



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI ED AMBIENTALI  
CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

DINAMICHE MICROBICHE DEL SALAME CIAUSCOLO DURANTE  
LA FERMENTAZIONE  
MICROBIAL DYNAMICS OF CIAUSCOLO SALAMI DURING  
FERMENTATION  
TIPO TESI: sperimentale

Studente:  
Federico Scanzani

Relatore:  
PROF. ANDREA OSIMANI  
Correlatore:  
DOTT.SSA VESNA MILANOVIC

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

## INDICE

1	Introduzione	2
1.1	Storia del Ciauscolo;	2
1.2	Carne fermentata tra tradizione ed innovazione;	4
1.3	La popolazione microbica degli insaccati;	9
1.4	I batteri lattici;	13
1.5	Il microbiota delle carni fermentate prodotte in Italia;	14
1.6	Le colture starter;	15
1.7	Classificazione delle colture starter;	16
1.8	Ruolo delle colture starter negli insaccati;	17
2	Scopo del lavoro;	19
3	Materiali e metodi;	20
3.1	Campionamento;	20
3.2	Analisi chimico-fisiche;	21
3.3	Conte microbiche;	21
3.4	Determinazione del contenuto di acido lattico;	23
3.5	Determinazione di acido acetico;	23
3.6	Estrazione di RNA e sintesi di cDNA;	23
4	Risultati e discussione;	23
5	Conclusioni;	29
6	Bibliografia.	30



## **1.Introduzione**

### **1.1. Storia del ciauscolo**

Secondo la definizione etimologica il nome “ciauscolo, ciavuscolo” deriverebbe da “ciabusculum” ossia piccolo cibo o piccolo pasto, spuntino consumato a piccole dosi, fedelmente con la tradizione contadina, negli intervalli tra la colazione e il pranzo e tra il pranzo e la cena.

Le consolidate tecniche e metodiche di lavorazione, conservazione e stagionatura attuate per l’ottenimento del prodotto di salumeria Ciauscolo, sono direttamente riconducibili alla sapiente tradizione delle popolazioni contadine e rurali del territorio Piceno.

La macellazione e la lavorazione domestica del maiale, infatti, sono sempre stati momenti di socializzazione tra le famiglie ed i vicini, nonché un motivo di scambio tra gli stessi e di regalie da parte del mezzadro al proprietario del fondo (“padrone”). Sempre la mattazione domestica del maiale e la successiva lavorazione hanno rappresentato un tradizionale evento stagionale invernale, anche a sfondo sociale, del quale la cultura popolare ne rivela usanze, folclore, costumi e ne custodisce la memoria. La tradizionalità della lavorazione, la stagionatura e la conservazione del prodotto alimentare “Ciauscolo” sono direttamente riconducibili ai secoli passati tanto che oggi, come in passato, i processi di lavorazione e stagionatura del tradizionale “Ciauscolo” continuano a caratterizzare gli elementi essenziali del prodotto finale.

La particolare combinazione dei fattori produttivi, quali la manualità e l'artigianalità, unitamente ai fattori pedoclimatici dell'area delimitata consente a questo tipo di produzione di differenziarsi con decisione da tutto il comparto di riferimento.

La materia prima deve provenire da suini delle razze tradizionali large white Italiana e Landrace Italiana o figli di verri delle stesse razze o della razza Duroc Italiana. Non sono ammessi invece, in particolar modo suini portatori di caratteri antitetici, soprattutto con riferimento al gene responsabile della sensibilità agli stress (PSS).

Il ciauscolo è un salame morbido e spalmabile caratterizzato da una breve stagionatura, è un prodotto della lavorazione del suino che deriva dalla fermentazione di un impasto di carne trita ottenuta dai seguenti tagli impiegati in ordine decrescente: pancetta fino ad un massimo del 70%; spalla fino ad un massimo del 40%; rifilature di prosciutto e lonza fino ad un massimo del 30%, addizionata di sale, di varie spezie e facoltativamente di nitrati e nitriti, siero di latte e zuccheri (destrosio, fruttosio, saccarosio) ed insaccato in budelli naturali o sintetici. È espressamente vietato l'uso di farine lattee, caseinati e altre sostanze coloranti.

Recentemente il ciauscolo ha ricevuto il marchio di origine IGP (Indicazione Geografica Protetta) un marchio di origine che lega il prodotto, più che alla materia prima del territorio alla produzione geografica, al processo produttivo e alla qualità originaria.

Il Ciauscolo per essere immesso sul mercato con il marchio IGP deve sottostare a diversi parametri dati dal disciplinare del ciauscolo, le caratteristiche fisiche, chimiche e organolettiche che il prodotto deve presentare sono qui di seguito descritte:

- Caratteristiche fisiche:
  - La principale caratteristica fisica è la morbidezza e la capacità della fetta di essere stesa e spalmata sul pane.
  - Peso: da 400g a 2500g;
  - Diametro compreso tra 4,5 e 10 cm;
  - Aspetto esterno: forma cilindrica;
  - Lunghezza: compresa tra 15 e 45 cm
  - Consistenza: morbida
  - Aspetto al taglio: La fetta si presenta di colore rosso, uniforme ed omogenea, esente da frazioni rancide
- Caratteristiche chimiche:
  - PH maggiore o uguale a 4,8;
  - Proteine minimo 15%;
  - Grasso compreso tra il 32 e il 42 %;

- Rapporto acqua/proteine massimo 3,1;
- Rapporto grassi/proteine massimo 2,8;
- Caratteristiche sensoriali:
  - Odore: profumo delicato, aromatico, tipico deciso e speziato;
  - Gusto: sapido e delicato, mai acido.

## **1.2 Carne fermentata tra tradizione e innovazione**

Le carni fermentate sono prodotti unici, spesso rappresentano il patrimonio e l'identità culinaria del luogo di produzione, ma la loro tipicità è stata spesso compromessa nel corso degli anni.

I prodotti industrializzati di oggi vengono a volte percepiti come di bassa qualità, perciò stanno emergendo nuove strategie per influenzare la qualità e la salubrità anche se il processo di fermentazione della carne è ormai consolidato, infatti si ha un contrasto tra il concetto di innovazione e di originalità perché negli stratagemmi di marketing vengono impiegate diciture come “artigianali” su prodotti che poi non hanno un giusto equilibrio tra qualità, sicurezza, tradizione e innovazione.

La carne fresca è altamente nutriente ma allo stesso tempo estremamente deperibile, la sua conservazione è stata una grande sfida per le prime civiltà umane, successivamente emersero tecniche di conservazione facendo uso di salatura ed asciugatura spinta a condizioni climatiche appropriate (Zeuthen, 2007), queste tecniche abbassarono il valore dell'attività dell'acqua proteggendo la carne dal deterioramento e il consumatore dallo sviluppo microorganismi patogeni.

Mentre per i pezzi di carne interi bastava solo la salatura o l'essiccamento, i composti di carne sminuzzata e addizionata di grasso, richiedevano un ulteriore processo di fermentazione a causa della loro maggiore instabilità ossidativa e microbica. A tale scopo il composto tritato e salato di carne e grasso veniva di solito inserito in budelli, originariamente intestini di animali, per creare condizioni di anaerobiosi. Successivamente si scoprì che le carni fermentate ottenevano le loro caratteristiche finali per via della produzione di acido lattico da parte di determinate specie di batteri lattici che venivano selezionate dall'ambiente anaerobico creatosi all'interno dell'insaccato, a cui seguiva una fase di essiccamento per stabilizzare e maturare ulteriormente il prodotto (Leroy, Verluiten, & De Vuys, 2006; Ravyts, De Vuys, & Leroy, 2012).

La fermentazione, combinata con la salagione, l'essiccamento e a volte l'affumicatura, è una strategia per la conservazione della carne che risale a tempi molto antichi, ad esempio sono stati trovati dei resti di salami nella tomba di Ramses III (1166 a.C.), e la descrizione di un metodo per il trattamento del prosciutto crudo

nel testo antico denominato “De Agricoltura” (Cato the Censor, 234/149 a.C.). Secondo Lucke (2000), probabilmente la produzione dei salumi ha avuto origine nelle regioni temperate dell’area mediterranea perché il suo clima è particolarmente favorevole per il processo di maturazione, ed è ancora molto diffuso in questi paesi. Infatti, l’Europa è la maggior produttrice e consumatrice di salsicce fermentate, le quali sono generalmente prodotte da carne di maiale o più raramente di manzo, vitello o altri tipi di carne (Talon et al., 2004).

L’esatta origine della salagione e dell’essiccamento della carne non è nota, ma il materiale iconografico ritrovato dagli storici, ha dimostrato che queste tecniche erano probabilmente applicate nell’antico Egitto, mentre le prime fonti che documentano la produzione di salsicce fermentate risalgono ai Sumeri (Pearson e Tauber, 1984). I primi riferimenti scritti conosciuti risalgono al 600 a.C. circa nell’antica Grecia. La tecnica della salatura e dell’essiccamento della carne è stata descritta in dettaglio intorno al 160 a.C. da Cato il Vecchio nella sua De Agricoltura (Mateo, Caro, Figuiera, Ramos, & Zumalacàrregui, 2009; Zeuthen, 2007). I romani potrebbero aver copiato il metodo dei Galli e delle popolazioni celtiche che svilupparono metodiche per preservare la carne durante i mesi invernali, tale attività era, peraltro, vitale per la sopravvivenza della tribù. Nelle case celtiche, sopra il focolare era previsto uno spazio dove appoggiare la carne e, grazie al fuoco continuo ed al fumo prodotto, portava all’affumicatura della stessa, con la produzione in genere di pezzi interi di carne come prosciutto crudo, zampe posteriori del maiale e prodotti simili. La particolare categoria di carni fermentate a forma di salsiccia risale ai romani, che sembravano aver appreso la tecnica dai lucani, una tribù dell’Italia meridionale che è all’origine dei nomi greci e spagnoli per i salumi essiccati (rispettivamente “*loukaniko*” e “*longaniza*”).

La parola “salame” deriva probabilmente dal latino medievale “*salumen*”.

I romani gettarono le basi per l’attuale produzione dei salami; gli emigranti europei avrebbero poi esportato le tecniche di produzione in tutto il mondo, comprese le Americhe, il Sud Africa e l’Australia.

Sebbene la fermentazione della carne possa essere percepita come una tecnologia antica e consolidata, gli approcci al processo sono cambiati nel corso dei secoli a causa del mutamento degli standard tecnologici, dovuto all’insorgere non solo di problemi di sicurezza ma anche per migliorarne l’efficienza complessiva del processo, questi cambiamenti sono divenuti particolarmente chiari negli ultimi decenni.

Generalmente parlando, il segmento alimentare è stato radicalmente trasformato a causa dell’urbanizzazione e dagli stili di vita dei consumatori che sono cambiati nel

tempo, nonché a causa dell'industrializzazione e globalizzazione della produzione e distribuzione di alimenti (Gezyen et al., 2012). Questo ha creato nuove priorità relative ai costi, alla sicurezza, alla standardizzazione, alla distribuzione, ecc.

Dagli anni '50 in poi le fermentazioni delle carni sono state condotte con modalità rapide ed uniformi. Tempi di processo più brevi contribuiscono ad un miglior margine di profitto e alla competitività del prodotto finale (Ordòñez & de la Hoz, 2007). Un'accelerazione considerevole è stata raggiunta attraverso l'inoculo, nell'impasto, di colture starter commerciali, l'uso diretto di nitrito al posto del salnitro a base di nitrato, l'uso di acceleranti di polimerizzazione (es: ascorbato), l'uso di temperature di fermentazione più elevate, l'applicazione delle camere termostate per migliorare il controllo del processo e talvolta anche l'aggiunta di acidificanti chimici, ove permesso (Roncalés, 2007; Sindelar & Milkowski, 2012; Zeuthen, 2007). Inoltre, nella maggior parte dei casi, i budelli naturali sono stati sostituiti da budelli sintetici più economici e standardizzati, compromettendo la percezione di autenticità del salume stesso, infatti, su richiesta del consumatore, il paradigma della semplice efficienza del processo e della riduzione dei costi ha iniziato ad evolversi in una mentalità industriale che coinvolge sia la qualità che la sicurezza, includendo però gli elementi tradizionali ricercati. Il confine tra innovazione e tradizione sembra quindi essersi in parte confuso.

La produzione del salame parte spezzettando la carne e il grasso in piccoli pezzi o tritandoli insieme dove vengono poi aggiunti sale e spezie, e, in alcuni casi anche zuccheri, erbe aromatiche e altri ingredienti; la miscela accuratamente omogeneizzata viene inserita in involucri (naturali o artificiali) e subisce quindi la fermentazione e la maturazione (con contemporaneo essiccamento).

L'uso dei conservanti (nitrati e nitriti) è generalmente adottato seguendo la legislazione comunitaria pertinente (Reg. CE 1333/2008), a meno che non sia soggetto ad altri regolamenti come i prodotti a denominazione protetta.

I salumi possono essere classificati secondo differenti criteri, per esempio in base alla loro attività dell'acqua finale e/o al pH, o in base alle condizioni di processo applicate, come la durata della maturazione o l'uso dell'affumicatura (Luke, 2000). Usando questi criteri, si hanno due grandi categorie di prodotti carnei fermentati europei identificati come prodotti del nord o del sud Europa (Talon et al., 2007). I prodotti del nord Europa come ad esempio i salami tedeschi e ungheresi subiscono una veloce fermentazione con un pH inferiore a 5 e sono di solito affumicati, mentre le produzioni dell'area mediterranea quindi del sud dell'Europa (Italia, Francia, Grecia, Spagna) possono essere: asciutti, con una maturazione superiore alle 4 settimane e un'attività dell'acqua inferiore a 0,90 o semi-asciutti, con una

maturazione inferiore a 4 settimane e un'attività dell'acqua compresa tra 0,90 e 0,95, non sono generalmente affumicati e presentano sulla superficie un microbiota con muffe, lieviti e cocchi gram positivi (Luke, 2000). Il livello di fermentazione può variare (specialmente al variare della temperatura) e il pH finale si ferma a 5 o compreso tra 5,3 e 6,2 (García-Varona et al., 2000; Rantsiou et al., 2005; Aymerich et al., 2006; Lebert et al., 2007). In relazione alle tradizioni e alle preferenze dei consumatori le tipologie dei salumi possono variare molto in differenti paesi e regioni, gli ingredienti e le tecniche di produzione adottate differiscono considerevolmente all'interno di ciascuna di queste categorie, inoltre la maggior parte dei prodotti europei segue procedure tradizionali di fermentazione e maturazione, e fanno affidamento sull'attività di microorganismi autoctoni appartenenti ad una comunità estremamente eterogenea che deriva sia dalle materie prime che dall'ambiente di produzione (Chevallier et al., 2006).

La flora microbica è dominata da due grandi gruppi di batteri: i batteri lattici (LAB) il cui contributo si basa principalmente sull'acidificazione e sulla produzione di composti volatili attraverso la fermentazione dei carboidrati, e il gruppo dei cocchi coagulasi negativi (CCN), che comprende sia i micrococchi che stafilococchi coagulasi negativi (SCN), che è il principale responsabile dello sviluppo e della stabilizzazione del colore, della proteolisi, della lipolisi e della decomposizione di amminoacidi e perossidi liberi (Talon et al., 2004; Iacumin et al., 2006; Rantsiou e Cocolin, 2006; Talon e Leroy, 2006; Urso et al., 2006).

Lieviti e muffe svolgono un ruolo minore ma pur sempre molto importante, infatti grazie alla formazione del film superficiale esercitano un'azione protettiva contro l'eccessiva disidratazione del prodotto e ossidazione della frazione lipidica dovuta all'ossigeno e alla luce (Gardini et al., 2001; Cocolin et al., 2006).

Nelle seguenti figure troviamo rispettivamente: nella figura 1. La panoramica del posizionamento tecnologico e sociale delle carni fermentate prendendo in considerazione il contesto conflittuale di apprezzamento e sfiducia tra tradizione ed innovazione, portando così al riemergere di elementi tradizionali nei processi industriali innovativi; nella figura 2 invece troviamo tutte le tipologie di salami studiati nella letteratura scientifica con riferimento al microbiota autoctono di ciascun tipo di salame prodotto nell'area del mediterraneo.



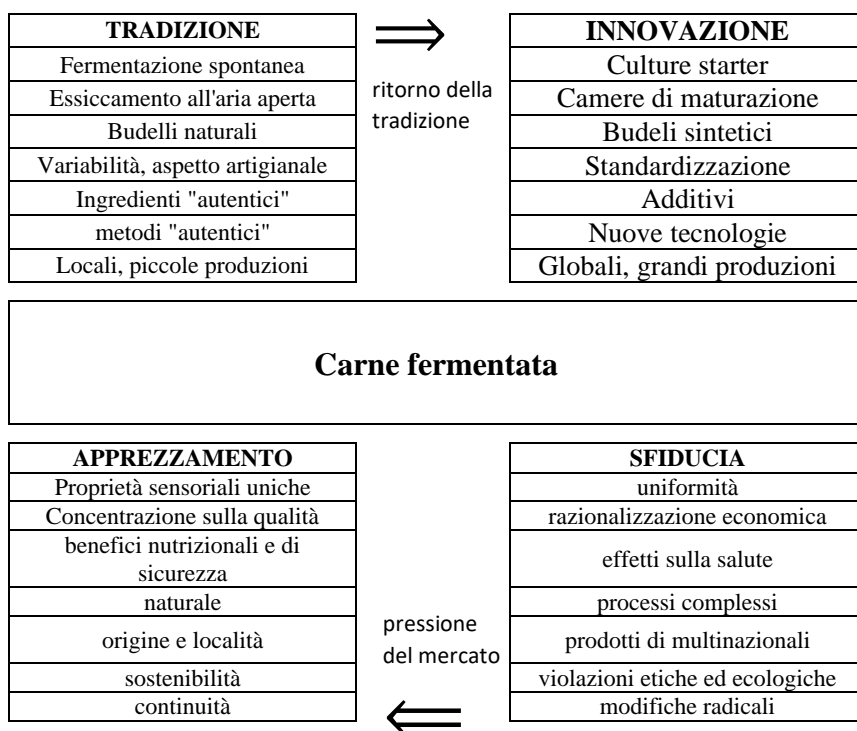


Figura 1.

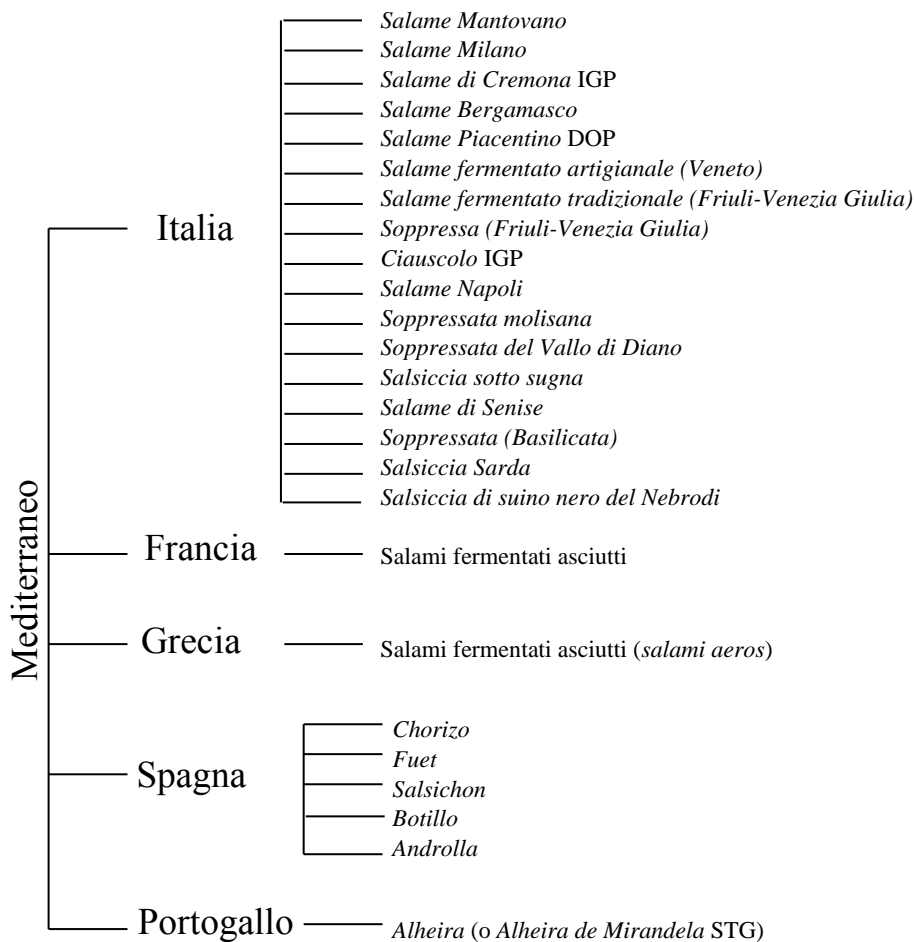


Figura 2.

### 1.3 La popolazione microbica degli insaccati

La maturazione dei prodotti carnei stagionati è il risultato dell'attività microbica e dell'attività enzimatica svolte da microrganismi 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) considerando poi anche la probabile presenza di 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, potrebbe risultare anche dannosa perché potrebbe apportare microrganismi patogeni al prodotto finito; al contrario, la flora batterica derivante dalle materie prime ha 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.

I microrganismi maggiormente rappresentati nelle carni sono elencati in Tabella 1 (Caserio, 1991): tra questi è possibile elencare una grande gamma di batteri, lieviti e muffe, la cui presenza può essere correlata alla metodica di conservazione. Quest'ultima, infatti, può avvenire per semplice refrigerazione in aerobiosi, come si usa di solito per le mezzene, o essere basata sull'utilizzo di tecniche di condizionamento, quali il confezionamento sottovuoto o in atmosfera modificata, generalmente applicate a tagli di carne di ridotte dimensioni. Nel primo caso, fra i microrganismi Gram-negativi troviamo dominanti le Pseudomonaceae, Enterobacteriaceae, i microrganismi del gruppo *Acinetobacter* ed *Aeromonas*, mentre tra i Gram-positivi prevalgono alcuni generi di batteri lattici. I microrganismi psicrotrofici risultano in genere presenti in cariche più elevate, a causa della loro capacità di moltiplicazione durante la refrigerazione delle carcasse. Nel secondo caso, invece, predominano gli anaerobi facoltativi come le Enterobacteriaceae ed i microrganismi anaerobi-aero tolleranti come i batteri lattici.

Nei budelli, generalmente conservati sotto sale, è presente una microflora alofila (*Micrococcus*, *Halobacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sarcina*, *Leuconostoc*), mentre nelle spezie possono spesso trovarsi microrganismi termofili e sporigeni in quantità variabili da  $10^3$  ufc/g a  $1-30 \cdot 10^6$  ufc/g.

<b>Batteri</b>	<b>Lieviti</b>	<b>Muffe</b>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>
Cocchi coagulasi negativi	<i>Hansenula</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Thamnidium</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Mucor</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Monilia</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Rhizopus</i>
<i>Corynebacterium</i>		<i>Geotrichum</i>
<i>Acinetobacter</i>		<i>Sporotrichum</i>
<i>Flavobacterium</i>		<i>Alternaria</i>
<i>Xanthomonas</i>		
<i>Kurthia</i>		
<i>Bacillus</i>		
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Aeromonas</i>		
<i>Pediococcus</i>		

**Tabella 1.** Microrganismi presenti nella carne (Caserio, 1991).

Nel corso della maturazione, per effetto di fattori intrinseci (pH,  $a_w$ , potenziale redox, inibitori, etc.), estrinseci (temperatura, composizione dell'atmosfera, etc.) e di attività microbiche (fermentazione, etc.) si ha una modifica della popolazione microbica, che al termine del processo si conclude con la sopravvivenza di un numero limitato di specie. Si verifica, così, la scomparsa di batteri Gram-negativi presenti nella popolazione microbica iniziale, a favore di specie Gram-positive alotolleranti, principalmente micrococchi, ma anche lattobacilli, streptococchi e *Brocothrix thermosphacta* (specie alterativa).

Numerosi studi hanno evidenziato che la comunità microbica dei prodotti carnei fermentati è principalmente costituita da batteri lattici e cocchi coagulasi negativi (Rantsiou e Cocolin, 2006), lieviti e muffe. In particolare, i salami con una più breve maturazione presentano un maggior sviluppo di lattobacilli nella fase iniziale della fermentazione e, per effetto della loro attività acidificante, al termine della maturazione il prodotto si presenta con un sapore acido e un aroma meno spiccato; al contrario, da processi di stagionatura più lunghi si ottengono salami maggiormente contaminati da cocchi coagulasi negativi.

I batteri lattici presenti nei salumi fermentati, e nei prodotti carnei in genere, sono omo-eterofermentanti ed in misura minore etero-fermentanti e sono responsabili del catabolismo dei glucidi, e della conseguente produzione di acido lattico, acido acetico, formico, alcool etilico, acido propionico, CO<sub>2</sub>, acido butirrico, etc. (Urso *et al.*, 2006). Tali microrganismi appartengono principalmente ai seguenti generi:

- *Lactobacillus*, le cui specie più diffuse sono *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum* (Leroy *et al.*, 2006), insieme a *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* ed altre;
- *Pediococcus* (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*)
- *Leuconostoc* (*Leuconostoc carnosus*, *Leuconostoc gelidum*).

La loro moltiplicazione è favorita da un'atmosfera ricca di CO<sub>2</sub> e dalla microaerobiosi. Questi possiedono, inoltre, una considerevole attività peptidasi e una debole attività proteolitica e lipolitica.

I membri del gruppo dei cocchi coagulasi negativi, le cui specie più frequentemente ritrovate sono *Staphylococcus xilosus* e *Staphylococcus simulans* (Cocolin *et al.*, 2001b), possiedono una ridotta attività acidificante, ma una buona attività proteolitica, per mezzo della quale liberano peptidi ed aminoacidi, così da causare l'aumento del pH che caratterizza gli ultimi stadi della maturazione. Inoltre, essi sintetizzano lipasi la cui azione determina il rilascio di varie sostanze aromatiche ed acidi organici (Cocolin *et al.*, 2001a) che conferiscono al prodotto un gradevole gusto e un buon profumo, a fronte di una minore acidità. Cocchi coagulasi negativi e specie del genere *Kokuria*, inoltre, demoliscono i perossidi impedendo fenomeni di irrancidimento a carico della componente lipidica ed esplicano attività nitrato e nitrito-reduttasi. Da tali attività dipende la produzione di NO<sub>2</sub>, HNO<sub>2</sub> e NO, quest'ultimo indispensabile per la nitrosazione della mioglobina da cui dipende il caratteristico colore dell'insaccato.

I microrganismi in grado di produrre proteinasi, endocellulari o extracellulari, comprendono generi e specie sporigene (*Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*) e non sporigene (*Pseudomonas fluorescens*, *Proteus*, cocchi coagulasi negativi, etc.) e

varie specie di muffe appartenenti ai generi *Penicillium* (*Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roquefortii*) e *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus candidus*, etc.). Per effetto della proteolisi, il prodotto si omogenizza, acquistando una maggiore affettabilità e un caratteristico sapore. L'attività proteolitica non è l'unica azione causata dalle muffe nel corso della maturazione: in un primo momento, queste colonizzano la superficie del prodotto, in corrispondenza delle parti magre, per portarsi successivamente in profondità, dove determinano una perdita di umidità uniforme, evitando l'eccessiva asciugatura dell'involucro. Inoltre, dal momento che il loro sviluppo si ha sulla pelle e sotto di essa, facilitano il distacco del budello dall'impasto al momento del consumo. A questo fenomeno contribuiscono probabilmente anche i lieviti, principalmente membri del genere *Debaryomyces*, che si sviluppano subito dopo la preparazione dell'insaccato. Più in dettaglio, la penetrazione delle muffe in profondità avviene quando la fermentazione lattica si è esaurita e il prodotto ha raggiunto valori minimi di pH. In questa fase, le muffe utilizzano l'acido lattico e l'acido acetico per la loro crescita, provocando un innalzamento del pH, talvolta fino a valori superiori a quelli iniziali.

La presenza delle muffe inoltre protegge il salame dall'esposizione alla luce e all'aria; le muffe assimilano i nitrati e sono in grado di demolire i perossidi, ostacolando fenomeni di irrancidimento. Le muffe, come i lieviti, aumentano considerevolmente di numero subito dopo la preparazione dell'insaccato, diminuendo progressivamente nelle zone profonde fino ad una completa scomparsa. A differenza dei batteri lattici e dei cocchi coagulasi negativi, i lieviti si ritrovano più frequentemente sulla superficie del salume e ne contribuiscono alla definizione del sapore (Cocolin *et al.*, 2006). La specie di muffa caratteristica più ritrovata è *Debaryomyces hansenii*; tuttavia è nota anche la presenza di specie minori, appartenenti ai generi *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Torulopsis*, *Trichosporon* e *Cryptococcus* (Rantsiou e Cocolin 2006).

Infine, durante la stagionatura, gli enterobatteri, ed in particolare i coliformi, diminuiscono fino a scomparire nel giro di 10-15 giorni; solamente in partite difettose con un elevato grado di umidità, i coliformi sopravvivono per periodi di tempo più lunghi, ma mai fino al termine della stagionatura. *Aeromonas* e Gram-negativi, dopo un modesto aumento durante la stufatura, diminuiscono senza mai scomparire completamente; con la stessa dinamica, dopo un aumento iniziale, diminuisce anche il numero di streptococchi fecali. Diverso è il comportamento degli sporigeni: durante la stagionatura le forme vegetative diminuiscono mentre le spore,

a causa del pH del mezzo, non sono in grado di germinare, diminuendo o restando costanti in numero.

Un ruolo fondamentale nella definizione di struttura e composizione della popolazione microbica è svolto, infine, dalla salagione. Il cloruro di sodio, infatti, alle normali concentrazioni d'uso (2,5-3 %), esercita un'azione batteriostatica e selettiva, permettendo lo sviluppo di specie alofile e alotolleranti, ed inibendone altre. L'azione conservante è esplicata dal processo di disidratazione, dovuto a fenomeni di osmosi che determinano la fuoriuscita di acqua dalle cellule. L'abbassamento dell'attività dell'acqua ( $a_w$ ) produce nel prodotto un aumento di soluti, un fattore selettivo per lo sviluppo microbico. La presenza di elevate concentrazioni di sale nel prodotto finito, per effetto dell'essiccamento dello stesso, seleziona, nell'ambito dei micrococchi e dei lattobacilli, solo le specie maggiormente osmofile o alotolleranti.

#### **1.4 I batteri lattici**

A questo punto risulta chiaro che il gusto di un insaccato fermentato è il risultato dell'interazione tra sapore e aroma; il primo dipende dalla produzione di acido lattico, peptidi e amminoacidi liberi, mentre il secondo è principalmente legato alla presenza di composti volatili, derivanti dal metabolismo batterico e da processi di perossidazione lipidica. Più in dettaglio, il sapore di un salume dipende in massima parte dall'attività delle proteasi tissutali. Enzimi come le catepsine del gruppo D, infatti, sembrano essere responsabili, durante le prime fasi della fermentazione, del rilascio di peptidi, mentre gli enzimi di natura microbica sono più attivi negli ultimi stadi della maturazione, sebbene anche questi forniscano un contributo, se pur minimo e ceppo-dipendente, al processo iniziale di idrolisi delle proteine. Più rilevante è, al contrario, il contributo delle peptidasi batteriche, principalmente responsabili della liberazione, a partire da peptidi ed oligopeptidi, dei singoli amminoacidi, successivamente convertiti in composti aromatici.

Lattobacilli, pediococchi, e, in misura maggiore, stafilococchi sono anche responsabili della degradazione della catena laterale degli amminoacidi. Tale caratteristica tende a ridurre, in parte, l'importanza di questi microrganismi nei processi di formazione di composti, come il 3-metil butanale, responsabili dei caratteristici sapori dei salumi fermentati (Larroure *et al.*, 2000).

Importanti sono anche i processi lipolitici, che conducono al rilascio di composti aromatici. La liberazione di acidi grassi a corta catena, con meno di 6 atomi di carbonio, può essere, infatti, correlata all'insorgenza di odori forti e sgradevoli. La liberazione di questi acidi grassi è principalmente dovuta alle lipasi tissutali, sebbene

siano state descritte attività simili anche per lipasi batteriche, soprattutto stafilococciche. La lipolisi rappresenta soltanto il primo stadio di un processo costituito da numerose fasi di degradazione ossidativa, che conducono alla formazione di alcani, alcheni, alcol, aldeidi, chetoni ed altre molecole causa di odori e sapori indesiderati.

Ai fini del delineamento del gusto finale di un insaccato fermentato, non trascurabili sono, infine, i processi glicolitici. Fatta eccezione per la glicolisi post-mortem, i composti prodotti dal catabolismo glucidico dei batteri, come carboidrati di ridotte dimensioni, acido lattico, acetico, etanolo, acetoino e diacetile, sono, infatti, essenziali per la definizione del gusto. Inoltre, un significativo contributo è fornito dai batteri lattici, i quali producono, durante la fermentazione, grandi quantità di acido lattico e, in parte, di acido acetico e composti volatili. Sebbene questi microrganismi non mostrino, in genere, una significativa attività proteolitica o lipolitica, un certo grado di proteolisi e lipolisi è stato osservato nei batteri lattici tipici della carne.

Oltre ai microrganismi del genere *Lactobacillus*, anche altri batteri lattici possono influenzare positivamente il sapore di un insaccato. È stato dimostrato, ad esempio, come gli enterococchi giochino un ruolo fondamentale nel processo di maturazione, grazie alle attività di proteolisi, lipolisi ed esterolisi (Sarantinopoulos *et al.*, 2001).

### **1.5 Il microbiota delle carni fermentate prodotte in Italia**

I prodotti a base di carne fermentata caratteristici dell'Italia meridionale hanno un sapore più forte di quelli prodotti nel nord e centro Italia, a causa dell'aggiunta di diversi tipi e quantità di ingredienti (come particolari tagli di carne e spezie, come il peperoncino). D'altra parte, l'uso di diverse ricette può alterare la composizione e le dinamiche del microbiota che a loro volta influenzano le caratteristiche finali dei prodotti. Pertanto, i salumi provenienti dall'Italia centro-settentrionale e meridionale sono stati trattati separatamente nei paragrafi seguenti.

Molti prodotti a base di carne fermentata realizzati nelle regioni centrali e settentrionali dell'Italia, come il salame Milano, il salame mantovano, il salame di Cremona IGP, il salame bergamasco e il salame piacentino DOP hanno denominazioni che includono il nome del luogo in cui si trova la produzione principale, come prova della loro antica tradizione, indipendentemente dal loro marchio DOP o IGP.

Nel tentativo iniziale di caratterizzare le comunità di lattobacilli e stafilococchi di Salame Milano, è stato utilizzato un approccio combinato che includeva test

fisiologici e analisi molecolari su campioni raccolti durante due mesi di maturazione (Rebecchi et al., 1998). Dopo 15 giorni e fino alla fine della maturazione sono stati trovate come specie dominanti *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus plantarum*, mentre *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri* hanno prevalso nella popolazione dei SCN, con valori rispettivamente del 30 e 25%. La conta dei LAB è aumentata dopo 15 giorni da circa 2 a 8 log ufc/g e poi è rimasta stabile, mentre i micrococchi e gli stafilococchi non patogeni hanno raggiunto il loro massimo dopo 30 giorni.

I prodotti a base di carne fermentata dell'Italia meridionale sono chiamati con i nomi generici di salame, soppressata o salsiccia e comprendono molti tipi differenti. Sono prodotti seguendo le antiche tradizioni delle diverse regioni e spesso il nome del luogo di produzione è incluso nella denominazione, sebbene molti di questi prodotti non possiedano denominazioni protette a livello dell'UE. Nei primi studi, l'ecologia microbica dei salumi prodotti nel sud Italia è stata generalmente studiata attraverso l'isolamento di un gran numero di colture seguite dallo studio delle loro principali caratteristiche fisiologiche, come è stato eseguito sul salame Napoli (Coppola et al., 1995), un salume tradizionale campano prodotto senza aggiunta di zucchero nella carne macinata e affumicato per un massimo di 10 giorni. In generale, il microbiota varia durante la maturazione con un rapido incremento dei lattobacilli mesofili durante i primi 7 giorni di maturazione, fino a 8 log ufc/g, per poi decrescere nell'avanzare della maturazione. Al contrario, i CCN aumentano lentamente da 5 a 7 log ufc/g dopo 30 giorni di maturazione. Isolando i ceppi, è stata dimostrata la netta predominanza delle specie *Lb. sakei* e *Lb. curvatus*, che rappresentano rispettivamente il 63 e il 29% degli isolati e altre specie minoritarie come *Lb. alimentarius*, *Lb. casei ssp. tollerans* e *Lb. sakei*.

### **1.6 Le colture starter**

Molti alimenti fermentati sono prodotti tutt'oggi sfruttando in maniera non consapevole la crescita di microrganismi utili naturalmente presenti nelle materie prime o nell'ambiente di produzione. Questi microrganismi, anche se possono essere inizialmente presenti in basso numero, prendono il sopravvento sugli agenti di deterioramento e sui patogeni perché la formulazione dell'alimento o le condizioni di produzione o, ancora, la stessa crescita dei microrganismi utili, rende l'ambiente favorevole alla loro crescita a scapito dei microrganismi dannosi. In particolare, i fermenti lattici, che fanno parte della microflora di molti alimenti fermentati, abbassano rapidamente il pH degli alimenti producendo acido lattico (ed



eventualmente altri prodotti) per fermentazione di carboidrati naturalmente presenti nelle materie prime o aggiunti nella formulazione.

Tuttavia, affidarsi alla contaminazione naturale delle materie prime con microrganismi utili diventa sempre più difficile. I microrganismi presenti potrebbero non essere in numero sufficiente per prendere rapidamente il sopravvento sui microrganismi dannosi, o svilupparsi in ritardo, rallentando il processo di produzione e rendendolo disomogeneo. Inoltre, dal momento che molte proprietà tecnologiche dei microrganismi sono ceppo specifiche, piuttosto che specie specifiche (una specie microbica può comprendere molti ceppi diversi che si differenziano per proprietà fisiologiche o tecnologiche pur essendo molto simili fra loro), i ceppi naturalmente presenti potrebbero non avere le caratteristiche necessarie all'ottenimento di prodotti di qualità in modo riproducibile. L'incostanza delle fermentazioni spontanee è sempre stata un problema, la comprensione del ruolo dei microrganismi nelle fermentazioni portò alla nascita dell'industria delle colture starter. Queste colture, composte da miscele indefinite o definite di microrganismi, selezionate sulla base delle loro proprietà tecnologiche, venivano riprodotte da istituzioni o industrie specializzate e distribuite ai produttori di alimenti già nel 1895 in Danimarca.

Gli starter quindi fanno “partire” la fermentazione e la indirizzano correttamente, apportando microrganismi utili in quantità sufficienti allo scopo. Dalle prime esperienze con le colture starter è trascorso ormai più di un secolo di ricerca e sviluppo tecnologico e sono oggi disponibili una varietà di colture, definite e indefinite, per una varietà enorme di prodotti, commercializzate o distribuite da industrie o istituzioni specializzate. Lo sviluppo di nuove colture avviene ormai basandosi quasi completamente sull'enorme mole di conoscenze accumulate sulla fisiologia, sulla genetica e sulla tecnologia dei principali gruppi di microrganismi utili.

### **1.7 Classificazione delle colture starter**

Le colture starter possono essere classificate sulla base di diversi criteri:

- complessità della composizione (colture miste, composte da molte specie o ceppi in miscele indefinite; colture a composizione definita, composte da un numero limitato di specie o ceppi in rapporti noti e definiti)
- substrato utilizzato per la riproduzione (latte, siero, etc.)
- riproduzione in condizioni artigianali o presso istituzioni specializzate
- temperatura ottimale di crescita (mesofile, termofile)
- presenza di ceppi aromatizzanti

- funzioni (starter primari, colture aggiuntive o secondarie, probiotici)
- modo in cui vengono conservate distribuite (liquide, congelate, liofilizzate, concentrate).

### **1.8 Ruolo delle colture starter negli insaccati fermentati.**

Il ruolo svolto dai microrganismi utili negli insaccati fermentati è molto più complesso di quello svolto dai microrganismi nei formaggi. Per ottenere un salume maturo occorre infatti l'azione sinergica di diversi gruppi di microrganismi (batteri lattici, LAB; cocchi coagulanti negativi, CCN; lieviti e muffe) che svolgono i seguenti ruoli:

1. **Creazione di un ambiente ostile per la crescita di agenti di deterioramento e patogeni;** È probabilmente la funzione più importante, infatti le materie prime sarebbero facilmente deteriorabili, mentre invece molti alimenti fermentati possono essere conservati a temperatura ambiente, l'aumento della conservabilità è dato da:
  - produzione di acidi organici (specialmente acido lattico, per fermentazione dei carboidrati o zuccheri presenti nella materia prima), che abbassano il pH dell'alimento rendendolo inospitale per la maggior parte dei patogeni e degli agenti di deterioramento;
  - alla produzione di sostanze inibitorie naturali con azione simile agli antibiotici: le batteriocine sono a tutti gli effetti dei conservanti naturali, sono piccole proteine che possono essere prodotte da molti fermenti lattici ed inibiscono lo sviluppo di pericolosi patogeni ed agenti di deterioramento; anche alcune muffe che crescono sulla superficie dei salumi possono produrre sostanze inibitorie;
  - alla creazione di un ambiente riducente, che inibisce la crescita dei microrganismi aerobi,
  - alla pura e semplice competizione: anche se gli alimenti sono ricchi di nutrienti, alcune sostanze sono limitanti e i microrganismi che crescono più velocemente possono consumarle a scapito degli altri.
2. **Produzione di acido lattico per fermentazione degli zuccheri;** l'acido lattico conferisce un sapore acidulo ai prodotti ma ha anche funzioni importanti per ottenere la consistenza caratteristica: a pH 5,3 le proteine della carne coagulano, trattenendo meno acqua, che può essere più facilmente allontanata per essiccamento, e rendendo il prodotto più consistente ed affettabile. Per rendersi conto di quanto questo possa essere importante basta confrontare l'affettabilità di una salsiccia fresca e di una salsiccia fermentata: mentre nel primo caso il prodotto si sfalda, nel secondo caso le fette sono più solide e le particelle di carne e grasso sono ben legate fra di loro.

3. **Attività proteolitica e lipolitica:** le proteine e il grasso della carne fresca non sono molto sapidi, mentre i prodotti della loro decomposizione (peptidi e aminoacidi dalle proteine; acidi grassi dal grasso) hanno sapori e talvolta odori pronunciati e vanno a loro volta incontro ad ulteriori processi di trasformazione (enzimatica o puramente chimica) producendo il sapore e l'aroma complesso (centinaia e centinaia di composti volatili e solubili).
4. **Condizionamento dell'aspetto del prodotto:**
  - produzione di un colore rosso stabile: mentre la carne fresca perde rapidamente il colore rosso vivo una volta esposta all'aria, gli insaccati fermentati hanno un colore rosso e stabile anche dopo essere stati affettati; il colore stabile deriva dalla formazione della nitrosomioglobina, che si ottiene dall'interazione della mioglobina (proteina rossa presente nella carne) con l'ossido nitrico, prodotto per azione biologica (dalla riduzione dei nitrati a nitriti, che possono essere ridotti ulteriormente ad ossido nitrico) o anche soltanto chimica (i nitriti si trasformano spontaneamente in ossido nitrico in ambiente acido);
  - formazione di una superficie dall'aspetto desiderabile: in molti insaccati la superficie è coperta da una patina bianca, che può essere ottenuta con la crescita di muffe specifiche; la patina protegge il prodotto dall'essiccamento eccessivo e dalla luce (vedi dopo) e può facilitare (insieme alla crescita di lieviti) la separazione del budello dalla fetta del prodotto maturo.
5. **Protezione dall'irrancidimento:** gli insaccati sono ricchi di grassi, che si possono irrancidire per azione fisica, chimica o biologica; molti microrganismi utili presenti nella carne producono l'enzima catalasi, che degrada l'acqua ossigenata prodotta da alcuni microrganismi e che potrebbe ossidare i grassi. La crescita di muffe sulla superficie del prodotto protegge il grasso dall'azione della luce e limita l'accesso dell'ossigeno, riducendo l'irrancidimento ossidativo.
6. **Riduzione del livello di sostanze tossiche:** oltre all'inibizione di microrganismi tossigeni, i microrganismi utili possono contribuire ulteriormente a ridurre la presenza di sostanze indesiderabili negli insaccati:
7. **Eliminazione dei nitriti:** anche se i nitriti svolgono alcuni ruoli utili (vedi dopo), livelli residui eccessivi possono causare intossicazioni o favorire la produzione di nitrosammine, cancerogene. I microstafilococchi presenti naturalmente negli insaccati o aggiunti come coltura starter sono in grado di ridurre completamente i nitriti a sostanze volatili, eliminandoli.
8. **Prevenzione della produzione di micotossine:** molte muffe sono in grado di produrre delle tossine, che hanno effetti sia acuti che cronici (alcune sono

cancerogene); la crescita di muffe utili sulla superficie dei salumi previene la crescita di muffe tossigene.

Non sempre i microrganismi che hanno delle funzioni utili sono del tutto privi di effetti negativi. Per esempio, fermenti lattici appartenenti alla specie *Lactobacillus curvatus* possono produrre amine biogene per decarbossilazione degli aminoacidi e alcuni stafilococchi possono produrre, dagli acidi grassi e dagli aminoacidi, sostanze che danno aromi sgradevoli ai salumi.

È riconosciuto che la sicurezza degli insaccati fermentati è legata all'impiego di nitriti e nitrati, essendo gli unici composti in grado di inibire lo sviluppo di *Clostridium botulinum*, inoltre influenzano positivamente il colore prevenendo l'ossidazione dei grassi infatti grazie alle attività nitrato e nitrito riduttasiche, svolte dai CCN con formazione di ossido di azoto (NO), il quale si va a legare con la mioglobina della carne formando la nitrosomioglobina (rosso brillante). Ciononostante, si reputa necessario la sostituzione dei nitrati e nitriti con altri elementi efficaci ed alternativi perché si è dimostrata una stretta relazione tra l'assunzione di nitriti da prodotti carnei e l'insorgenza di carcinomi.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

I microrganismi sono i pilastri della vita sulla Terra. Da miliardi di anni, si sono evoluti in ogni nicchia immaginabile sul pianeta. I microbi hanno rimodellato gli oceani, l'atmosfera e ha dato origine a condizioni favorevoli agli organismi pluricellulari.

Solo nell'ultimo decennio abbiamo iniziato a scrutare a fondo il cosmo microbico e ciò che abbiamo trovato è 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 diversità 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 ha avuto quindi un duplice intento:

- i) ottenere informazioni sul complesso microbiota che interagisce con la matrice carnea durante la produzione del salame Ciauscolo;
- ii) preparare campioni di acidi nucleici microbici per successive analisi metagenomiche;

- iii) promuovere la valorizzazione del Ciauscolo per la futura selezione di colture autoctone potenzialmente utilizzabili dai produttori locali.

A tale scopo sono stati selezionati n.2 produttori di Ciauscolo localizzati nella Regione Marche per la caratterizzazione microbiologica di salami analizzati durante le fasi di produzione.

### **3. Materiali e metodi**

#### **3.1 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 (C) è stato scelto in base all'assenza di nitrati/nitriti e colture starter utilizzati per la produzione dell'insaccato, mentre il secondo salumificio (V) 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).

### **3.2 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).

### **3.3 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.

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.

### **3.4 Determinazione del contenuto di acido lattico**

Per determinare la presenza e la concentrazione dell'acido lattico abbiamo utilizzato un kit di analisi fornito dalla Megazyme con le seguenti procedure:

Diluizione del campione: La quantità di acido lattico presente nella cuvetta (cioè negli 0,1ml di campione analizzato) deve essere compresa tra 0,5 e 30 µg, la soluzione con il campione deve essere diluita sufficientemente per avere una concentrazione di acido lattico tra i 0,005 e 0,30 g/L, se il valore è troppo basso bisognerà pesare più campione o diluire di meno la soluzione, oppure in alternativa si può incrementare il volume da pipettare fino a 1,5ml, assicurandosi che la somma dei componenti del campione (con acqua distillata) sia di 1,6ml.

Chiarificazione del campione:

soluzione di Carrez 1: sciogliere 3,60 g di esacianoferrato di potassio in 100ml di acqua distillata e mantenere a temperatura ambiente.

Soluzione di Carrez 2: sciogliere 7,20g di solfato di zinco in 100ml di acqua distillata e mantenere a temperatura ambiente.

Procedura: inserire 5g di campione in un matraccio da 100ml e aggiungere 60ml di acqua distillata. Aggiungere nel matraccio 5ml di soluzione di Carrez 1, 5ml della soluzione di Carrez 2 e 10 ml di NaOH (100mM), miscelare ad ogni aggiunta ed infine portare a volume con acqua distillata e poi filtrare il tutto con carta da filtro.

Verifica: la soluzione filtrata va pipettata nelle cuvette da analizzare poi con l'utilizzo dello spettrofotometro.

### **3.5 Determinazione del contenuto di acido acetico**

Per determinare la presenza e la concentrazione dell'acido acetico abbiamo utilizzato un kit rapido di analisi fornito dalla Megazyme con le seguenti procedure:

Diluizione del campione: La quantità di acido lattico presente nella cuvetta (cioè negli 0,1ml di campione analizzato) deve essere compresa tra 0,3 e 25 µg, la soluzione con il campione deve essere diluita sufficientemente per avere una concentrazione di acido lattico tra i 0,03 e 0,25 g/L, se il valore è troppo basso bisognerà pesare più campione o diluire di meno la soluzione, oppure in alternativa si può incrementare il volume da pipettare fino a 2ml, assicurandosi che la somma dei componenti del campione (con acqua distillata) sia di 2,1ml.

La chiarificazione, la procedura e la verifica è uguale a quella descritta precedentemente dell'acido lattico.

### 3.6 Estrazione di RNA e sintesi di cDNA

1,5 mL di ciascun omogenato del campione (diluizione 10<sup>-1</sup>) 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 ° 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.

Il sequenziamento target del gene che codifica per il 16S rRNA e la relativa analisi bioinformatica risultano in fase di esecuzione presso il laboratorio esterno incaricato.

## 4. Risultati e discussione

I risultati delle conte vitali dei campioni analizzati sono mostrati in **Tabella 2** e **Tabella 3**.

**Tabella 2:** risultati delle conte vitali (log ufc/g) di batteri ed eumiceti nel ciauscolo (C) durante la fermentazione e la maturazione

Batch	Tempo di campionamento (giorni)	Batteri lattici	Cocchi coagulasi negativi	<i>Enterobacteriaceae</i>	Eumiceti
1	T0	2.95±0.28	2.87±0.04	3.05±0.08	3.97±0.24
	T5	2.73±0.06	3.21±0.08	3.03±0.04	3.95±0.11
	T10	7.48±0.00	3.75±1.01	2.87±0.12	5.52±0.23
	T20	8.18±0.06	2.56±0.03	2.22±0.14	4.31±0.47
2	T0	3.20±0.23	3.15±0.03	1.93±0.09	3.81±0.06
	T5	2.97±0.04	3.42±0.12	1.86±0.25	3.98±0.25
	T10	3.25±0.31	2.89±0.62	1.67±0.24	4.06±0.14
	T20	7.55±0.03	3.85±0.13	1.42±0.17	5.74±0.37

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.



**Tabella 3:** Risultati delle conte vitali (log ufc/g) di batteri ed eumiceti nel ciauscolo (V) durante la fermentazione e la maturazione

Batch	Tempo di campionamento (giorni)	Batteri lattici	Cocchi coagulasi negativi	<i>Enterobacteriaceae</i>	Eumiceti
1	T0	2.87±0.07	3.51±0.01	2.87±0.05	3.84±0.06
	T5	8.03±0.10	4.39±0.14	1.99±0.02	3.07±0.08
	T10	8.13±0.02	5.94±0.51	1.66±0.23	4.40±0.78
	T20	8.26±0.07	4.80±0.39	1.45±0.00	3.50±0.22
2	T0	3.42±0.17	3.45±0.35	1.93±0.18	3.10±0.11
	T5	8.58±0.12	4.39±0.39	<1	3.46±0.35
	T10	8.47±0.41	4.79±0.07	<1	3.94±0.03
	T20	8.95±0.15	4.82±0.17	<1	3.18±0.56

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 C e conte vitali inferiori 1 Log ufc/g per il produttore V. 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 V 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 V (con starter) con valori massimi già a 5 giorni di maturazione. Al contrario, per i prodotti realizzati dal produttore C, 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 C e V 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 V.

I risultati relativi alla misurazione dei parametri chimico-fisici dei campioni analizzati sono mostrati in **Tabella 4** e **Tabella 5**.

**Tabella 4:** I parametri fisico-chimici del salame Ciauscolo (C) durante la fermentazione e la maturazione

Batch	Tempo di campionamento (giorni)	pH	aw	TTA (mL di NaOH 0.1N)	Acido lattico (g/100g)	Acido acetico (g/100g)
1	T0	5.66±0.00	0.959±0.003	6.1±0.14	4.14±0.75	0.08±0.01
	T5	5.87±0.01	0.961±0.000	5.8±0.00	4.44±0.73	0.15±0.02
	T10	5.68±0.01	0.950±0.000	7.0±0.00	5.41±0.05	0.20±0.01
	T20	5.49±0.01	0.954±0.004	9.2±0.57	6.96±0.90	0.55±0.10
2	T0	5.86±0.00	0.960±0.002	5.8±0.21	4.45±0.50	0.08±0.05
	T5	5.75±0.01	0.962±0.001	6.6±0.00	5.14±0.50	0.18±0.07
	T10	5.69±0.01	0.945±0.007	6.8±0.28	5.80±0.77	0.45±0.23
	T20	5.69±0.01	0.954±0.001	7.9±0.49	6.14±0.47	0.59±0.05

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

**Tabella 5:** I parametri fisico-chimici del salame Ciauscolo (V) durante la fermentazione e la maturazione

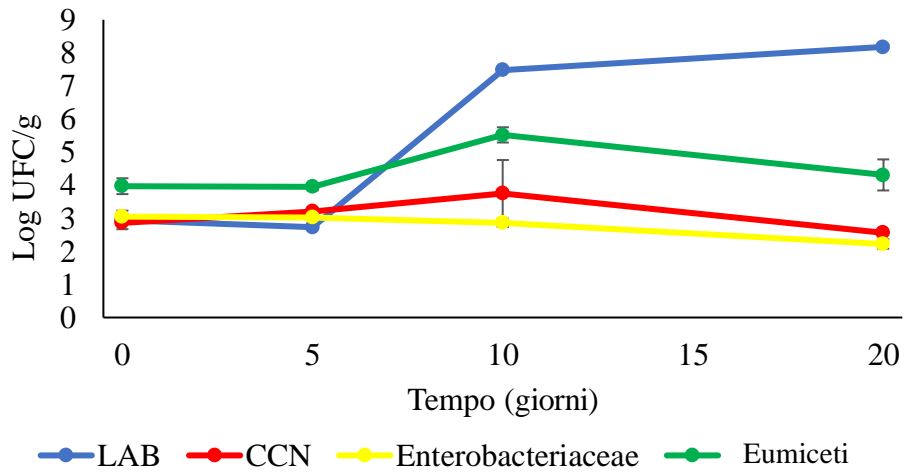
Batch	Tempo di campionamento (giorni)	pH	aw	TTA (mL di NaOH 0.1N)	Acido lattico (g/100g)	Acido acetico (g/100g)
1	T0	5.70±0.04	0.960±0.001	6.6±0.07	3.68±0.27	0.15±0.04
	T5	5.44±0.01	0.954±0.001	7.7±0.07	5.59±0.45	0.34±0.09
	T10	5.55±0.00	0.941±0.001	8.5±0.42	6.84±0.06	0.60±0.08
	T20	5.52±0.01	0.940±0.002	10.1±0.28	6.07±0.57	0.69±0.02
2	T0	5.94±0.01	0.961±0.001	6.6±0.14	4.11±0.03	0.14±0.02
	T5	5.39±0.03	0.955±0.001	8.4±0.21	6.47±0.09	0.33±0.01
	T10	5.23±0.01	0.942±0.001	9.9±0.00	7.63±0.02	0.59±0.31
	T20	5.57±0.06	0.936±0.001	11.0±0.14	9.01±0.03	0.25±0.11

I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

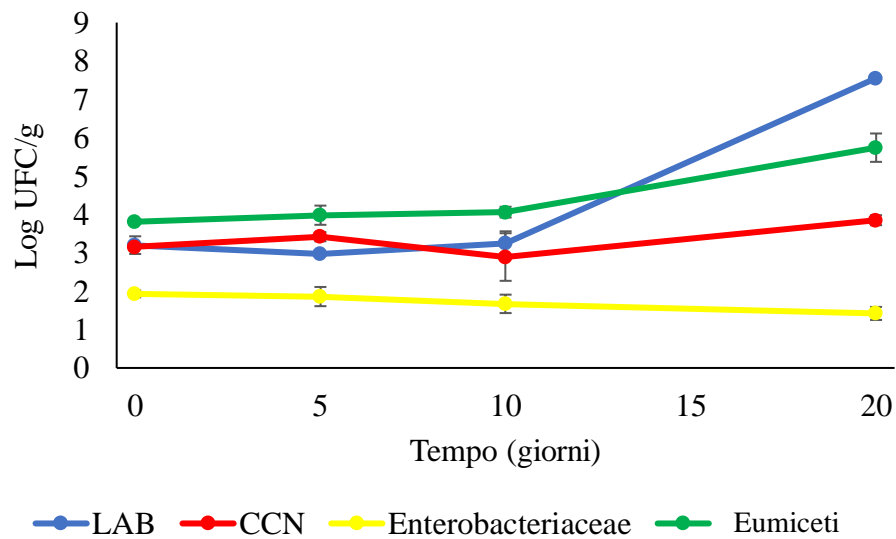
Nelle figure 3 e 4 abbiamo costruito i grafici riassuntivi per entrambi i batch per ogni produttore, ciò ci dimostra con maggior chiarezza l'evoluzione microbica e la differente dinamica presente tra i due tipi di ciauscolo, infatti, confrontando l'attività dei LAB si nota la notevole differenza, nel ciauscolo V grazie all'inoculo con starter crescono molto velocemente in 5 giorni mentre nel ciauscolo C servono più di 10 giorni per arrivare alla stessa carica, un'altra differenza importante è la conta delle Enterobatteriacee, infatti nel ciauscolo V dove sono utilizzati nitrati e nitriti si osserva un bassissima carica, quasi nulla, mentre nel ciauscolo C si è mantenuto il livello di 1 Log UFC/g, è un ottimo risultato ma sicuramente più alto rispetto all'altro produttore che utilizza additivi.

**Figura 3.** Batteri lattici (LAB), cocchi coagulasi negativi (CCN), conte di *Enterobacteriaceae* ed Eumiceti in Batch 1 (grafico A) e Batch 2 (grafico B) del Ciauscolo (C) durante la fermentazione e la maturazione. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

A)

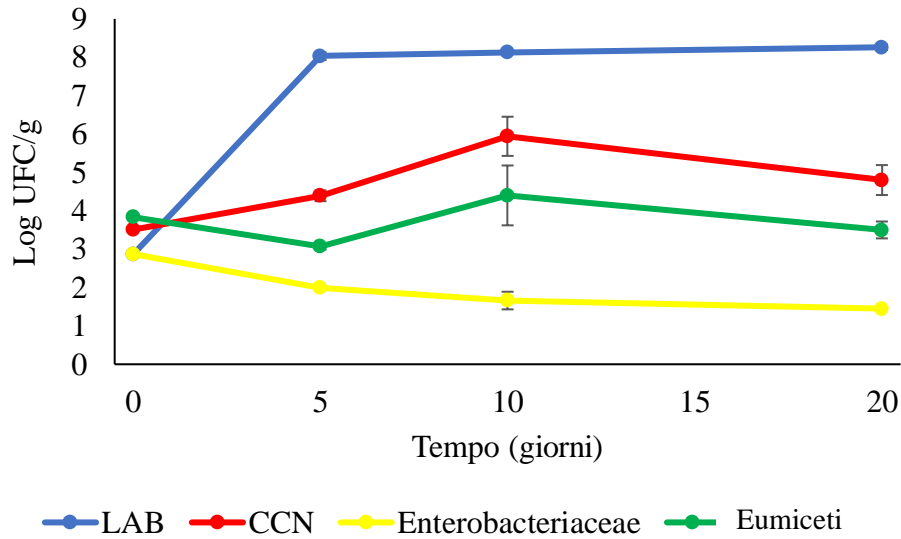


B)

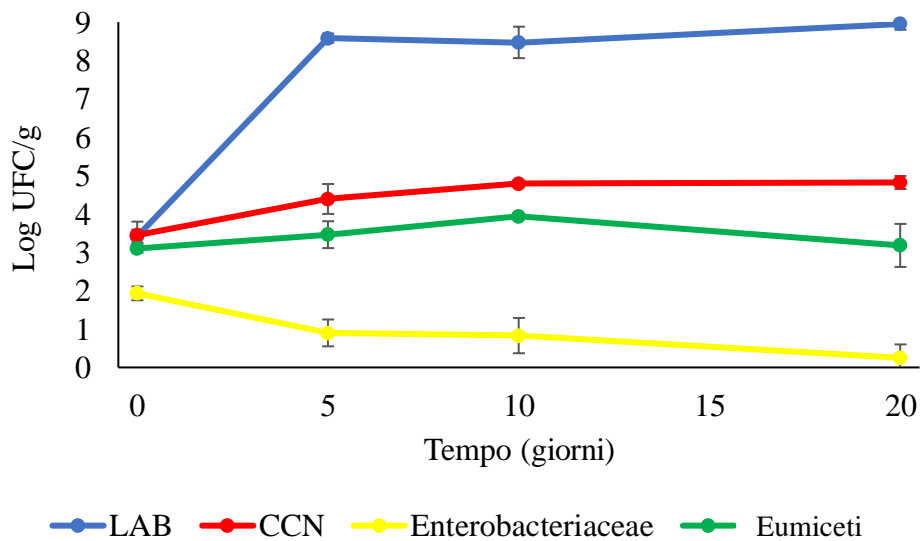


**Figura 4.** Batteri lattici (LAB), cocchi coagulasi negativi (CCN), conte di *Enterobacteriaceae* ed Eumiceti in Batch 1 (grafico A) e Batch 2 (grafico B) del Ciauscolo (V) durante la fermentazione e la maturazione. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

A)



B)



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 (V) hanno mostrato un più marcato abbassamento di pH durante la maturazione, probabilmente 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 V hanno mostrato un abbassamento di pH relativamente più lento ma con valori finali comparabili a quelli dei prodotti del salumificio C. In ogni caso, i valori raggiunti sono conformi a quanto previsto dal disciplinare che stabilisce valori di pH per 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.

Il ciauscolo è l'unico salame protetto dal marchio IGP prodotto nell'Italia centrale; la sua ecologia microbica è stata già affrontata in uno studio riguardante sia le comunità batteriche (LAB e CCN) sia gli eumiceti (lieviti e muffe) in salumi pronti per la vendita, acquistati da 22 stabilimenti situati nella Regione Marche (Silvestri et al., 2007). I risultati dei conteggi validi di LAB e CCN hanno mostrato una certa variabilità (maggiore per i CCN), probabilmente a causa delle differenze nelle tecniche di produzione e nelle condizioni ambientali. Nonostante tale eterogeneità, si è sempre visto un chiaro dominio dei LAB sui CCN, con conteggi per lo più superiori a 7,5 log ufc/g per i LAB e inferiori a 5,0 log ufc/g per i CCN. Sulla base degli indici di diversità calcolati, è stata riscontrata una maggiore eterogeneità per i batteri rispetto lieviti e muffe, confermando così il ruolo secondario di questi ultimi due gruppi microbici nel processo di maturazione del salame. Una delle 22 produzioni di ciauscolo prese in considerazione è stata sottoposta ad un approccio analitico polifasico volto a valutare le dinamiche microbiche durante il processo di produzione (Aquilanti et al., 2007; Santarelli et al., 2007; Petruzzelli et al., 2010). Come previsto sono stati ritrovati carichi elevati di LAB dall'inizio del periodo di maturazione: in effetti dal terzo giorno alla fine della maturazione i valori di log ufc/g erano compresi tra 7 e 8 per LAB, come richiesto dal disciplinare di produzione del ciauscolo IGP, e tra 5 e 6 per i CCN.

## 5. Conclusioni

I risultati della presente tesi hanno messo in luce l'evoluzione delle comunità microbiche che intervengono durante la fermentazione del Ciauscolo.

In particolare, è stato ancora una volta verificato il ruolo fondamentale dei batteri lattici, sia nei salami sperimentali preparati senza l'uso di colture starter, sia in quello realizzati con l'utilizzo di starter commerciali. In questi ultimi, è stata osservata una più alta produzione di acidi organici e un maggiore controllo dei microrganismi indicatori di scarsa igiene quali le Enterobacteriaceae. Infatti, nei salami contenenti starter, l'enumerazione di Enterobacteriaceae ha mostrato livelli più bassi in entrambi i batch di produzione alla fine della maturazione, traducendosi così in una maggiore qualità del prodotto.

Inoltre, appare molto importante sottolineare che in nessun batch di prodotti sottoposti ad analisi microbiologiche sono risultati presenti i patogeni alimentari quali, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, indice di alta qualità delle materie prime utilizzate e dell'igiene del processo di produzione.

## 6. Bibliografia

Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A. and Clementi, F. 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 120(1-2): 136-145.

Aymerich, T., Martìn, B., Garriga M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S. and Hugas, M. 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100(1): 40-49.

Chevallier, I., Ammor, S., Laguet, A., Labayle, S., Castanet, V., Dufour, E. and Talon, R. 2006. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control* 17(6): 446-453.

Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C., Comi, G., 2001. A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of micrococccaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science* 58(1):59-64.

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001b. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16s rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5113-5121.

Cocolin L., Urso R., Rantsiou K., Cantoni C., Comi G.,: Dynamics and characterisation of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Res* 2006, 6, 692.

Coppola, R., Marconi, E., Rossi, F. and Dellaglio, F. 1995. Produzioni artigianali di salame tipo Napoli: aspetti chimici e microbiologici. *Italian Journal of Food Science* 7:5 7-62.

García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I. and Rovira, J. 2000. Characterisation of Micrococccaceae isolated from different varieties of choizo. *International Journal of Food Microbiology* 54(3): 189-195.

Gardini, F., Suzzi G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M., A., Andrighetto, C., Schirone, M. and Tofalo, R. 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research* 1(2): 161-167.

Geyzen, A., Scholliers, P., & Leroy, F., (2012). Innovative traditions in swiftly transforming foodscapes: an exploratory essay. *Trends in Food Science & Technology*, 25, 47-52.

Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C. and Cocolin, L. 2006. Ecology and dynamics of coagulase- negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and applied Microbiology* 29(6):480-486.

Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., Vidal- Carou, M.C. and Talon, R. 2007. Diversity of micro-organisms in environments and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science* 76(1): 112-122.

Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270-285.

Lucke, F.K. 2000. Fermented Meats. In: *Microbiological safety and quality of food*, Lund, B., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. (Eds.) pp.420-444.

Ordòñez, J. A., & de la Hoz, L. (2007). Mediterranean products. In F. Toldrà (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 333-347). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.

Petruzzelli, A., Blasi, G., Masini, L., Calza, L., Duranti, A., Santarelli, S., Fisichella, S., Pezzotti, G., Aquilanti, L., Osimani, A. and Tonucci, F. 2010. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami manufactured in the Marche region (central Italy), *The Journal of Veterinary Medical Science* 72(4): 499-502.

Rantsiou, K. and Cocolin, L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 108(2): 255-267.

Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichard, J., Tòth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G. and Cocolin, L. 2005a. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology* 22(1): 19-28.

Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo P., Comi, G. and Cocolin, L., 2005b. Culture-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1977-1986.



Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G. and Cocconcelli, P.S., 1998. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of applied Microbiology* 84(6) 1043-1049.

Roncalés, P., (2007). Additives. In F., Toldrà (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 77-86). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.

Santarelli, S., Aquilanti, L., Silvestri, G., Osimani, A., Pietruzzelli, A. and Clementi, F., 2007. Evoluzione delle comunità microbiche nel corso della maturazione del Ciauscolo. *Industrie Alimentari* 46:744-748.

Silvestri, G., Santarelli, S., Aquilanti, L., Beccaceci, A., Osimani, A., Tonucci, F. and Clementi, F., 2007. Investigation of the microbial ecology of ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science* 77(3): 413-423.

Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, 15, 259-266.

Talon, R., Leroy-Setrin, S. and Fadda, S., 2004. Dry fermented sausages – Chapter 23. In Y.H. Hui, L. Meunier-Goddik, A.S. Hansen, J. Josephsen, W.-K. Nip, & P.S. Stanfield, et al. (Eds), *Handbook of food and beverage fermentation technology* (pp. 397-416). New York: Marcel Dekker Inc.

Talon, R. and Leroy, S., 2006. Latest developments in meat bacterial starters -Chapter 16. In L. Nollet & F. Toldrà (Eds.), *Advanced technologies for meat processing* (pp.401-418). New York: CRC Press/Taylor and Francis Group.

Talon, R., Leroy, S. and Lebert, I., 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77(1): 55-62.

Urso, R., Comi, G., and Coccolin, L., 2006. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 29(8): 671-680.

Zeuthen, P., 2007. A historical prespective of meat fermentation. In F. Toldrà (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry* (pp.3-8). Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing.