



Ancona, 30/09/2019
All' Agenzia per i Servizi nel
Settore Agroalimentare delle
Marche – ASSAM

OGGETTO: *Relazione finale relativa al progetto Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"*

1. Premessa

L'attività di ricerca svolta, finalizzata allo studio della biodiversità microbica relativa alla produzione di formaggio di tipo pecorino, ha visto coinvolte cinque aziende agrarie ubicate nell'area del sisma del 2016 nei monti Sibillini.

In tutti i caseifici (identificati con le sigle MM-caseificio 1; BB-caseificio 2; L-caseificio 3; A-caseificio 4; PC-caseificio 5) sono stati effettuati campionamenti sia negli ambienti di lavorazione che nei formaggi a vari stati di maturazione, laddove possibile. Unica eccezione per il caseificio A, nel quale al momento del campionamento non erano disponibili formaggi e quindi si è proceduto con il solo monitoraggio degli ambienti di lavoro. Per ogni caseificio è stato anche effettuato un campionamento diretto dell'aria mediante l'utilizzo di un sistema di filtrazione collegato a una piastra sterile (Napoli et al., 2012).

Le modalità di campionamento si sono svolte con procedure identiche per ogni caseificio e secondo quanto riportato in bibliografia (unitamente alle direttive Reg. CE 882/04 relativo ai controlli ufficiali in ambito alimentare).

Brevemente: i) relativamente agli ambienti sono state campionate mediante l'uso di tamponi sterili immersi in soluzione fisiologica, superfici di muri, pavimenti, interstizi muro/pavimento, piani di lavoro e di appoggio utilizzando apposite mascherine sterili in grado di circoscrivere un'area di 10 cm²; ii) relativamente ai formaggi sono state prelevate porzioni di formaggio che includevano anche la crosta, non meno di 250 g mediate l'uso di appositi bisturi sterili, messi poi all'interno di sacchetti sterili chiusi ermeticamente.



Tutti i campioni prelevati sono stati conservati a 4 °C sino all'arrivo in laboratorio, dove sono state svolte le analisi.

Ogni campione (formaggi e tamponi ambientali) è stato sottoposto a adeguate diluizioni seriali in acqua peptonata sterile al fine di rendere il campione adeguato alla fase successiva di semina in piastra. L'uso combinato di terreni solidi di coltura selettivi e/o differenziali (YPDA, WL e Rose Bengal addizionato di cloranfenicolo per i lieviti e PCA, M17 e MRS per i batteri) ha permesso di indentificare e quantizzare i seguenti gruppi microbici:

- lieviti
- muffe
- batteri lattici omo ed etero fermentanti
- enterobatteri e salmonelle.

I campioni seminati sono stati incubati alle apposite temperature e condizioni di aerofilia sino alla comparsa delle colonie. Laddove la valutazione dell'aspetto macro morfologico delle colonie destasse dubbio, una ulteriore osservazione microscopica delle singole cellule è stata effettuata.

Ogni campione di lievito proveniente da colonia singola, con caratteristiche macro/micro morfologiche comuni (appartenenti presumibilmente a distinti gruppi fenotipici) è stato isolato e successivamente elaborato secondo protocolli molecolari e sottoposto ad analisi di sequenziamento (ditta Genewiz European Headquarters, Germany Sanger DNA sequencing).

I campioni di batteri, una volta enumerati sono stati solo crioconservati in modo rappresentativo.

Avvenuto il sequenziamento, i lieviti identificati (per un numero pari a 92 di cui 44 provenienti dai formaggi e 48 provenienti dagli ambienti) sono stati rinfrescati in duplice copia, di cui una inserita nella ceppoteca del DiSVA (enumerati secondo i codici riportati in tabella), l'altra disponibile per le analisi fenotipiche.

Queste ultime hanno previsto dei semplici saggi in piastra per valutare le attività lipolitica, proteolitica, killer, esterasica, antiossidante e la capacità di crescere/sopravvivere a 37°C con e senza la presenza di sali biliari, seguendo i protocolli standardizzati riportati in letteratura (Rosini, 1985; Buzzini and Martini, 2002; Kühle et al., 2005; Chen et al., 2010).



2. Obiettivi della ricerca

La presente attività ha avuto lo scopo di:

- stimare la presenza di lieviti e batteri (sia lattici che enterici, questi ultimi come indice di contaminazione fecale) in formaggi di tipo pecorino a latte crudo prodotti nella zona dei monti Sibillini, Regione Marche, in particolar modo nelle aziende che non usano inoculi commerciali (eccezione caseificio PC);
- ottenere informazioni riguardo la presenza di lieviti, batteri e muffe negli ambienti di lavorazione e stagionatura dei formaggi, nonché nelle celle di conservazione;
- identificare mediante metodi molecolari i lieviti isolati ed ascriverli al relativo Genere e specie;
- caratterizzare i lieviti identificati per rendere noti i principali tratti fenotipico/fisiologici caratterizzanti il loro ruolo durante la maturazione dei formaggi;
- creare una ceppoteca al fine di avere crioconservati nel tempo i ceppi di lievito di cui sopra.

I risultati di seguito verranno riportati dapprima singolarmente per ogni caseificio e poi verrà fatta una analisi comparativa per gruppi microbici e per caseificio, con lo scopo di valutare l'influenza dell'ambiente e delle tecniche di lavorazione, sulla biodiversità microbica.

3. BIBLIOGRAFIA

- Buzzini, P., & Martini, A. (2002). Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J. of Appl. Microbiol.* 93(6), 1020-1025.
- Chen, L.S., Ma, Y., Maubois, J.L., Chen, L.J., Liu, Q.H., Guo, J.P. (2010). Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 47-54.



- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2005). In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. of Food Microbiol.* 101(1), 29-39.
- Napoli, C., Marcotrigiano, V., Montagna, M. T. (2012). Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*, 12(1), 594.
- Rosini, G. (1985). Interaction between killer strains of *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast species. *Can. J. Microbiol.* 31, 300-302

4. Risultati ottenuti: elaborazione grafica e discussione divisa per caseifici

4.1 MM - Caseificio 1

La valutazione della microflora dei campioni ambientali dell'MM – Caseificio 1 ha mostrato una concentrazione di lieviti compresa tra 10^3 e 10^6 UFC/cm² dove le concentrazioni maggiori erano relative ai campioni tavole in legno (faggio) utilizzate come appoggio per le forme in fase di maturazione e teli in cotone interposti tra le tavole e le suddette forme di formaggio. Relativamente ai batteri lattici, la concentrazione tra lattobacilli e lattococchi è stata pressoché confrontabile in tutti i campioni (eccezione per un campione di muro dove la concentrazione dei lattobacilli mostrava tre ordini log superiori rispetto ai lattococchi). In ogni caso, i batteri lattici negli ambienti sono stati ritrovati in quantitativi pari a 10^5 UFC/cm² (risultato atteso, già riportato in bibliografia). La concentrazione degli enterobatteri era inferiore a 10^3 UFC/cm² (unica eccezione telo di cotone, un ordine di grandezza superiore) (Figura 1).

Valutazione microbica della qualità dell'aria:

- Batteri: 4×10^2 UFC/m³
- Muffe: $> 1 \times 10^3$ UFC/m³

Valutazione microbica dell'ambiente:

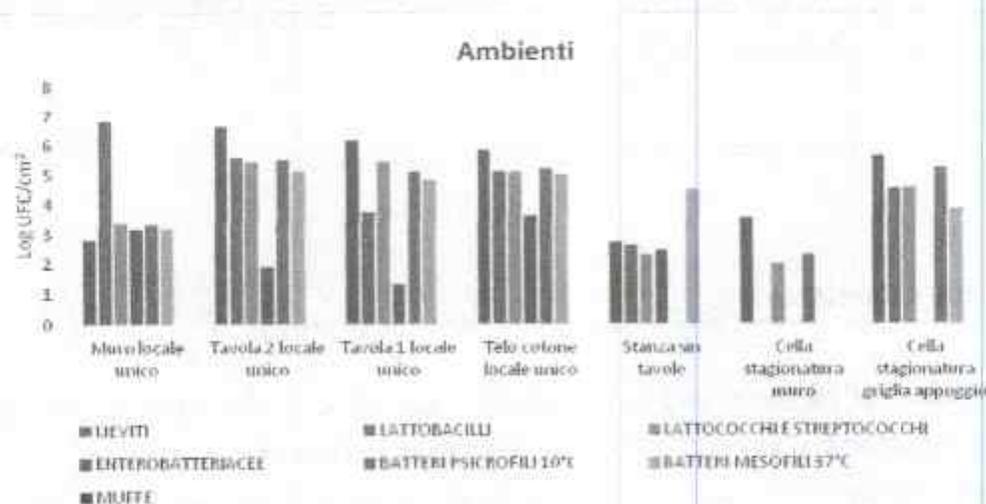


Figura 1. CONTA MICROBICA TOTALE AMBIENTE MM-caseificio 1



Valutazione microbica dei formaggi:

Nel MM-caseificio 1 la presenza di lieviti nei formaggi era costante (10^6 UFC/g) non è stata quindi influenzata dai tempi di maturazione (campioni freschi 3 giorni, stagionati 3 mesi, stagionati più di sei mesi). Stesso risultato per i batteri lattici (lattococchi e lattobacilli nell'ordine di 10^8 UFC/g). Nei formaggi, rispetto agli ambienti, come atteso, la concentrazione delle enterobatteriacee aumentava sino a raggiungere un valore di 10^6 UFC/g nel formaggio fresco, 10^5 UFC/g nel formaggio a stagionatura intermedia, 10^3 UFC/g nel formaggio più stagionato (Figura 2). La valutazione della qualità microbica dell'aria in questo caseificio ha mostrato livelli quantitativi di batteri e muffe che rientravano nella norma.

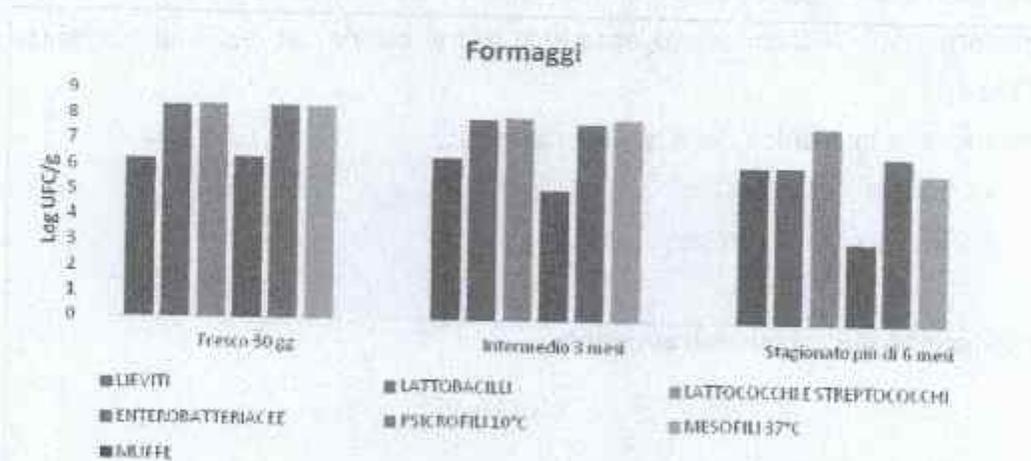


Figura 2. CONTA MICROBICA TOTALE FORMAGGI MM-caseificio 1

4.2 BB - Caseificio 2

Nel caso dei campioni ambientali del BB - Caseificio 2 la concentrazione dei lieviti era costante intorno a valori di 10^4 UFC/cm² seppure assenti in due campioni, muro (poroso in quanto rivestito di materiale plastico) e carrello di acciaio, utilizzato come piano d'appoggio del formaggio. In questo caso la concentrazione di batteri lattici era più bassa rispetto agli



ambienti dell'MM – Caseificio 1 con un ordine di grandezza di 10^4 UFC/cm² (stessa concentrazione tra lattobacilli e lattococchi). Le enterobatteriacee erano assenti in tutti i campioni, fatta eccezione del carrello (Figura 3).

Valutazione microbica della qualità dell'aria:

- Batteri: $1,7 \times 10^2$ UFC/m³
- Muffe: $> 1 \times 10^3$ UFC/m³

Valutazione microbica dell' ambiente:

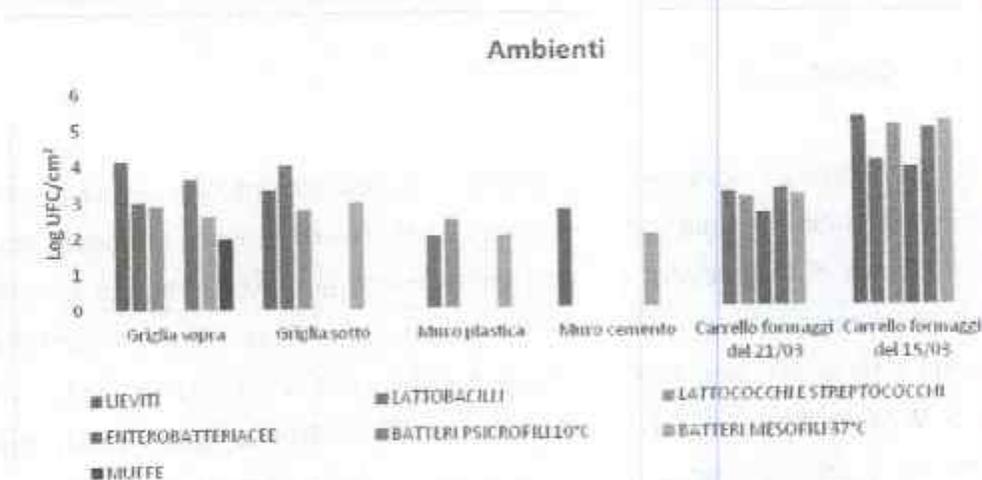


Figura 3. CONTA MICROBICA TOTALE AMBIENTE BB-caseificio 2

Valutazione microbica dei formaggi:

La microflora dei formaggi del BB – Caseificio 2 la concentrazione dei lieviti era costante, intorno a 10^5 UFC/g e non subiva variazione in funzione del grado di stagionatura dei formaggi, analogamente a quanto visto nell'MM – Caseificio 1. I batteri lattici erano presenti con due ordini di grandezza, lattococchi assenti nel formaggio più stagionato (Becerica razza sarda) (Figura 4). La valutazione nell'aria del BB – Caseificio 2 ha mostrato risultati analoghi e confrontabili con quelli dell'MM -Caseificio 1.

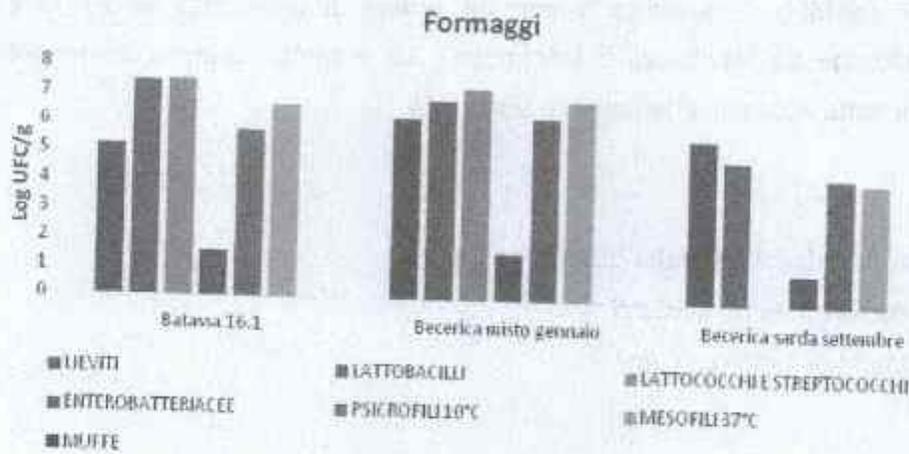


Figura 4. CONTA MICROBICA TOTALE FORMAGGI BB-caseificio 2

4.3 L – Caseificio 3

Nell' L – Caseificio 3 è stato possibile effettuare campionamenti degli ambienti come segue. In maniera del tutto anomala non sono state rilevate cellule di lievito ma batteri coltivabili nel muro del locale di lavorazione, probabilmente dovuto al recente trasloco in locali appena ristrutturati. Analogamente, nel locale di stagionatura a temperatura controllata (cella refrigerata a 16°C) la concentrazione dei lieviti era di gran lunga inferiore rispetto ai locali dei caseifici MM-caseificio 1 e BB-caseificio 2 ($< 10^2$ UFC/cm²). Batteri lattici assenti. Una concentrazione dei lattococchi di 10^6 UFC/cm² è stata ritrovata nelle griglie di acciaio utilizzate come piano d'appoggio nei locali di stagionatura (Figura 5).

Valutazione microbica della qualità dell'aria:

- Lieviti: 2 UFC/m³
- Muffe: $> 1 \times 10^5$ UFC/m³

Valutazione microbica dell'ambiente:

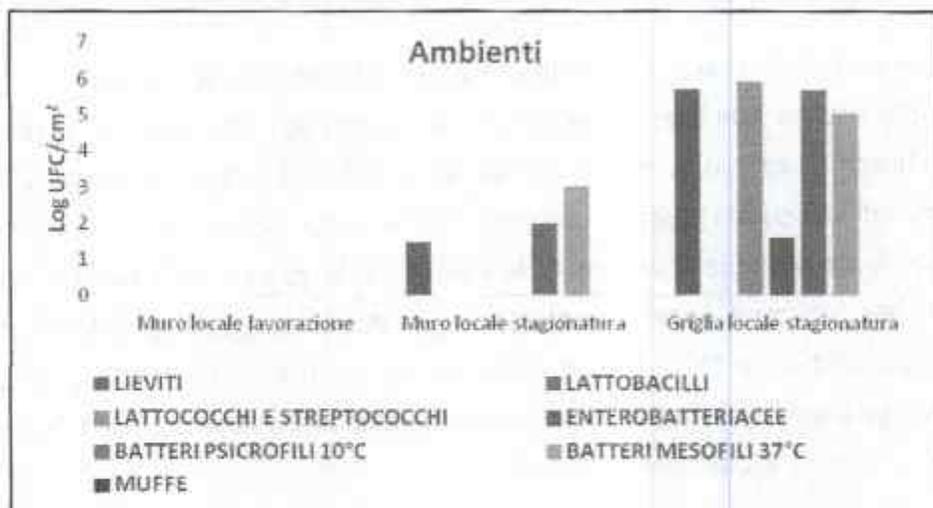


Figura 5. CONTA MICROBICA TOTALE AMBIENTE L-caseificio 3

Valutazione microbica dei formaggi:

Nell' L - Caseificio 3 è stato possibile solo effettuare il campionamento di formaggi freschi (primosale maturazione inferiore a 20 giorni) dove la presenza di lieviti era dell'ordine di 10^5 UFC/g e i batteri lattici due ordini superiori (10^8 UFC/g). Molto alto il numero di enterobatteriacee 10^5 UFC/g probabile sintomo di scarse condizioni igienico sanitarie (Figura 6).

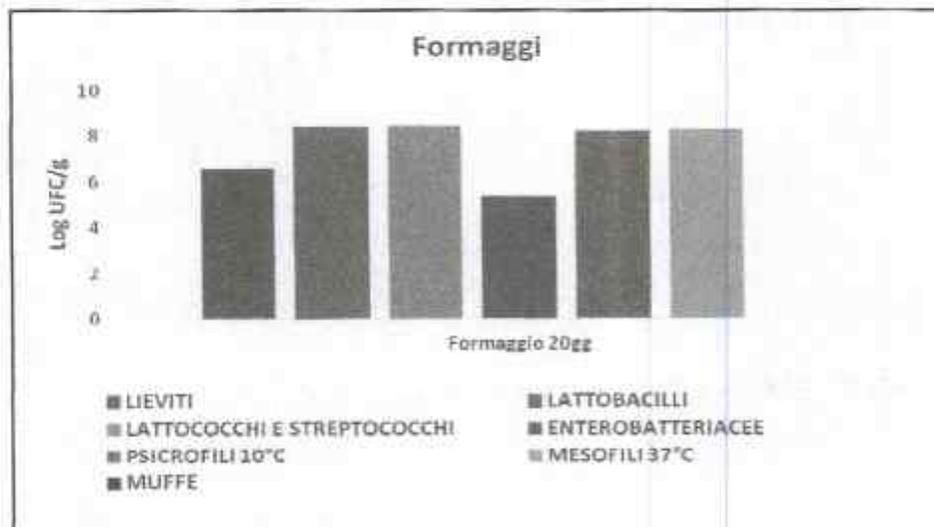


Figura 6. CONTA MICROBICA TOTALE FORMAGGI L-caseificio 3

4.4 A – Caseificio 4

Complessivamente la valutazione della microflora coltivabile degli ambienti A – Caseificio 4 ha mostrato risultati quantitativamente inferiori rispetto agli altri caseifici, probabilmente a causa della sanitizzazione avvenuta appena prima del campionamento. Tuttavia, si è rilevata la presenza di lattococchi seppur in concentrazione molto basse (10^2 - 10^3 UFC/cm²) nei muri della cella di stagionatura e in alcuni cesti usati per lo spurgo della cagliata. Le griglie in acciaio forate, utilizzate come piano d'appoggio dei formaggi nelle celle di stagionatura (temperatura controllata 15°C) la concentrazione dei lieviti aumentava fino a 10^5 UFC/cm² in modo analogo a quella dei batteri lattici (rapporto lattobacilli e lattococchi 1:1, concentrazione finale 10^5 UFC/cm²). Muffe assenti (Figura 7).

Valutazione microbica della qualità dell'aria:

- Muffe: $> 1 \times 10^3$ UFC/m³
- Lieviti: non rilevati a causa della crescita estesa delle muffe sin dopo 24 h dall'incubazione

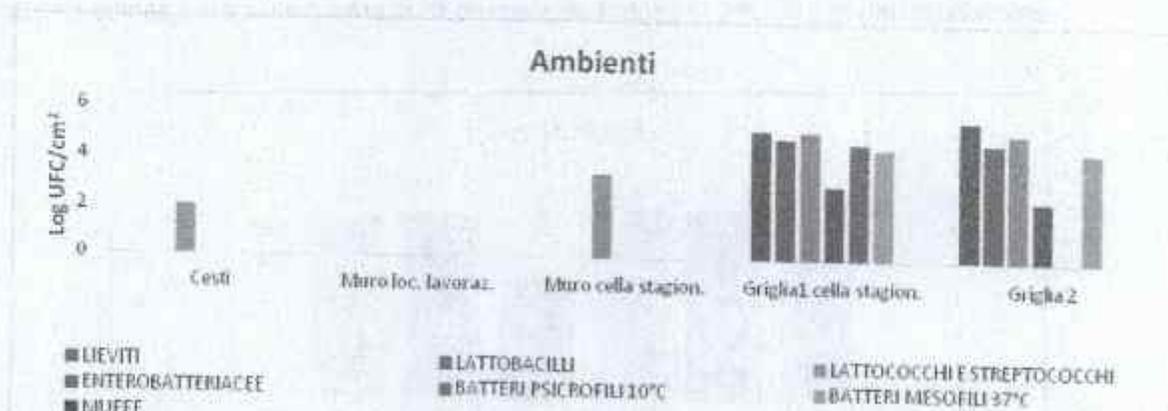


Figura 7. CONTA MICROBICA TOTALE AMBIENTE A-caseificio 4



Valutazione microbica dei formaggi: nessun formaggio in fase di stagionatura al momento del campionamento.

4.5 PC – Caseificio 5

I campioni ambientali provenienti dal PC – Caseificio 5 evidenziano una consistente concentrazione di lieviti in tutti gli ambienti compresa la sala di stagionatura (13°C) dove i lieviti erano gli unici microrganismi coltivabili (batteri lattici, enterobatteriacee e muffe assenti). I lattococchi erano presenti in quasi tutti gli altri ambienti analizzati seppure con una concentrazione più bassa rispetto ai caseifici precedentemente valutati (da 10^2 UFC/cm² a 10^5 UFC/cm²). I lattobacilli sono stati coltivati soltanto dalla griglia della sala di stagionatura e dalla griglia della sala di maturazione, anche in questo caso a concentrazione più bassa rispetto agli altri caseifici 10^4 UFC/cm²). Enterobatteriacee assenti, in linea con un visibile alto livello di igiene (Figura 8).

Valutazione microbica della qualità dell'aria:

- Muffe: $> 1 \times 10^3$ UFC/m³

Valutazione microbica dell' ambiente:

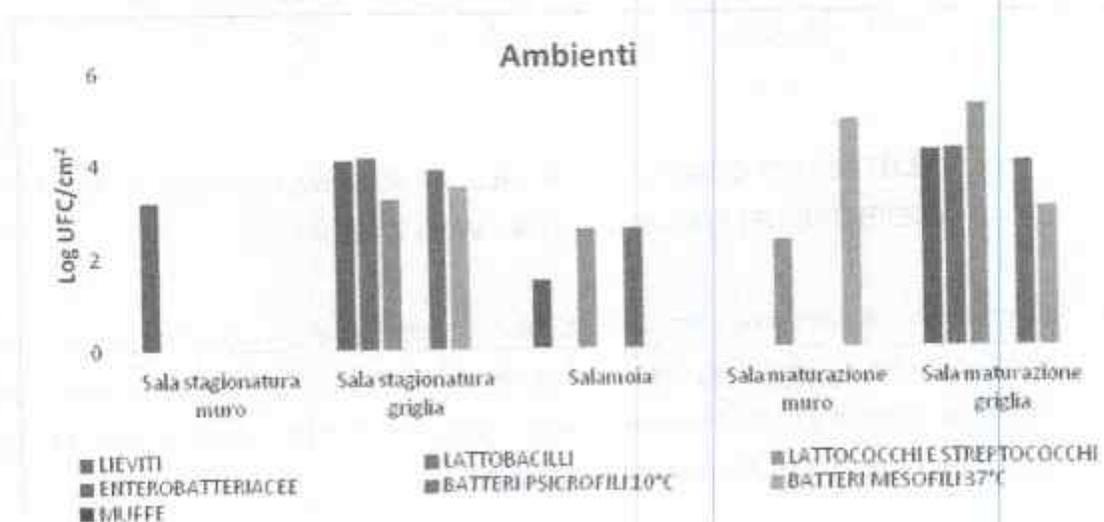


Figura 8. CONTA MICROBICA TOTALE AMBIENTE PC-caseificio 5

Valutazione microbica dei formaggi:

In questo caso, alla cagliata avvenivano aggiunti starter commerciali (diversamente dagli altri caseifici monitorati). Tuttavia, nel formaggio appena messo in forma (2 giorni) i lattococchi erano assenti, i lattobacilli 10^2 UFC/g e i lieviti erano presenti in concentrazioni pari a 10^4 UFC/g. Nelle forme dopo 25 giorni di maturazione il numero dei lieviti aumentano a 10^6 UFC/g, i lattobacilli aumentano a 10^7 UFC/g e si evidenzia la presenza di lattococchi pari a 10^8 UFC/g. Nei formaggi stagionati 18 mesi, il numero dei lieviti rimane costante mentre i batteri lattici (lattobacilli e lattococchi) diminuiscono di due ordini di grandezza. Gli enterobatteri presenti solo nei formaggi freschi (10^2 UFC/g) e assenti nelle forme stagionate, probabile indice di eccellenti condizioni igieniche di tutti i locali del caseificio (Figura 9).

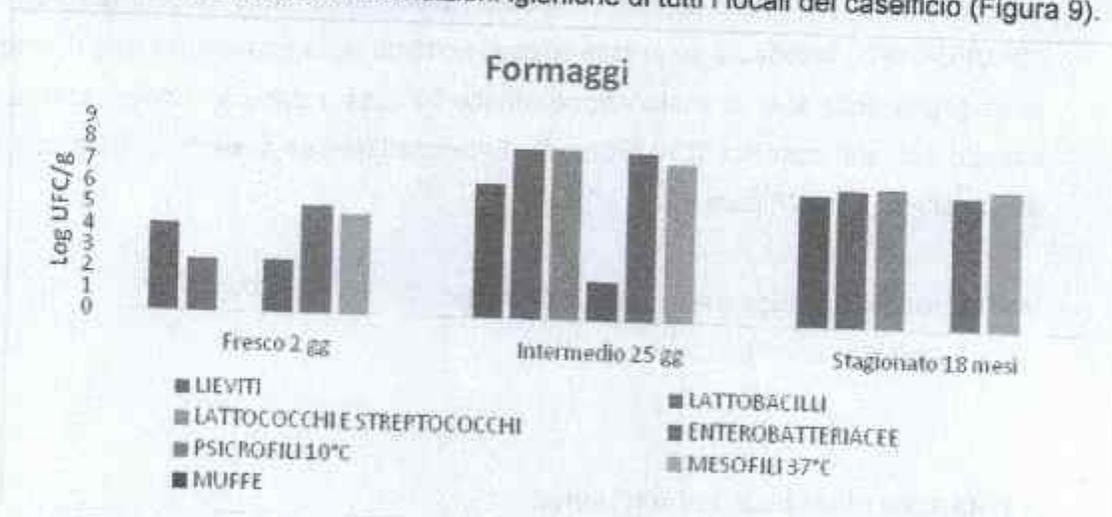


Figura 9. CONTA MICROBICA TOTALE A FORMAGGI PC-caseificio 5

5. VALUTAZIONE COMPARATIVA DELLA PRESENZA DEI LIEVITI NEGLI AMBIENTI E NEI FORMAGGI TRA I VARI CASEIFICI

La presenza di lieviti negli ambienti di tutti i caseifici analizzati, ha messo in evidente una quantizzazione superiore rispetto a quella dei batteri lattici. Tuttavia, un aspetto rilevante è la maggiore concentrazione degli stessi lieviti nelle celle di stagionatura quando la temperatura diminuisce, rispetto agli ambienti di lavorazione.

Nei formaggi freschi (tipo primosale o comunque entro 1 mese dalla messa in forma) la presenza di lieviti è generalmente inferiore a quella dei batteri. La concentrazione dei lieviti rimane uguale o diventa superiore a quella dei batteri, nei formaggi con stagionatura maggiore di 6 mesi. Indice questo di una maggiore tolleranza a condizioni di alofilia (minore attività dell'acqua e quindi maggiore concentrazione di sale) dei lieviti rispetto ai batteri lattici. Probabilmente il ruolo attivo dei lieviti è più evidente man mano che i tempi di stagionatura aumentano (per attività lipolitica e proteolitica vedi tabella 2).

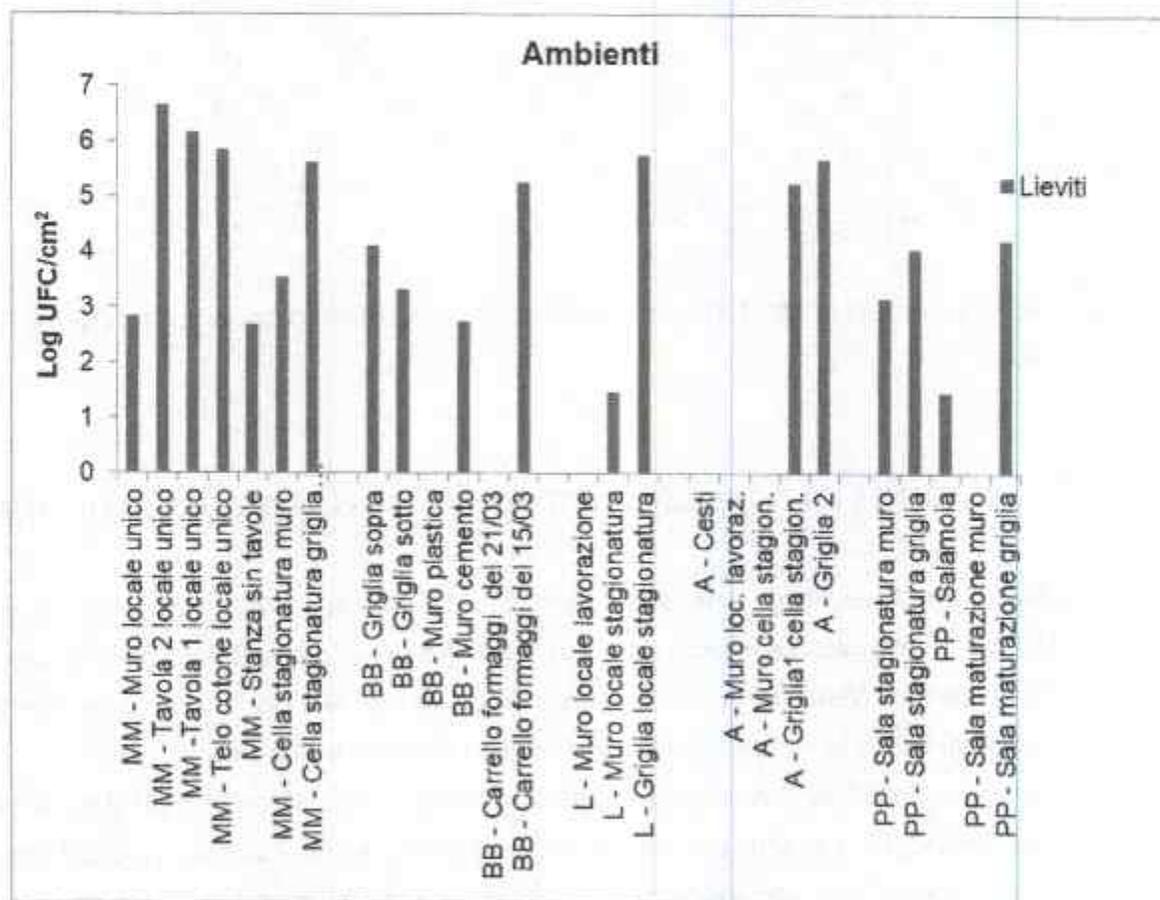


Fig.10 a) ANALISI COMPARATIVA DI LIEVITI RILEVATI NEGLI AMBIENTI IN TUTTI I CASEIFICI VALUTATI

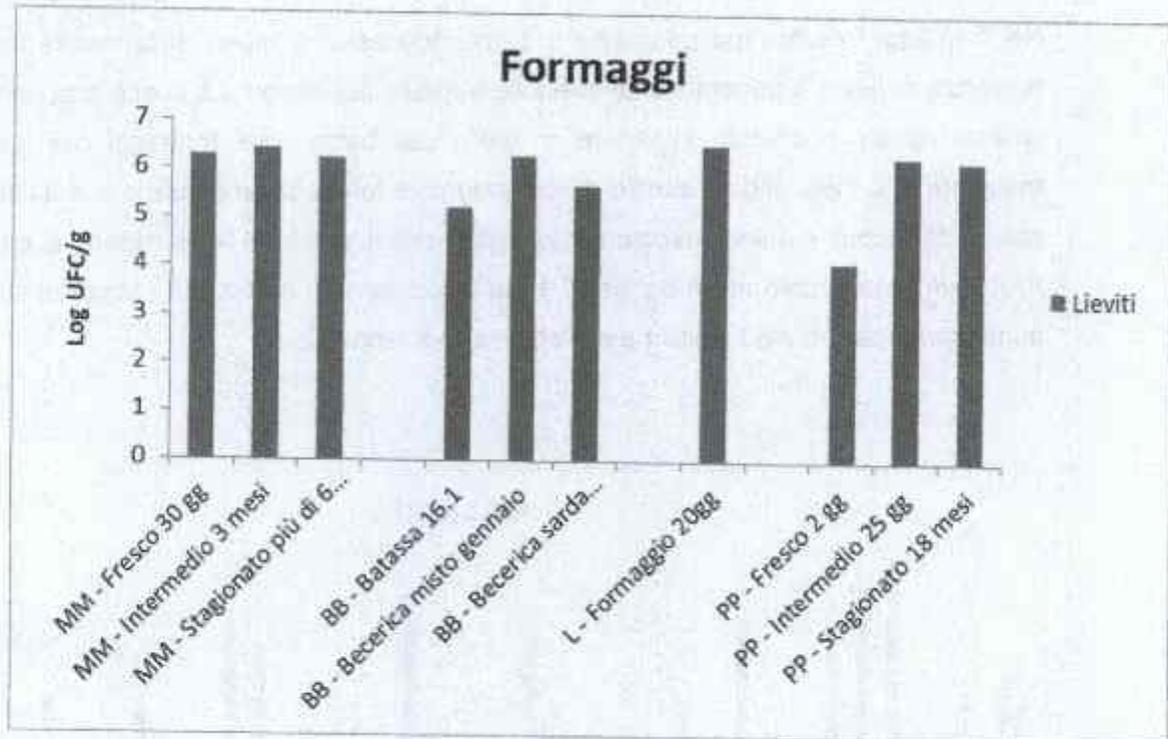


Fig.10 b) ANALISI COMPARATIVA DI LIEVITI RILEVATI NEI FORMAGGI IN TUTTI I CASEIFICI VALUTATI

6. IDENTIFICAZIONE DEI LIEVITI ISOLATI DAGLI AMBIENTI E DAI FORMAGGI

Nell' MM – Caseificio 1 sono stati identificati 38 lieviti, di cui 24 provenienti dall' ambiente e 14 dal formaggio. Le specie ritrovate negli ambienti erano *Candida friedrichii*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula laringis* e *Yarrowia lipolytica*. Nei formaggi *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica*.

Nel BB – Caseificio 2 sono stati identificati 26 lieviti, di cui 12 provenienti dall' ambiente e 14 dal formaggio. Le specie ritrovate negli ambienti erano *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Moniliella spp.*, *Yamadazyma triangularis* e *Yarrowia lipolytica*. Nel formaggio *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Moniliella spp.* e *Yarrowia lipolytica*.

Nel L – Caseificio 3 sono stati identificati 6 lieviti di cui 3 dall'ambiente e 3 dal formaggio, tutti identificati come *Debaryomyces hansenii*.



Nel A – Caseificio 4 sono stati identificati 2 lieviti tutti provenienti dall'ambiente e sono *Candida zeylanoides* e *Debaryomyces hansenii*.

Nel PP- Caseificio 5 sono stati identificati 20 lieviti di cui 7 dagli ambienti e 13 dai formaggi. L'unica specie ritrovata negli ambienti era *Debaryomyces hansenii*, mentre nei formaggi *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces lactis*.

Tutti i ceppi isolati ed identificati sono stati codificati con codice numerico progressivo da 1 a 92 sono riportati in tabella 1.

Codice numerico	Specie	Codice di isolamento	Provenienza	Caratteristiche sequenziamento	Attività enzimatiche
1	<i>Candida friedrichii</i>	MM1_rugosa wl	MM-caseificio 1 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
2	<i>Candida parapsilosis</i>	BB1_lucida ch rose	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
3	<i>Candida parapsilosis</i>	BAT2_lucida wl	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
4	<i>Candida zeylanoides</i>	LAIF1_lucida wl	BB-caseificio 2 A	ITS	
5	<i>Candida zeylanoides</i>	LAIF1_rugosa a rose	BB-caseificio 2 A	ITS	
6	<i>Candida zeylanoides</i>	LAIF1_lucida scuro rose	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
7	<i>Candida zeylanoides</i>	LAIF1_lucida ch rose	BB-caseificio 2 A	ITS	



8	<i>Candida zeylanoides</i>	AN4_lucida p.to scuro rose	A-caseificio 4 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
9	<i>Candida zeylanoides</i>	MMF1_rosa ch lucida rose	MM-caseificio 1 F	ITS	
10	<i>Candida zeylanoides</i>	MMI1_rugosa a rose	MM-caseificio 1 F	ITS	
11	<i>Candida zeylanoides</i>	MMI2_p.to scuro rose	MM-caseificio 1 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
12	<i>Candida zeylanoides</i>	MMI2_lucida rose	MM-caseificio 1 F	ITS	
13	<i>Candida zeylanoides</i>	MM1_lucida rose	MM-caseificio 1 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
14	<i>Candida zeylanoides</i>	MM2_accarto cciata rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
15	<i>Candida zeylanoides</i>	MM4_ch lucida rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
16	<i>Candida zeylanoides</i>	MM4_rugosa rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
17	<i>Candida zeylanoides</i>	MM4_scuro opaca rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
18	<i>Candida zeylanoides</i>	MMF2_opaca a rugosa rose	MM-caseificio 1 F	ITS	
19	<i>Candida zeylanoides</i>	MMF2_p.to scuro rose	MM-caseificio 1 F	ITS	



20	<i>Candida zeylanoides</i>	MMS2_verd lucida wl	MM-caseificio 1 F	ITS	
21	<i>Candida zeylanoides</i>	MM2_opaca rugosa rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
22	<i>Candida zeylanoides</i>	MM2_lucida ch rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
23	<i>Candida zeylanoides</i>	MMF1_scura /chiara wl	MM-caseificio 1 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
24	<i>Candida zeylanoides</i>	MMS1_scura rose	MM-caseificio 1 F	ITS	
25	<i>Candida zeylanoides</i>	BAT1_lucida rose	BB-caseificio F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
26	<i>Candida zeylanoides</i>	BB2_picc verde wl	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
27	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCF1_verde ch lucida wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
28	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCF1_opaca wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
29	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCF1_rosa ch piccola rose	PC-caseificio 5 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
30	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCF2_opaca rose	PC-caseificio 5 F	ITS	
31	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCF2_lucida p.to scuro rose	PC-caseificio 5 F	ITS	
32	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCS1_verde ch lucida wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
33	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCS1_opaca rose	PC-caseificio 5 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche



34	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCS2_verde opaca wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
35	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCS2_rosa scura lucida rose	PC-caseificio 5 F	ITS	
36	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCI1_lucida p.to scuro wl	PC-caseificio 5 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCI1_verde ch lucida wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
38	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PCI2_opaca wl	PC-caseificio 5 F	ITS	
39	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC1_lucida p.to scuro rose	PC-caseificio 5 A	ITS	
40	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC2_opaca wl	PC-caseificio 5 A	ITS	
41	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC2_lucida p.to scuro rose	PC-caseificio 5 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
42	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC3_lucida p.to scuro rose	PC-caseificio 5 A	ITS	
43	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC5_verde ch lucida wl	PC-caseificio 5 A	ITS	
44	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC5_lucida p.to scuro rose	PC-caseificio 5 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
45	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PC5_opaca wl	PC-caseificio 5 A	ITS	
46	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAIF1_opaca scuro wl	L-caseificio 3 F	ITS	
47	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAIF1_opaca ch wl	L-caseificio 3 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche



48	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAlF2_opaca wl	L-caseificio 3 F	ITS	
49	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BAT2_v. scuro wl	BB-caseificio 2 F	ITS	
50	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BAT2_piatta crema wl	BB-caseificio 2 F	ITS	
51	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BAT2_opaca ch rose	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
52	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BEM1_opaca wl	BB-caseificio 2 F	ITS	
53	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BEM1_piatta crema wl	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
54	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BEM1_ch rose	BB-caseificio 2 F	ITS	
55	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MMF1_p.to rosa centro rose	MM-caseificio 1 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
56	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM2_opaca p.to verde wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
57	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM2_lucida p.to verde wl	MM-caseificio 1 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
58	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM2_opaca rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
59	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM3_lucida piatta wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
60	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM3_rugosa rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
61	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM3_p.to centrale rose	MM-caseificio 1 A	ITS	



62	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM4_piatta opaca rugosa rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
63	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM6_ch piccola wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
64	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM6_scura opaca rose	MM-caseificio 1 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
65	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM6_p.to rosa rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
66	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM7_ch piatta wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
67	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM7_ch lucida rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
68	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BAT1_opaca umbon wl	BB-caseificio 2 F	ITS	
69	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM1_opaca wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
70	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM6_rugosa piccola rose	MM-caseificio 1 A	ITS	
71	<i>Debaryomyces hansenii</i>	AN4_scur rose	A-caseificio 4 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
72	<i>Debaryomyces hansenii</i>	MMS1_p.to scuro rose	MM-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
73	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BB1_p.to verde wl	BB-caseificio 2 A	ITS	
74	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BES1_opaca wl	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
75	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BB2_picc rose	B-caseificio 2 A	ITS	



76	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAI2_opaca rose	L-caseificio 3 A	ITS	
77	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAI3_opaca wl	L-caseificio 3 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
78	<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAI3_lucida scuro wl	L-caseificio 3 A	ITS	
79	<i>Debaryomyces hansenii</i>	BB4_opaca rose	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
80	<i>Kluyveromyces lactis</i>	PCF1_rosa scura lucida rose	PC-caseificio 5 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
81	<i>Kluyveromyces lactis</i>	BAT2_bordo verde wl	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
82	<i>Monillella spp.</i>	BES2_fiore rose	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
83	<i>Monillella spp.</i>	BEM2_fiore wl	BB-caseificio 2 F	No Seq	Vedi Tab attività enzimatiche
84	<i>Monillella spp.</i>	BB1_fiore wl	BB-caseificio 2 A	No Seq	Vedi Tab attività enzimatiche
85	<i>Rhodotorula laryngis</i>	MM6_marron e lucida wl	MM-caseificio 1 A	ITS	
86	<i>Yamadazyma triangularis</i>	BB2_picc lucida wl	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
87	<i>Yarrowia lipolytica</i>	BAT1_ch rugosa rose	BB-caseificio 2 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
88	<i>Yarrowia lipolytica</i>	BB1_crema wl	BB-caseificio 2 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
89	<i>Yarrowia lipolytica</i>	MMF1_bianc a grande opaca wl	MM-caseificio 1 F	ITS	



90	<i>Yarrowia lipolytica</i>	MMI2_rugos a rose	MM-caseificio 1 F	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
91	<i>Yarrowia lipolytica</i>	MM4_grande bianca wl	MM-caseificio 1 A	ITS	Vedi Tab attività enzimatiche
92	<i>Yarrowia lipolytica</i>	MMI1_grand e bianca crema wl	MM-caseificio 1 F	ITS	

Tabella 1 Ceppi di lievito identificati a livello di specie mediante sequenziamento A= ambiente; F=formaggio

I lieviti appartenenti a specie rappresentative per ogni caseificio (ambienti e formaggi) sono stati sottoposti ad una preliminare caratterizzazione fenotipica valutando le attività proteolitica, killer, lipolitica ed esterasica, antiossidante, nonché la crescita a 37 °C (dopo 24 e 120 ore di incubazione) e in presenza di sali biliari. La valutazione delle attività saggate aveva come scopo quello di caratterizzare da un punto di vista fenotipico i ceppi di lievito rilevati, isolati ed identificati. I risultati riportati in tabella 2 indicano che l'attività è poco diffusa tra i lieviti isolati, infatti solo *C. parapsilosis*, *D.hansenii*, *K. Lactis* e *Y. lipolitica* hanno risposto positivamente al test in piastra. L'attività proteolitica è invece estesa anche tra la specie *C. zeylanoides*, ampiamente diffusa e ritrovata in tutti i caseifici valutati. L'attività killer, che conferisce ad un lievito la capacità di avere un effetto tossico nei confronti di altre cellule di lievito appartenenti a generi o specie uguali o diverse, è stata rilevata fra le specie *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *Moniliella* spp. E *K. Lactis*, come atteso ed ampiamente riportato in bibliografia. L'attività esterasica è stata rilevata soltanto in alcuni ceppi di *Y. lipolitica*. Da un'analisi comparativa dei principali tratti fenotipici analizzati, è interessante notare come le stesse specie esibiscono tratti fenotipici diversi a seconda dei ceppi specifici isolati in caseifici diversi. Ad esempio, non tutti i ceppi di *C. zeylanoides* posseggono attività proteolitica o killer, così come l'attività lipolitica è stata riscontrata seppur lievemente, in un unico ceppo di *C. parapsilosis* isolato nel BB- caseificio 2.



Specie	Codice	Proteolitica	Killer	Lipolitica	Esterasica	37°C 24h	37°C 120h	Sali bilia ri	Antiossidante % riduzione DPPH
<i>Candida friedrichii</i>	MM1_rugosa wl	-	-	-	-	-	+	-	23
<i>Candida parapsilosis</i>	BAT2_lucida wl	-	-	±	-	+	+	±	53
<i>Candida parapsilosis</i>	BB1_lucida ch rose	±	-	-	-	+	+	-	60
<i>Candida zeylanoides</i>	BAT1_lucida a rose	-	+	-	-	-	+	-	30
<i>Candida zeylanoides</i>	BB2_picc verde wl	-	+	-	-	+	+	-	64
<i>Candida zeylanoides</i>	LAIF1_lucida a scuro rose	±	+	-	-	-	-	-	10
<i>Candida zeylanoides</i>	AN4_lucida p.to scuro rose	+	-	-	-	-	-	-	28
<i>Candida zeylanoides</i>	MMF1_scura/chiaro wl	±	+	-	-	-	+	-	39
<i>Candida zeylanoides</i>	MMI2_p.to scuro rose	±	±	-	-	-	-	-	24
<i>Candida zeylanoides</i>	MM1_lucida a rose	+	-	-	+	-	+	-	31
<i>Debaryomyces hanseni</i>	BES1_opaca wl	+	-	-	-	-	-	-	25
<i>Debaryomyces hanseni</i>	BAT2_opaca ch rose	±	-	-	-	-	±	-	0
<i>Debaryomyces hanseni</i>	BEM1_piatta crema wl	+	+	-	±	-	+	-	19
<i>Debaryomyces hanseni</i>	PCI1_lucida a pto scuro wl	+	-	-	-	-	+	-	27
<i>Debaryomyces hanseni</i>	PCS1_opaca rose	±	-	±	-	-	±	-	18
<i>Debaryomyces hanseni</i>	PC2_lucida pto scuro rose	+	-	-	-	-	-	-	36
<i>Debaryomyces hanseni</i>	PC5_lucida p.to scuro rose	+	-	-	-	±	±	-	21
<i>Debaryomyces hanseni</i>	MM6_scura opaca rose	-	-	-	-	-	±	-	22
<i>Debaryomyces hanseni</i>	PCF1_rosa ch picc	+	±	-	-	-	+	-	19



	rose								
<i>Debaryomyces hansenii</i>	MMS1_p.to scuro rose	+	-	±	-	-	-	-	13
<i>Debaryomyces hansenii</i>	MM2_lucida p.to verde wl	+	-	-	-	-	-	-	25
<i>Debaryomyces hansenii</i>	BB4 opaca rose	+	±	-	-	-	+	-	21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	AN4_scuro rose	+	-	-	-	-	+	-	21
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LAIF1_opaca ch wl	+	-	±	-	-	+	±	13
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LA13_opaca wl	+	±	-	-	+	+	-	29
<i>Debaryomyces hansenii</i>	MMF1_pto rosa centro rose	+	-	-	-	-	+	-	24
<i>Kluyveromyces lactis</i>	BAT2_bord o verde wl	+	+	-	-	±	+	±	40
<i>Kluyveromyces lactis</i>	PCF1_rosa scura lucida rose	±	±	+	-	±	+	-	44
<i>Moniliella spp.</i>	BEM2_fiore wl	-	+	+	-	-	+	±	21
<i>Moniliella spp.</i>	BES2_fiore rose	-	+	±	-	-	-	±	22
<i>Moniliella spp.</i>	BB1_fiore wl	-	+	±	-	-	-	-	28
<i>Yamadazyma triangulus</i>	BB2_picca lucida wl	-	-	-	-	-	-	+	5
<i>Yarrowia lipolytica</i>	BAT1_ch rugosa rose	-	+	+	+	-	+	-	30
<i>Yarrowia lipolytica</i>	BB1_crema wl	-	±	+	-	±	+	±	40
<i>Yarrowia lipolytica</i>	MMI2_rugosa rose	-	-	+	+	-	+	-	32
<i>Yarrowia lipolytica</i>	MM4_grande bianca wl	-	±	+	+	-	+	-	35

Tabella 2. Valutazione delle caratteristiche fisiologiche di alcuni dei ceppi di lievito identificati



7. CONCLUSIONI

La ricerca condotta nell'ambito del progetto Bio.Mi.Ma ha avuto lo scopo di censire e catalogare le risorse microbiche legate alla produzione di formaggio di tipo Pecorino Tradizionale, della zona dei Monti Sibillini.

Nello specifico, le analisi microbiologiche di ambienti e formaggi correlati a cinque caseifici situati nella zona del cratere del sisma del 2016, hanno portato all'individuazione di 92 ceppi di lievito appartenenti a generi e specie affini a tali matrici, che sono attualmente depositate nella ceppoteca del DiSVA crioconservati a -80 °C.

Le analisi condotte hanno permesso di rilevare una presenza costante di tali lieviti nei caseifici, sia negli ambienti che nei formaggi, seppure con una relativamente alta variabilità tra i vari caseifici caseifici.

Le specie principalmente ritrovate appartengono ai generi *Candida* (con le specie *parapsilosis* e *zeylanoides*), *Debaryomyces* (con l'unica specie *hansenii*), *Kluyveromyces* e *Yarrowia lipolitica*.

Da una analisi generale si può dedurre che la presenza dei lieviti nei formaggi tende ad aumentare (da un punto di vista quantitativo) con l'aumentare della stagionatura, sintomo evidente della loro alta capacità di colonizzare matrici ad alto grado di alofilia e ridotto contenuto di acqua. Probabilmente in queste condizioni (formaggi stagionati più di 6 mesi), tali lieviti riescono a svolgere attività metaboliche quali proteolitica, lipolitica ed esterasica, che contribuiscono attivamente a definire le caratteristiche aromatico-sensoriali del prodotto finito. Tuttavia, il preliminare screening delle principali attività enzimatiche dei lieviti ha mostrato una forte variabilità ceppo-specifica.

Matrice di Isolamento	Microrganismi isolati	Numero di isolati	Metodi di identificazione	Anno	Ente finanziatore	Titolo Progetto	Responsabile	Pubblicazione
caseificio	<i>Candida friedrichii</i>	1	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio e formaggio pecorino	<i>Candida parapsilosis</i>	2	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio e formaggio pecorino	<i>Candida zeylanoides</i>	23	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio e formaggio pecorino	<i>Debaryomyces hansenii</i>	53	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
formaggio pecorino	<i>Kluyveromyces lactis</i>	2	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio e formaggio pecorino	<i>Moniliella spp.</i>	3	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio	<i>Rhodotorula laryngis</i>	1	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio	<i>Yamadazyma triangularis</i>	1	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/
caseificio e formaggio pecorino	<i>Yarrowia lipolytica</i>	6	Identificazione morfologica e Sequenziamento	2019	ASSAM	Bio.Mi.Ma "Biodiversità Microbica delle Marche nei processi di trasformazione delle produzioni regionali tradizionali"	Prof. ssa Francesca Comitini	/