

## La fermentazione delle olive da tavola

Le olive da tavola sono probabilmente il prodotto vegetale fermentato più popolare nell'occidente e, congiuntamente all'olio d'oliva, occupano un ruolo cruciale nella dieta mediterranea (Panagou *et al.*, 2008). I frutti dell'olivo contengono un secoiridoide glicosidico, l'oleuropeina, non tossico ma dal sapore amaro, che rende le drupe non direttamente commestibili dopo raccolta. Qualsiasi metodo di lavorazione è teso, dunque, alla rimozione dell'amaro naturale di questo frutto. Le olive verdi sono comunemente prodotte secondo il metodo "spagnolo" o "sivigliano"; le olive nere sono processate secondo il metodo "greco", noto anche come "naturale", o seguendo il metodo "californiano".

In genere, la fermentazione delle olive da tavola è una fermentazione spontanea, tendenzialmente mediata da batteri lattici e lieviti (Poiana *et al.*, 2006). I batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, numericamente rilevanti nelle primissime fasi di fermentazione, sono rapidamente soppiantati da batteri lattici afferenti prevalentemente al genere *Lactobacillus*. In pochi giorni, i batteri lattici passano dall'uno all'80% della popolazione microbica totale (Randazzo *et al.*, 2004). *Lactobacillus (Lb.) plantarum*, e la specie filogeneticamente correlata *Lb. pentosus*, rappresentano i batteri lattici comunemente associati alla fermentazione delle olive verdi processate con il metodo sivigliano. Nel giro di 1-2 settimane dalla messa in salamoia delle olive, essi dominano sui Gram-negativi e su altri batteri lattici, coesistendo con i lieviti fino alla fine della fermentazione, nonché durante la conservazione del prodotto (Leal-Sánchez *et al.*, 2003). Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che altre specie di *Lactobacillus* possono dominare tale processo; ad esempio *Lb. casei* è stato ritrovato quale specie lattica principale durante la fermentazione delle olive siciliane (Randazzo *et al.*, 2004). Nella tabella 1, riadattata dall'articolo pubblicato da Hurtado e collaboratori nel 2012, è riepilogato lo stato delle conoscenze sulla speciografia dei batteri lattici in olive da tavola di cultivar diverse e processate con metodi differenti.

**Tabella 1.** Specie di batteri lattici identificate durante la fermentazione di olive da tavola (da Hurtado *et al.*, 2012)

Scecie identificate	Cultivar e Processo di trasformazione	Bibliografia
<i>Lb. plantarum</i>	Olive verdi trattate (Spagna)	Ruiz-Barba et al., 1991; Ruiz-Barba & Jiménez-Díaz, 1994; Ruiz-Barba & Jiménez-Díaz, 1995
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>	Olive verdi al naturale, cv Galega (Portogallo)	Fernández-Díez, 1983; Van Den Berg et al., 1993; Oliveira et al., 2004
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Enterococcus</i> sp.	Olive verdi trattate (Spagna)	Floriano et al., 1998
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Olive nere al naturale, cv Edincik e Gemlik (Turchia)	Borcakli et al., 1993
<i>Lb. plantarum</i>	Olive verdi trattate, cv Picholine (Marocco)	Asehraou et al., 2002
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Pd. damnosus</i>	Olive naturali (Turchia)	Korukluoglu et al., 2002
<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Ec. faecalis</i>	Olive verdi al naturale (Algeria)	Kacem et al., 2004
<i>Lb. plantarum</i>	Olive cangianti al naturale, cv Oblica (Croazia)	Kulisic et al., 2004
<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Ec. faecium</i>	Olive verdi al naturale (Italia)	Randazzo et al., 2004
<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Ec. faecalis</i> , <i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. durans</i>	Olive verdi al naturale, cv Sigoise (Algeria)	Mourad & Nour-Eddine, 2006
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>	Olive nere al naturale, cv Leccino (Italia)	Ercolini et al., 2006
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. collinoides</i>	Olive al naturale (Tunisia)	Chamkha et al., 2008
<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i>	Olive verdi al naturale, cv Arbequina (Spagna)	Hurtado et al., 2008; Hurtado et al., 2009; Hurtado et al., 2010
<i>Lb. pentosus</i>	Olive nere al naturale, cv Conservolea (Grecia)	Panagou et al., 2008
<i>Lb. brevis</i> , <i>Ln. cremoris</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i>	Olive nere al naturale, cv Gemlik (Turchia)	Kumral et al., 2009
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. veridesens</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>	Olive nere al naturale, cv Jijelia (Algeria)	Idoui et al., 2009
<i>Lb. coryniformis</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. vaccinostercus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>Ec. casseliflavus</i> , <i>Ec. italicus</i>	Olive verdi trattate, cv Bella di Cerignola (Italy)	De Bellis et al., 2010
<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. vaccinostercus</i> , <i>Lb. suebicus</i> , <i>Lb. paracollinoides</i> , <i>Pediococcus</i> sp.	Olive verdi al naturale, cv Aloreña (Spagna)	Abriouel et al., 2011a
<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. coryniformis</i>	Olive verdi trattate, cv Nocellara del Belice (Italia)	Aponte et al., 2012
<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Pd. pentosaceus</i>	Olive verdi trattate, cv Picholine (Marocco)	Ghabbour et al., 2011

Il principale riflesso della fermentazione dei carboidrati da parte dei lattobacilli è l'abbassamento del pH per produzione di acido lattico. La rapida acidificazione del mezzo comporta una forte selezione ambientale a discapito, soprattutto, delle *Enterobacteriaceae*, particolarmente sensibili agli acidi organici. Di fatto, acidità totale e libera sono i parametri di norma monitorati, per valutare il successo della fermentazione.

I lattobacilli possono utilizzare gli zuccheri per fermentazione omo- o etero-lattica. I batteri lattici omofermentanti, da una mole di glucosio, producono due moli di acido lattico, mentre, gli eterofermentanti producono una mole di acido lattico, una mole di CO<sub>2</sub> e una mole di etanolo o acido acetico (Caplice *et al.*, 1999). I lattobacilli del cosiddetto *Lb. plantarum group* sono omofermentanti facoltativi, ovvero possono utilizzare carboidrati esosi attraverso la via omolattica e, grazie alla fosfo-chetolasi inducibile, zuccheri pentosi attraverso quella eterolattica. Tale versatilità metabolica rende questi batteri in grado di superare le carenze di carboidrati e, in generale, le condizioni ostili di alcuni ecosistemi, come lo stesso ambiente delle salamoie di olive da tavola.

Nel processo di fermentazione delle olive da mensa si preferisce il metabolismo omofermentativo perché consente, di fatto, ai lattobacilli di moltiplicarsi velocemente garantendo una più efficiente cinetica di acidificazione. In tal ottica, l'aggiunta di carboidrati quali glucosio e saccarosio alla salamoia determina una migliore acidificazione del mezzo, un aumento del rapporto acido lattico/acido acetico e, di conseguenza, un maggior abbassamento del pH: in altri termini una più incisiva riduzione della popolazione di *Enterobacteriaceae* (Chorianopoulos *et al.*, 2005). Alcune tecnologie di fermentazione prevedono la pre-acidificazione della salamoia con acido lattico fino a un valore di pH prossimo a 4, onde inibire la crescita di batteri Gram-negativi e potenzialmente alterativi (Poiana *et al.*, 2006).

Diversi fattori possono influenzare il corretto svolgimento della fermentazione, tra questi si annoverano il pH del frutto, la soda residua nelle olive trattate, la quantità di sale in salamoia, la temperatura di fermentazione, la disponibilità di nutrienti e la loro diffusione attraverso l'epicarpo della drupa, il contenuto di polifenoli del frutto, l'aerazione delle vasche in cui avviene la fermentazione, oltre che la dimensioni e il tipo delle stesse (Hurtado *et al.*, 2012). La temperatura è un fattore importante ma difficile da controllare. La fermentazione delle olive da mensa avviene, generalmente, in contenitori in vetroresina da 200 Lt circa. L'assenza di un sistema di coibentazione induce, soprattutto in considerazione del periodo dell'anno in cui avviene la produzione di olive da mensa, profonde fluttuazioni termiche a carico della massa in fermentazione. Se la temperatura ambientale scende sotto i 18°C, possono prendere avvio altre fermentazioni, come ad esempio quelle operate da lieviti, causa sovente di rammollimento delle drupe e/o di produzione di aromi sgradevoli (Aponte *et al.*, 2010). La dimensione delle

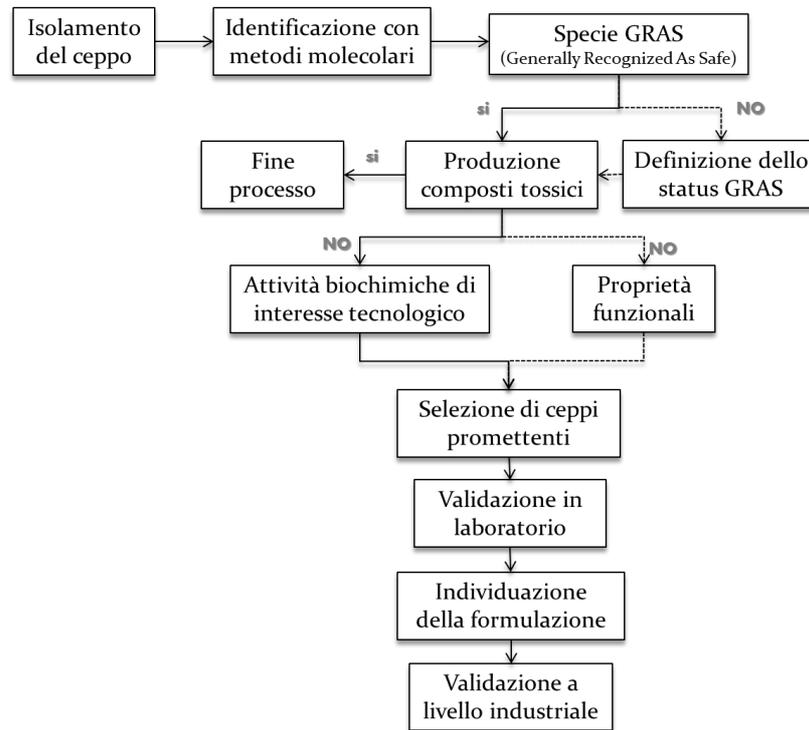
vasche di fermentazione influisce direttamente sulla temperatura: piccoli volumi hanno un'inerzia inferiore; ciò si riflette sull'andamento della fermentazione e, di conseguenza, la qualità delle olive risulta piuttosto incostante (Hurtado *et al.*, 2012).

Tradizionalmente, la fermentazione è condotta dalla microflora epifitica delle olive e/o da quella che si seleziona nell'ambiente di lavorazione, tra cui si ritrovano, oltre a batteri lattici, enterobatteri, pseudomonadi, stafilococchi, clostridi e lieviti. In questo complesso ecosistema microbico i batteri lattici costituiscono la microflora protecnologica del processo di fermentazione, la presenza di alcune specie di lieviti può essere apprezzata, mentre la presenza di enterobatteri, pseudomonadi, stafilococchi e clostridi è sempre e invariabilmente indesiderata. Nel processo di fermentazione delle olive, non tutti i batteri lattici hanno lo stesso significato tecnologico, *Enterococcus (E.) faecalis* ed *E. faecium*, ad esempio, sono dei comuni contaminanti delle olive (Foulquière Moreno *et al.*, 2006). Gli enterococchi possiedono proprietà proteolitiche, lipolitiche e metabolizzano il citrato, caratteristiche che determinano la generazione di aromi spesso auspicati nei formaggi. Nei vegetali, invece, il loro ruolo non è del tutto chiaro.

L'impiego di lattobacilli come coltura starter può contribuire al buon esito del processo fermentativo e congiuntamente amplificare la pregevolezza sensoriale delle olive da tavola, giacché i batteri protecnologici introdotti ostacolano la proliferazione di microrganismi alterativi e produttori di "off-flavour", e perché di per sé sono genericamente selezionati in funzione delle proprietà aromatizzanti.

Una coltura starter è per definizione una coltura microbica in grado di avviare la fermentazione e di assicurare il buon esito del processo produttivo; di fatto, esistono anche colture microbiche che esercitano una funzione di contenimento della proliferazione di microrganismi alterativi e/o patogeni, le cosiddette "colture protettive", colture di microrganismi che hanno il solo effetto di migliorare il profilo qualitativo del prodotto finito, come ad esempio le "colture aromatizzanti" o fornire proprietà funzionali all'alimento come le "colture probiotiche" (Silvestri *et al.*, 2009). In figura 1 è schematizzato il processo di selezione di una coltura starter.

Fig. 1. Processo di selezione di una coltura starter per uso alimentare.



L'industria birraria ha rappresentato il settore alimentare che per primo, nel XIX secolo, ha impiegato microrganismi isolati e caratterizzati per ottenere prodotti fermentati di qualità e, dopo circa un secolo, anche l'industria casearia ha cominciato a utilizzare colture *starter* selezionate (Hansen, 2002). Spesso, nelle produzioni artigianali, l'inoculo della matrice da fermentare è costituito da una aliquota della precedente produzione che costituisce lo *starter* naturale, il quale propaga il proprio ecosistema microbico caratteristico. Tale pratica, denominata con terminologia anglosassone "*backslopping*", viene applicata nella produzione di numerosi alimenti fermentati, quali formaggi ottenuti mediante l'uso di colture naturali in siero (siero-innesti) o latte (latto-innesti), prodotti da forno lievitati con madri acide e salsicce fermentate con gli impasti carnei. Oggi, la disponibilità di colture *starter* è notevolmente cresciuta. Il mercato, che si stima abbia raggiunto dimensioni mondiali, è principalmente imperniato sull'impiego di batteri lattici destinati all'industria lattiero-casearia (Hansen, 2002), mentre esistono poche colture *starter* selezionate per la trasformazione di alimenti vegetali (Garden *et al.*, 2001). In Europa sono prodotti circa 21 differenti prodotti vegetali fermentati, fra questi i più importati sono le olive, i crauti e i cetrioli in salamoia (Caplice *et al.*, 1999). Nell'area mediterranea, dove è forte la tradizione olivicola, si concentra il 98% della coltivazione mondiale di olive (Uccella, 2001). In queste aree, le olive da mensa costituirebbero il primo esempio di alimento vegetale fermentato prodotto con il concorso di colture *starter*

selezionate *ad hoc* (Chammen *et al.*, 2005). I microrganismi comunemente proposti come starter per olive verdi da mensa sono *Lb. plantarum* e *Lb. pentosus*, due specie filogeneticamente correlate. Alcuni autori, propongono anche l'impiego di specie afferenti al genere *Enterococcus*, generalmente, in combinazione con i lattobacilli, che svolgono un ruolo fondamentale nel portare a termine la fermentazione (de Castro *et al.*, 2002). *Lb. plantarum* è dotato di una spiccata acido-tolleranza, che gli conferisce la capacità di completare in maniera ottimale la fermentazione e, per questo motivo, è molto comune nei vegetali fermentati. Oltre alla possibilità di sopravvivere in ambiente fortemente acido, le principali proprietà dei batteri d'interesse tecnologico per la fermentazione delle olive da mensa possono essere così riassunte: resistenza ad alte concentrazioni di cloruro di sodio (NaCl); crescita a basse temperature (Duran Quintana *et al.*, 1999); produzione di batteriocine e/o altre sostanze antimicrobiche (Delgado *et al.*, 2005); capacità di avviare la fermentazione a valori di pH alcalini (Sánchez *et al.*, 2001) e attitudini oleuropeinolitiche (Ciafardini *et al.*, 1994).

In realtà, spesso le colture starter sono adoperate per migliorare il profilo sensoriale di olive che sono state già deamarizzate per via chimica. Nel metodo Sivigliano, che prevede la deamarizzazione per idrolisi chimica alcalina in idrossido di sodio dell'oleuropeina in acido elenolico e idrossitirosolo (Marsilio *et al.*, 2005), l'aggiunta dello starter avviene solo in seguito, quando, dopo rimozione dell'alcale, le olive sono trasferite in salamoia (Aponte *et al.*, 2012).

La concentrazione di NaCl è certamente un parametro fondamentale per la successiva fermentazione, operando una stringente selezione della microflora naturale; se troppo concentrata, la salamoia può ostacolare la crescita microbica e determinare il raggrinzimento irreversibile delle olive. La concentrazione di NaCl della salamoia è funzione della varietà, del grado di maturazione delle drupe, e della temperatura di processo e, in genere, oscilla fra il 10 e il 12% (Durán Quintana *et al.*, 1999). Tuttavia, tra olive e salamoia si instaura rapidamente un equilibrio osmotico e la concentrazione salina si abbassa fino al 5%. Le olive da tavola di diverse cultivar sono fermentate in salamoie contenenti livelli di NaCl che vanno dal 4 al 15% (Hurtado *et al.*, 2012). In generale, salamoie a bassa concentrazione di sale favoriscono lo sviluppo di batteri lattici, mentre concentrazioni più alte stimolano la crescita di lieviti (Hurtado *et al.*, 2009). *Lb. pentosus* è risultato in grado di crescere fino a 82 g/L di NaCl, ma la tolleranza sale è un fattore strettamente ceppo-dipendente (Hurtado *et al.*, 2009).

La *cultivar* è un fattore determinante soprattutto nelle olive al naturale. I batteri lattici hanno dimostrato di potersi sviluppare nelle *cultivar* Arbequina, Conservolea, Gordal o Aloreña trasformati al naturale, ma non in Hojiblanca e Manzanilla (Hurtado *et al.*, 2012). Inoltre, a seconda di pratiche locali, ogni *cultivar* è raccolta in una fase diversa della maturazione e ciò naturalmente condiziona il contenuto in zuccheri e polifenoli della drupa oltre che la

permeabilità della parete cellulare. Nonostante numerosi ceppi di batteri lattici siano in grado di degradare l'oleuropeina e/o altri composti specifici, in termini generali, più alta è la concentrazione di polifenoli, maggiore è il rischio di inibizione alla crescita dei batteri lattici. Un altro aspetto che può condizionare l'avvio della fermentazione è la disponibilità di nutrienti (Hurtado *et al.*, 2008) e, inoltre, in olive verdi Manzanilla è stato dimostrato che un trattamento alcalino inadeguato, per insufficiente penetrazione della soda, induce un eccessivo rilascio di composti antimicrobici in salamoia, con conseguente inibizione della crescita di *Lb. pentosus* (Medina *et al.*, 2008).

Nel metodo Greco o metodo naturale, in cui le olive, tradizionalmente quelle nere, sono messe direttamente in salamoia senza alcun preventivo trattamento deamarizzante, la fermentazione è prevalentemente portata avanti dalla popolazione blastomicetica (Panagou *et al.*, 2008). Il prodotto ottenuto con tale tipo di preparazione, caratterizzato da un aroma fruttato e un gusto leggermente amaro, è largamente diffuso in Turchia, Grecia e paesi Nord Africani, e, sebbene la produzione sia diminuita considerevolmente dal 1960, si aggira comunque intorno al 30% del mercato mondiale (Piga *et al.*, 2001). Gli aspetti del processo da tenere maggiormente sotto controllo in questo caso sono: disponibilità di sostanze fermentescibili, contenuto in sale della salamoia, pH, condizioni aerobiche ed anaerobiche e controllo della temperatura (Durán Quintana *et al.*, 1999; de Castro *et al.*, 2002; Chorianopoulos *et al.*, 2005). Nella fermentazione naturale di olive da tavola Arbequina, i principali microrganismi coinvolti sono risultati essere i lieviti quali *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida membranaefaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia membranaefaciens* e *Rhodotolura glutinis*, mentre i batteri lattici costituivano una microflora accessoria (Hurtado *et al.*, 2008). Dallo studio della fermentazione naturale, tanto artigianale quanto industriale, della cultivar "Galega", principale varietà portoghese, è emerso un diverso andamento delle popolazioni di lattici nelle due tipologie di processo (Oliveira *et al.*, 2004). Mentre, nel processo artigianale, i batteri lattici proliferavano solo all'inizio della fermentazione per sparire in concomitanza con l'aggiunta dell'8% di NaCl, con *Lb. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* quali specie dominanti, nel processo industriale, invece, oltre che ad inizio fermentazione, i batteri lattici raggiungevano un secondo picco di popolazione a fine fermentazione, con dominanza delle specie *Lb. plantarum* *Lb. pentosus*, ma anche *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus*. I lieviti non sembravano, invece, essere condizionati dalle due tecniche di produzione e il loro numero rimaneva costante durante l'intero periodo di monitoraggio, con *Pichia membranaefaciens* quale *taxon* dominante seguito da *Candida boidinii*, *Pichia kluyveri* e *Torulaspora delbrueckii* (Oliveira *et al.*, 2004).

In Italia la produzione di olive da tavola è presente sia come produzione rigorosamente normata da disciplinari di produzione per quanto riguarda le produzioni a marchio tipico (DOP, Denominazione di Origine Protetta), sia come produzione completamente artigianale, tipica di olive tradizionali fortemente altalenanti nella propria connotazione sensoriale e reologica. Le produzioni a carattere familiare riguardano piccoli quantitativi di prodotto, generalmente consumati *in loco* ed estesamente condizionati dall'andamento stagionale. Tali produzioni non riescono a soddisfare la domanda ed è per questo che in Campania oltre l'80% delle olive commercializzate è importato, provenendo principalmente dalla Sicilia e, in particolare, dal trapanese. Si tratta per lo più della Nocellara DOP, prodotto che incarna un tipico esempio di oliva da tavola di qualità standardizzata, come si evince peraltro dal suo disciplinare di produzione. Ciò consente di rimarcare un ulteriore aspetto che lede le potenzialità del mercato delle olive da tavola in Italia: il progressivo allineamento nelle tecnologie di produzione che ha finito per privilegiare il metodo Sivigliano come processo di elezione. I prodotti che compaiono oggi sul mercato sono molto simili tra loro e le olive da tavola, tradizionalmente prodotte in Italia, sono state progressivamente spersonalizzate e in molti casi, rappresentano essenzialmente l'omologo merceologicamente più scadente delle produzioni d'oltralpe, caratterizzate da calibro superiore. Oltre a produzioni DOP quali "Olive di Gaeta", "Nocellara del Belice", "Oliva Ascolana" e "Bella Daunia", in Italia esistono numerosi metodi tradizionali, poco o niente adottati a livello industriale, che potrebbero rappresentare una risposta alternativa alle tecnologie più celebri, ma inadatte a frutti ottenuti da varietà di olive a duplice attitudine e dunque poco idonei alla trasformazione in olive da mensa. Tecnologie di processo alternative potrebbero contribuire senz'altro alla definizione di prodotti con accresciuto grado di tipicità e tradizionalità, ossia in grado di meglio esaltare, così come avvenuto per vini, insaccati e formaggi il legame con l'area geografica di produzione. Si pensi alle olive nere "Infornate alla Calabrese", "Secche alla Francese", "Punzecchiate al Sale", "Conservate a Secco", "Tagliate ad Arta" o "Essiccate al Sole".

Nell'ambito del progetto ITEO, tra i principali obiettivi realizzativi si annoverava la selezione di uno starter adatto alla fermentazione di olive della *cultivar* "Pisciottana" caratterizzate da diversi tratti di assoluta specificità e che fosse in grado di esaltarne il profilo sensoriale, naturalmente sia in salamoia a basso contenuto in sale, sia nella prevista fermentazione in acqua di mare .

In una prima fase a carattere spiccatamente sperimentale sono state allestite prove di micro-fermentazione su piccoli lotti, adoperando quali *starter*, diversi ceppi di batteri lattici isolati da olive da mensa, di varietà anche diverse dalla Pisciottana, e selezionati sulla scorta di caratteristiche di interesse tecnologico nella fermentazione di olive da tavola. Segnatamente i

cinque ceppi (OM53, OM33, OM24, OM52, OM50) di *Lb. pentosus*, appartenenti alla collezione della Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Agraria, provenienti da olive da tavola e caratterizzati genotipicamente oltre che fisiologicamente, il ceppo OM13 della stessa collezione e già adoperato quale coltura *starter* per olive Nocellara del Belice, il ceppo OM94 da oliva mensa e afferente alla specie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e, infine, il ceppo probiotico commerciale *Lb. plantarum* 299v.

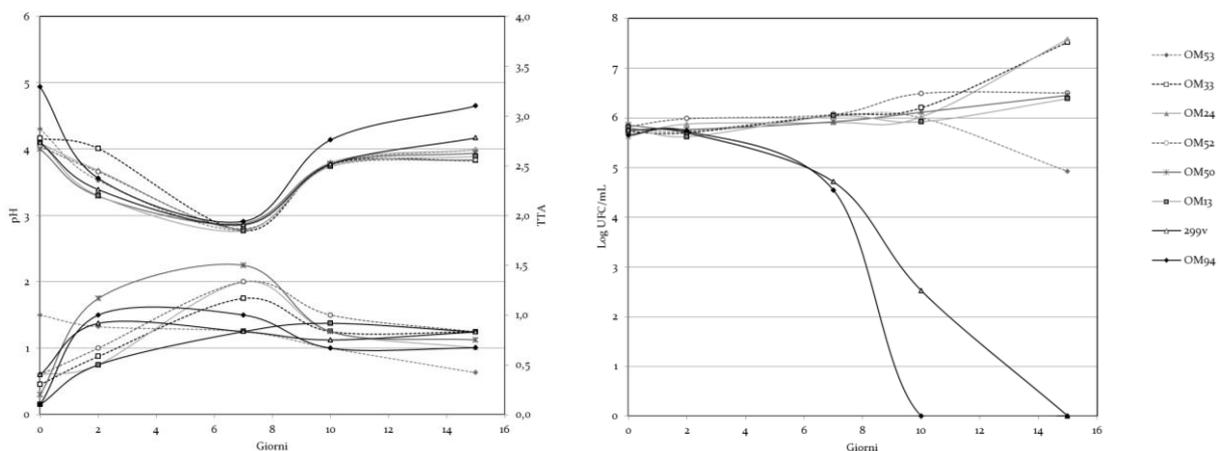
Previo rinfresco in adeguato substrato colturale, i ceppi sono stati adoperare per inoculare, sino a un livello di circa  $10^6$  UFC/mL di salamoia, 100 g di olive lavate e immerse in rapporto 1:5(peso/volume) in acqua marina prelevata presso il “Parco Marino degli Infreschi” (Fig. 2).

Fig.2. Test di microfermentazione in beuta



Al tempo zero e dopo 2, 7, 10 e 15 è stato effettuato un monitoraggio di pH, acidità titolabile e carica in batteri lattici per conta vitale in piastra su substrato selettivo (MRS agar addizionato di cicloesimide) (Fig. 3)

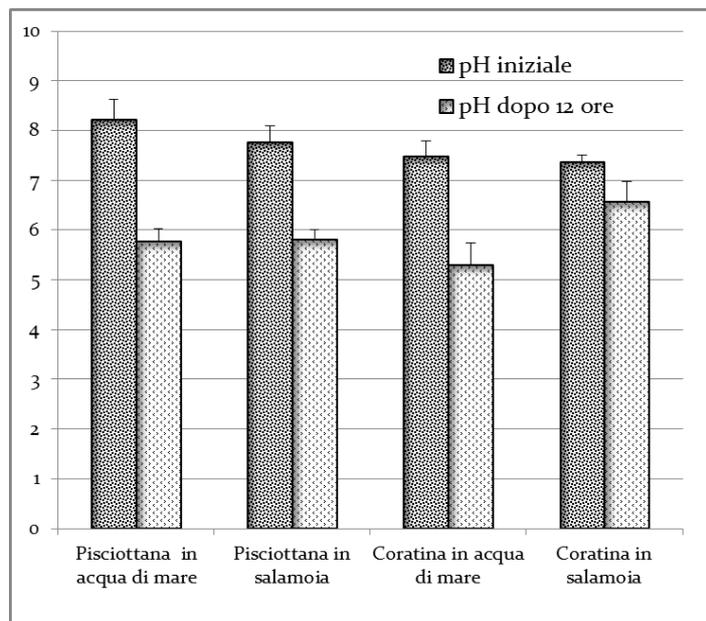
Fig. 3. Evoluzione di pH, acidità titolabile e batteri lattici nei test di microfermentazione.



Il pH, come atteso, scende di oltre due unità durante la prima settimana di fermentazione, salvo poi risalire per effetto del consumo di acidi organici da parte di lieviti e muffe sviluppatasi nella salamoia. Naturalmente, l'andamento dell'acidità titolabile riflette perfettamente tale andamento. Il pH iniziale dei campioni varia da 4.00 a 4.94; tale basso valore è presuntivamente da imputare all'acqua marina adoperata, ovvero quella del "Parco Marino degli Infreschi". Per confermare tale ipotesi, olive della varietà Coratina sono state sottoposte a fermentazione nella stessa acqua marina. Anche per la Coratina il pH è diminuito notevolmente, ma in misura minore rispetto a quanto riscontrato nella Pisciottana (Fig. 4).

Fig. 4

Variatione di pH di olive della varietà Pisciottana e Coratina dopo 12 ore di immersione in salamoia o in acqua marina



Per ciò che concerne i livelli di carica raggiunti dai lattobacilli, non sorprende l'incapacità di adattamento del ceppo probiotico, né di quello afferente al genere *Leuconostoc*, che comprende specie normalmente parte di una microflora accessoria in questo ecosistema. Tutti i *Lb. pentosus* considerati hanno palesato una notevole capacità di adattamento e due ceppi in particolare, OM33 e OM 52, hanno evidenziato un *trend* positivo che li ha portati a superare i 7 cicli logaritmici di sviluppo a due settimane dall'inoculo. Nelle tesi inoculate con i ceppi OM50 e OM13, si registra la comparsa di muffe dopo 7 e 15 giorni dall'inoculo, rispettivamente.

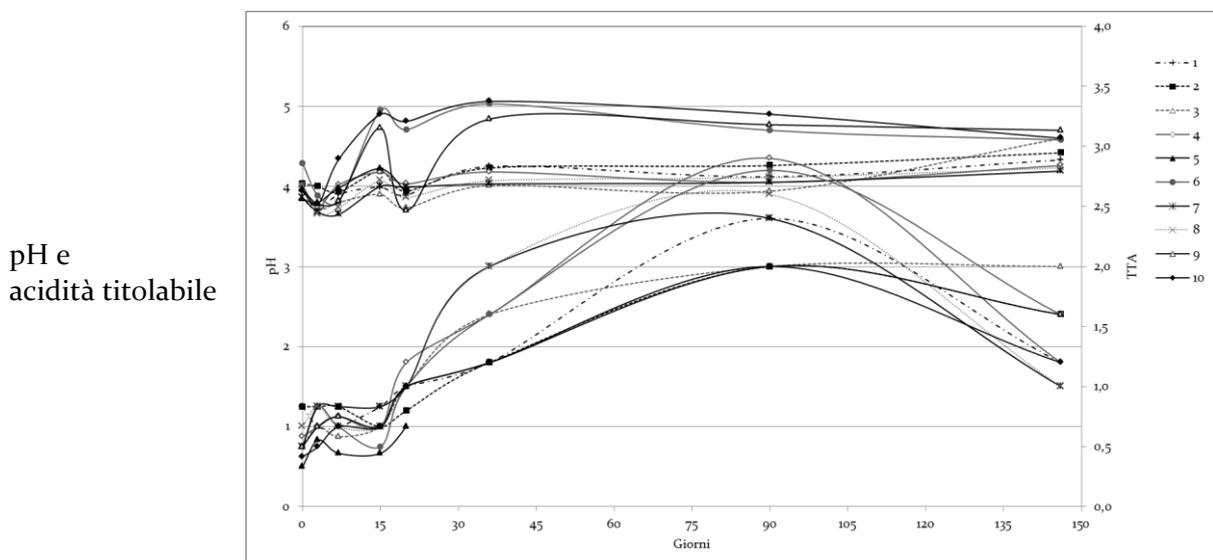
I due ceppi che hanno esibito le *performances* più soddisfacenti, segnatamente le colture OM33 e OM 52, sono state selezionate per esperimenti successivi condotti su un volume maggiore di olive in salamoia. Le tesi realizzate sono riepilogate nel prospetto che segue:

## Elenco delle fermentazioni pilota con indicazione dei lattobacilli adoperati

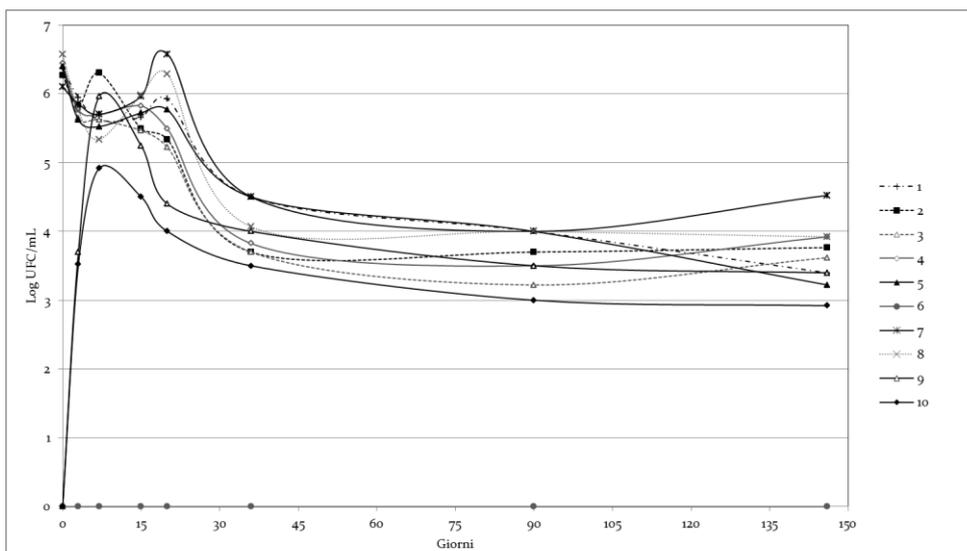
1	<i>Lb. pentosus</i> OM33 in acqua marina
2	<i>Lb. pentosus</i> OM33 in salamoia (5%)
3	<i>Lb. pentosus</i> OM52 in acqua marina
4	<i>Lb. pentosus</i> OM52 in salamoia (5%)
5	<i>Lb. pentosus</i> OM33 in acqua marina (con drupe selezionate per qualità)
6	<i>Debaromyces hansenii</i> OL39 in acqua marina
7	<i>Debaromyces hansenii</i> OL39 + <i>Lb. pentosus</i> OM33 in acqua marina
8	<i>Debaromyces hansenii</i> OL39 + <i>Lb. pentosus</i> OM52 in acqua marina
9	Fermentazione naturale in acqua marina
10	Fermentazione naturale in salamoia (5%)

In sintesi, i due ceppi sono stati valutati in salamoia a basso contenuto in sale e in acqua marina, da soli oppure in consociazione con *Debaromyces hansenii* (OL39), un lievito a metabolismo spiccatamente fermentativo e comunque proveniente da olive in fermentazione. Le medesime analisi in precedenza citate sono state affiancate dal monitoraggio della carica blastomicetica su substrato selettivo (DRBC agar) ed effettuate a 0, 3, 7, 15, 20, 36, 90 e 146 giorni di fermentazione (Fig. 5).

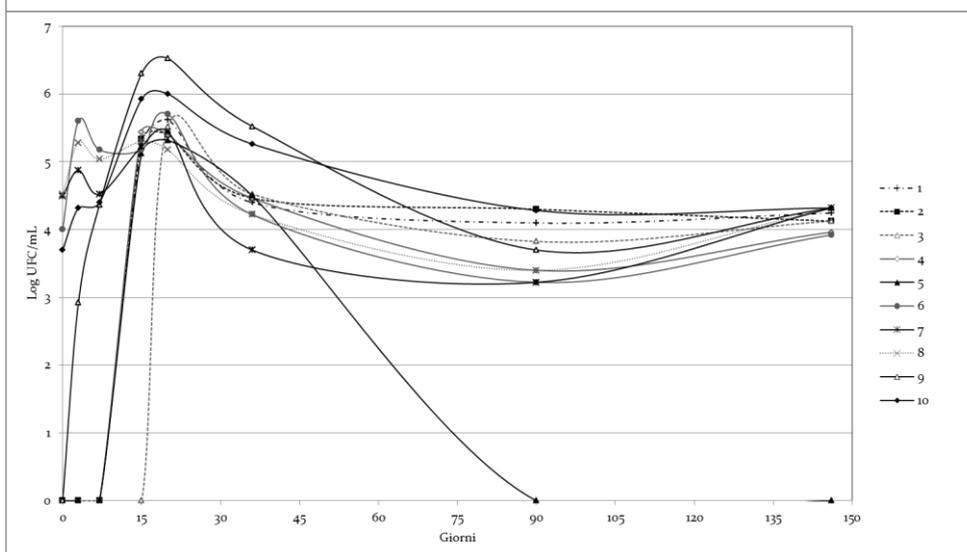
Fig. 5. Evoluzione di pH, acidità titolabile, batteri lattici, lieviti e muffe durante la fermentazione di olive della cv Pisciottana.



Batteri lattici



Lieviti e muffe

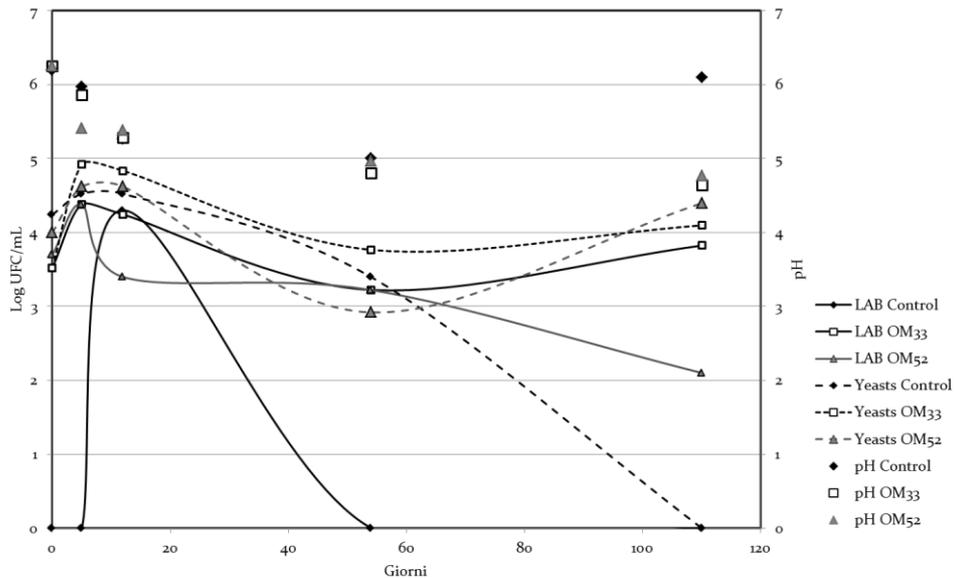


Come atteso, le tesi in acqua marina (OM33; OM52; OL39; OL39+OM33 e OL39+ OM52) hanno esibito un pH costantemente più basso rispetto alle fermentazioni in salamoia. I valori di pH restano più alti nelle due tesi in cui la fermentazione è affidata alla microflora lattica epifita delle olive e nel caso in cui è stato inoculato il solo lievito OL39. L'acidità titolabile presenta un *trend* simile nelle diverse tesi, ovvero si assiste ad un accumulo di acidi organici seguito da una flessione della curva per effetto del consumo di tali metaboliti da parte di altri gruppi microbici. In generale, l'acidità titolabile è oscillata tra 0.42 mL a un massimo di 2.80 mL di NaOH/100 mL. La popolazione di lattici ha registrato un picco durante la prima settimana di fermentazione, salvo poi diminuire. Rileva, tuttavia, che anche dopo 5 mesi di fermentazione il livello di lattobacilli resti superiore alle 1000 UFC per mL di salamoia. In linea generale sembrerebbe che i batteri lattici siano in gradi di tollerare meglio l'acqua marina che la salamoia, sebbene il contenuto di sale adoperato in essa presente fosse estremamente basso (5%). Le popolazioni di lieviti autoctoni raggiungono livelli più alti delle restanti tesi, comprese

quelle in cui è stato effettuato l'inoculo con OL39. Nei campioni a fine monitoraggio la concentrazione di lieviti è numericamente superiore a quella dei batteri lattici indipendentemente dalla tesi considerata.

In seguito, i due ceppi OM33 e OM52, sono stati inoculati in contenitori della capacità di 5 litri, contenenti 1.5 kg di olive e 1.5 Lt di acqua marina. Un terzo contenitore non è stato inoculato, ovvero in fermentazione naturale, ha rappresentato la tesi di controllo (Fig. 6).

Fig. 6. Evoluzione del pH, dei batteri lattici e di lieviti e muffe in lavorazioni di olive della cv Pisciottana in acqua marina



Il pH del campione non inoculato (controllo), è pari a  $6.20 \pm 0.34$  a inizio fermentazione e scende a circa 5.00 dopo due mesi per poi risalire superando il valore di 6.00 a 110 giorni dall'inoculo. Questi valori sono ben oltre la soglia limite del 4.5 e sono presumibilmente da mettere in relazione con l'istaurarsi di muffe (Brighigna, 1998). Nei due campioni inoculati, il pH iniziale è pari a  $6.25 \pm 0.12$  in entrambi, ma, contrariamente tende a rimanere al di sotto di 5.00 poi sino a fine monitoraggio. Anche in questo caso, tuttavia, il pH resta superiore al valore preconizzato come di sicurezza di 4.5.

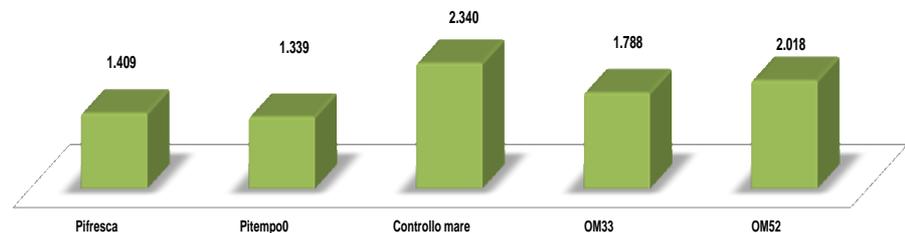
La carica batterica aumenta nel controllo dopo 12 giorni dall'inoculo, raggiungendo circa 4 Log CFU/mL, ma resta, poi, al di sotto della soglia rilevamento per l'intero monitoraggio. Una flessione di popolazione si registra anche nel caso di inoculo con OM53, mentre il ceppo OM33 esibisce una maggiore capacità di adattamento restando oltre i 3 Log UFC/mL finanche a fine monitoraggio. Questi dati appaiono confermati dai valori del pH e da quelli dell'acidità titolabile (non mostrati). La carica dei lieviti dei campioni inoculati con OM52 e OM33 è maggiore, mentre nel controllo, aumenta oltre 4.00 Log UFC/mL al 5° giorno e poi decresce fino a scomparire.

Sulla scorta dei dati analitici e di una valutazione organolettica preliminare le olive migliori sono state ottenute inoculando con il ceppo *Lc. Pentosus* OM33. Nonostante la pessima qualità delle drupe, l'elevata temperatura ambientale e la presenza di troppo ossigeno nello spazio di testa dei contenitori, lo starter si è sviluppato, ha impedito la proliferazione di muffe e lieviti a metabolismo ossidativo sul pelo libero della salamoia e le olive ottenute possedevano un odore piacevole, vinoso privo di difetti quali rammollimento, comparsa di bollosità o odori anomali, tipo cuoio, cantina ecc.

I dati relativi all'analisi dei fenoli totali estratti dalle olive dei campioni (controllo mare, OM33 e OM52) trasformati e in comparazione con le stesse olive fresche è riportato in figura 7.

Le olive fermentate in acqua marina senza il concorso dello starter presentano più fenoli rispetto ai due campioni inoculati (Fig. 7). Tra i due campioni inoculati, le olive con meno fenoli sono quelle ottenute con il ceppo *Lb pentosus* OM33; esse contengono addirittura meno della metà dei polifenoli presenti nelle olive fresche di Pisciottana. Le olive sono state immerse in acqua marina il 16 ottobre e inoculate con i due lattobacilli il 27 novembre, ovvero a 41 gg. I fenoli sono stati estratti dalle olive il 12 gennaio, ossia dopo quindici dall'inoculo.

Fig. 7. Polifenoli totali



Lo starter è stato saggiato su scala precompetitiva presso l'azienda partner su due lavorazioni, una con olive cv Pisciottana e una con cv Nocellara del Belice. Dal controllo qualità microbiologico effettuato sulle olive al momento del consumo è emerso che le *Enterobacteriaceae*, esponenti del gruppo *Coli-aerogenes* e microrganismi sporigeni risultavano al di sotto della soglia di rilevamento del metodo ( $<1$  UFC/mL). I lieviti erano superiori a 6 Log UFC/mL per entrambe le tesi:  $6.2 \pm 0.4$  e  $6.6 \pm 0.7$  UFC/mL per cultivar "Pisciottana" e "Nocellara del Belice", rispettivamente. I batteri lattici hanno esibito un migliore adattamento alla cv Nocellara del Belice ( $6.6 \pm 0.1$  UFC/mL) confermando quanto riportato in letteratura per questa cultivar (Aponte *et al.*, 2012). Sebbene il ceppo OM33 fosse stato selezionato anche per la resistenza al verbascoiside, di cui è ricca la cv Pisciottana, esso non riesce a raggiungere livelli altissimi, attestandosi comunque sul soddisfacente valore di  $4.9 \pm 0.5$  UFC/mL nel prodotto al consumo.

## Bibliografia

- Aponte, M., Ventorino V., Baiotta G., Volpe G., Farina V., Avellone G., Lanza C.M., Moschetti G. 2010. Study of green Sicilian table olive fermentation through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiology*. **27**:162-170.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., Moschetti, G. 2012. Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*. **30**(1):8-16.
- Brighigna, A. 1998. Le olive da tavola. Ed. Edagricole.
- Caplice, E., Fitzgerald G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. **50**:131-149.
- Chammen, N., Kachouri M., Mejri M., Peres C., Boudabous A., Hamdi M. 2005. Combined effect alkali pre-treatment and sodium chloride addition on the olive fermentation process. *Bioresource technology* **96**:1311-1316.
- Chorianopoulos, N.G., Bozaris I.S., Stamatiou A., Nuchas G.J.E. 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurised green table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*. **22**:117-124.
- Ciafardini, G., Marsilio V., Lanza B., Pozzi N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**:4142-4147.
- de Castro, A., Mõntano A., Casado F.J., Sanchez A.H., Rejano L. 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as a starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*. **19**:637-644.
- Delgado, A., Brito D., Peres C., Noè-Arroyo F., Garrido-Fernandez A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*. **22**:521-528.
- Duràn Quintan, M.C., García-García P., Garrido Fernández A. 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*. **51**:133-143.
- Foulquiè Moreno, M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. **106**:1-24.
- Garden, N., Savard T., Obermeier P., Caldwell G., Champagne C.P. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*. **64**:261-275.
- Hansen, E.B. 2002. Commercial bacteria starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*. **78**:119-131.
- Hurtado, A., Reguant C., Esteve-Zarzoso B., Bordons A., Rozès N. 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International*. **41**:738-744.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N. 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*. **31**: 1-8.
- Leal-Sánchez M.V., Ruiz-Barba J.L., Sánchez A.H., Rejano L., Jiménez-Díaz R., Garrido A. 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*. **20**:421-430.
- Marsilio, V., Seghetti L., Iannucci E., Russi F., Lanza B., Felicioni M. 2005. Use of Lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europea* L cv *Ascolana tenera*) processing. *Journal of Agriculture and Food Science*. **85**:1084-1090.
- Medina, E., Romero, C., de Castro, A., Brenes, M., García, A. 2008. Inhibitors of lactic acid fermentation in Spanish-style green olive brines of the Manzanilla variety. *Food Chemistry*. **110**:932 e 937.

- Oliveira, M., Brito D., Catulo L., Fausto Leitão F., Gomes L., Silva S., Vilas-Boas L., Peito A., Fernandes I., Gordo F., Peres C. 2004. Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*. **55**(3): 219-226.
- Panagou, E.Z., Schillinger U., Franz C.M.A.P., Nychas G-J.E. 2008 Microbiological and biochemical profile of cv *Conservolea* naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. **25**: 348-358.
- Piga, A., Gambella F., Vacca V., Agabbio M. 2001. Response of three Sardinian olive cultivars to Greek-style processing. *Italian Journal of Food Science*. **13**:29-40.
- Poiana, M., Romeo F.V. 2006. Change in chemical and microbiological parameters of some varieties of Sicily olives during natural fermentation. *Grasas y Aceites*. **57**(4):402-408.
- Randazzo, C.L., Restuccia C., Romano A.D., Caggia C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian olives. *International Journal of Food Microbiology*. **90**: 9-14.
- Sánchez, A.H., Reiano L., Montano A., de Castro A. 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. **67**:115-122.
- Silvestri, V., Francesca N., Settanni L., Moschetti G. 2009. Attitudini tecnologiche di batteri lattici starter per la fermentazione di olive verdi da mensa *Industrie Alimentari XLVIII*.
- Uccella, N. 2001. Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science and Technology*. **11**:328-339.