono state determinate usando il kit dsDNA Quantico iT PicoGreen (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. Per garantire l'assenza di dimeri di primer e per valutare la purezza, è stata valutata la qualità della libreria di ampliconi generata utilizzando un Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) associato a ad un Kit DNA ad alta sensibilità (Agilent). Dopo la quantificazione, il ampliconi purificati sono stati miscelati e combinati in rapporti equimolari.

Il sequenziamento con metodo Illumina ha dato origine a sequenze ottenute dal sequenziamento che sono state elaborate utilizzando il pacchetto software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) versione 1.9. Le letture sono state associate a ciascun campione secondo il codice a barre univoco; coppie di letture dei frammenti di DNA originali sono state riunite usando uno script

implementato in QIIME. Le sequenze con un livello di qualità <20 sono state rimosse (trimming). Le sequenze rimanenti sono state assegnate ad unità tassonomiche operative (OTU) con una soglia di identità del 97%. Le sequenze OTU sono state quindi classificate tassonomicamente utilizzando un classificatore Ribosomal Database Project (RDP) 2.0.1 ed allineate utilizzando PyNAST con un minimo lunghezza di allineamento di 150 bp e un'identità minima all'80%.

I risultati sono stati elaborati globalmente per singolo produttore, utilizzando i due lotti come repliche, al fine di ottenere una maggiore solidità del dato.

## Risultati e discussione

I risultati delle conte vitali dei campioni analizzati sono mostrati in **Tabella 1** e **Tabella 2**

**Tabella 1:** Conte vitali (log cfu/g) di batteri ed eumiceti in campioni di Ciauscolo (media dei valori ottenuti in entrambi i lotti analizzati) prodotti dal salumificio (A)

Tempo di campionamento (giorni)	Batteri lattici	Cocchi coagulasi negativi	Enterobacteriaceae	Eumiceti
T0	3,07±0,28	3,01±0,04	2,49±0,08	3,89±0,24
T5	2,85±0,06	3,32±0,08	2,45±0,04	3,97±0,11
T10	5,37±0,00	3,32±1,01	2,27±0,12	4,79±0,23
T20	7,87±0,06	3,21±0,03	1,82±0,14	5,03±0,47

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

**Tabella 2:** Conte vitali (log cfu/g) di batteri ed eumiceti in campioni di Ciauscolo (media dei valori ottenuti in entrambi i lotti analizzati) prodotti dal salumificio (B)

Tempo di campionamento (giorni)	Batteri lattici	Cocchi coagulasi negativi	Enterobacteriaceae	Eumiceti
T0	3,15±0,07	3,48±0,01	2,40±0,05	3,47±0,06
T5	8,31±0,10	4,39±0,14	<1	3,27±0,08
T10	8,30±0,02	5,37±0,51	<1	4,17±0,78
T20	8,61±0,07	4,81±0,39	<1	3,34±0,22

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

L'enumerazione delle Enterobacteriaceae ha mostrato valori medi di circa 1 Log ufc/g nei campioni di Ciauscolo prodotti dal produttore A e conte vitali inferiori 1 Log ufc/g per il produttore B. Tale risultato evidenzia una qualità generalmente buona del prodotto finito in entrambe le tipologie di Ciauscolo. A tale proposito si evidenzia come le conte di Enterobacteriaceae siano inferiori nel prodotto B verosimilmente grazie all'utilizzo di starter di batteri lattici e cocchi coagulasi negativi che hanno permesso di realizzare un prodotto verosimilmente più stabile e con pH leggermente inferiore. La buona qualità delle due tipologie di Ciauscolo è anche confermata dall'assenza di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. in tutti i lotti al termine della maturazione.

Le conte di batteri lattici sono risultate elevate già nei primi stadi della fermentazione dei prodotti realizzati dal produttore B (con starter) con valori massimi già a 5 giorni di maturazione. Al contrario, per i prodotti realizzati dal produttore A, le conte di batteri lattici hanno raggiunto i valori massimi al 10 giorno di maturazione in entrambi i lotti analizzati. Anche in questo caso, le differenze fra i prodotti di tipologia A e B sono verosimilmente dovute all'utilizzo o meno dello starter. Per entrambe le produzioni, le cariche di batteri lattici sono conformi a quanto previsto dal disciplinare che stabilisce cariche di batteri lattici superiori a 7 log cfu/g al momento della commercializzazione.

Le conte vitali di cocchi coagulasi negativi e lieviti hanno evidenziato la tendenza ad un progressivo aumento, con massimi compresi fra i 10 e 20 giorni. Anche per i cocchi coagulasi negativi, l'utilizzo di starter ha portato a cariche generalmente maggiori nei campioni realizzati dal produttore B.

I risultati relativi alla misurazione dei parametri chimico-fisici dei campioni analizzati sono mostrati in **Tabella 3** e **Tabella 4**

**Tabella 3:** Parametri chimico-fisici dei campioni di Ciauscolo (media dei valori ottenuti in entrambi i lotti analizzati) prodotti dal salumificio (A)

Tempo di campionamento (giorni)	pH	$a_w$
T0	5,76±0,00	0,959±0,003
T5	5,81±0,01	0,961±0,000
T10	5,68±0,01	0,947±0,000
T20	5,59±0,01	0,954±0,004

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

**Tabella 4:** Parametri chimico-fisici dei campioni di Ciauscolo (media dei valori ottenuti in entrambi i lotti analizzati) prodotti dal salumificio (B)

Tempo di campionamento (giorni)	pH	$a_w$
T0	5,82±0,04	0,960±0,001
T5	5,42±0,01	0,954±0,001
T10	5,39±0,00	0,941±0,001
T20	5,55±0,01	0,938±0,002

I valori sono espressi come media ± deviazione standard

Per quanto riguarda i valori di pH, sono stati misurati trend differenti per le due tipologie di prodotto. Infatti, i prodotti realizzati con l'utilizzo di starter (B) hanno mostrato un più marcato abbassamento di pH durante la maturazione, verosimilmente dovuto al massiccio inoculo di batteri lattici nell'impasto carneo. È noto infatti che tale gruppo microbico, producendo acidi organici (fra i quali l'acido lattico) è in grado di determinare l'abbassamento di pH della materia prima. I prodotti realizzati dal salumificio A hanno mostrato un abbassamento di pH relativamente più lento

ma con valori finali comparabili a quelli dei prodotti del salumificio B. In ogni caso, i valori raggiunti sono conformi a quanto previsto dal disciplinare che stabilisce valori di pH per i il prodotto finito che devono essere maggiori o uguali a 4,8. Per entrambe le tipologie di prodotto i valori di attività dell'acqua (progressivamente decrescenti) sono coerenti con la progressiva disidratazione del prodotto durante la maturazione e stagionatura.

#### *Composizione del microbiota*

Il numero totale di sequenze ottenute dai campioni di Ciauscolo ha raggiunto 491.031 letture grezze. Dopo il filtraggio di qualità, sono state utilizzate un totale di 329.719 letture, con un valore medio di 20.607 letture/campione e una lunghezza media di sequenza di 465 bp. La copertura stimata del campione ha mostrato una copertura soddisfacente per tutti i campioni (> 98%), mentre l'indice di diversità alfa non ha mostrato differenze significative in funzione del produttore né in funzione dell'uso di starter o nitrito/nitrato. La stessa tendenza è stata osservata dal calcolo della diversità beta in cui non sono state osservate differenze significative tra i campioni. Abbiamo rilevato uno spostamento nella composizione del microbiota solo in funzione del tempo di maturazione (Adone,  $P = 0,012$  basato sulla matrice di distanza Unifrac ponderata).

Tenendo conto della composizione del microbiota al più alto livello tassonomico (Figura 1) possiamo osservare che i Ciauscoli (lotto 1 + lotto 2) prodotti dal salumificio A (quindi senza starter né nitriti/nitrati) erano caratterizzata dalla presenza di *Pseudomonas fragi* e *Campylobacter* soprattutto nell'impasto carneo (T0) e dopo 5 giorni di maturazione (32,17 e 26,79 % dell'abbondanza relativa per *P. fragi* e 25,33 e 40,61 per *Campylobacter*). Negli stessi campioni, *Brochothrix thermosphacta* è stato rilevato alla massima percentuale dopo 5 e 10 giorni di maturazione (12,84 e 39,30% dell'abbondanza relativa), mentre *Lactobacillus algidus* e *Leuconostoc carnosum* hanno dominato il microbiota alla fine della maturazione con percentuali di abbondanza relativa del 49,89 e 36, 71%, rispettivamente. Va notato che *Lactobacillus sakei* (tipicamente presente nei salami) è stato trovato durante la maturazione ma con una percentuale di abbondanza relativa che è arrivata soltanto fino all'8%.

Nei Ciauscoli prodotti dal salumificio B (lotto 1 + lotto 2) (quindi con starter e nitriti/nitrati), è stata osservata la predominanza di *P. fragi* nell'impasto carneo (76% dell'abbondanza relativa) seguita da una popolazione di OTU minori (circa il 3%) composta da *Staphylococcus sciuri* (verosimilmente proveniente dallo starter), *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Psychrobacter* e *L. sakei* (verosimilmente proveniente dallo starter). Durante la maturazione il microbiota era composto principalmente da *L. sakei* (40%), *L. algidus* (40%) e *L. carnosum* (15%) Figura 1.

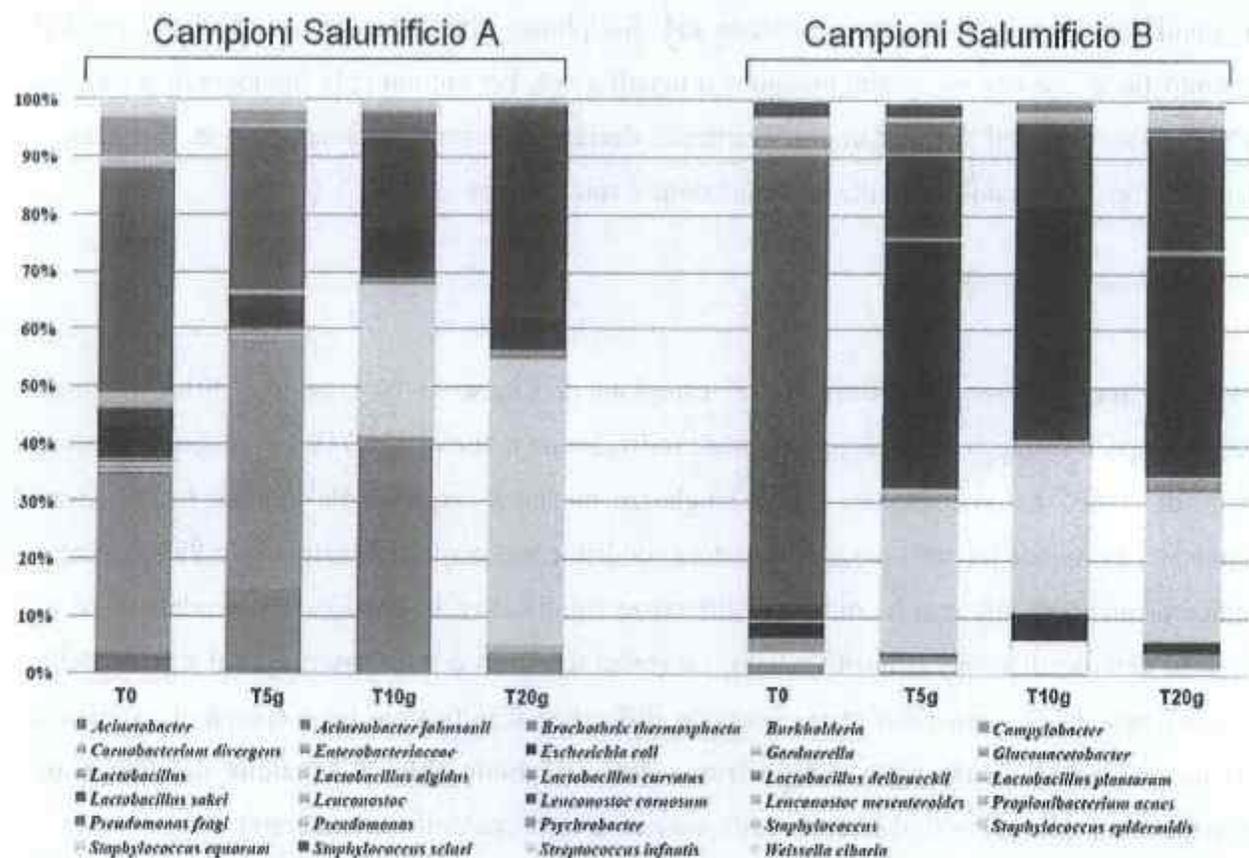


Figura 1. Abbondanze relative (%) delle specie batteriche rilevate tramite sequenziamento metagenomico (Illumina) nei campioni di Ciauscolo (lotto 1 + lotto 2) analizzati ai diversi tempi di produzione (T0-T20 giorni) e prodotti dai salumifici A (a sinistra) e B (a destra).

L'analisi statistica applicata alle sequenze ha fatto emergere che *L. sakei*, *Leuconostoc* e *Staphylococcus sciuri* risultavano associati ai Ciauscoli contenenti starter e nitriti/nitriti (Salumificio B) (FDR <0,05, Figura 2) mentre *Brochothrix thermosphacta*, *Campylobacter* e *Staphylococcus equorum* erano associati ai Ciauscoli prodotti senza starter nè nitriti/nitriti (Salumificio A).

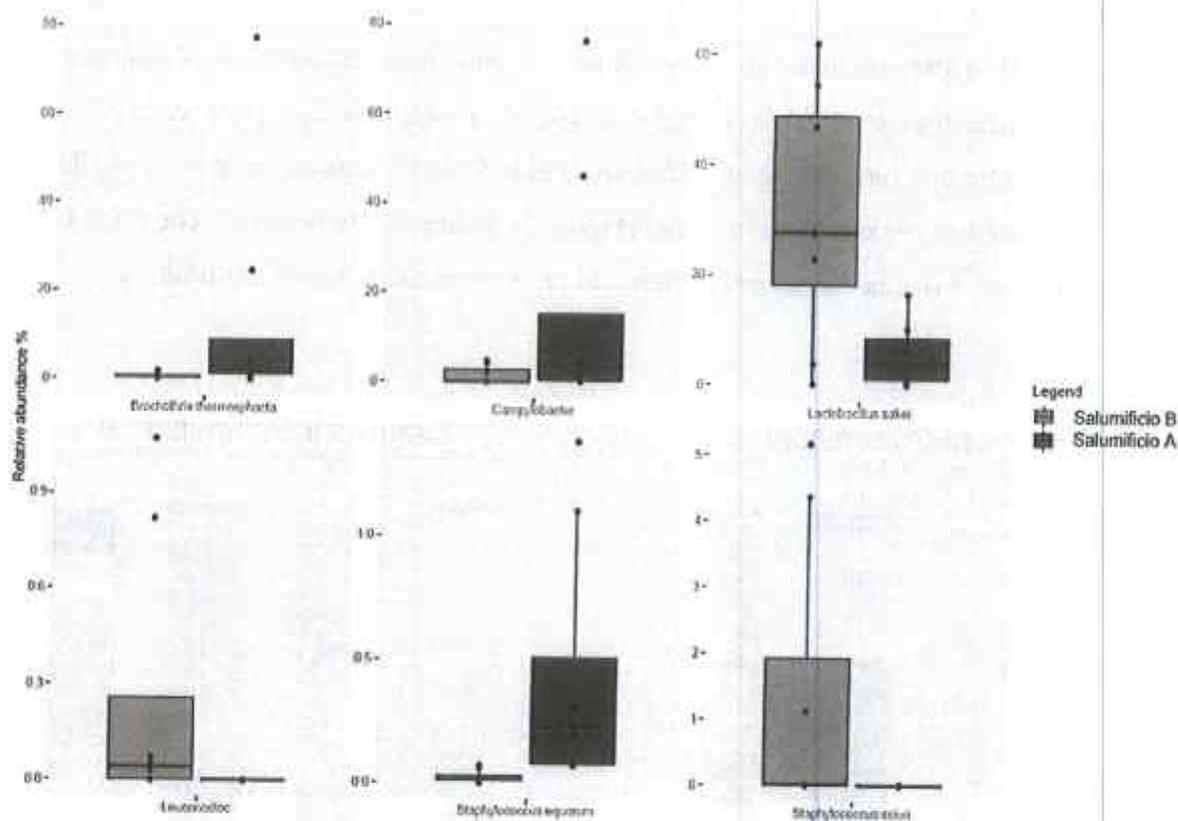


Figura 2. Boxplots che mostrano le abbondanze relative di specie batteriche (OTUs) sulla base del test di Kruskal–Wallis test (FDR < 0.05) nel microbiota dei Ciauscoli (lotto 1 + lotto 2) dei due produttori (A, in blu e B, in verde).

### Composizione del micobiota

Il numero totale di sequenze ottenute dai Ciauscoli ha raggiunto 815.973 letture grezze. Dopo il filtraggio di qualità, sono state utilizzate in totale 702.816 letture, con un valore medio di 50.201 letture/campione e una lunghezza media della sequenza di 380 bp. La copertura stimata del campione ha mostrato un valore soddisfacente per tutti i campioni (> 98%) ma non sono state osservate differenze per l'altro indice di diversità in funzione dei campioni.

I Ciauscoli (lotto 1 + lotto 2) prodotti senza starter né nitriti/nitrati (Salumificio A) (Figura 3) ha mostrato una elevata abbondanza relativa di *Debaryomyces hansenii* che variava dal 7,36 al 60,05% ed è risultata essere la principale specie di lievito presente alla fine della maturazione. *Glomus hyderabadensis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Malassezia* e *Kurtzmaniella zeylanoides* sono stati rilevati anche durante la maturazione con circa il 16, 6, 4 e 7% di abbondanza relativa, rispettivamente.

I campioni prodotti dal salumificio B (lotto 1 + lotto 2) (quindi prodotti con starter e nitriti/nitrati) (Figura 3) hanno mostrato una prevalenza di *Glomus hyderabadensis* e *Debaryomyces hansenii* (entrambi circa il 18%) durante la maturazione e una predominanza di *Cladosporium cladosporioides* specialmente durante i primi 5 giorni di maturazione (con circa il 25% dell'abbondanza relativa). *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium* e *Malassezia* sono stati rilevati come parte del microbiota dei campioni inoculati (Figura 3) Inoltre è stato osservato che fra le OTU minori, *Candida galli*, è risultata associata ai ciauscoli prodotti senza starter né nitriti/nitrati.

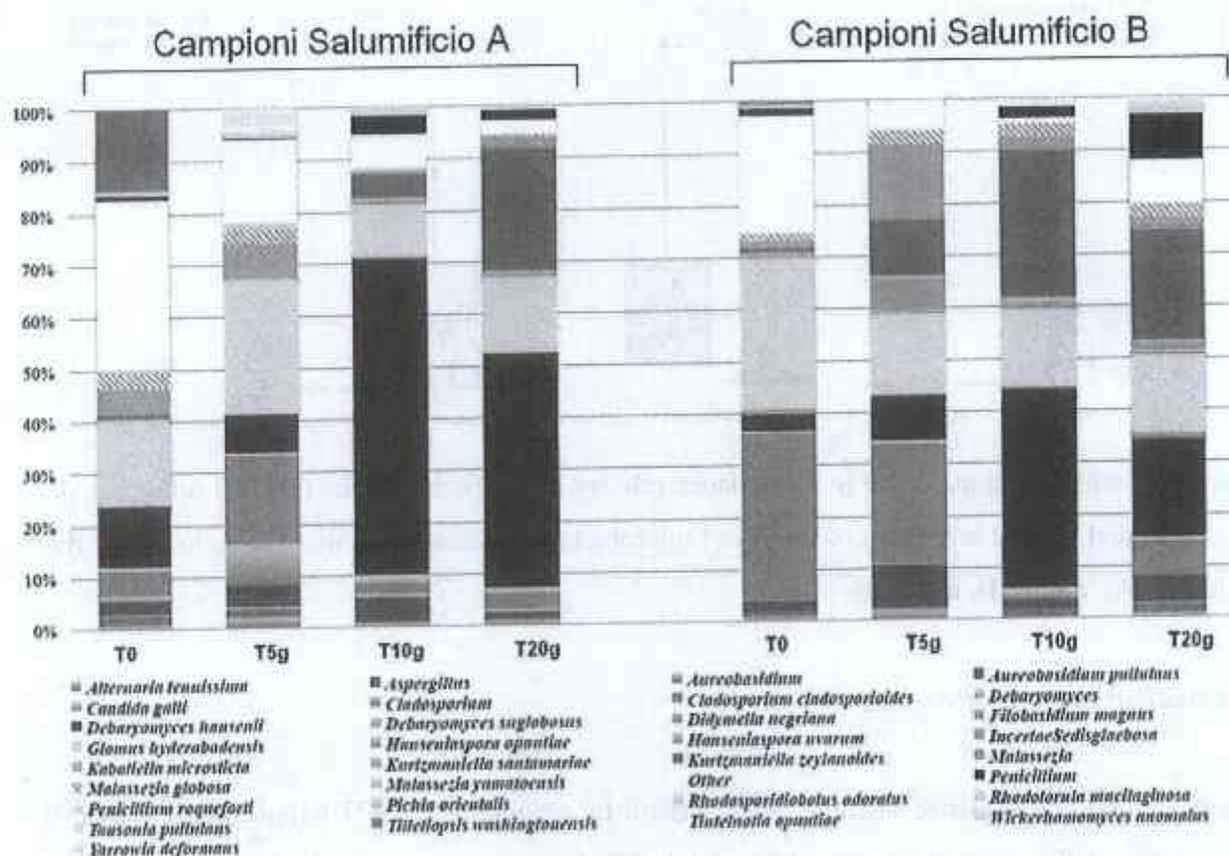


Figura 3. Abbondanze relative (%) delle specie eucitetiche (muffe e lieviti) rilevate tramite sequenziamento metagenomico (Illumina) nei campioni di Ciauscolo (lotto 1 + lotto 2) analizzati ai diversi tempi di produzione (T0-T20 giorni) e prodotti dai salumifici A (a sinistra) e B (a destra).

## Conclusioni

La maturazione dei prodotti carnei stagionati è il risultato dell'attività microbica e dell'attività di enzimi contenuti nella carne.

La popolazione microbica degli insaccati fermentati dipende da quella dei vari costituenti che entrano a far parte del prodotto finito (carni, involucri, sale, spezie); a questa componente microbica vanno aggiunti tutti i contaminanti, sia quelli derivanti da utensili, apparecchiature impiegate e superfici di lavoro, sia quelli di origine umana, provenienti dal ripetuto contatto del prodotto con le mani dell'operatore. Questo tipo di contaminazione, oltre a non essere utile ai fini della maturazione, risulta anche dannosa poiché può apportare microrganismi patogeni; al contrario, la flora batterica derivante dalle materie prime gioca un ruolo molto importante ai fini del processo di stagionatura. Le carni sono contaminate da una flora molto varia che viene influenzata dalle condizioni fisiologiche dell'animale prima della macellazione e dai metodi di macellazione e di conservazione utilizzati. **L'uso di starter e additivi può inoltre modificare la BIODIVERSITA' microbica dei prodotti finiti**, consentendo a determinate specie microbiche (presenti nello starter) di prendere il sopravvento su quelle naturalmente presenti nell'impasto carneo e guidando quindi la fermentazione.

I microrganismi sono i pilastri della vita sulla Terra. Da miliardi di anni, si sono evoluti in ogni nicchia immaginabile del pianeta. Solo nell'ultimo decennio la ricerca ha iniziato a scrutare a fondo il cosmo microbico e ciò che viene evidenziato risulta sempre sorprendente. Gli ecosistemi microbici si comportano, in molti casi, come gli ecosistemi su larga scala, anche se ci sono importanti eccezioni. Pertanto, la comprensione di come la **DIVERSITA' MICROBICA** sia distribuita tra gli ambienti, come i microrganismi influenzino gli ecosistemi in cui vivono e come queste "nano-macchine" possano essere sfruttate per far avanzare la nostra comprensione del mondo naturale sono aspetti di enorme rilevanza.

Il presente studio rappresenta la prima ricerca svolta sulla BIODIVERSITA' MICROBICA del Ciauscolo utilizzando un approccio polifasico tramite conte vitali e metodi di analisi biomolecolare di nuova generazione, quale il sequenziamento Illumina. Dall'analisi dei dati emerge una relativa **bassa BIODIVERSITA'** fra le tipologie di Ciauscolo analizzate in termine di varietà di specie microbiche rilevate. Nonostante questo, importanti considerazioni possono essere fatte relativamente alla differenza di abbondanza relativa delle diverse specie che, sebbene analoghe nei salami con o senza starter e nitrati/nitriti, sono state profondamente influenzate dall'aggiunta di starter, con vantaggio delle specie pro-tecnologiche (*Lactobacillus algidus*, *Leuconostoc carnosum*,

*Lactobacillus sakei*) nei Ciauscoli inoculati con lo starter, specialmente a fine maturazione (20 giorni).

#### **Divulgazione dei Risultati**

I risultati del presente Progetto di Ricerca verranno divulgati in occasione del **5th International Conference on Microbial Diversity 2019**, 25-27 Settembre 2019, Catania, Italy, con un **Poster** dal titolo: "*The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation*" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, L. Ferrocino, L. Cocolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi (Allegato 1).

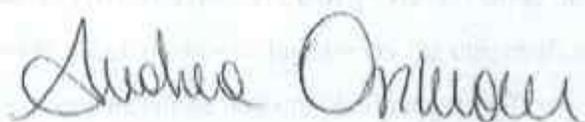
#### **Ringraziamenti**

Questo progetto è stato finanziato dall'Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM) nell'ambito del Progetto: Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali" (Finanziamento: MIPAAF - Legge 194/2015 ).

30 Settembre 2019

Il Responsabile della Convenzione

Prof. Andrea Osimani



## Allegato 1



### The biodiversity of *Ciauscolo* salami during its natural fermentation

A. Osimani<sup>1</sup>, L. Belleghia<sup>1</sup>, V. Milanović<sup>1</sup>, I. Ferrocino<sup>2</sup>, L. Cocolin<sup>2</sup>, M.N. Haouet<sup>3</sup>, S. Scuota<sup>3</sup>, A. Maoloni<sup>1</sup>, C. Garofalo<sup>1</sup>, L. Aquilanti<sup>1</sup>, A. Micheletti<sup>4</sup>, P. Staffolani<sup>4</sup>, F. Clementi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

<sup>2</sup> Department of Agricultural, Forest, and Food Science, University of Turin, Largo Paolo Braccini 2, 10095, Grugliasco, Torino, Italy

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, via Salvemini, Perugia, Italy

<sup>4</sup> Agenzia Servizi Settore Agroalimentare Marche, via dell'Industria 1, Osimo, Italy

\* Corresponding author, e-mail address: [f.clementi@univpm.it](mailto:f.clementi@univpm.it)

**Introduction:** *Ciauscolo* salami represents an undisputed food delicacy of the Marche region (Central Italy) with unique sensory traits. Such a fermented sausage obtained the Protected Geographical Indication (PGI) status, in accordance with Commission Regulation (EC) No 729/2009 of 10 August 2009. According to the production disciplinary, *Ciauscolo* can be produced in some selected cities located in four (Ancona, Ascoli Piceno, Fermo, and Macerata) out of the five provinces of the Marche region (central Italy). *Ciauscolo* is characterized by a soft, homogeneous and rosy paste with high ductility for spreading. The taste is low acidic and savoury, and the flavour is spicy and aromatic. To the best of the authors' knowledge, only a few studies investigating the microbiota of *Ciauscolo* salami are available in the scientific literature.

**Materials and Methods:** This study applied a polyphasic approach based on viable counting and 16S amplicon-based sequencing (Illumina sequencing), to disclose the biodiversity ecology of *Ciauscolo* salami manufactures. To this end, two batches of fermented sausages manufactured by two local producers were analyzed at different sampling times (0, 5, 10 and 20 days). Viable counts of lactic acid bacteria (LAB), coagulase negative staphylococci (CNS), Enterobacteriaceae, and eumycetes were carried out. Microbiological indicators of food safety were also assessed. Moreover, the diversity of metabolically active microbiota occurring during the natural fermentation of *Ciauscolo* salami was evaluated through RNA-based sequencing of the 16S rRNA gene.

**Results:** At the end of ripening (20 days), viable counting revealed LAB counts of 8 log cfu/g, whereas CNS were comprised between 4 and 5 log cfu/g. Moreover, Enterobacteriaceae were still present, although at very low levels. Finally, eumycetes counts attested at about 4 log cfu/g. RNA-based sequencing of the 16S rRNA gene allowed the identification of the main bacterial species present in the active microbial population at different sampling times.

**Conclusions:** The present study allowed: i) to gain information on the complex microbiota occurring during the production of *Ciauscolo* salami; ii) to promote the valorization of such a fermented sausage for the future selection of autochthonous starter cultures to be potentially exploited by local producers. This project was supported by the Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche (ASSAM) within the Project: Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali" (Grant: MIPAAF - Legge 194/2015).

5th International Conference on Microbial Diversity 2019

25-27 Settembre 2019, Catania, Italy

Matrice di Isolamento	Microorganismi rilevati	Numero di isolati	Metodi di identificazione	Anno	Ente finanziatore	Titolo Progetto	Responsabile	Publicazione	Publicazione
Ciauscolo	<i>Lactobacillus sakei</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Lactobacillus algidus</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Leuconostoc carnosum</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Glomus hyderabadensis</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Kurtzmaniella zeylanoides</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Debaryomyces hansenii</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.
Ciauscolo	<i>Malassezia spp.</i>	n.d.	Illumina sequencing (analisi cultura indipendente)	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. Andrea Osimani	Poster dal titolo: "The biodiversity of Ciauscolo salami during its natural fermentation" A. Osimani, L. Belleggia, V. Milanović, I. Ferrocino, L. Coccolin, M.N. Haouet, S. Scuota, A. Maoloni, C. Garofalo, L. Aquilanti, A. Micheletti, P. Staffolani, F. Clementi. 5th International Conference on Microbial Diversity 2019, 25-27 Settembre	Articolo su Rivista Scientifica Internazionale: "A new glance into the microbiota of Ciauscolo salami during its natural fermentation as revealed by high-throughput sequencing" Luca Belleggia, Vesna Milanović, Ilario Ferrocino, Luca Coccolin, M. Naceur Haouet, Stefania Scuota3, Antonietta Maoloni, Cristiana Garofalo, Federica Cardinali, Lucia Aquilanti, Massimo Mozzon, Roberta Foligni, Marina Pasquini, Maria Federica Trombetta, Francesca Clementi, Andrea Osimani. In fase di realizzazione.