



Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione tecnologica di ceppi isolati in un prodotto IGP della Regione Marche: il Ciauscolo - Study of the native flora in food bio-preservation: technological characterization of strains isolated in a traditional salami of the Marche Region (Italy): The "Ciauscolo"

Ciarrocchi F., Briscolini S., Lanciotti M., Striano G., Palombo B., Blasi G.

Abstract The main objective of this research is the study of the native flora of "Ciauscolo", a traditional salami of Marche Region (Italy), whose methods of production, currently, does not involve the use of starter cultures. The study is part of the research project: "Study of the native flora in food bioconservatives: characterization of strains isolated from traditional products of the Marche Region." The identification of some strains with strong technology attitudes, suggests a possible use of these microorganisms for the formulation of autochthonous starter cultures.

Riassunto. L'obiettivo principale di questa ricerca è lo studio della flora autoctona del Ciauscolo, un insaccato fermentato tradizionale marchigiano, le cui metodiche di produzione, attualmente, non prevedono l'impiego di colture starter. Lo studio si inserisce all'interno di un progetto di ricerca corrente: "Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione dei ceppi isolati in prodotti tradizionali della Regione Marche". L'individuazione di alcuni ceppi dalle spiccate attitudini tecnologiche, suggerisce un possibile impiego di queste colture per la formulazione di colture starter autoctone a composizione mista.

Introduzione

Il Ciauscolo è un insaccato fermentato tradizionale marchigiano, le cui metodiche di produzione, consolidate nel tempo, non prevedono l'impiego di colture starter. Come per altri prodotti tradizionali, l'importanza dello studio della microflora autoctona coinvolta nel processo produttivo risiede nella possibilità di valorizzare ulteriormente questo tipo di prodotto e al contempo, promuovere e approfondire il legame tra prodotto tipico, località e tecnologia di produzione. Questo studio si inserisce all'interno di un progetto di ricerca corrente: "Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione dei ceppi isolati in prodotti tradizionali della Regione Marche".

L'obiettivo principale di questa ricerca ha riguardato lo studio della flora autoctona del Ciauscolo mediante l'impiego di tecniche innovative di identificazione rapida di questi microrganismi e di valorizzazione del loro utilizzo, attraverso lo studio delle attività biochimiche e antagoniste di interesse tecnologico.

Materiali e metodi

Vengono di seguito descritti sinteticamente gli aspetti salienti dei materiali e metodi adottati nella presente ricerca.

Cepi batterici: sono stati impiegati 72 ceppi di batteri lattici (LAB) e 11 ceppi di cocchi coagulasi negativi (CCN) precedentemente identificati e genotipizzati con metodiche molecolari e provenienti da lotti diversi di Ciauscolo (Tabella 1).

Tabella 1. Gruppi microbici sottoposti alle indagini sull'attività antimicrobica e sulle attività tecnologiche di interesse per la produzione di insaccati fermentati	
Specie	n. ceppi
Lb. plantarum	14
Lb. paraplantarum	4
Lb. sakei	23
P. pentosaceus	15
Lb. johnsonii	1
Lc. garviae	1
Lb. casei	1
Lc. lactis	2
Lb. reuteri	1
S. saprophyticus ssp. saprophyticus	8
Lb. brevis	2
S. xylosus	2
S. carnosus	1
Lb. casei/ paracasei	2
Lb. curvatus	2
Leuc. mesenteroides	2
Lb. curvatus	1
S. epidermidis	1
Totale	83

Attività antagonistica nei confronti di Listeria monocytogenes: il saggio è stato condotto sui LAB mediante "Agar spot test", nei confronti di *L. monocytogenes*. 10 µL di ciascuna coltura overnight di LAB in brodo MRS sono stati inoculati sulla superficie delle piastre seminate con ceppi di *L. monocytogenes*, 4 isolati da produzioni carnee locali ed un ceppo di collezione (ATCC 7644). L'attività antimicrobica dei ceppi è stata valutata mediante la rilevazione della presenza di un alone di inibizione intorno alle colture seminate dopo 48 ore di incubazione in anaerobiosi a 37 °C.

Attività acidificante: il saggio, effettuato sui LAB, è stato condotto mediante il terreno liquido SB, formulato per simulare alcune condizioni della produzione di insaccati carnei. Il pH è stato misurato prima dell'inoculo (pH T0) e dopo incubazione a 25°C per 16 (pH T16), 72 (pH T72) e 96 (pH T96) ore.

Attività proteolitica: tale valutazione è stata condotta sui LAB e sui CCN su terreno agarizzato inoculato con la frazione sarcoplasmatica e miofibrillare delle proteine di carne suina. L'attività proteolitica è stata valutata mediante "agar plate assay".

Attività lipolitica: la prova è stata condotta sui CCN mediante “agar plate assay”, su Tributyrin agar. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, specie riconosciuta dalle capacità lipolitiche, è stato usato come controllo positivo. L’attività lipolitica è stata valutata mediante misurazione dell’alone di chiarificazione formatosi intorno agli spot dopo 48 e 72 ore di incubazione a 37 °C. I valori registrati sono stati sottoposti ad ANOVA, al fine di individuare gli isolati caratterizzati da attività statisticamente differenti ($P < 0,05$) sia all’ interno delle specie, sia tra le specie appartenenti alle diverse produzioni investigate.

Risultati

Il 72 % dei LAB studiati ha mostrato di avere attività antibatterica nei confronti di almeno un ceppo target, con la formazione di un alone di inibizione superiore ad 1 mm. All’ interno delle specie *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*, è stata registrata la coesistenza tra stipiti completamente inattivi e stipiti dall’ elevata azione inibitrice, con il raggiungimento di un alone di inibizione uguale o maggiore di 3 mm (Figura 1). E’ interessante notare come *Lb. sakei* 48420-1 abbia mostrato la migliore attività antagonistica contro tutte le listerie.

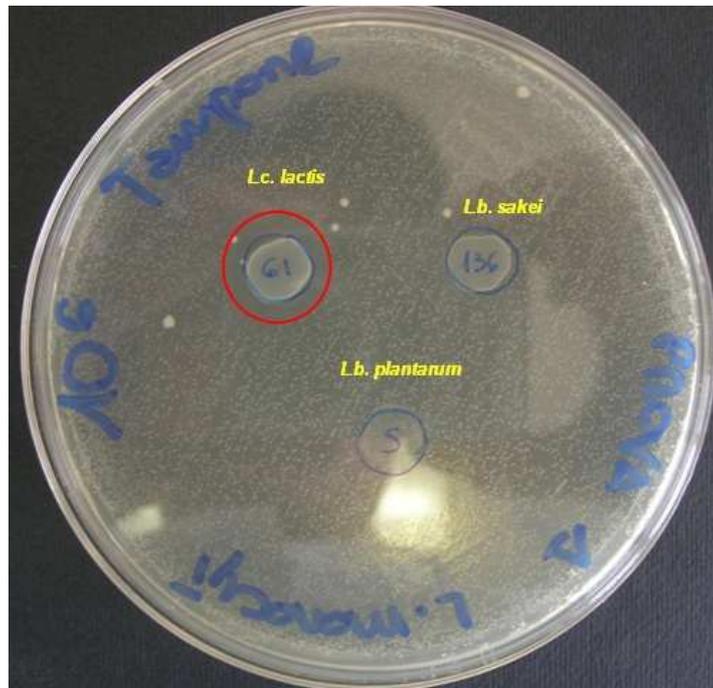


Figura 1. Attività antagonistica nei confronti di *L. monocytogenes* da parte di tre ceppi appartenenti alle specie *Lc. lactis*, *Lb. sakei* e *Lb. plantarum*. Il cerchio rosso evidenzia l’alone di inibizione prodotto.

Dai risultati della valutazione dell’ attività acidificante si può notare come esistano evidenti differenze, sia a livello inter-specifico, sia intra-specifico (Tabella 2). Le due specie eterofermentanti facoltative *Lb. plantarum* e *Lb. paraplantarum* hanno manifestato la migliore attitudine all’ acidificazione, sia in termini di velocità (pH T16), sia in termini di capacità acidificante totale (pH T96). Hanno evidenziato una buona attitudine acidificante anche *Leuconostoc mesenteroides* (13123-19), *P. pentosaceus* (43072-1) e *Lb. curvatus* (16128-1). Quest’ultima è infatti riconosciuta, insieme a *Lb. sakei*, come la specie responsabile dell’ acidificazione dell’ impasto carneo sin dalle prime fasi della fermentazione.

Tabella 2. Attività acidificante dei 72 ceppi di batteri lattici dopo 16, 72 e 96 ore di incubazione, espressa come differenza tra il valore registrato immediatamente dopo l' inoculo e quello registrato al termine del periodo di incubazione													
n. ceppi	Specie	pH 16 h				pH 72 h				pH 96 h			
		Min	Max	Media	DS	Min	Max	Media	DS	Min	Max	Media	DS
14	Lb. plantarum	0,02	0,58	0,18	0,21	0,09	1,67	1,00	0,44	0,10	1,74	1,28	0,44
4	Lb. paraplantarum	0,02	0,51	0,18	0,22	0,24	1,23	0,96	0,48	1,21	1,44	1,35	0,10
23	Lb. sakei	0,01	0,56	0,09	0,10	0,09	1,21	0,40	0,34	0,09	1,44	0,70	0,45
16	P. pentosaceus	0,01	0,56	0,08	0,11	0,33	1,68	0,76	0,31	0,20	1,69	0,92	0,30
1	Lb. casei	0,22	0,22	-	-	0,29	0,29	-	-	0,36	0,36	-	-
2	Lb. paracasei	0,10	0,21	0,12	0,07	0,10	0,31	0,26	0,07	0,28	0,40	0,34	0,09
2	Lc. lactis	0,17	0,17	0,17	0,00	0,32	0,65	0,49	0,23	0,86	0,90	0,88	0,03
2	Lb. brevis	0,03	0,11	0,05	0,05	0,47	0,87	0,67	0,40	0,94	0,99	0,96	0,03
1	Lb. johnsonii	0,30	0,30	-	-	0,31	0,31	-	-	0,36	0,36	-	-
1	Lc. garviae	0,19	0,19	-	-	0,34	0,34	-	-	0,52	0,52	-	-
1	Lb reuteri	0,30	0,30	-	-	0,09	0,09	-	-	0,09	0,09	-	-
2	L. mesenteroides	0,07	0,12	0,07	0,04	0,31	1,33	0,82	0,67	0,80	1,47	1,13	0,47
3	Lb. curvatus	0,07	0,21	0,10	0,09	0,20	1,39	0,60	0,68	0,25	1,41	0,65	0,66

Per il 50 % ca dei ceppi saggiati è stato possibile evidenziare capacità proteolitica. In particolare, l'attitudine ad idrolizzare la componente proteica del mezzo è risultata superiore nella microflora lattica, rispetto al gruppo dei CCN (dati non mostrati). Cinque ceppi maggiormente proteolitici, in grado di formare un alone di chiarificazione superiore ai 3 mm, sono stati attribuiti alle specie P. pentosaceus, Lb. paracasei , Lb. plantarum, Lb. sakei ssp. sakei.

Tutti i ceppi CCN saggiati hanno dimostrato di possedere attività lipolitica in seguito a semina su terreno agarizzato (Tabella 3). Staphylococcus saprophyticus ha mostrato la migliore attività lipolitica dopo 48 ore di incubazione, mentre S. xylosus è risultata possedere la maggiore capacità lipolitica dopo 72 ore di incubazione.

Tabella 3. Attività lipolitica dei ceppi. I valori sono espressi come media delle due misurazioni degli aloni di chiarificazione (mm). Le medie nella stessa colonna con la stessa lettera non sono significativamente differenti (P> 0,05).

Ditta	Specie	Ceppo	Lipolisi (mm) 48 h	Lipolisi (mm) 72 h
1	<i>S. saprophyticus</i> ssp. <i>saprophyticus</i>	12668-10	3,5 ^{ef}	4,45 ^f
		12971-1	3,07 ^{ef}	4,90 ^g
		15958-1	3,63 ^f	4,36 ^{ef}
2	<i>S. saprophyticus</i>	9202-5	1,28 ^{abc}	2,37 ^a
		9202-9	4,16 ^g	5,13 ^g
		62781-7	3,43 ^{ef}	4,12 ^{de}
3	<i>S. saprophyticus</i>	59574-6	1,13 ^{ab}	2,19 ^a
		7828-7	1,81 ^c	4,60 ^f
4	<i>S. saprophyticus</i>	29448-6	1,27 ^{abc}	2,10 ^a
5	<i>S. saprophyticus</i>	48420-26	1,61 ^{ac}	2,29 ^a
		48420-27	2,49 ^d	4,16 ^e
		48420-28	3,37 ^{ef}	6,80 ^l
		48420-29	3,27 ^{ef}	6,41 ⁱ
		48420-30	2,93 ^{def}	6,31 ⁱ
5	<i>S. carnosus</i>	48420-18	1,71 ^{ac}	3,49 ^c
		48420-19	1,68 ^{ac}	2,39 ^a
		48420-20	1,76 ^c	2,92 ^b
		48420-22	1,85 ^c	3,88 ^d
		48420-23	1,62 ^{ac}	4,13 ^{de}
		48420-25	1,61 ^{ac}	3,09 ^b
5	<i>S. xylosus</i>	48420-21	1,69 ^{ac}	7,03 ^l
		48420-24	5,42 ^h	6,86 ^l
6	<i>S. xylosus</i>	10814-19	1,60 ^{abc}	5,89 ^h
		10814-22	1,77 ^c	6,38 ⁱ
CP	<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	3,55 ^f	9,01 ^m

La valutazione delle attività tecnologiche, nonché lo studio dell'attitudine dei ceppi selezionati alla bioconservazione dell'alimento mediante attività anti-*Listeria*, ha evidenziato diversi livelli di eterogeneità tecnologica, inter- e intraspecifica, degli stipti isolati, correlabile all'elevata eterogeneità genetica della popolazione microbica tipica del Ciauscolo. Non tutte le specie saggiate hanno mostrato capacità di idrolizzare le proteine della carne. Tutti i ceppi CCN saggiati hanno dimostrato di possedere attività lipolitica ma come riscontrato per le altre attività tecnologiche

studiate, sono stati osservati diversi livelli di intensità sia a livello di specie, sia a livello di stipite batterico. L'individuazione di alcuni ceppi dalle spiccate attitudini tecnologiche (Lb. sakei 48420-1 per l'attività anti-Listeria, Staphylococcus xylosus 48420-24 per l'attività lipolitica e le specie Lb. plantarum e Lb. paraplantarum per l'attività acidificante) suggerisce un possibile impiego di queste colture per la formulazione di colture starter autoctone a composizione mista.

Lavoro presentato al: *XXI CONVEGNONAZIONALE AIVI- Firenze*, 8-10 Giugno 2011.
Progetto di Ricerca Corrente realizzato con i fondi del Ministero della Salute



Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione tecnologica di ceppi isolati in un prodotto IGP della Regione Marche: il Ciauscolo by Ciarrocchi F, et al, 2011 is licensed under a Creative Commons Attribution 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it