

**DEA  LIVA**



**MINISTERO DELL'AGRICOLTURA  
DELLA SOVRANITÀ ALIMENTARE  
E DELLE FORESTE**



## Progetto di Ricerca DEAOLIVA

Miglioramento della qualità, sostenibilità e sicurezza d'uso nella de-amarizzazione delle olive da tavola attraverso processi innovativi a scala pilota (D.M. 93882/2017 e D.M. 35902/2019).

ISBN: 9788833852751

Sito internet: <https://deaoliva.crea.gov.it>

## Progetto di Ricerca DEAOLIVA

Miglioramento della qualità, sostenibilità e sicurezza d'uso nella de-amarizzazione delle olive da tavola attraverso processi innovativi a scala pilota (D.M. 93882/2017 e D.M. 35902/2019).

# ATTI DEL CONVEGNO

25 MAGGIO 2023

CREA-IT Sede di Pescara

Risultati finali del Progetto DEAOLIVA

A cura di

Barbara Lanza, Martina Bacceli, Giuseppina di Loreto, Nicola Simone

# Indice

**Introduzione - Il Progetto DEAOLIVA - Coordinatore B. Lanza**  
..... pg. 6

**Realizzazione di un dispositivo prototipale per il monitoraggio dei principali parametri di fermentazione delle olive da tavola – R. Manganiello, R. Ciccoritti, R. Tomasone, C. Cedrola, P. Mattei, M. Pagano**  
..... pg. 8

**Nuove tecniche di selezione ottica e spettrale – R. Manganiello, S. Figorilli, C. Costa, L. Ortenzi, S. Violino, S. Vasta, F. Tocci, L. Moscovini, B. Lanza, F. Antonucci** ..... pg. 22

**Produzione sperimentale in azienda di olive da tavola fermentate con o senza aggiunta di starter - N. Simone, G. Di Loreto, M. Bacceli, S. Di Marco, M. Cellini, G. Vecchiotti, B. Lanza** ..... pg. 36

**Monitoraggio della qualità igienica di olive da tavola commerciali: uno sguardo alla sicurezza dei prodotti - N. Timpanaro, E. Pistorio, P. Foti, G. Sciuto, M. C. Giuffrida, F. V. Romeo**..... pg. 56

**Ruolo del rame esogeno nella formazione di clorofilline rameiche che determinano i processi di rinverdimento delle olive prodotte mediante il metodo Castelvetro - G. Pastore, F. Natella, A. Aguzzi, P. Gabrielli, N. Nardo, R. Ambra** ..... pg. 82

**Valutazione di colture starter di ceppi selezionati di batteri lattici (LAB) e lieviti killer in fermentazioni su scala di laboratorio di olive da tavola (*Olea***

**europaea L.) cv. Leccino** - G. F. Bencresciuto, C. Mandalà, C. A. Migliori e L. Bardi ..... pg. 98

**Ocratossina A e Aflatossine: valutazione adattamento del test ELISA alla “matrice olive”** - A. Cammerata, V. Del Frate, T. Monforte ..... pg. 120

**Caratterizzazione della texture di olive da tavola mediante test meccanici-acustici** - G. Cortellino, S. Paccani, F. Lovati, M. Grassi, M. Vanoli ..... pg. 132

**Caratterizzazione sensoriale di olive e patè del commercio** – M. Bacceli, N. Simone e B. Lanza..... pg. 147

**Caratterizzazione chimico/nutrizionale di olive del commercio** – L. Di Giacinto, M. G. Di Serio, P. Del Re, L. Giansante..... pg. 165

**Lavori scientifici realizzati nell’ambito del progetto DEAOLIVA** ..... pg. 188

---

## IL PROGETTO DEAOLIVA

Il progetto DEAOLIVA, acronimo di “Miglioramento della qualità, sostenibilità e sicurezza d'uso nella de-amarizzazione delle olive da tavola attraverso processi innovativi a scala pilota”, è stato finanziato con D.M. 93882 del 29/12/2017 del MiPAAF. Il Progetto nasce dalla necessità di fornire alle aziende produttrici una serie di input procedurali per migliorare la qualità del prodotto finito ed evitare fermentazioni anomale, fenomeni di spoilage e deterioramento delle olive stesse. Il Progetto si propone quindi di *a)* selezionare ed utilizzare come starter batteri lattici e lieviti in prove di fermentazione “al naturale” lab-scale o direttamente in azienda al fine di individuare quelli in grado di fornire le migliori performances fermentative; *b)* sperimentare sistemi innovativi per la classificazione automatica di lotti di olive da tavola rispetto a patterns colorimetrici per la valutazione qualitativa del prodotto in ingresso; *c)* progettare, sviluppare ed implementare un dispositivo prototipale per il monitoraggio e controllo step-by-step dei parametri di fermentazione; *d)* monitorare le salamoie di fermentazione alla ricerca di microrganismi potenzialmente patogeni; *e)* controllare i fenomeni di "spoilage" anche mediante l'utilizzo di lieviti killer; *f)* affrontare il complesso problema di "green staining" nel sistema “Castelvetrano”; *g)* migliorare il prodotto relativamente agli aspetti organolettici, igienico-sanitari e di sostenibilità produttiva.

Il progetto ha durata quinquennale e l'attività prevista si sviluppa operando su quattro WPs e numerose Tasks:

WP 1 - Coordinamento (Coordinatore: B. Lanza CREA-IT Pescara)

WP 2 - Implementazioni tecnologiche innovative (WP Leader: M. Pagano CREA-IT Monterotondo)

- Task 2.1. Produzione sperimentale di olive da tavola e patè deamarizzati/fermentati lab-scale con o senza aggiunta di starter (Task Leader: B. Lanza CREA-IT Pescara)
- Task 2.2. Nuove tecniche di selezione ottica e spettrale (Task Leader: F. Antonucci CREA-IT Monterotondo)
- Task 2.3. Progettazione, sviluppo, implementazione e messa a punto di un dispositivo prototipale per il monitoraggio e controllo step-by-step, dei parametri di fermentazione (Task Leaders: M. Pagano e R. Tomasone CREA-IT Monterotondo)

- Task 2.4. Divulgazione dei risultati ottenuti tramite affidamento esterno ad una società/consorzio di O.P. (Task Leader: B. Lanza CREA-IT Pescara)

WP 3 - Controllo della qualità dei prodotti fermentati attraverso analisi microbiologica e chimica delle olive e delle salamoie di fermentazione (WP Leader: F.V. Romeo CREA-OFA Acireale)

- Task 3.1: Monitoraggio microbiologico e ricerca di microrganismi potenzialmente patogeni (Task Leader: F.V. Romeo CREA-OFA Acireale)
- Task 3.2: Controllo di fenomeni di spoilage mediante lieviti killer (Task Leader: L. Bardi CREA-IT Torino)
- Task 3.3. Analisi dei possibili determinanti la comparsa del green staining (Task Leader: G. Pastore CREA-AN Roma)

WP 4 - Controllo texturale, sensoriale e chimico/nutrizionale dei prodotti (WP Leader: G. Cortellino CREA-IT Milano)

- Task 4.1. Caratterizzazione texturale (Task Leader: G. Cortellino CREA-IT Milano)
- Task 4.2. Caratterizzazione sensoriale (Task Leader: B. Lanza CREA-IT Pescara)
- Task 4.3. Caratterizzazione chimico/nutrizionale (Task Leader: L. Di Giacinto CREA-IT Pescara)

Coordinatore Dott.ssa Barbara Lanza

# Realizzazione di un dispositivo prototipale per il monitoraggio dei principali parametri di fermentazione delle olive da tavola

**R. Manganiello<sup>1</sup>, R. Ciccoritti<sup>2</sup>, R. Tomasone<sup>1</sup>, C. Cedrola<sup>1</sup>, P. Mattei<sup>1</sup>, M. Pagano<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari (CREA-IT) - Via della Pascolare 16, 00015 Monterotondo (Roma)

<sup>2</sup> Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA) - Via di Fioranello, 52 00134 Roma

## Introduzione

La filiera delle olive da tavola rappresenta un settore chiave dell'agroalimentare italiano, considerato che nel 2020 è stato stimato un consumo pro-capite di circa 1,8 kg anno che viene soddisfatto grazie ad un import di circa 100.000 t [1]. Tuttavia, il settore in Italia, attualmente dominato da piccole aziende produttrici, mostra interessanti potenzialità di crescita, pur necessitando di strategie di sviluppo, innovazione e investimenti. La produzione di olive da mensa di qualità, che siano integre e prive di difetti nell'aspetto, nei sapori e negli aromi, e che soddisfino le aspettative dei consumatori, richiede l'adozione di accorgimenti particolari volti a limitare gli effetti collaterali associati ai processi fermentativi che hanno luogo durante le fasi di trasformazione e conservazione. Le olive al momento della raccolta non sono commestibili, infatti l'elevato contenuto di oleuropeina, (un secoiridoide glicosidico) conferisce alle stesse un sapore amaro; è quindi necessario sottoporle ad un particolare tipo di trattamento (deamarizzazione in salamoia) secondo diversi metodi di lavorazione volti a deamarizzare e stabilizzare il prodotto finale. Nelle varie fasi del processo di deamarizzazione, le drupe possono andare incontro a fermentazioni spontanee non sempre desiderate, causate principalmente da batteri lattici e lieviti [2]. I principali fattori che possono innescare i processi fermentativi sono: variazioni del rapporto olive/salamoia, cambiamenti nelle condizioni ambientali (sbalzi di temperatura e condizione di aerobiosi), alterazione dei parametri chimico-fisici della salamoia (pH, acidità, concentrazione di sali e ossigeno disciolti). Le fermentazioni anomale, come ad esempio la fermentazione putrida, butirrica o propionico-butirrica (detta



comunemente “Zapateria”), andando ad alterare i valori di pH, acidità e concentrazione salina, possono determinare la formazione di muffe e film blastomicetici sulla superficie delle salamoie, oppure il raggrinzimento, rammollimento o creazione di sacche di gas nella polpa delle olive, modificando così il “flavor” del prodotto finale e diminuendone significativamente il valore commerciale e nutrizionale [3]. Generalmente, le cattive pratiche industriali sono le cause più comuni di queste anomalie che favoriscono lo sviluppo incontrollato dei processi fermentativi [4]. Pertanto, è necessario monitorare costantemente le condizioni delle salamoie durante le fasi di lavorazione e conservazione delle olive, affinché il prodotto finale risulti privo di sapori anomali, difetti olfattivi o altri sintomi di alterazioni in corso, quindi conforme secondo l’attuale regolamento commerciale [5].

I principali parametri chimico-fisici monitorati nelle salamoie (temperatura, pH, acidità libera e volatile, soda residua, concentrazione salina), durante il processo di conservazione delle olive da tavola, sono generalmente stimati applicando metodiche analitiche generalmente complesse che richiedono laboratori attrezzati e personale specializzato. Negli ultimi anni, grazie al potenziamento di sensori sempre più affidabili, è stato possibile sviluppare dispositivi e sistemi elettronici impiegati, ad esempio, per il monitoraggio delle variazioni di temperatura, pH e salinità, principalmente in soluzioni acquose [6]. Ad oggi, tuttavia, non risultano in commercio sistemi automatizzati per il monitoraggio in salamoia dei parametri precedentemente menzionati né di altri importanti indicatori di processo, quali, ad esempio, l’acidità libera, acidità volatile e l’idrossido di sodio residuo. I principali fattori che hanno ostacolato lo sviluppo di sistemi automatizzati per il monitoraggio dei parametri chiave delle salamoie, nel trattamento delle olive da mensa, consistono sostanzialmente nell’alta concentrazione di sali disciolti e nella densità/viscosità della matrice.

Nell’ambito del progetto DEAOLIVA (coordinato dal CREA-IT e finanziato dal MiPAAF: D.M. n. 93882/2017), è stato progettato e realizzato un sistema portatile dotato di dispositivi digitali e sensorizzati per il monitoraggio continuo della salamoia delle olive da tavola, utile per controllare le fasi di produzione che inducono cambiamenti non desiderati durante le fasi di stoccaggio. I principali parametri di fermentazione (temperatura, pH, salinità, acidità libera e acidità volatile) di diversi tipi di salamoia (conforme ed alterata), sono stati analizzati sia con l’impiego del prototipo sensorizzato, in maniera automatizzata, sia con le metodiche di riferimento, secondo i protocolli ufficiali, con l’obiettivo di testare il

funzionamento del dispositivo prototipale e verificarne l'affidabilità e la ripetibilità delle misure.

L'impiego del prototipo realizzato potrà consentire la verifica degli effetti sul prodotto finale, in termini di qualità, salubrità e, soprattutto, sostenibilità economica ed ambientale. Infatti, il monitoraggio continuo e automatizzato delle salamoie, comporta una ridotta necessità di personale specializzato, un risparmio di materiali di laboratorio (reagenti chimici) convenzionalmente utilizzati per il controllo periodico dei parametri di processo nei contenitori di stoccaggio e allo stesso tempo, consente di evitare il deterioramento del prodotto finale, conferendo la possibilità di intervenire tempestivamente con piccole correzioni dei parametri chimico-fisici delle salamoie, secondo gli standard legislativi [5].

## **Materiali e metodi**

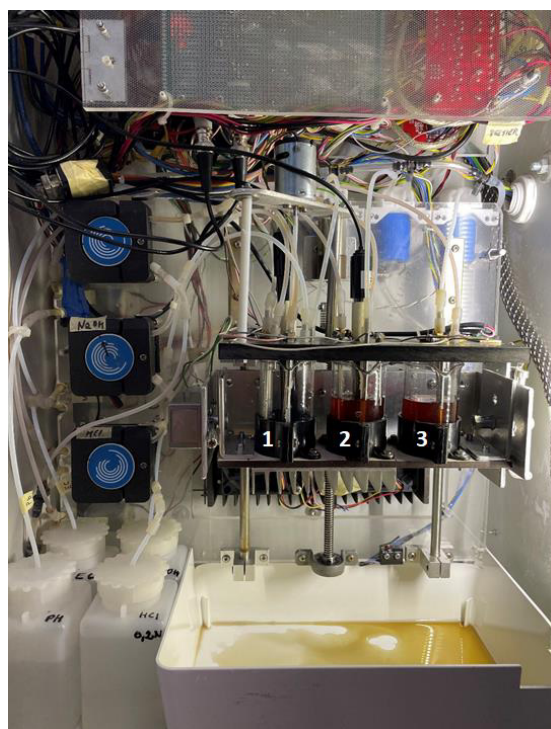
### *Prototipo sensorizzato*

Il dispositivo è stato progettato e realizzato dai ricercatori del CREA-IT di Monterotondo (RM) nell'ambito del progetto DEAOLIVA (WP2: "Implementazioni tecnologiche innovative").

Il sistema di analisi è costituito da un case principale (600x400x250 mm) nel quale sono stati inseriti un pH-metro, un conduttivimetro e un sensore di gas organici volatili che misurano i principali parametri chimico-fisici. La salamoia viene prelevata mediante pompe peristaltiche ed inviata in 3 becher dove avvengono le varie misurazioni. Il dispositivo è costituito da un secondo case (300x230x90 mm) nel quale è stato inserito un PC (touch screen) dotato di software per il controllo e gestione del funzionamento e dell'acquisizione e archiviazione dei dati (Figura 1).



**Figura 1.** Foto del prototipo sensorizzato, contenente l'intero sistema di analisi e il pc.



**Figura 2.** Interno del case principale, contenente i sensori, le pompe, i microcontrollori, i reagenti, i 3 becher e la vaschetta di raccolta per lo svuotamento dei becher.

All'interno del *case* principale alloggiano tutte le componenti meccatroniche per la movimentazione del modulo di analisi: i microcontrollori, i sensori, le pompe con i relativi condotti ed i contenitori con i reagenti chimici utilizzati per le titolazioni potenziometriche (idrossido di sodio 0.1N e acido cloridrico 0.2N) ed i liquidi di mantenimento della sonda del pH-metro (cloruro di potassio 3N) e del conduttivimetro (Standard Buffer Solution 12,88 mS/cm) (Figura 2).

La salamoia da analizzare e l'acqua distillata utilizzata per il lavaggio delle pompe e dei becher vengono prelevate da contenitori esterni mediante pompe peristaltiche bidirezionali. Il *case* presenta sul retro un ampio radiatore per il controllo termico: l'unità è in grado di mantenere la temperatura della cella di analisi sul valore prefissato nel range 15-30°C, riscaldandola o raffreddandola secondo necessità. Esiste, inoltre, un sistema di riscaldamento aggiuntivo per il terzo becher, in grado di portare lo stesso fino e oltre i 50°C, per poter effettuare l'analisi dei composti organici volatili.

Esternamente al *case* principale è posizionato un sensore (DS18B20) che misura costantemente la temperatura dell'ambiente esterno.

Il modulo di analisi è costituito da 3 becher da 50 ml disposti sopra una piastra termostata mediante l'impiego di due celle di Peltier. I becher sono fissati ad un cestello motorizzato semovente che si sposta lungo 2 guide verticali con un'escursione di 150 mm. Un secondo motore permette la rotazione di 165° del cestello, per consentirne lo svuotamento del contenuto in una vaschetta di raccolta posizionata al di sotto del blocco. I becher sono alimentati da pompe peristaltiche bidirezionali dove il livello di riempimento utile nelle misurazioni è controllato da sensori di livello elettronici.

Il primo becher ospita il pH-metro (*pH Circuit V4.0*, Atlas Scientific, Long Island City, NY, USA) ed è deputato alle titolazioni potenziometriche per determinare l'acidità libera e combinata in soluzione. È alimentato da pompe peristaltiche con risoluzione pari o inferiore al  $\mu$ l, per poter prelevare la quantità stechiometrica di campione e dispone, inoltre, di un agitatore meccanico per poter agitare la soluzione durante l'analisi.

Il secondo becher supporta il conduttivimetro (*DFRobot Gravity DFR0300-H: analog electrical conductivity sensor/meter K=10*) ed è destinato alla determinazione della salinità della salamoia. Il campo di misura è fino a 100 mS/cm.

Il terzo becher è destinato all'analisi dell'acidità volatile mediante un sensore di gas a film spesso di semiconduttore di ossido metallico serigrafato (*TGS2620*, Figaro Group, Mino, Osaka, Japan), caratterizzato da un'elevata selettività e sensibilità ai

vapori organici volatili, tra cui l'acido acetico. Il becher dispone di un riscaldatore aggiuntivo per favorire la liberazione dei vapori una volta prelevata la salamoia.

Al termine delle analisi, tutti i becher e le pompe vengono lavati prelevando acqua distillata dal contenitore esterno. I sensori di pH ed EC vengono immersi negli specifici liquidi di mantenimento nei becher 1 e 2, mentre il sensore di gas (posto sopra al becher 3) si mantiene in aria libera.

I 3 microcontrollori (*MCU Arduino*) installati nel dispositivo hanno la funzione di interfacciare l'hardware con il sistema di controllo senza interagire tra loro. Il primo (*Arduino Uno*) controlla le 10 pompe, i 2 motori del cestello con i 4 sensori di posizione, i 3 sensori di livello e l'agitatore. Il secondo (*Arduino Uno*) controlla i 6 sensori di temperatura (ambiente esterno, ambiente interno, radiatore esterno, radiatore interno, cella becher 1, cella becher 3), le due celle di Peltier, il riscaldatore resistivo del becher 3 e i due ventilatori. Il terzo (*Arduino Mega 2560*) gestisce l'alimentazione dei sensori ed ospita il software di controllo del conduttivimetro.

### *Metodi sperimentali di analisi e sistema di controllo del prototipo*

La procedura di analisi è la riproduzione robotizzata delle operazioni che sarebbero state effettuate da un operatore umano sulle salamoie, ovvero: la determinazione dell'acidità libera e dell'acidità combinata nel becher 1, la determinazione della concentrazione salina nel becher 2 e la determinazione dell'acidità volatile nel becher 3. Prima di ogni analisi è necessario effettuare una serie di step: verificare la temperatura preimpostata, controllare lo status dei sensori, recuperare i liquidi di mantenimento, precaricare le varie pompe con la salamoia e lavare i becher.

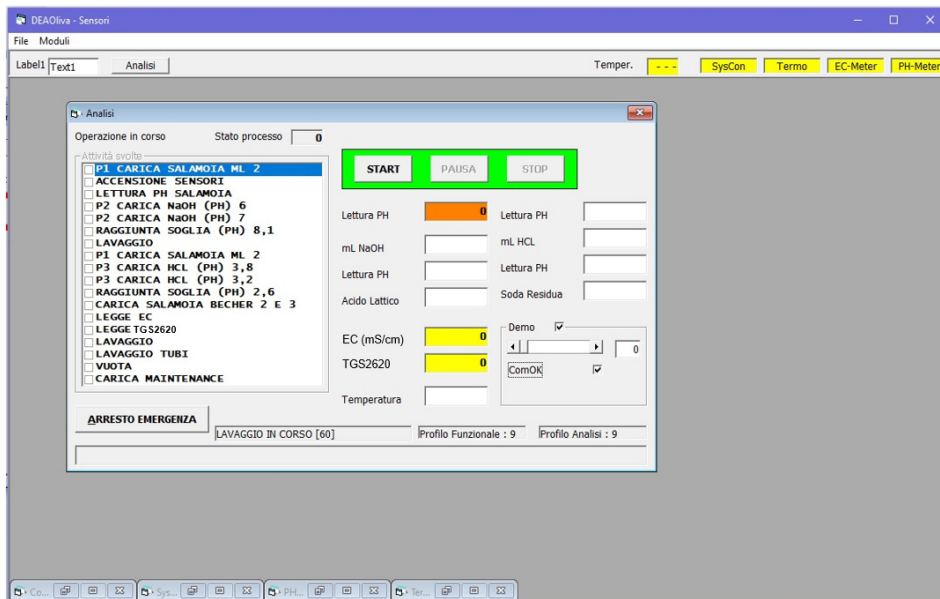
La determinazione dell'acidità libera prevede il prelievo di 15 ml di salamoia che vengono titolati goccia a goccia con una soluzione di NaOH 0.1N nel becher 1, sotto agitazione meccanica, misurando il pH fino al valore di 8.1. Terminata la titolazione il becher 1 viene svuotato e lavato con acqua distillata, per effettuare l'analisi successiva.

La determinazione dell'acidità combinata è una misura indiretta della soda residua presente nella salamoia a contatto con le olive. L'analisi viene effettuata nel becher 1 mediante titolazione potenziometrica di 15 ml di campione con HCl 0.20N, misurando il pH fino al raggiungimento del valore di 2.6.

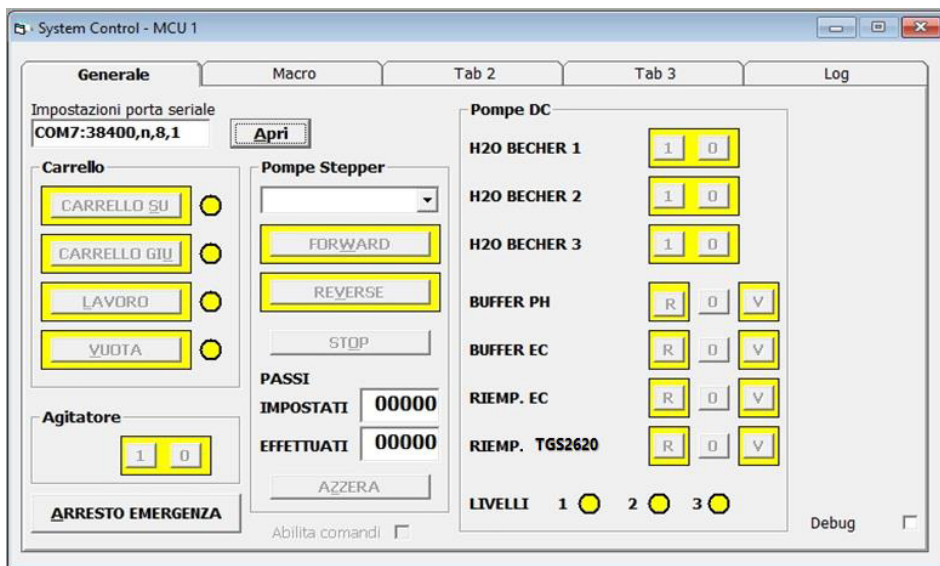
Le misure della conducibilità elettrica della salamoia e della quantità di vapori organici volatili vengono effettuate rispettivamente nei becher 2 e 3, prelevando 25 ml di salamoia e attendendo qualche minuto per la lettura dei sensori.

Il PC, contenuto nel case accessorio, consente di controllare e gestire l'esecuzione dei vari applicativi del modulo di analisi. In particolare, consente di configurare l'hardware, impostare i parametri funzionali dei singoli moduli, ovvero i coefficienti di taratura delle pompe *stepper*, in modo che possano prelevare la quantità esatta di campione o di reagente e gestire le impostazioni delle singole operazioni contenute nelle "macro". Al termine di ogni analisi è possibile visualizzare sul monitor i valori ottenuti dalle titolazioni o dalle letture dei sensori, come mostrato in figura 3.

Ogni sensore può essere attivato, disattivato o tarato manualmente mediante un pannello di controllo. Inoltre, il pannello di controllo generale (figura 4) permette di eseguire manualmente ogni singola operazione, tra cui: la movimentazione del carrello, l'accensione o spegnimento dell'agitatore nel becher 1, la taratura delle 3 pompe *stepper* (salamoia, NaOH e HCl), il riempimento o svuotamento dei becher con acqua distillata, buffer pH-metro, buffer conduttivimetro, salamoia nei becher 2 e 3. È possibile anche arrestare il processo tramite il comando "arresto di emergenza".



**Figura 3.** Interfaccia grafica del sistema di controllo del prototipo, dove vengono visualizzate tutte le operazioni svolte (a sinistra) e i valori ottenuti al termine di ogni analisi (a destra)



**Figura 4.** Interfaccia grafica del sistema di controllo grazie al quale è possibile visualizzare e svolgere manualmente tutte le operazioni del prototipo.

Terminato un ciclo completo di analisi, i risultati acquisiti vengono registrati ed archiviati automaticamente, per poter essere consultati e dare la possibilità di intervenire tempestivamente con la correzione delle salamoie.

### *Metodi di analisi di riferimento*

L'analisi dei parametri chimico-fisici dei liquidi di governo (salamoie) delle olive da tavola sono state effettuate secondo i protocolli riportati in Gazzetta Ufficiale [7], per confrontare i risultati ottenuti dalle analisi automatizzate del prototipo.

Il pH è il principale indicatore dell'andamento del processo fermentativo in salamoia e la sua determinazione è stata effettuata mediante un pH-metro da banco (*Orion Star A111*, CARLO ERBA Reagents S.r.l., Cornaredo, Milano), con sonda di temperatura incorporata.

La determinazione dell'acidità libera, ovvero degli acidi organici liberi in soluzione a causa della fermentazione lattica, è stata effettuata mediante titolazione acido-base, con il metodo dell'indicatore (fenolftaleina), secondo il protocollo ufficiale di analisi per le conserve vegetali [7].

L'acidità combinata si riferisce alla quantità di acidi organici salificati in seguito all'azione della soda; pertanto, può essere determinata per stimare la percentuale

di soda residua, quando tra olive e salamoia si è stabilito un certo equilibrio. L'analisi di questo parametro è stata effettuata mediante titolazione potenziometrica della salamoia con una soluzione di acido cloridrico, come descritto da Cappello e Poiana [8].

La determinazione dell'acidità volatile è importante per individuare eventuali anomalie e difetti, poiché in caso di andamenti anomali del processo fermentativo si verifica un aumento della frazione volatile. Nelle salamoie delle olive da tavola la componente principale della frazione di acidità volatile è rappresentata da acido acetico. La sua determinazione è stata effettuata attraverso la distillazione della salamoia in corrente di vapore e la successiva titolazione del distillato con il metodo dell'indicatore [8].

Infine, la determinazione della concentrazione salina, parametro molto importante per la sua influenza sui processi fermentativi, è stata effettuata mediante titolazione argentometrica (Metodo di Mohr) secondo il protocollo ufficiale per la determinazione dei cloruri [8].

## **Risultati e discussione**

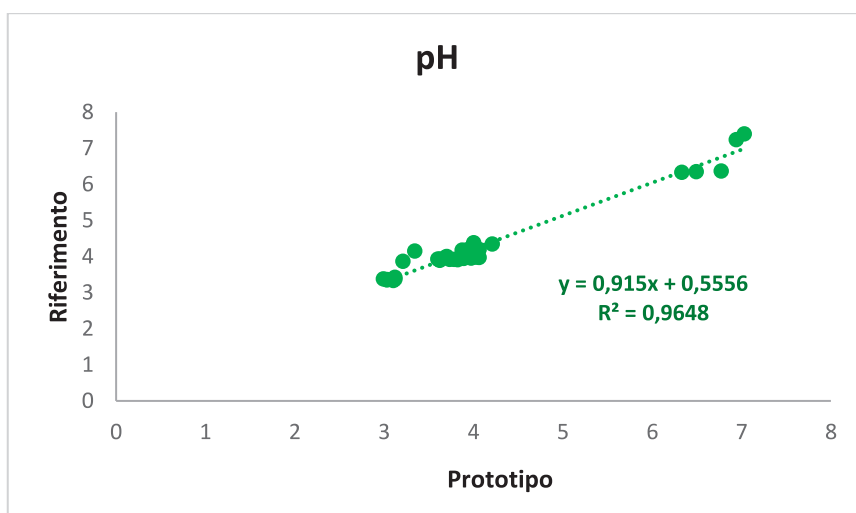
Diversi tipi di salamoia (2 vergini contenenti diverse concentrazioni di sale, 5 conformi a contatto con diverse varietà di olive, 5 alterate in seguito a fermentazioni anomale) sono state analizzate sia con il prototipo automatizzato, sia con i metodi ufficiali in laboratorio, effettuando tre repliche per ciascuna determinazione.

Il confronto tra i dati ottenuti dalle analisi convenzionali di laboratorio e quelli registrati con il prototipo mostra una buona correlazione lineare per quasi tutti i parametri, ovvero il pH (figura 5), l'acidità libera (figura 6), l'acidità combinata (figura 7) e la concentrazione salina (figura 8). L'andamento dei parametri chimico-fisici nelle varie salamoie analizzate rispecchia quello di studi precedenti effettuati su salamoie conformi e alterate, analizzate nel corso di processi fermentativi sia spontanei che controllati [9]. Inoltre, le misure effettuate con i sensori del prototipo in maniera automatizzata sono riproducibili e ripetibili nel tempo, a dimostrazione che la strumentazione oggetto del presente studio consente di effettuare delle misurazioni con errori delle determinazioni analitiche contenuti.

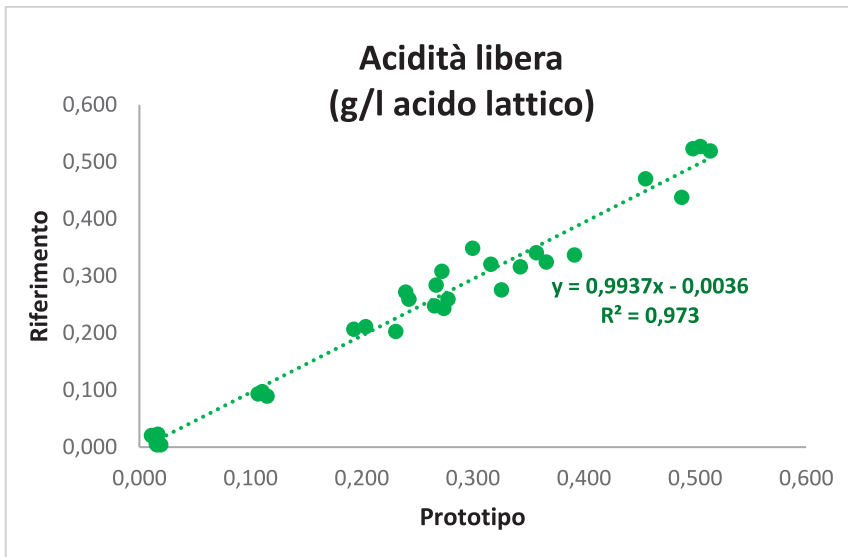
Per quanto riguarda l'acidità volatile (figura 9), il coefficiente di correlazione lineare tra il metodo sperimentale del prototipo e quello di riferimento è inferiore a quello degli altri analiti (0.897). La minor linearità tra i dati ottenuti dalla metodica di riferimento e quelli valutati dallo strumento è riconducibile all'elevata selettività



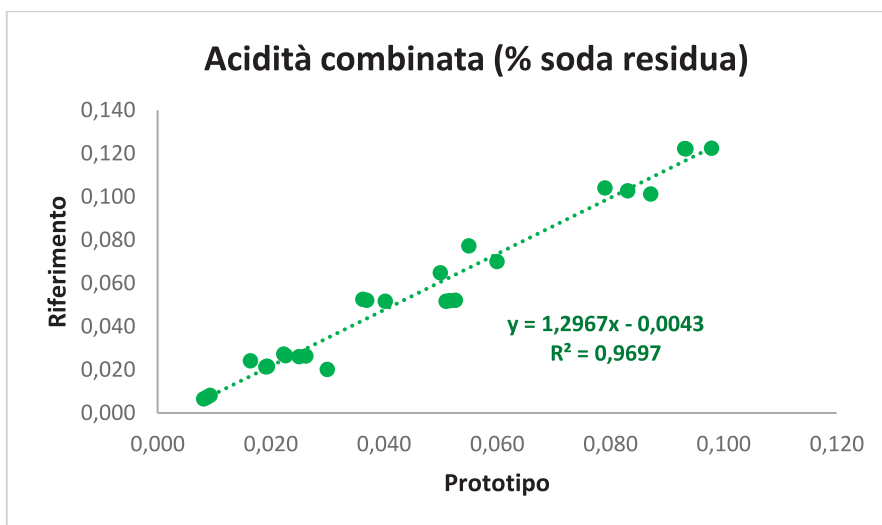
del sensore stesso verso ogni singolo gas organico volatile, in questo caso l'acido acetico. Viceversa, la determinazione mediante flusso di vapore e successiva titolazione non discrimina i vapori degli acidi organici volatili in relazione alla natura chimica; nel computo totale rileva anche l'etanolo e l'acido propionico, che insieme agli acidi lattico e acetico sono i prodotti metabolici maggiormente presenti nelle salamoie. L'acido acetico e l'etanolo nelle salamoie sono prodotti dalla fermentazione eterolattica dei lattobacilli, soprattutto in condizioni di stress ambientale (come, ad esempio, la carenza di ossigeno, la limitazione di nutrienti, la concentrazione di sale, bassi livelli di pH). Inoltre, l'etanolo in salamoia viene prodotto soprattutto dalla fermentazione alcolica dei lieviti ed è presente in elevate quantità per via della sua elevata miscibilità con l'acqua. In concentrazioni minori è presente anche l'acetato di etile, prodotto dell'esterificazione dell'acido acetico in fase acquosa con l'etanolo.



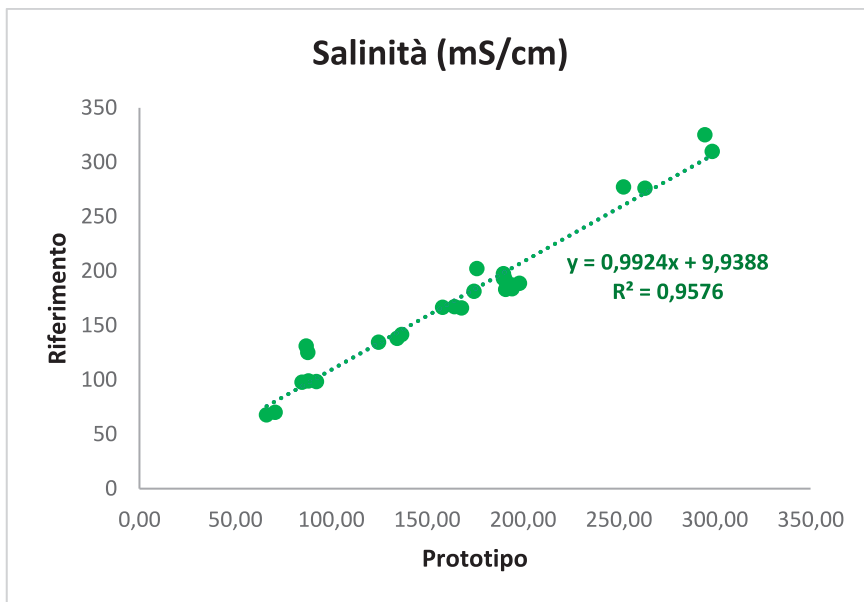
**Figura 5.** pH delle diverse salamoie analizzate: correlazione tra la determinazione ufficiale e la determinazione automatizzata con il prototipo.



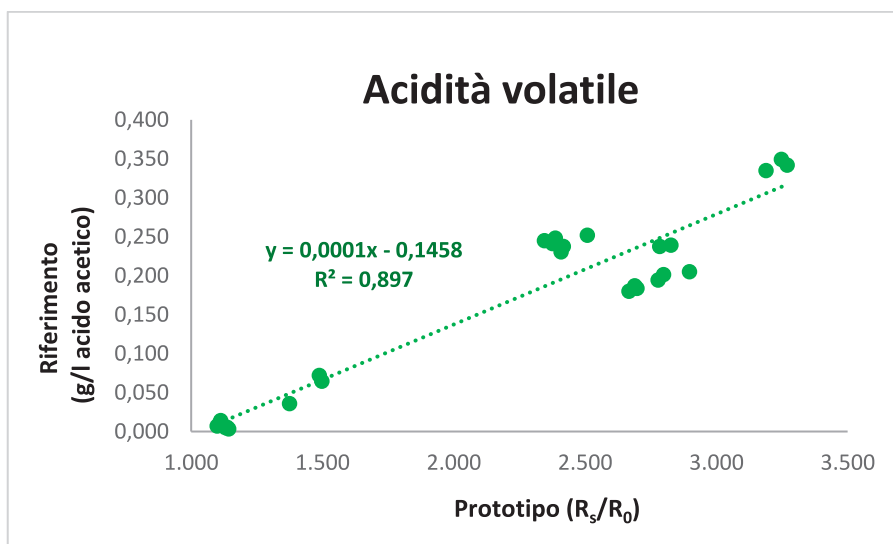
**Figura 6.** Acidità libera titolabile (espressa in g/l di acido lattico) delle diverse salamoie: correlazione tra il metodo di riferimento e la titolazione automatizzata effettuata con il prototipo.



**Figura 7.** Acidità combinata (espressa in Eq/l di salamoia) delle diverse salamoie: correlazione tra il metodo di riferimento e la titolazione automatizzata effettuata con il prototipo.



**Figura 8.** Concentrazione salina (espressa in mS/cm) delle diverse salamoie: correlazione tra il metodo di riferimento (Metodo di Mohr) e il metodo sperimentale del prototipo (conduttivimetro).



**Figura 9.** Acidità volatile misurata nelle diverse salamoie: correlazione tra il metodo di riferimento secondo cui è espressa in g/l di acido acetico e il metodo sperimentale del prototipo che misura il rapporto tra la resistenza elettrica al passaggio del gas ( $R_s$ ) e la stessa in aria libera ( $R_0$ ).

Le salamoie alterate da fermentazioni anomale hanno mostrato un aumento del contenuto di acidità volatile e la relativa diminuzione della concentrazione di acido lattico, con un caratteristico rapporto acidità volatile/acidità libera maggiore di 1 rispetto ai campioni conformi, in accordo con lo studio di Montaño *et al.* [10]. In particolare, le salamoie alterate dalle fermentazioni propionica e butirrica sono caratterizzate da un elevato contenuto di acidi carbossilici, mentre quelle putride e ammuffite hanno un maggiore contenuto di alcoli.

## Conclusioni

Il prototipo progettato e realizzato nell'ambito del progetto DEAOLIVA consente di monitorare step-by-step i parametri di fermentazione delle salamoie di stoccaggio delle olive da tavola in modalità automatizzata, favorendo un risparmio in termini di tempo, impiego di personale specializzato e di reagenti chimici normalmente utilizzati per svolgere le analisi chimico-fisiche con i metodi convenzionali. I principali parametri chimico-fisici delle salamoie (pH, acidità libera e volatile, soda residua e concentrazione salina) misurati con il prototipo, sono stati confrontati e confermati dai metodi di controllo tradizionali. I sensori installati nel prototipo e i reagenti necessari per le analisi chimiche sono facilmente reperibili a costi accessibili. Inoltre, il dispositivo è di tipo portatile e di facile utilizzo. In futuro, il sistema messo a punto potrà essere collegato simultaneamente a più contenitori di stoccaggio. Un'ulteriore implementazione dell'apparato potrebbe prevedere l'inserimento di un *alert-system* per ciascun parametro misurato, in modo da poter intervenire tempestivamente se verranno rilevate variazioni significative nella concentrazione di sale, o innalzamenti dei valori di pH e temperatura. Sarà quindi possibile monitorare costantemente ed in maniera automatizzata le salamoie, per prevenire ed evitare le alterazioni anomale, sia nel corso della lavorazione delle olive da mensa che nella fase di stoccaggio del prodotto finito, traendo vantaggi sia in termini qualitativi che di sostenibilità ambientale, energetica ed economica.

## Bibliografia

1. Pezzolla A., 2021. Olive da mensa: un settore affascinante. *Fruit Journal: Olivo e olio*, 1 dicembre 2021.
2. 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.
3. Lanza B., Poiana M., 2012. Olive da tavola: tecnologia. Collana divulgativa dell'Accademia, Volume XX. Accademia Nazionale dell'Olivo e dell'Olio. Spoleto (PG). ISSN 2281-4930.
4. Sánchez R., Fernández A., Martín-Tornero E., Meléndez F., Lozano J., Martín-Vertedor D., 2022. Application of digital olfaction for table olive industry. *Sensors*, 22(15), 5702.
5. COI, 2004. Norma commerciale applicabile alle olive da tavola. COI/OT/NC n. 1, Dicembre 2004; Madrid, Spagna.
6. Reljić M., Romić M., Romić D., Gilja G., Mornar V., Ondrasek G., Bubalo Kovačić M., Zovko M, 2023. Advanced continuous monitoring system—tools for water resource management and decision support system in salt affected delta. *Agriculture*, 13(2):369.
7. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, 1989. Metodi ufficiali di analisi per le conserve vegetali. Supplemento ordinario alla *Gazzetta Ufficiale. Serie generale* n.168 del 20-07-1989, pagg. 39-41.
8. Cappello A., Poiana, M., 2005. Le olive da tavola in Sicilia. Produzioni di qualità, Regione Siciliana, Università Mediterranea di Reggio Calabria, Castelvetro, pagg. 157-160.
9. Panagou E. Z., Schillinger U., Franz C. M., 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(2): 348-358.
10. Montañó A., De Castro A., Rejano L., Brenes M., 1996. 4-hydroxycyclohexanecarboxylic acid as a substrate for cyclohexanecarboxylic acid production during the "Zapatera" spoilage of Spanish-style green table olives. *Journal of food protection*, 59(6):657-662.

# Nuove tecniche di selezione ottica e spettrale

**R. Manganiello, S. Figorilli, C. Costa, L. Ortenzi, S. Violino, F. Pallottino, S. Vasta, F. Tocci, L. Moscovini, B. Lanza e F. Antonucci\***

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari Via della Pascolare 16, 00015 Monterotondo Scalo (Roma)

## Introduzione

Ad oggi, l'elevata competitività che caratterizza la globalizzazione dei mercati, ha reso fondamentale individuare strategie che puntino all'ottenimento di prodotti di qualità. In generale, la qualità dei frutti è determinata dall'insieme delle caratteristiche intrinseche ed estrinseche che permettono di soddisfare le aspettative del consumatore. Il raggiungimento di determinati standard qualitativi dipende da numerosi fattori conseguenza delle operazioni che vengono effettuate, a partire dalle operazioni di post-raccolta fino alle lavorazioni e trasformazioni dei prodotti [1]. Nel caso del settore olivicolo, soprattutto per le olive da mensa, è di grande importanza, durante il post-raccolta, classificare le drupe rispetto sia a pattern colorimetrici (maturazione) che a difetti (interni ed esterni), per la valutazione qualitativa del prodotto in ingresso preliminarmente alle fasi di trasformazione (pre- e post-lavorazione) [2].

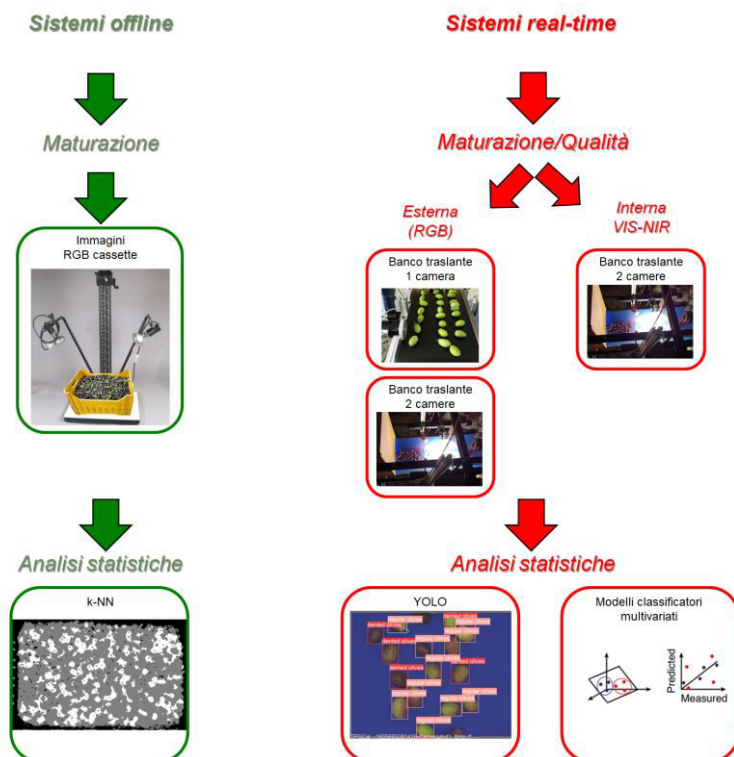
A tal fine, negli ultimi anni, sono stati messi a punto strumenti di ispezione automatica basati sull'utilizzo di tecnologie all'avanguardia che prevedono l'utilizzo di telecamere ad alta definizione, che, attraverso l'elaborazione e l'analisi delle immagini acquisite, permettono una determinazione oggettiva e non distruttiva di determinate caratteristiche ottiche di questi prodotti, correlabili a precisi parametri di qualità.

La velocità, l'accuratezza ed i costi tendenzialmente bassi sono l'insieme delle caratteristiche dei sistemi ottici innovativi utilizzati in questo studio, i quali hanno permesso una classificazione automatica ed oggettiva di lotti di olive da mensa, rispetto a pattern colorimetrici e difetti (esterni ed interni), per la valutazione qualitativa del prodotto in ingresso ed in uscita alle fasi di trasformazione.

Nello specifico, sono state effettuate due tipologie di analisi (Figura 1):

- "sistemi offline" per la stima speditiva in campo del grado di maturazione di lotti di olive attraverso sistemi di imaging RGB di intelligenza artificiale;

- “sistemi real-time” per identificare il grado di maturazione e gli aspetti qualitativi interni ed esterni delle drupe attraverso due apparati meccano-optoelettronici per immagini (RGB, e combinato RGB e iperspettrale VIS-NIR), appositamente implementati per il progetto, in combinazione con lo sviluppo di reti neurali convoluzionali (*You Only Look Once*, YOLO) e modelli classificatori multivariati di intelligenza artificiale.



**Figura 1:** Workflow delle analisi sviluppate in questo studio. “Sistemi offline” per la stima speditiva in campo del grado di maturazione di lotti di olive attraverso sistemi di imaging RGB di intelligenza artificiale; “sistemi real-time” per identificare il grado di maturazione e gli aspetti qualitativi interni ed esterni delle drupe attraverso due apparati meccano-optoelettronici per immagini (RGB, e combinato RGB e iperspettrale VIS-NIR) appositamente implementati per il progetto, in combinazione con lo sviluppo di reti neurali convoluzionali (*You Only Look Once*, YOLO) e modelli classificatori multivariati di intelligenza artificiale.

## Sistemi offline

Il grado di maturazione delle olive è un fattore molto importante da considerare al momento della raccolta, soprattutto per la determinazione della qualità dei

prodotti finali. L'Indice di maturazione di Jaén [3] è attualmente considerato uno dei metodi più indicativi per determinarlo. Tuttavia, il conteggio e la valutazione visuale di 100 olive non è un procedimento rapido ed obiettivo per le operazioni di campo. Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare, immediatamente dopo la raccolta, il grado di maturazione di lotti di olive attraverso un sistema di visione artificiale, ripetibile ed obiettivo, utilizzando l'analisi di semplici immagini RGB di cassette di olive appena raccolte, basata sull'algoritmo di clustering *k-Nearest Neighbors* (k-NN) [4]. Per superare diversi scenari di illuminazione che possono verificarsi in ambienti dinamici (es. frantoio, aria aperta, ecc.), le immagini sono state sottoposte ad un metodo di calibrazione colorimetrica automatica sviluppato da Menesatti *et al.* [5].

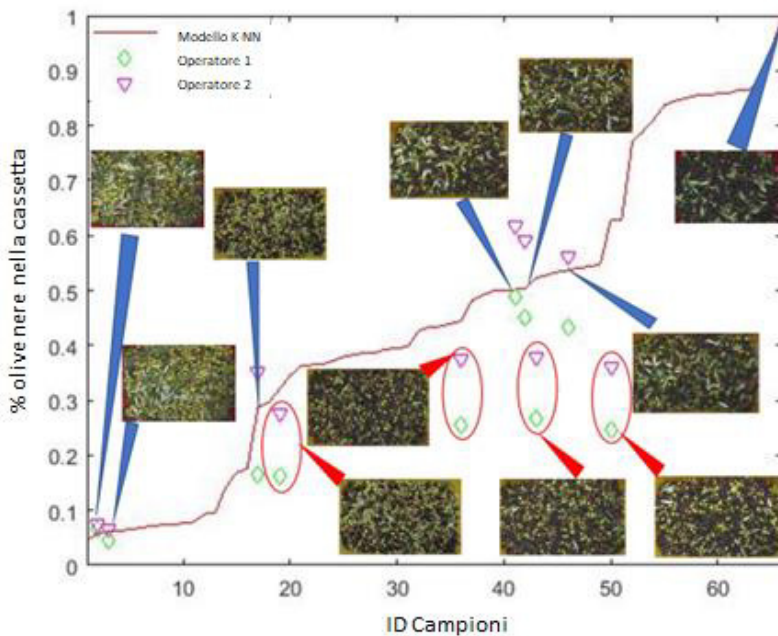
Le olive di tre cultivar differenti (i.e., Carboncella, Frantoio e Leccino) a diversi stadi di maturazione, sono state poste in cassette di plastica e poi portate al frantoio per l'acquisizione delle immagini. Per la validazione, alcune immagini sono state valutate visivamente da due operatori (Operatore 1 e Operatore 2) che hanno contato le olive nere, verdi e invaiate. La Figura 2 mostra il *color checker* utile per la calibrazione colorimetrica automatica (A) ed il confronto tra l'immagine acquisita originale (B) e quella calibrata risultante (C).



**Figura 2:** A) *Color checker* all'interno della cassetta di olive; B) Immagine originale acquisita della cassetta di olive; C) Immagine calibrata risultante della cassetta di olive. Modificata da Ortenzi *et al.* [4].

Una volta calibrate, le immagini sono state segmentate e i pixel classificati mediante soglia con l'algoritmo di *clustering* k-NN. La classificazione dei pixel consente la segmentazione dell'immagine, dove i pixel bianchi corrispondono alle olive mature (nere), i pixel grigi alle olive acerbe (verdi) e i pixel neri alle altre classi (cassette rosse e gialle, foglie, sfondo e olive invaiate). I due operatori hanno evidenziato una piccola discrepanza nella percentuale stimata delle olive mature (Figura 3), a causa della diversa percezione soggettiva del grado di maturazione tipica dell'occhio umano, che definisce un intervallo di confidenza per la valutazione dell'algoritmo.





**Figura 3:** Percentuale stimata di olive mature (nere) per ogni cassetta per percentuale crescente (linea rossa). Per 10 campioni la percentuale di olive mature è stata valutata dai due operatori: Operatore 1 (rombi verdi) e Operatore 2 (triangoli viola). Modificata da Ortenzi *et al.* [4].

Il metodo ha mostrato una buona accuratezza di classificazione ed è stato reso oggettivo e ripetibile grazie alla calibrazione colorimetrica automatica. Il sistema può essere facilmente implementato in un'apposita *app* mobile sviluppata per la valutazione automatica della maturazione delle olive direttamente in campo, per ottimizzare le pratiche agronomiche o pianificare strategie di raccolta differenziate. Ciò porterebbe a un sistema agricolo più efficiente e produzioni di qualità superiore.

### Sistemi real-time

La filiera olivicola è una delle più importanti del “Made in Italy” [6]. L’impiego di tecnologie innovative potrebbe salvaguardare una maggiore qualità del prodotto, ottimizzando l’efficienza dei processi produttivi, in un’ottica di sostenibilità economica e ambientale. In ambito industriale, i sistemi di classificazione real-time garantiscono un controllo chiaro e ben definito dell’intero processo produttivo. Le tecniche rapide e non distruttive impiegate in questa attività di ricerca, che vedono,

l'applicazione dell'analisi di immagine in combinazione all'utilizzo di algoritmi di intelligenza artificiale, hanno permesso di classificare il grado di maturazione delle olive e i loro aspetti qualitativi esterni ed interni nelle fasi sia di post-raccolta che di post-trasformazione. In particolare, sono stati effettuati tre studi:

- 1) classificazione dei difetti (esterni) di diversi lotti di olive attraverso analisi di immagini RGB in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali;
- 2) classificazione del grado di maturazione e dei difetti (esterni ed interni) di diversi lotti di olive attraverso analisi di immagini RGB e VIS-NIR in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali e modelli classificatori multivariati di intelligenza artificiale;
- 3) analisi di filiera: classificazione dei difetti (esterni) di lotti di olive fresche e trasformate in salamoia attraverso analisi di immagini RGB in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali.

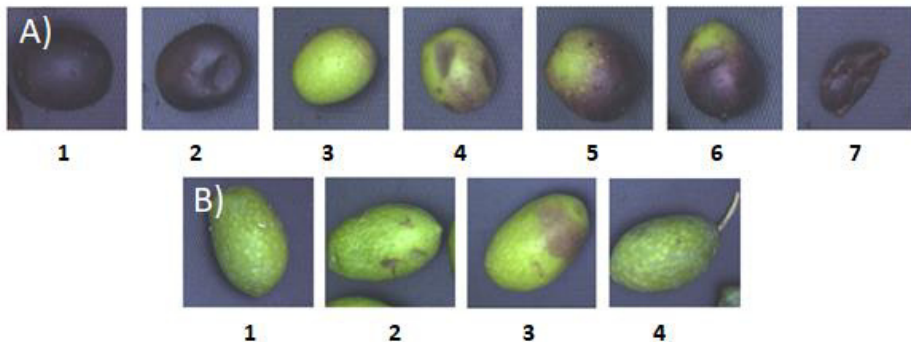
### **Classificazione dei difetti (esterni) di diversi lotti di olive attraverso analisi di immagini RGB in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali**

Lo scopo di questo studio è stato quello di testare l'efficienza di un sistema real-time (sistema optoelettronico banco traslante con una camera RGB; Figura 4) per la selezione qualitativa massiva (difetti esterni generali) di cultivar di olive in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali (*You Only Look Once*, YOLO) [7]. Le reti neurali YOLO sono state applicate su due dataset di immagini RGB di olive acquisite automaticamente dal sistema optoelettronico ad una camera.



**Figura 4:** Sistema optoelettronico banco traslante con una camera RGB [Mako con sensore di tipo CMOS e risoluzione 1456 (H) × 1088 (V)] durante l’acquisizione delle immagini delle olive della cultivar “Bella di Cerignola”.

Il primo dataset è formato dalle cultivar Carboncella, Frantoio e Leccino ed è composto da sette classi che differiscono in termini di colore, presenza e assenza di difetti (Fig. 5 A). Il secondo set di dati comprende solo la cultivar Bella di Cerignola, ed è composto da quattro classi secondo la presenza ed il numero di difetti (Fig. 5B).

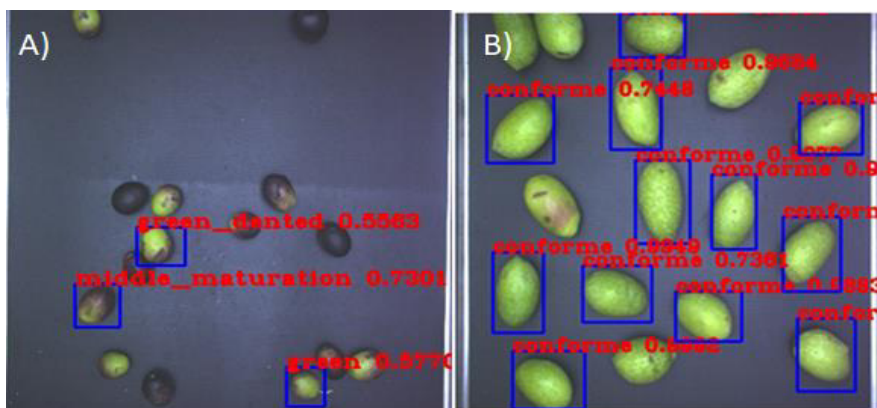


**Figura 5:** A) Esempi per ogni classe di difetti delle cultivar Carboncella, Frantoio e Leccino: nero (1); nero ammaccato (2); verde (3); verde ammaccato (4); invaiato (5); invaiato ammaccato (6); altro (7). B) Esempi per ogni classe di difetti delle cultivar Bella di Cerignola: regolare (1); ammaccato (2); macchiato (3); pedunculato (4). Modificato da Salvucci *et al.* [7].

In generale, i sistemi di elaborazione delle immagini possono supportare la produzione di alta qualità tramite, ad esempio, processi che riescano a identificare automaticamente diverse tipologie di olive tra quelle presenti in un nastro trasportatore di un banco tralante. Le prestazioni richieste in questi contesti riguardano non solo l'accuratezza della selezione ma anche i tempi di elaborazione. Le reti neurali sono sicuramente uno degli approcci più efficienti per l'identificazione automatica degli oggetti nelle immagini. In particolare, le reti neurali note come *Deep Neural Networks* (DNNs), caratterizzate da un numero elevato di livelli di elaborazione interni, hanno dimostrato livelli di accuratezza molto alti in diversi campi applicativi.

Nel caso di immagini acquisite da un sistema optoelettronico, che contengono un numero maggiore di uno di campioni, in questo caso drupe, il processo da prendere in considerazione è quello del rivelamento di oggetti, per il quale è particolarmente indicata la famiglia delle reti convoluzionali YOLO, progettate per avere sufficiente velocità di elaborazione da poter essere utilizzate nel riconoscimento real-time [8].

L'algoritmo della YOLO è stato addestrato sull'80% del dataset e testato sul restante 20% utilizzando due differenti set di dati: il primo composto da 1500 immagini per le cultivar Carboncella, Frantoio e Leccino; il secondo da 930 immagini per la cultivar Bella di Cerignola. La Figura 6 mostra alcuni esempi di classificazione effettuata dalle YOLO. I risultati hanno mostrato un'accuratezza di classificazione superiore al 95% per entrambi i tipi di olive con un errore marginale [7].



**Figura 6:** Esempio di output dell'algoritmo delle YOLO per ogni classe di difetti delle cultivar A) Carboncella, Frantoio e Leccino e B) Bella di Cerignola con relativa accuratezza di classificazione. Modificato da Salvucci *et al.* [7].

## Classificazione del grado di maturazione e dei difetti (esterni ed interni) di diversi lotti di olive attraverso analisi di immagini RGB e VIS-NIR in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali e modelli classificatori multivariati di intelligenza artificiale

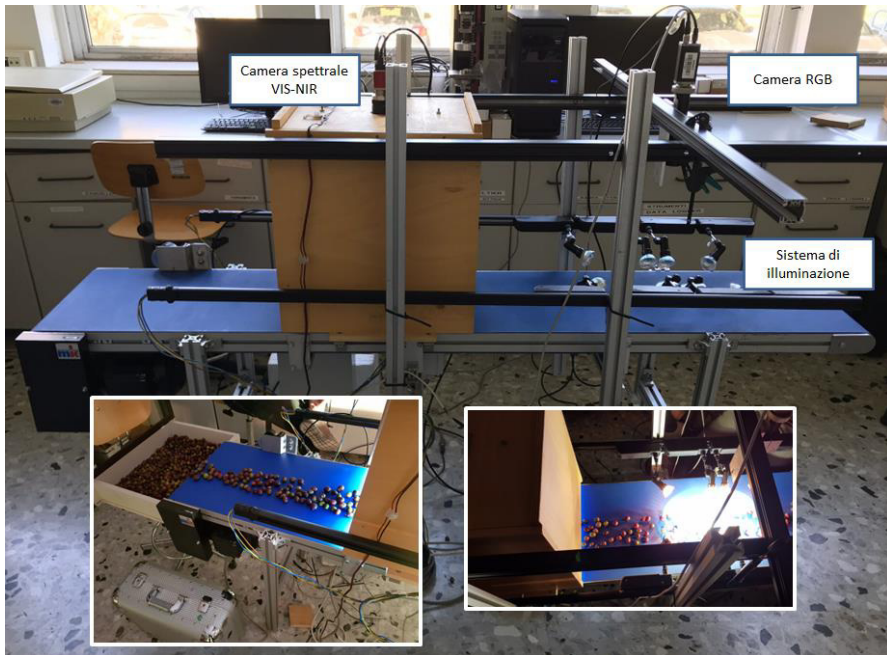
Con il sistema optoelettronico real-time a due camere (RGB e VIS-NIR) sono stati analizzati, per quanto riguarda il grado di maturazione e i difetti (sia interni che esterni), lotti di olive provenienti da diversi campionamenti ed anni delle cultivar: Grossa di Cassano, Itrana e Leccino. L'obiettivo è stato quello di ricavare un modello di classificazione, sia del grado di maturazione che della presenza o meno dei difetti, generalizzabile a prescindere dall'appartenenza alla cultivar. Inizialmente, per le singole cultivar, lì dove possibile, è stato calcolato l'indice di Jaén per identificare il grado di maturazione (Figura 7).



**Figura 7:** Esempio di suddivisione del lotto di olive della cultivar Grossa di Cassano in base al relativo indice di Jaén calcolato: A) indice di Jaén 2.2 (verdi); B) indice di Jaén 3.8 (invaiate); C) indice di Jaén 5.5 (nere).

A questo punto le singole cultivar sono state processate sul sistema optoelettronico banco traslante a due camere, che ha permesso l'acquisizione in real-time di immagini sia RGB che iperspettrali (VIS-NIR; Figura 8).

Per l'analisi di immagine iperspettrale sono state classificate le cultivar (i.e., Grossa di Cassano, Itrana e Leccino) per ogni loro grado di maturazione (i.e., verdi, invaiate e nere); inoltre, sono stati classificati i difetti (i.e., conformi vs danneggiate) per ogni singola cultivar per tutti i gradi di maturazione.



**Figura 8:** Banco traslante a due camere: una camera RGB MANTA G-504 con sensore CCD e una risoluzione  $2452 (H) \times 2056 (V)$  e una camera VIS-NIR mSpec V10 (Specim Ltd, Oulu, Finland) posizionata sopra la cassetta di legno per acquisire i valori di riflettanza spettrale ricavati dall'emissione della luce emessa dalle lampade.

La camera iperspettrale lineare VIS-NIR applicata al banco traslante e operante nelle bande dai 400 ai 700 nm, ha acquisito immagini con step di 10 punti per un totale di 32 lunghezze d'onda. Su ogni singola immagine spettrale acquisita sono state selezionate delle regioni di interesse (ROI) rappresentanti i valori di riflettanza spettrale delle singole olive. La matrice dei dati spettrali ottenuta è stata analizzata tramite degli specifici algoritmi di classificazione che hanno permesso l'identificazione delle classi sopra citate.

Sono stati presi a campione un numero di elementi tali da avere i dataset bilanciati, questo per render più robusta la costruzione del modello e applicare in modo più preciso la tecnica della *cross-validation*, che permette di valutare al meglio la performance della classificazione. Per l'analisi dei dati e la costruzione del modello è stata utilizzata una classificazione binaria attraverso un processo di apprendimento supervisionato, avendo etichettato ogni classe del dataset.

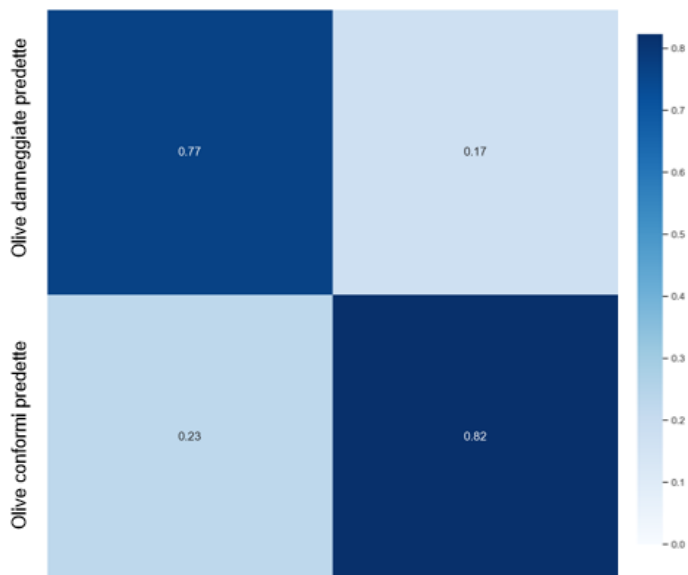
La tecnica del *k-fold Cross validation* utilizzata consiste nel suddividere il dataset in  $n$  partizioni, in questo caso 10, e per 10 volte creare un modello costituito da un *training set* formato da 9 partizioni (ogni volta una partizione diversa). La partizione

restante viene utilizzata come *test set*, per valutare la capacità di generalizzazione del modello. Al fine di ottenere un modello robusto, in questo studio, sono stati selezionati 10 *fold*. Per l'analisi e la realizzazione del modello è stato utilizzato il tool *Weka* che ha una collezione di algoritmi di *Data Mining* e di pre-processazione dei dati. L'algoritmo utilizzato per il *training set* è il *Logistics regression*, che è un ottimo algoritmo quando l'attributo di classe è categorico. Il risultato finale è la media dell'accuratezza calcolata sul *training set* per ciascun modello.

I risultati della classificazione delle cultivar per ogni loro grado di maturazione (i.e., verdi, invaiate e nere), hanno mostrato delle ottime accuratèzze di classificazione: tra il 100% ed il 98%. Questo significa che i modelli applicati discriminano le cultivar a parità del grado di maturazione: ad esempio, per le olive invaiate si ha un'accuratèzza del 99% di identificare le 3 cultivar. All'interno della stessa cultivar invece le olive danneggiate sono state classificate rispetto a quelle conformi con accuratèzze di circa l'80%.

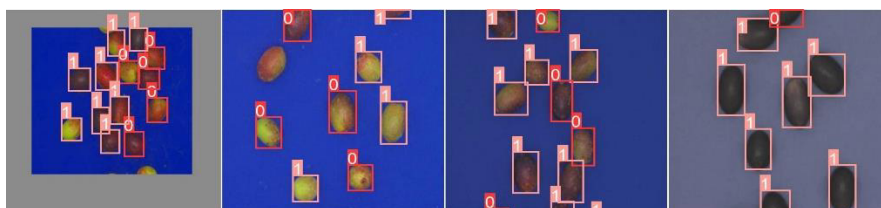
Per l'analisi di immagine RGB, invece, sono state utilizzate le reti neurali convoluzionali YOLO. Sono state addestrate e testate due tipi di reti considerando tutti i gradi di maturazione insieme: le prime per classificare le olive conformi e danneggiate per ogni singola cultivar (i.e., Grossa di Cassano, Itrana e Leccino), le seconde costruendo un modello "multi-cultivar" che classifica le olive conformi e quelle danneggiate a prescindere dall'appartenenza alla cultivar. In generale, le performance di accuratèzza sono state buone per tutte e 4 le reti neurali (3 per ogni singola cultivar e 1 per tutte le cultivar insieme). Nello specifico, il modello che considera le 3 cultivar insieme ha mostrato il 77% di accuratèzza nel riconoscere le olive danneggiate e l'82% nel riconoscere quelle conformi, come mostrato nella *confusion matrix* (Fig. 9).

Questo studio che vede la combinazione dell'analisi di immagine (RGB e VIS-NIR), grazie al sistema optoelettronico banco traslante, e l'utilizzo di algoritmi di classificazione multivariati di intelligenza artificiale, potrebbe contribuire a migliorare diversi aspetti nel controllo qualitativo dei prodotti nelle fasi di post-raccolta e pre-trasformazione, quali: numero di campioni esaminato, ripetibilità, rapidità, obiettività, riduzione dell'errore umano [9]. Complessivamente, la performance ottenuta suggerisce che la procedura può essere implementata in scenari operativi. Tuttavia, alcuni miglioramenti potrebbero essere considerati anche agendo meccanicamente direttamente sulla linea di selezione di un processo produttivo.



**Figura 9:** *Confusion matrix* della YOLO con le performance di accuratezza di predizione delle olive danneggiate e delle olive conformi di tutte e 3 le cultivar (i.e., Grossa di Cassano, Itrana e Leccino) analizzate insieme.

La Figura 10 mostra un esempio di output di immagine classificata dalle YOLO nella quale gli “0” rappresentano le olive danneggiate mentre gli “1” quelle conformi per le 3 cultivar analizzate insieme nello stesso modello.

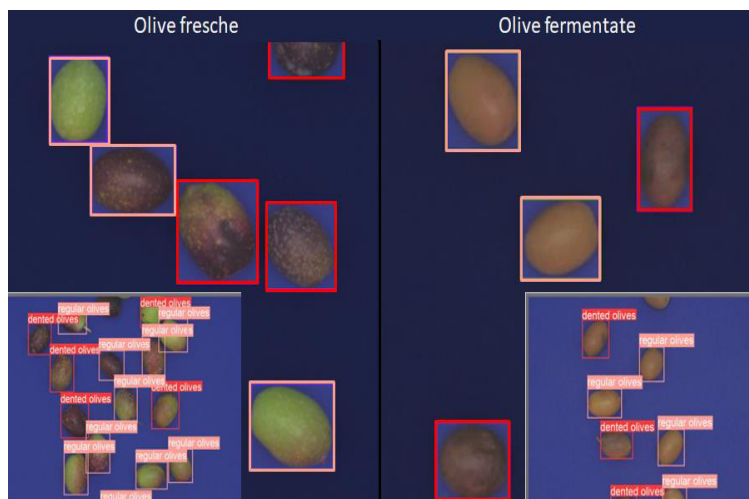


**Figura 10:** Output di immagine classificata dalle YOLO: gli “0” rappresentano le olive danneggiate, gli “1” quelle conformi per le 3 cultivar (i.e., Grossa di Cassano, Itrana e Leccino) analizzate insieme.



## Analisi di filiera: classificazione dei difetti (esterni) di lotti di olive fresche e trasformate in salamoia attraverso analisi di immagini RGB in combinazione con l'utilizzo di reti neurali convoluzionali

Il processo di trasformazione delle olive da mensa comporta l'ottenimento dei tipici caratteri organolettici e di consistenza. Conoscere il grado di danneggiamento delle olive in post-raccolta risulta essere di grande importanza per evitare di produrre eccessivi scarti e quindi perdite da un punto di vista sia di tempo che economico. I danneggiamenti degli stessi lotti che poi vengono fermentati in salamoia per ottenere il prodotto finito deamarizzato, durante questo processo potrebbero aumentare facendo diminuire la resa finale per la vendita. In questo caso di studio, il sistema optoelettronico banco traslante con camera RGB in combinazione con l'utilizzo delle YOLO ha permesso di classificare e confrontare per due classi qualitative (i.e., conformi e danneggiate), gli stessi lotti di olive (cv Grossa di Cassano) prima e dopo la loro trasformazione [10]. Sono state acquisite più di 800 immagini tra olive fresche e fermentate. Il modello ha classificato correttamente con una buona percentuale sia le olive fresche danneggiate che conformi, mentre ha mostrato delle performance leggermente minori per la classificazione delle olive fermentate (sia conformi che danneggiate). La Figura 11 mostra l'output delle YOLO nella fase di *training* (figure grandi) e di *test* (figure piccole) del modello, evidenziando in rosso le olive danneggiate e in rosa quelle conformi sia per le fresche che per le fermentate.



**Figura 11:** Output delle reti neurali convoluzionali YOLO delle olive (cv Grossa di Cassano) fresche e fermentate classificate per le due classi qualitative conformi (*regular*; rosso) e danneggiate (*dented*; rosa).

In generale, il modello è risultato migliore per la classificazione delle olive danneggiate nel prodotto fresco. Questa applicazione potrebbe essere utile per una classificazione real-time delle olive su una linea di selezione in pre- e post-trasformazione. In linea di massima un sistema automatizzato consente di migliorare diversi aspetti: numero di campioni analizzati, oggettività, ripetibilità, rapidità, riduzione di costi e dell'errore umano.

## **Conclusioni**

L'utilizzo di questi specifici sistemi (i.e., offline e real-time) ha permesso di effettuare con dei sistemi innovativi, ripetibili ed oggettivi, la selezione di diverse classi qualitative, come ad esempio la presenza o meno di difetti nelle singole olive o il loro grado di maturazione, di interi lotti di olive lì dove in letteratura si utilizzano ancora analisi visive (es. l'indice di Jaén). La qualità delle drupe delle olive da mensa rappresenta un aspetto fondamentale per la commercializzazione, soprattutto per l'accettabilità e la disponibilità all'acquisto da parte del consumatore finale che tende a prediligere un prodotto integro e privo di difetti. Il raggiungimento di tali standard qualitativi dipende da numerosi fattori come, per esempio, tutte le operazioni che vengono effettuate durante la raccolta, nel post-raccolta e durante le fasi di lavorazione e trasformazione del prodotto. Avere un sistema automatizzato che permette di stabilire, per esempio il grado di maturazione direttamente nel frantoio per inviare poi i lotti di olive nelle specifiche fasi di trasformazione, è utile sia da un punto di vista economico che temporale. I prototipi dei sistemi optoelettronici banchi traslanti, che hanno permesso l'analisi delle drupe tramite immagini sia RGB che VIS-NIR, in combinazione con gli algoritmi di intelligenza artificiale sono risultati un buon metodo per discriminare, a parità o meno del grado di maturazione delle olive, le olive danneggiate da quelle conformi, sia che queste fossero fresche o deamarizzate. Questo rende possibile il loro impiego nelle linee di lavorazione dei processi produttivi, consentendo inoltre di partire da un grado qualitativo più accettabile, limitando dispendi soprattutto economici e temporali e azzerando l'errore dell'occhio umano. In generale, l'impiego di questi sistemi innovativi non invasivi potrebbe contribuire a rendere il sistema agricolo più efficace ed efficiente, ottenendo produzioni di qualità superiore.

## Bibliografia

1. Castellari L., 2002. I caratteri della qualità. Pianeta pesca. Qualità e sicurezza per il consumatore, Il Divulgatore: 3-4.
2. Salvucci G., Pallottino F., Costa C., De Laurentiis L., Del Frate F., Manganiello R., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Bassotti B., Violino S., Ortenzi L., and Antonucci F., 2022a. Valutazione della qualità delle olive tramite immagini RGB e modellazione avanzata di una rete neurale convoluzionale. Poster al V Convegno Nazionale dell'Olivo ed Olio, Alghero (SS), 26 – 28 ottobre 2022: 91. ISBN 978-88-903404-7-5.
3. COI (International Olive Council). Guide for the Determination of the Characteristics of Oil Olives, COI/OH/Doc. No 1 November 2011. <http://www.internationaloliveoil.org>. Accessed on 16 December 2020.
4. Ortenzi L., Figorilli S., Costa C., Pallottino F., Violino S., Pagano M., Imperi G., Manganiello R., Lanza B., and Antonucci F., 2021. A machine vision rapid method to determine the ripeness degree of olive lots. *Sensors*, 21: 2940.
5. Menesatti P., Angelini C., Pallottino F., Antonucci F., Aguzzi J., and Costa C., 2012. RGB color calibration for quantitative image analysis: the “3D Thin-Plate Spline” warping approach. *Sensors*, 12: 7063-7079.
6. Violino S., Ortenzi L., Antonucci F., Pallottino F., Benincasa C., Figorilli S., and Costa C., 2020. An artificial intelligence approach for Italian EVOO origin traceability through an open source IoT spectrometer. *Foods*, 9(6): 834.
7. Salvucci G., Pallottino F., De Laurentiis L., Del Frate F., Manganiello R., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Bassotti B., Violino S., Ortenzi L., and Antonucci F., 2022b. Fast olive quality assessment through RGB images and advanced Convolutional Neural Network modeling. *European Food Research and Technology*, 248(5): 1395-1405.
8. Huang Z., Sui B., Wen J., and Jiang G., 2020. An intelligent ship image/video detection and classification method with improved regressive deep convolutional neural network. *Complexity*, 2020: 1-11.
9. Ortenzi L., Violino S., Figorilli S., Vasta S., Tocci F., Antonucci F., Costa C., and Pallottino F., 2022. Machine learning e IA a supporto del settore olivicolo-oleario. Presentazione orale al V Convegno Nazionale dell'Olivo ed Olio, Alghero (SS), 26 – 28 ottobre 2022: 54. ISBN 978-88-903404-7-5.
10. Manganiello R., Ortenzi L., Violino S., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Costa C., Pallottino F., Lanza B., and Antonucci F., 2022. Approcci di machine learning per la selezione qualitativa real-time di diversi stadi di lavorazione di olive da mensa. Presentazione orale al V Convegno Nazionale dell'Olivo ed Olio, Alghero (SS), 26 – 28 ottobre 2022: 59. ISBN 978-88-903404-7-5.

# Produzione sperimentale in azienda di olive da tavola fermentate con o senza aggiunta di starter

**N. Simone\***, G. Di Loreto, M. Bacceli, S. Di Marco, M. Cellini, G. Vecchiotti, B. Lanza

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Via Nazionale S.S. 602 Km 51 +355, CEPAGATTI (PE)

## Introduzione

Le olive presentano un elevato contenuto di sostanze fenoliche che non le rendono consumabili tal quali per lo spiccato sapore amaro, ma lo diventano solo in seguito a opportuna deamarizzazione. Le olive da tavola, per diventare tali, necessitano quindi di un adeguato processo di trasformazione.

I processi di deamarizzazione delle olive da tavola sono diversi, ed ognuno di questi ha le sue peculiarità nell'ottenere un prodotto altamente appetibile e gradito che si sta diffondendo nel mondo, grazie alla "Dieta Mediterranea". Tra i diversi metodi di deamarizzazione, quello che attrae la ricerca è senza dubbio il metodo "al naturale", poiché arricchisce le caratteristiche sensoriali del frutto originale. Tale metodo prevede, successivamente alla raccolta, l'immersione in salamoia. Le olive immerse in salamoia iniziano una fermentazione dovuta alla microflora spontanea presente sull'epicarpo, che dura per diversi mesi (circa 7-8). Tali microrganismi deamarizzano le olive idrolizzando i fenoli complessi responsabili del sapore amaro (principalmente oleuropeina e ligstroside) in fenoli semplici (principalmente idrossitirosolo e tirosolo) e arricchiscono il prodotto di sostanze aromatiche.

La diversità di specie microbiche e fungine sull'epicarpo fa sì che le fermentazioni "al naturale" non siano mai esattamente identiche e pertanto tale metodo di preparazione rappresenta ancora una fonte di incognite nei confronti delle caratteristiche del prodotto finito. Nel corso degli anni sono state effettuate con successo diverse prove sperimentali "lab-scale" con colture starter di microrganismi selezionati [1-4], ma dalla bibliografia consultata, vi sono scarse evidenze di dati ottenuti a livello industriale; pertanto, abbiamo deciso di effettuare dei tests su grandi quantitativi e alle stesse condizioni operative dei processi commerciali, allo scopo di verificare l'efficacia di alcuni starters e monitorare l'andamento dei processi fermentativi dal punto di vista chimico-fisico e microbiologico direttamente in azienda. Questa sperimentazione è stata prevista all'interno del WP 2 del

progetto DEALIVA. La scelta di effettuare prove “in campo” è stata dettata dall’esigenza di capire con esattezza i processi che vengono abitualmente effettuati presso i produttori e monitorare l’andamento delle varie componenti caratterizzanti l’evoluzione del prodotto. In questo modo, ci si prefigge di aiutare i produttori ad ottenere un prodotto dalle caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali costanti e riproducibili e a scongiurare l’insorgenza di fermentazioni anomale. [5].

## Materiali e metodi

Le olive di cv. Leccino e di calibro 17+ sono state fornite dalla ditta Ficacci Olive Co. (Castel Madama RM), e fanno parte di un batch di diverse centinaia di fusti. La ditta ha messo a disposizione 5 barili, contenenti ciascuno circa 140 kg di olive e 80 kg di salamoia, scelti random dall’intero batch in data 06/11/2021. La salamoia iniziale all’interno dei barili era al 13% di NaCl in acqua potabile non sterilizzata. Tali barili sono stati denominati N1, N2, G1, G2 e FUIO come elencato in Tabella 1. N1, N2, G1 e G2 sono stati collocati al coperto in un capannone dell’azienda, mentre il fusto denominato FUIO ha seguito il processo fermentativo assieme a tutti gli altri fusti del batch produttivo, stoccati all’aperto in un piazzale esposto alle intemperie ed agli sbalzi di temperatura (Figura 1).

**Tabella 1.** Codici barili analizzati

Codice	Descrizione
N1	Fermentazione naturale spontanea (replica1)
N2	Fermentazione naturale spontanea (replica 2)
G1	Fermentazione guidata (replica 1)
G2	Fermentazione guidata (replica 2)
FUIO	Fermentazione naturale all’aperto

I fusti N1 e N2 sono due repliche del processo fermentativo al naturale che dovrebbe avvenire spontaneamente ad opera della microflora epifitica già presente. I fusti G1 e G2 sono repliche di un processo fermentativo guidato che, oltre alla microflora epifitica presente prevede l’aggiunta di un inoculo misto composto da *Lactiplantibacillus plantarum* ceppo B1 di provenienza dalla Collezione di microrganismi del CREA-IT di Pescara e con *Saccharomyces cerevisiae* di provenienza dalla collezione di microrganismi del CREA-IT di Torino. La scelta del ceppo B1 quale starter di fermentazione è stata effettuata dopo un intenso lavoro di screening per le attività protecnologiche sui microrganismi presenti in Collezione

[1]. La scelta di aggiungere all'inoculo batterico un lievito è stata dettata dal ruolo svolto da alcuni lieviti quali potenziali protettori da fenomeni di spoilage grazie all'attività killer che esplicano [6-8]. I fusti N1, N2, G1 e G2 sono stati oggetto di prelievi periodici di olive e salamoia per monitorare i parametri chimici e microbiologici, mentre il fusto FUO è stato lasciato chiuso fino alla fine del processo fermentativo. Il processo è durato circa 7 mesi (210 giorni).



**Figura 1.** Collocazione dei fusti. A sinistra: fusti N1, N2, G1 e G2 collocati all'interno del capannone; a destra: fusto FUO collocato all'esterno nel piazzale.

Una volta verificato il corretto riempimento dei quattro fusti, è stata apposta una apposita grata interna in materiale polimerico per alimenti allo scopo di impedire il sollevamento delle olive dalla salamoia, ed infine i fusti sono stati chiusi con l'apposito tappo a vite. Dopo un periodo di condizionamento, stabilito in circa 3 settimane, sono stati effettuati gli inoculi sui fusti G1 e G2. Secondo il calendario illustrato in Tabella 2, sono state effettuate le visite periodiche in azienda per effettuare i prelievi di salamoia e olive, avendo cura di rimpiazzare il contenuto sottratto con salamoia fresca allo scopo di non lasciare eccessivo spazio vuoto nel fusto, che avrebbe potuto influenzare con l'azione dell'aria, i processi.

In totale, sono stati effettuati n.7 prelievi, come specificato in Tabella 2.

Le modalità di prelievo delle aliquote di olive e salamoie dai fusti oggetto di indagini hanno seguito tutte le indicazioni di corretta prassi igienica (guanti monouso, mascherine FFP2, utensili puliti e disinfettati) come previsto dalle norme e dalle linee guida in materia di autocontrollo igienico (HACCP).

**Tabella 2.** Calendario prelievi.

DATA	GIORNI	DESCRIZIONE
06/11/2021	0	Preparazione fusti
02/12/2021	23	Inoculo fusti G1 e G2
09/12/2021	30	1° prelievo
16/12/2021	37	2° prelievo
13/01/2022	65	3° prelievo
03/03/2022	114	4° prelievo
16/06/2022	219	5° prelievo/fine fermentazione
20/09/2022	315	6° prelievo/shelf-life 3 mesi
07/12/2022	388	7° prelievo/shelf-life 6 mesi

Dal monitoraggio dei parametri chimico-fisici e microbiologici, abbiamo stabilito di far coincidere il 5° prelievo con il termine della fermentazione.

A partire da giugno 2022, sono stati effettuati prelievi anche sul fusto di olive stoccato all'aperto con il resto del batch di produzione (denominato con il codice FUO), allo scopo di valutare in quale modo e con quali risultati i processi di trasformazione a fermentazione spontanea fossero avvenuti (esattamente come in N1 ed N2), ma senza l'influenza esterna data dalle operazioni di prelievo di aliquote. Stessa procedura è stata applicata anche nei due prelievi successivi durante la shelf-life, ovvero a 3 e 6 mesi dopo la fine del processo di fermentazione.

In questo modo si è pensato di analizzare i parametri chimico-fisici e microbiologici delle olive in salamoia ben oltre il periodo "standard" di fermentazione per poter valutare eventuali cambiamenti nella composizione chimica, nello sviluppo e nella crescita delle varie specie microbiche fermentanti e nelle caratteristiche del prodotto finale.

La serie completa di analisi effettuate è elencata in Tabella 3. Tutte le analisi sono state effettuate in doppio seguendo la metodologia descritta in [1] e [2].

**Tabella 3.** Determinazioni effettuate sulle olive e sulle salamoie di fermentazione.

DETERMINAZIONI ANALITICHE	OLIVE FRESCHE	DURANTE IL PROCESSO	FINE PROCESSO	SHELF LIFE 3 MESI	SHELF LIFE 6 MESI
Analisi microbiologiche (batteri lattici, lieviti e muffe, enterobatteri)	X	X	X	X	X
Fenoli polpa	X	X	X	X	X
Fenoli salamoia		X	X	X	X
Colore	X		X	X	
Umidità	X		X		
Ceneri	X		X		
Contenuto in olio	X		X		
Rapporto polpa/nocciolo	X		X	X	X
Contenuto sale polpa	X				
Contenuto sale salamoia		X	X	X	X
Acidità libera polpa	X				
Acidità libera salamoia		X	X	X	X
Analisi texturale (TPA e acustico)	X	X	X	X	X
Analisi sensoriale			X	X	

### *Analisi statistica*

Il software utilizzato per l'analisi statistica univariata (ANOVA) e per l'analisi di correlazione (Pearson) è PAST nella sua versione 4.12 (PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>).

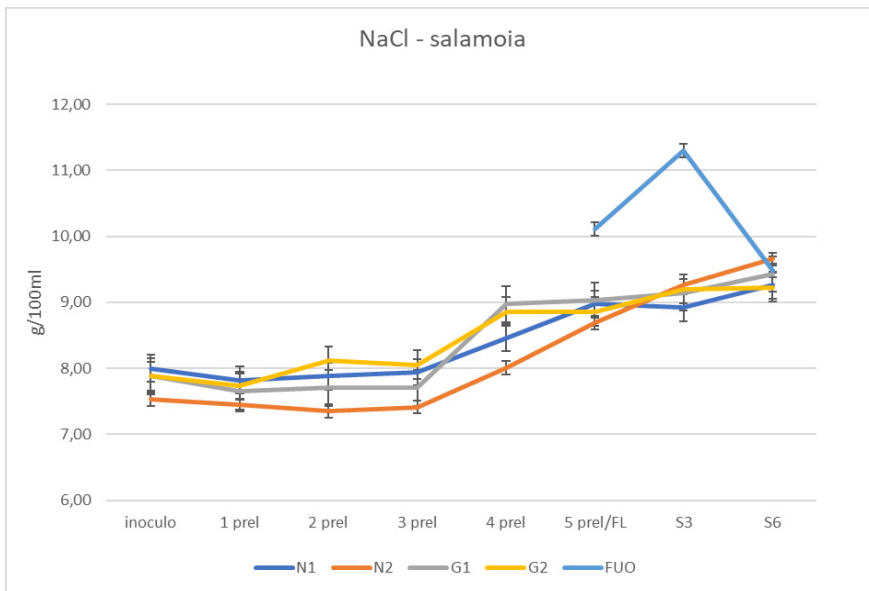
Il software utilizzato per l'analisi PCA e CAG è XLStat Premium di Addinsoft (Lumivero (2023). XLSTAT statistical and data analysis solution. Paris, France. <https://www.xlstat.com>).



## Risultati

### Monitoraggio chimico-fisico

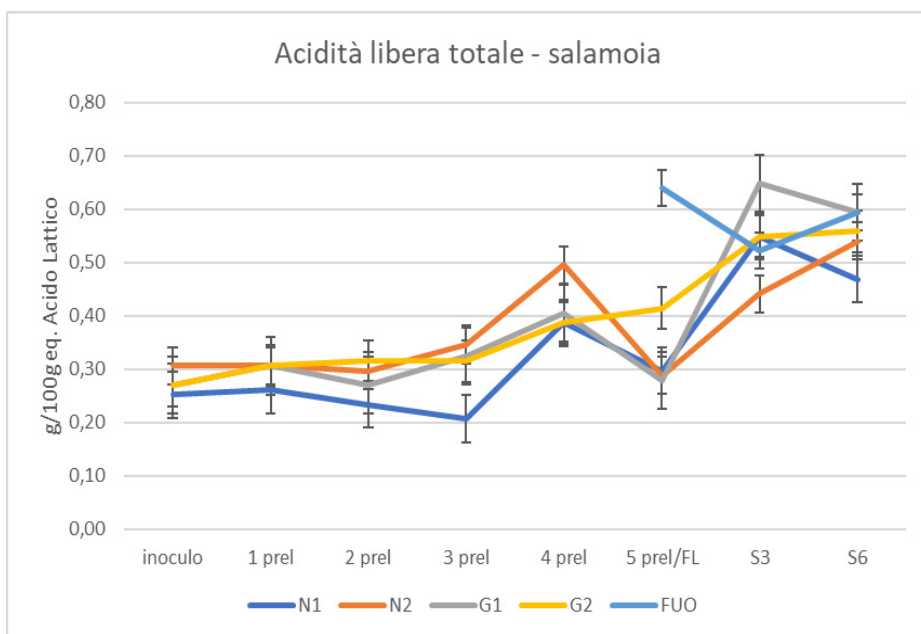
Da questa esplorazione sono stati raccolti numerosi dati relativi ai singoli parametri di indagine, che vengono di seguito descritti e interpretati. Per quanto riguarda il contenuto in sale delle diverse salamoie, le misurazioni iniziali dei 4 fusti (N1, N2, G1 e G2) restituiscono dei valori globalmente crescenti da un 8% circa di salinità fino a raggiungere quasi il 10%. Questo è spiegabile in quanto successivamente ai prelievi sono state aggiunte aliquote di salamoia fresca che avevano valori prossimi al 12%. Il fusto di controllo denominato FUO invece ha valori altalenanti nelle tre misurazioni effettuate (10,11 – 11,30 – 9,49%). Questo è spiegabile dal fatto che il fusto FUO non è mai stato aperto durante il processo fino al 5° prelievo (giugno), per cui l'aumento della salinità al prelievo successivo (settembre) è quasi certamente dovuto ad una eccessiva evaporazione della salamoia, essendo questo fusto situato in mezzo al piazzale di stoccaggio e pienamente esposto al sole estivo e ai suoi effetti termici. Difatti, dopo prelievo e rabbocco con salamoia fresca, il livello di salamoia rilevato alla riapertura era drasticamente diminuito. Al campionamento successivo (dicembre) si è ottenuto il valore di 9,49%, allineato ai fusti oggetto del test. I risultati globali sono visibili in Figura 2.



**Figura 2.** Andamento del contenuto di NaCl nelle salamoie.

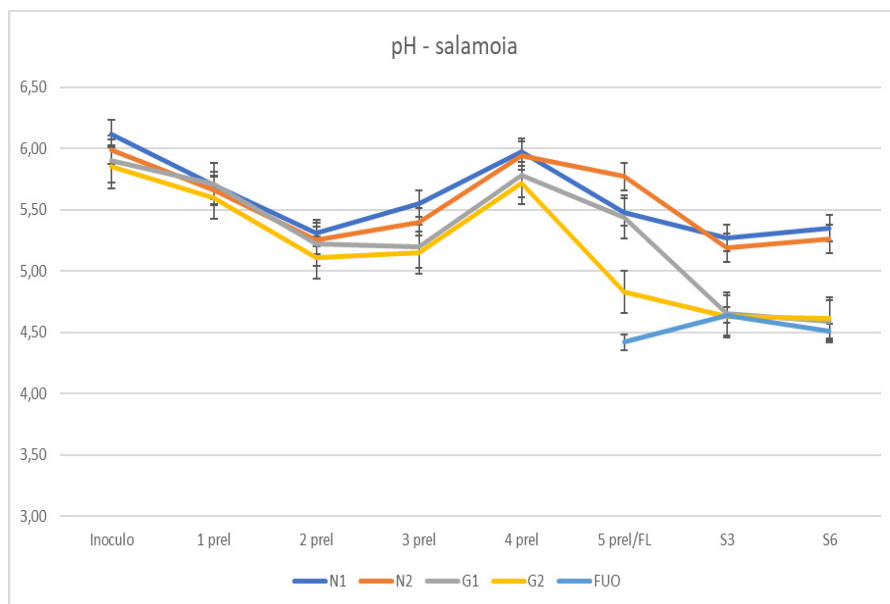
Per quanto riguarda l'acidità libera totale, i risultati sono mostrati in Figura 3. L'acidità libera totale è data da un insieme di acidi organici a catena corta che

vengono liberati nella salamoia durante i vari processi fermentativi da parte delle diverse specie della microflora fermentante, ed alcuni di questi, come l'acido acetico, influenzano il parametro pH più di altri. La metodica impiegata neutralizza tutti gli acidi con una base forte, l'idrossido di sodio (NaOH), e i risultati vengono espressi come g/100 g di acido lattico equivalente, impedendo la caratterizzazione delle singole componenti acidiche. Per questo motivo non è possibile effettuare tentativi di correlazione tra pH e acidità libera totale. I fusti oggetto di indagine, a fine fermentazione presentano tutti valori di acidità libera totale inferiori al fusto di controllo FUO; tuttavia, nel corso della shelf-life, l'acidità libera totale aumenta in tutti i fusti fino ad allinearsi ai valori raggiunti dal fusto FUO.



**Figura 3.** Andamento dell'acidità libera totale delle salamoie.

In Figura 4 possiamo osservare l'andamento del pH nei fusti durante le varie fasi del processo di fermentazione.



**Figura 4.** Andamento del pH delle salamoie.

In questo caso possiamo osservare che, a partire da valori di pH prossimi al neutro (5,85 – 6,12) in fase di inoculo, si avverte un iniziale abbassamento del pH nelle prime fasi della fermentazione fino a raggiungere un minimo al 2° prelievo (5,15 – 5,55) e successivamente un modesto rialzo che raggiunge il suo apice al 4° prelievo (5,72 – 5,97) e infine da un importante abbassamento tra il 5° e il 7° prelievo, con valori minimi per i fusti oggetto di inoculo, G1 e G2, al 7° prelievo (4,63 – 5,27). Il fusto di controllo all'esterno (FUO), nei tre prelievi presi in considerazione assumeva globalmente valori di pH più bassi dei fusti oggetto di indagine, con valori al 5°, 6° e 7° prelievo, rispettivamente di 4,42, 4,64 e 4,51.

Gli altri valori chimico-fisici relativi al frutto fresco e al frutto a fine lavorazione sono mostrati nelle tabelle 5 e 6.

**Tabella 5.** Parametri chimico-fisici delle olive a inizio esperimento. I risultati sono indicati come media +/- DS.

Parametri	FRUTTO FRESCO
Acidità libera (1)	0,44 +/- 0,01
Umidità (2)	69,53 +/- 0,08
Ceneri (3)	2,20 +/- 0,36
Sale (4)	0,60 +/- 0,01
P/N*	4,42
Contenuto in olio (5)	9,54 +/- 0,03

(1) g di acido lattico/100 g di polpa di olive; (2) g di H<sub>2</sub>O/100 g di polpa di olive; (3) g di ceneri/100 g di polpa di olive; (4) g di NaCl/100 g di polpa di olive; (5) g di olio/ 100 g di polpa di olive; \*P/N= rapporto polpa/nocciolo.

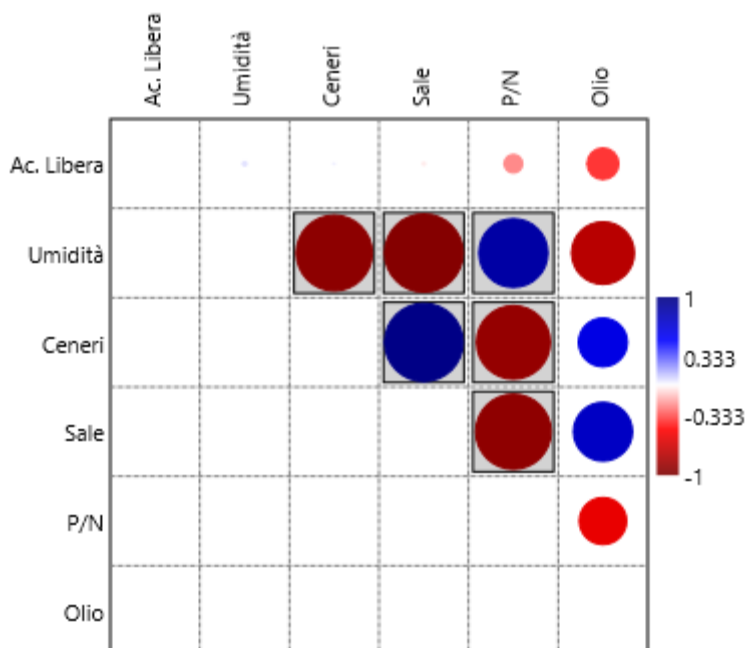
**Tabella 6.** Parametri chimico-fisici delle olive a fine fermentazione (5° prelievo). I risultati sono indicati come media +/- DS.

Parametri	N1	N2	G1	G2	FUO
Umidità (1)	62,19 +/- 0,01	63,93 +/- 0,35	61,48 +/- 0,56	62,66 +/- 0,04	61,63 +/- 0,08
Ceneri (2)	6,86 +/- 1,39	6,71 +/- 1,18	6,73 +/- 1,36	5,77 +/- 0,16	7,84 +/- 0,01
P/N*	3,83	3,63	3,81	3,63	3,42
Contenuto in olio (3)	10,74 +/- 0,24	11,03 +/- 0,50	12,13 +/- 0,30	11,70 +/- 0,30	10,67 +/- 0,00

(1) g di H<sub>2</sub>O/100 g di polpa di olive; (2) g ceneri/100 g di polpa di olive; (3) g di olio/100 g di polpa di olive; \*P/N= rapporto polpa/nocciolo.

Come si può notare in Figura 5, esistono delle correlazioni significative (Pearson) tra alcuni di questi parametri. I cerchi rossi indicano correlazione negativa, quelli blu correlazione positiva. I parametri nei riquadri grigi esprimono valori di  $p < 0,05$ . Possiamo così osservare, come è logico attendersi, la correlazione inversa tra ceneri e umidità, dato che all'aumentare della seconda sul peso fresco si avrà come conseguenza una diminuzione delle ceneri dopo calcinazione. Un'altra correlazione inversa logica e confermata è quella tra sale e umidità, poiché all'aumentare del sale nella salamoia si avrà una pressione osmotica crescente che porterà alla disidratazione dell'oliva. La correlazione tra ceneri e rapporto polpa/nocciolo (P/N), pur essendo evidente e significativa, è di non chiara interpretazione poiché per la determinazione delle ceneri si parte comunque da uguali quantitativi di polpa denocciolata. Lo stesso accade per la correlazione tra sale e rapporto P/N: presumibilmente si può considerare che nelle olive con rapporto P/N maggiore il

sale permei più lentamente i tessuti e pertanto olive che hanno un rapporto P/N minore hanno spessore della polpa minore e quindi offrono meno resistenza al passaggio del sale nei tessuti. Allo stesso modo è anche comprensibile la forte correlazione positiva tra contenuto in sale e ceneri, poiché questo si ritrova assieme alle ceneri, e così la correlazione tra rapporto P/N e umidità. Al contrario, il contenuto in olio dei vari campioni, pur esprimendo alcune interessanti correlazioni, non riporta valori di  $p < 0,05$ . A nostro avviso desta interesse il valore fortemente positivo di correlazione tra questo parametro e contenuto in sale (che potrebbe essere indice di lisi cellulare) mentre è logico osservare una correlazione negativa tra contenuto in olio e umidità, data la metodica analitica per la determinazione di quest'ultima.



**Figura 5.** Grafico di correlazione (Pearson) tra parametri chimico-fisici.

I dati ottenuti sono stati successivamente trattati mediante PCA (Analisi delle Componenti Principali) e CAG (Classificazione Ascendente Gerarchica) considerando i valori ottenuti sulla polpa del prodotto fresco e sulla polpa dei prodotti dei 5 fusti a fine fermentazione (5° prelievo).

La Figura 6 mostra la variabilità cumulata tra i parametri della matrice. Si è scelto di procedere analizzando F1 e F2 poiché la somma dei due fattori esprime il 93,40% della variabilità totale.

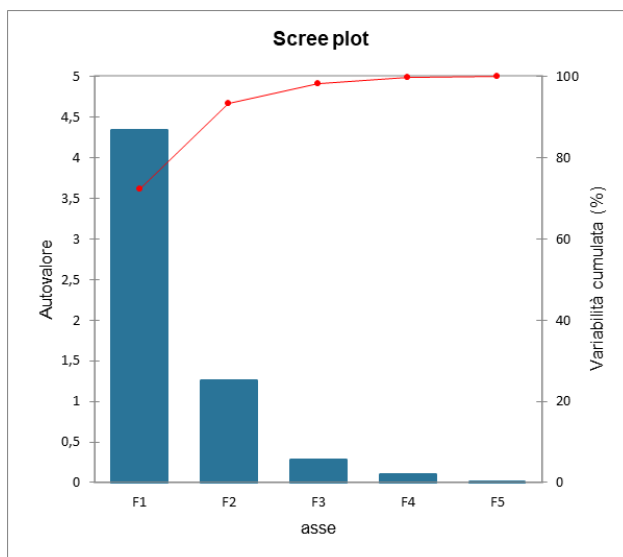


Figura 6. Scree plot variabilità cumulata

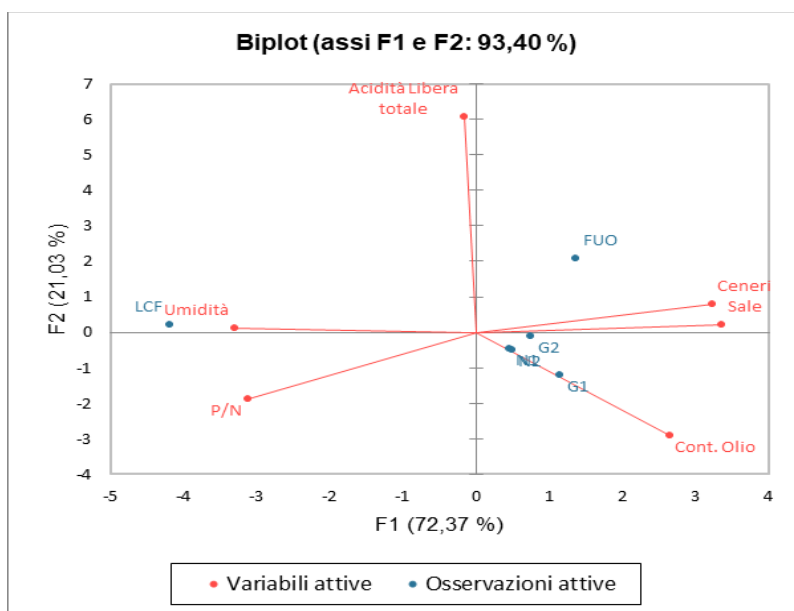
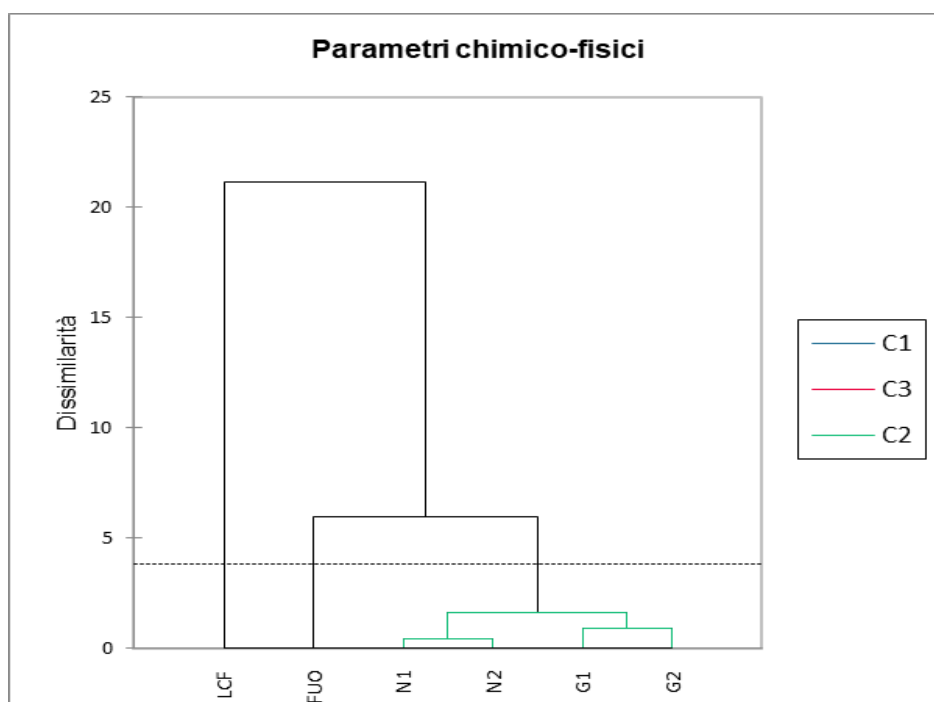


Figura 7. Biplot PCA parametri chimico-fisici

Come si può osservare in Fig. 7, dai dati processati in PCA emerge una chiara separazione tra prodotto fresco (LCF) nel quadrante in alto a sinistra, il fusto esterno (FUO) nel quadrante in alto a destra e tutti gli altri prodotti a fine fermentazione (FL) nel quadrante in basso a destra. Possiamo notare anche una quasi perfetta sovrapposizione dei campioni N1 e N2.

La stessa matrice è stata sottoposta a CAG (Classificazione Ascendente Gerarchica) utilizzando il criterio di dissimilarità con distanza Euclidea; il metodo di agglomerazione scelto è quello di Ward (poiché tende a creare gruppi di uguali dimensioni) con un taglio secondo Indice di Hartigan (valori di default del software: da 2 a 5). I risultati restituiti dall'analisi sono molto interessanti (Fig. 8). Possiamo osservare tre clusters: uno per il prodotto fresco, uno per il fusto esterno ed uno per i fusti oggetto del test. I campioni N1-N2 e G1-G2 vengono subclusterizzati a coppie con un bassissimo coefficiente di dissimilarità, affiancati dal campione stoccato all'esterno e, con un coefficiente di dissimilarità decisamente più elevato, con il campione fresco LCF a sinistra.

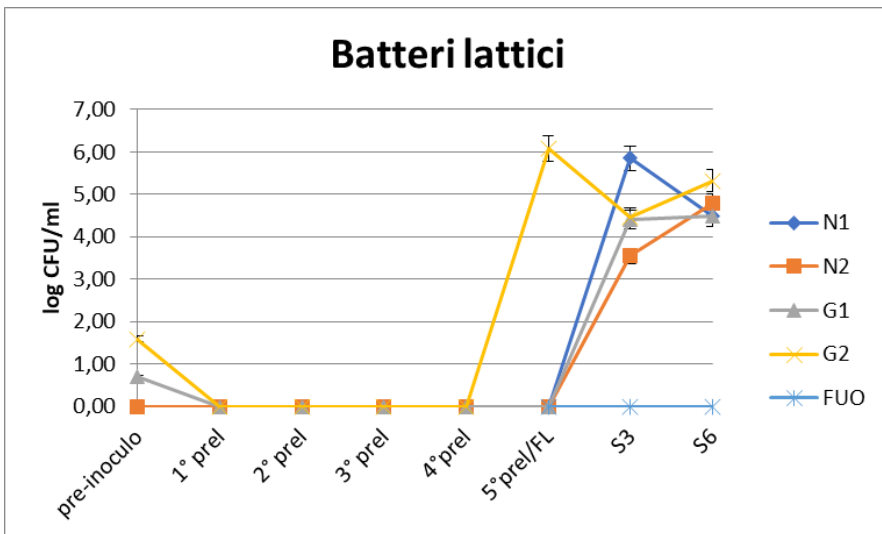


**Figura 8.** CAG parametri chimico-fisici

## Monitoraggio microbiologico

Dal punto di vista microbiologico, sono state prese in considerazione le analisi di LAB, lieviti, enterobatteri e muffe. In tutti i prelievi effettuati non è mai stata rilevata presenza di enterobatteri. Anche per quanto riguarda il contenuto in muffe, queste sono state rilevate in quantità irrisorie (0-1 UFC), in alcuni prelievi soltanto, e pertanto non vengono illustrate in grafico.

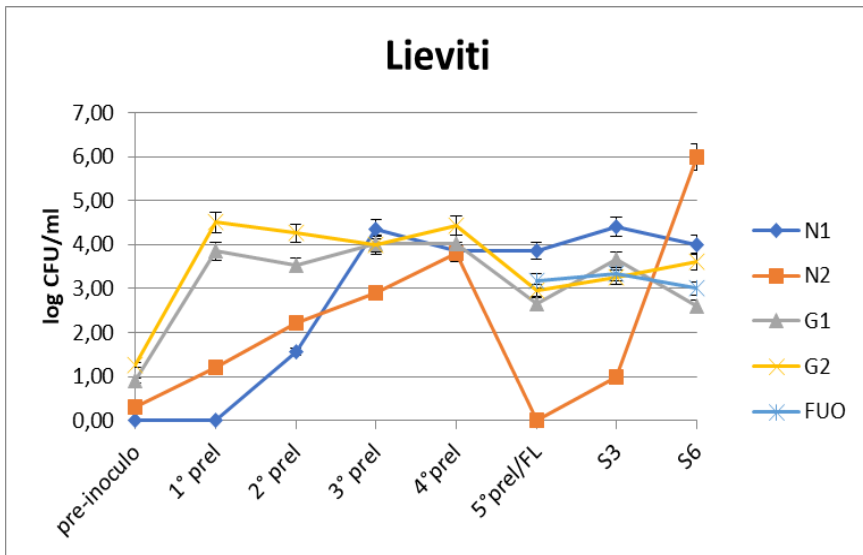
Esaminando l'andamento dei batteri lattici (Figura 9) notiamo che essi risultano assenti già a partire dal primo prelievo, nonostante siano stati anche inoculati di proposito con il nostro starter nei fusti G1 e G2, per crescere nel solo fusto G2 a partire dal 5° prelievo e successivamente, negli altri fusti (inclusi N1 ed N2) durante la shelf-life. Nel fusto FUO sono assenti.



**Figura 9.** Andamento della presenza di batteri lattici nei fusti oggetto di indagine

Per quel che riguarda la presenza di lieviti (Figura 10), i diversi fusti seguono andamenti diversi: il fusto N1 al 1° prelievo non presenta ancora tracce di lieviti sviluppatasi, mentre questi compaiono dal 2° prelievo ed aumentano fino a raggiungere un apice al 3° prelievo e successivamente mantenersi stabili nei prelievi successivi. Nel fusto N2, che presentava alcuni lieviti già nella fase di inoculo, si assiste ad un incremento costante del contenuto fino a raggiungere un apice al 4° prelievo e successivamente alla loro scomparsa al 5° prelievo, salvo poi riconfermare la loro presenza in modeste quantità al 6° prelievo.





**Figura 10.** Andamento della presenza di lieviti nei fusti oggetto di indagine.



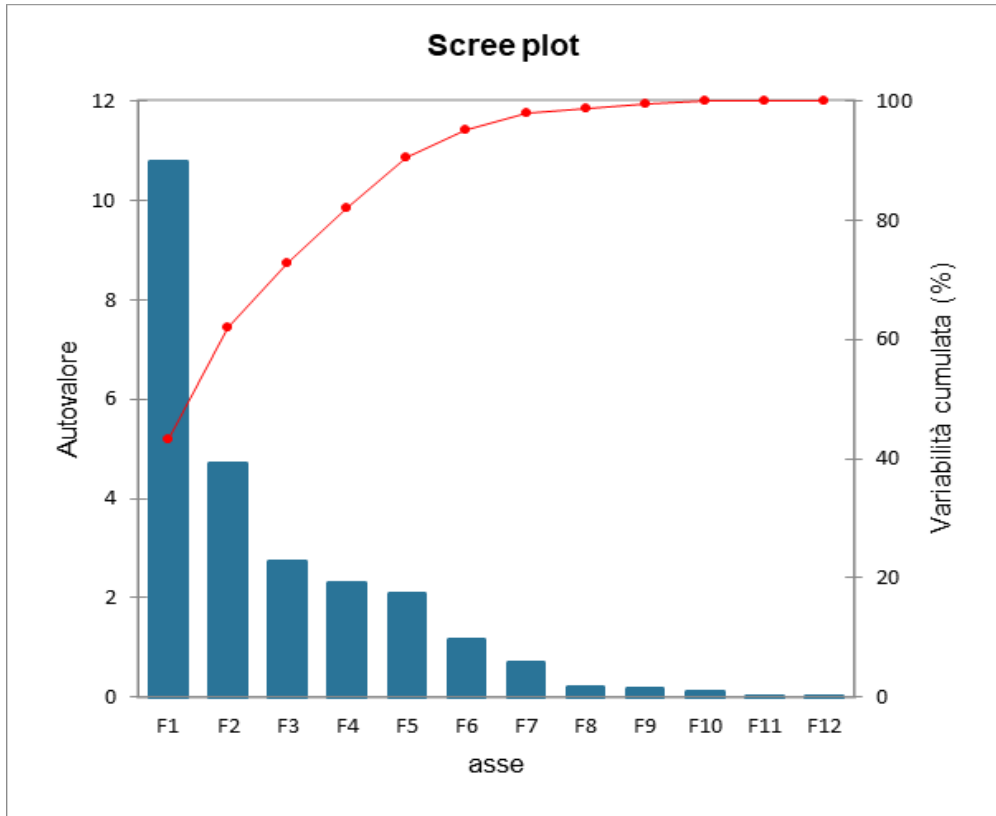
**Figura 11.** Fusto G2 al pre-inoculo (a sinistra) e al I prelievo (a destra).

I fusti G1 e G2 presentano già dal 1° prelievo (una settimana circa dall'inoculo) una elevata crescita (Figure 10 e 11) il cui andamento rimane costante durante tutte le fasi del processo, subendo una oscillazione verso il basso al 5° prelievo e poi una nuova crescita al 6° prelievo. Anche il contenuto del fusto FUGO mostra un andamento nella crescita/decrecita di lieviti analogo a quello dei fusti G1 e G2. Va considerato che il fusto FUGO, essendo completamente esposto agli agenti atmosferici, può aver subito degli shock termici, dato che alla data del 5° prelievo (16 giugno) le temperature superavano già abbondantemente i 30°C nelle ore di punta. I fusti oggetto di indagine, al contrario, erano stati posti all'ombra e pertanto si ritiene che l'azione termica sia stata limitata, o quantomeno che abbia influito in maniera analoga su tutti e quattro i fusti.

### *Contenuto fenolico*

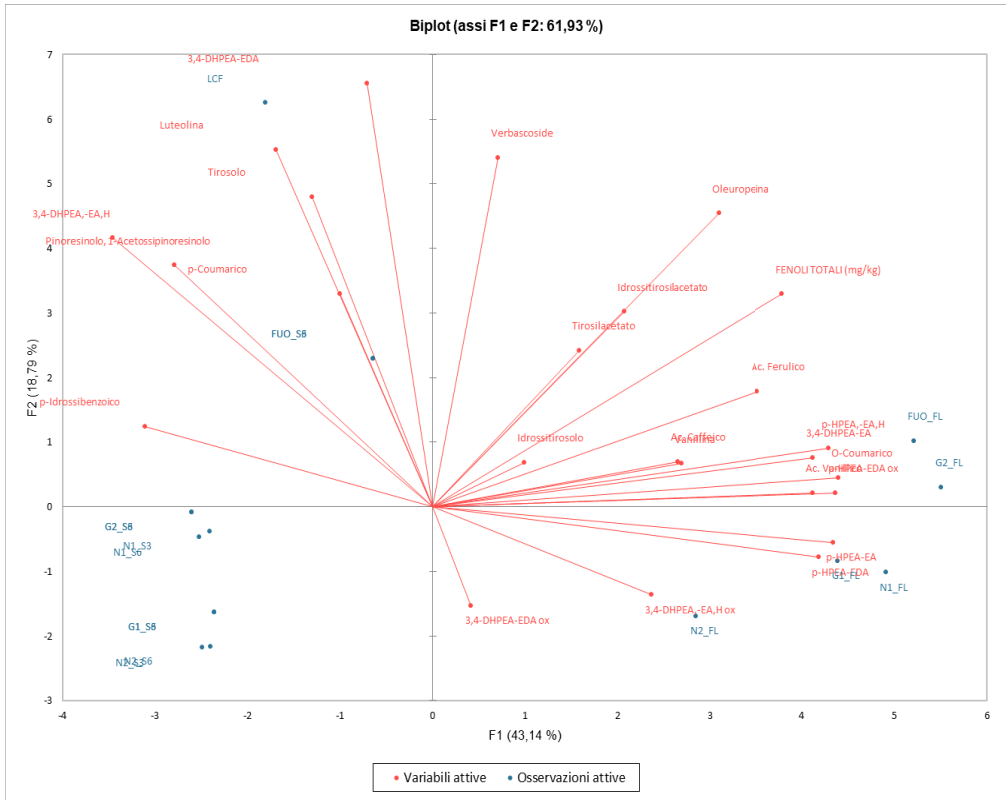
Per quanto riguarda l'analisi del contenuto fenolico, sono state determinate le specie fenoliche mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) come descritto dal metodo COI (COI/T.20/Doc. No 29/Rev.1 2017). Ad ogni prelievo, aliquote di olive e salamoie sono state riservate all'analisi del relativo contenuto fenolico. I dati sono stati successivamente trattati mediante PCA (Analisi delle Componenti Principali) e CAG (Classificazione Ascendente Gerarchica) considerando i valori ottenuti sulla polpa del prodotto fresco, sulla polpa dei prodotti dei 5 fusti a fine fermentazione (5° prelievo) e sulle polpe dei prodotti dopo shelf-life di 3 mesi (6° prelievo) e di 6 mesi (7° prelievo).

Lo Scree plot in Figura 12 mostra l'andamento della variabilità cumulata. Sono state selezionate le variabili F1 ed F2 che esprimono sui due assi il 61,93% della variabilità (43,14% F1 - 18,79% F2).



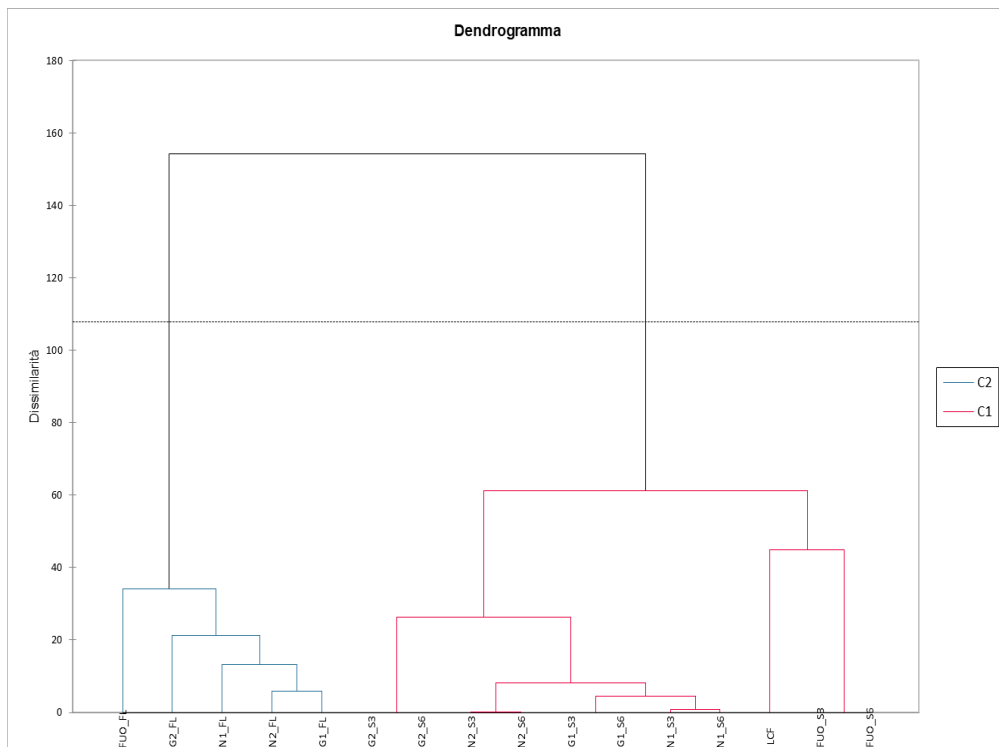
**Figura 12.** Scree plot variabilità cumulata

Dai dati esaminati, emerge in PCA (Figura 13) una chiara separazione tra il prodotto fresco (LCF) e tutti gli altri prodotti lavorati. I prodotti a fine fermentazione (FL) si concentrano invece nei due quadranti di destra, mentre i prodotti analizzati alla fine dei due periodi di shelf-life si posizionano concentrati sul quadrante in basso a sinistra. Fanno eccezione i risultati ottenuti nei due periodi di shelf-life del fusto FOU, che si posizionano sovrapposti nel quadrante in alto a sinistra ma comunque distinto dal campione fresco LCF.



**Figura 13.** PCA sostanze fenoliche. Biplot con osservazioni e variabili.

La stessa matrice dati, sottoposta a CAG (Classificazione Ascendente Gerarchica) ci consente di clusterizzare in maniera efficiente i diversi gruppi, come indicato in Figura 14. Possiamo quindi osservare come tutti i prodotti analizzati a fine fermentazione (FL) vengano correttamente clusterizzati nel gruppo1, con il campione FUO subclusterizzato singolarmente a sinistra e con un certo valore di dissimilarità rispetto agli altri campioni. I prodotti analizzati dopo i due periodi di shelf-life (indicati col suffisso S3 ed S6) clusterizzano invece tutti nel gruppo2. All'interno di questo gruppo troviamo che la dissimilarità tra FUO\_S3 e FUO\_S6 è inesistente ma questi due prelievi sono subclusterizzati assieme al prodotto fresco LCF. Anche i campioni N1, N2, G1 e G2 non presentano dissimilarità tra loro nei due diversi prelievi, ma il campione G2 si subclusterizza con una certa dissimilarità dagli altri campioni del gruppo.



**Figura 14.** CAG sostanze fenoliche polpa

Le analisi texturali, sensoriali e del colore, sia del prodotto a fine lavorazione che dopo un periodo di shelf-life di 3-6 mesi, non sono state discusse in questa sede.

## Conclusioni

Questa indagine, condotta in condizioni operative industriali, ha svelato alcuni aspetti della produzione di olive da tavola fermentate al naturale che dalla bibliografia consultata non emergevano.

Innanzitutto, il set di determinazioni analitiche condotto ha chiaramente evidenziato che nonostante la situazione di partenza sia la stessa, i prodotti finiti presentano leggere differenze. Questo può essere dovuto ad una serie di fattori che includono: popolazione della microflora residente (a livello qualitativo e quantitativo), competizione tra microrganismi starter, presenza di eventuali batteriofagi [9], condizioni climatiche, dislocazione dei fusti e condizioni operative.

In secondo luogo, l'evoluzione del profilo fenolico differenzia chiaramente il prodotto fresco dal prodotto finito, ma caratterizza ulteriormente i diversi prodotti finiti, dimostrando che esistono diverse tipologie di deamarizzazione a seconda del tipo di microflora che prende il sopravvento nella salamoia. Inoltre, constatiamo che la permanenza del prodotto nei fusti per un periodo di 3-6 mesi ulteriore alla fine della fermentazione (prelievi S3 e S6), influenza chiaramente il profilo fenolico, come si evince dall'analisi CAG in Figura 14.

Abbiamo anche notato come il fusto esterno, denominato FUO, lasciato esposto alle variazioni climatiche, abbia mostrato comunque un comportamento dissimile dagli altri fusti oggetto di test sia per quanto riguarda i parametri chimico-fisici sia per il contenuto fenolico. Stessa cosa per quanto riguarda il profilo microbiologico, che vede nel fusto FUO completamente assenti i batteri lattici in tutti e tre i prelievi (FL, S3 ed S6).

I risultati ottenuti sui fusti inoculati con colture starter selezionate hanno evidenziato invece alcune importanti criticità nella produzione industriale di olive da tavola: la scelta dell'inoculo è fondamentale! Nel nostro esperimento il lievito *Saccharomyces caerevisiae* si è dimostrato più efficace ed ha prevalso fin da subito sul batterio *Lactiplantibacillus plantarum*. A cosa sia dovuta questa prevalenza è difficile dirlo con esattezza ma possiamo fare delle ipotesi: a) l'impiego di salamoie ad elevata concentrazione di NaCl (10-12%) che, se da un lato garantiscono un certo grado di protezione alle olive per quanto riguarda l'insorgenza di microrganismi patogeni, dall'altro molto probabilmente inibiscono anche la crescita di microrganismi utili alla fermentazione; b) la presenza di batteriofagi che utilizzano la cellula batterica per replicarsi causando la morte dell'ospite per lisi cellulare; c) gli sbalzi termici; d) la competizione microbica per micro e macronutrienti.

La sperimentazione effettuata ha dimostrato quindi che in realtà ogni fusto è un ecosistema a sé stante e che "guidare" una fermentazione si può, ma richiede molta esperienza. Riteniamo che il nostro lavoro possa rappresentare uno spunto interessante per future ricerche sul campo e un valido aiuto per le aziende che operano nel settore.

## Bibliografia

1. Lanza B., Zago M., Di Marco S., Di Loreto G., Cellini M., Tidona F., Bonvini B., Bacceci M., and Simone N., 2020. Single and multiple inoculum of *Lactiplantibacillus plantarum* strains in table olive lab-scale fermentations. Fermentation – Special Issue “Lactic Acid Fermentation: Biotechnological Developments, Challenges, and Opportunities”, Fermentation 2020, 6(4), 126.
2. Lanza B., Di Marco S., Bacceci M., Di Serio M.G., Di Loreto G., Cellini M., and Simone N., 2021. *Lactiplantibacillus plantarum* Used as Single, Multiple, and Mixed Starter Combined with *Candida boidinii* for Table Olive Fermentations: Chemical, Textural, and Sensorial Characterization of Final Products. Fermentation 2021, 7, 239.
3. Panagou E. Z., Tassou C. C., and Katsaboxakis C. Z., 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 83 667–674
4. Bonatsou S, Tassou C.C., Panagou E.Z., and Nychas G.E., 2017. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms*. 2017 May 28;5(2):30.
5. Lanza B., 2013. Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Front Microbiol.* 2013 May 10; 4:91. doi: 10.3389/fmicb.2013.00091. eCollection 2013.
6. Arroyo-López F.N., Romero-Gil V., Bautista-Gallego J., Rodríguez-Gómez F., Jiménez-Díaz R., García-García P., Querol A., and Garrido-Fernández A., 2012. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, 160 (1): 42-49, 2012.
7. Psani M., and Kotzekidou P., 2006. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 221 329–1336.
8. Marquina D., Toufani S., Llorente P., Santos A., and Peinado J. M., 1997. Killer activity in yeast isolates from olive brines. *Adv. Food Sci.* 19 41–46.
9. Lanza B., Zago M., Carminati D., Rossetti L., Meucci A., Marfisi P., Russi F., Iannucci E., Di Serio M.G., and Giraffa G., 2012. Isolation and preliminary characterization of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages from table olive fermentation. *Ann. Microbiol.* 62 1467–1472.

# Monitoraggio della qualità igienica e sensoriale di olive da tavola commerciali: uno sguardo alla sicurezza dei prodotti

**N. Timpanaro, E. Pistorio, P. Foti, G. Sciuto, M. C. Giuffrida, F. V. Romeo\***

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria-Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA), C.so Savoia 190, 95024, Acireale (CT), Italia

## Introduzione

La filiera olivicola riveste un ruolo fondamentale nel settore agroalimentare italiano: rispetto ad altri paesi produttori, l'Italia possiede un patrimonio olivicolo variegato, grazie alla particolare posizione geografica che ha favorito lo sviluppo di molte varietà di ulivo. Pertanto, questo settore è oggetto di grande attenzione da parte della comunità scientifica. Tutte le olive contengono l'oleuropeina, un secoiridoide glicosidico, che conferisce sapore fortemente amaro alle drupe, e quindi non direttamente commestibili dopo la raccolta. Qualsiasi metodo di trasformazione delle olive ha come obiettivo primario la rimozione dell'amaro naturale di questo frutto, ossia la deamarizzazione. I sistemi di trasformazione più diffusi sono quelli che utilizzano un'idrolisi alcalina più veloce oppure un'idrolisi enzimatica più lenta (a pH acido). Inoltre, nella maggior parte dei metodi di trasformazione, viene avviato un processo fermentativo per aumentare l'appetibilità del prodotto finale. Le olive verdi sono prevalentemente trasformate secondo il metodo sivigliano che ne accorcia enormemente i tempi di deamarizzazione, mentre, le olive nere sono processate secondo il metodo greco, o fermentazione naturale in presenza di sale, oppure seguendo il metodo "Californiano" [1]. In altri casi, la fermentazione spesso è l'unica procedura applicata per la deamarizzazione e la conservazione delle olive da tavola e, soprattutto a livello delle piccole imprese, fioriscono ricette diverse che conferiscono spesso tipicità al prodotto. Il microbiota autoctono, che guida il processo, è fortemente influenzato dalla cultivar di ulivo e dai parametri tecnologici quali temperatura, pH, sale aggiunto [2], e concentrazione fenolica della cultivar utilizzata [3].

Nonostante i consumi di olive da tavola siano raddoppiati negli ultimi vent'anni, l'Italia continua a importarle molto più che esportarle. Per comprendere le

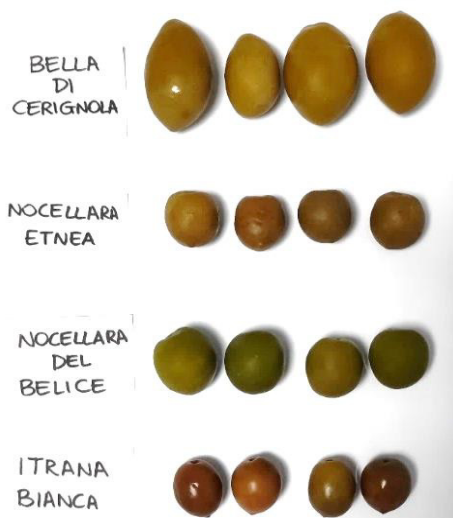


problematiche del settore delle olive da tavola, è necessario fare un monitoraggio pluriennale dei processi e dei prodotti commerciali al fine di analizzare i punti critici ed apportare soluzioni attraverso il contributo della ricerca. Molti patogeni possono sopravvivere nelle olive da tavola: alcuni studi hanno identificato, anche a bassa concentrazione, la presenza nei prodotti pronti al consumo di *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* [4; 5; 6; 7]. La qualità igienica delle olive da tavola riveste un ruolo fondamentale per garantire la massima sicurezza per il consumatore. Il progetto DEAOLIVA “Miglioramento della qualità, sostenibilità e sicurezza d’uso nella deamarizzazione delle olive da tavola attraverso processi innovativi a scala pilota” mira a migliorare la sicurezza alimentare, l’aspetto salutistico delle olive da tavola e l’ecosostenibilità dei sistemi produttivi. In particolare, le attività microbiologiche svolte rientrano nell’ambito del WP3 e si sono focalizzate sul controllo della qualità dei prodotti fermentati attraverso analisi microbiologiche e chimiche sia delle olive che delle salamoie di fermentazione, ponendo particolare attenzione al rilevamento di microrganismi potenzialmente patogeni e/o micotossigeni, al fine di implementare la qualità igienica delle olive da mensa.

## Materiali e metodi

### *Campionamento delle olive da tavola*

Sono state effettuate analisi su campioni commerciali forniti dall’azienda in convenzione Romeo Ficacci S.r.l. I campioni di olive verdi e nere da tavola, di cultivar Nocellara del Belice, Nocellara etnea, Bella di Cerignola, Itrana Bianca (Figura 1), Conservolea nera e Hojiblanca nera (Figura 2), intere, schiacciate o denocciolate, sono state preparate tramite diversi metodi di trasformazione, quali Castelvetro, Sivigliano, fermentazione naturale e Californiano.



**Figura 1.** Campioni commerciali di olive verdi

Negli anni della durata del progetto sono state analizzate quattro cv l'anno, ognuna delle quali confezionata in tre lotti differenti.

### *Misurazione del pH e monitoraggio microbiologico*

Tutti i campioni sono stati sottoposti a misurazione del pH mediante un pHmetro (MettlerDL25, Mettler-Toledo International Inc.) per valutare se la fermentazione fosse andata a buon fine e se il prodotto avesse raggiunto una stabilità commerciale, ossia un valore di pH di sicurezza per il consumatore.

Sono state condotte analisi di routine circa la quantificazione della carica di batteri lattici, conta mesofila totale, lieviti e muffe. Inoltre, analisi qualitative e quantitative delle principali popolazioni microbiche e dei patogeni sono state condotte sui campioni al fine di monitorare l'intero processo di fermentazione del prodotto.



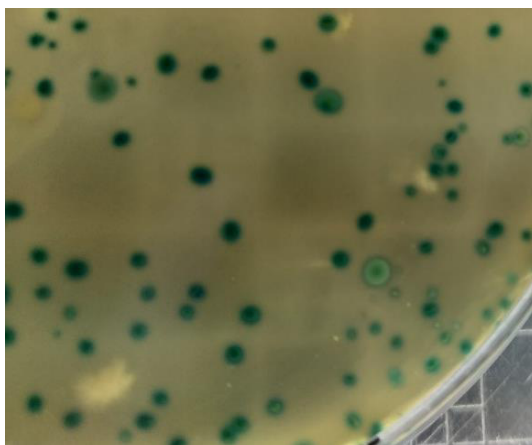
**Figura 2.** Campioni commerciali di olive nere ottenute con il metodo Californiano.

Le diverse popolazioni microbiche sono state enumerate utilizzando i seguenti mezzi selettivi e condizioni:

- ✓ batteri lattici su de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, Oxoid, Italia) incubati a 32°C per 48 ore in condizioni di anaerobiosi;
- ✓ batteri mesofili aerobi totali su Plate Count Agar (PCA, Oxoid) incubati a 25°C per 48 ore;
- ✓ lieviti e muffe su Sabouraud Chloramphenicol agar (SAB, Bio-Rad, Italia) incubati a 25°C per 48 ore;

- ✓ batteri coliformi su Chromogenic coliform Agar Base (CCA, Bibby Scharlau, Italia) incubati a 37°C per 24 ore;
- ✓ stafilococchi coagulasi positivi su Mannitol Salt Agar (MSA, Oxoid, Italia) incubati a 32°C per 72 ore;
- ✓ *Clostridium perfringens* su Oleandomycin Polymixin Sulphadiazine Perfringens Agar (OPSP, Lickson, Italia) incubati a 32°C per 3-5 giorni in condizioni di anaerobiosi;
- ✓ muffe micotossigene su *Aspergillus flavus* e *parasiticus* agar base (AFPA, Condalab, Italia) incubati a 30°C per 2-3 giorni;
- ✓ *Listeria* spp. Su Listeria Chromogenic Agar Base (ALOA, Condalab) a 37°C per 24/48 ore.

Le analisi microbiologiche sono state condotte sia sulle drupe che sulle salamoie. In dettaglio, circa 100 g di olive di ogni campione, privi di salamoia, sono state trasferiti in condizioni di sterilità in sacchetti per Stomacher ed è stata aggiunta una quantità uguale di soluzione diluente (Ringers solution, Oxoid) sterile. La miscela è stata omogeneizzata per 1 minuto utilizzando uno stomacher (Bag mixer, Interscience) ed in seguito è stata trasferita in provette sterili. Diluizioni appropriate dei campioni di drupe e di salamoia in esame, sono state preparate in soluzione diluente (Ringers solution, Oxoid) e seminate in terreni di crescita selettivi.



**Figura 3.** Colonie presunte di *Listeria monocytogenes* su ALOA agar.

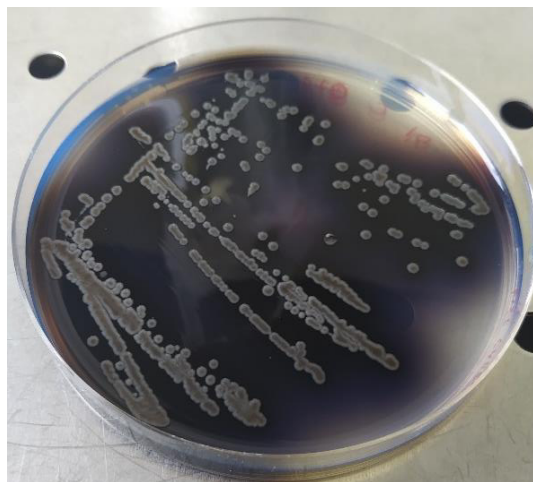
L'analisi dei campioni è stata effettuata in duplice replica e i risultati sono stati espressi in Log CFU/mL di salamoia e in Log CFU/g di olive.

### *Isolamento di Listeria spp. e identificazione fenotipica*

Un campione rappresentativo di colonie presunte di *Listeria monocytogenes* è stato prelevato da piastre di agar ALOA. In particolare, sono state selezionate colonie cresciute su terreno selettivo come colonie verdi/blu circondate da un caratteristico alone opaco (Figura 3). Mediante strisci per isolamento ripetuti su *Listeria selective agar base* (Oxoid), incubati a 37° per 48 ore, sono state ottenute colture pure per l'identificazione dei microrganismi (Figura 4). Le colture pure in seguito sono state sottoposte a test fenotipici quali caratterizzazione morfologica mediante osservazione al microscopio, test della catalasi e colorazione di Gram.

#### *Identificazione degli isolati di Listeria spp.*

L'identificazione biochimica degli isolati di *Listeria spp.* è stata effettuata utilizzando il sistema di cellette miniaturizzate API *Listeria* (BioMérieux, Francia). Questo sistema è costituito da una striscia comprendente 10 microtubi o cellette contenenti substrati in forma disidratata che permettono di realizzare test enzimatici e fermentazione degli zuccheri. I dieci test specifici per *Listeria spp.* comprendevano: arilamidasi (test DIM), esulina,  $\alpha$ -mannosidasi, D-arabitolio, xilosio, ramnosio, metil- $\alpha$ D-glucopiranoside, ribosio, glucosio-1-fosfato e tagatosio.



**Figura 4.** Striscio di isolamento su *Listeria selective agar base*.

Un'ansata della coltura cresciuta su agar è stata sospesa in 2 mL di acqua distillata sterile (contenuta all'interno del kit BioMérieux) fino ad ottenere una torbidità equivalente allo standard Mc Farland 0,5 pari a  $10^8$  Unità Formanti Colonie/mL. Al

fine di creare un ambiente umido, nel vassoio è stata versata dell'acqua sterile e su questa, in seguito, è stata posta la striscia con le cellette di reazione. All'interno delle 10 cellette è stata inoculata la sospensione batterica (100  $\mu$ L per il test DIM e 50  $\mu$ L per gli altri test). Successivamente le vaschette sono state chiuse e messe ad incubare a 36°C per 18-24 ore in aerobiosi. Durante il periodo di incubazione le reazioni hanno generato cambiamenti di colore (Figura 5); una goccia di ZYM B (fornita dal produttore) è stata aggiunta alla microprovetta DIM e lasciata reagire per 3 minuti, quindi, sono state annotate tutte le reazioni e sono state interpretate secondo le istruzioni del produttore.



**Figura 5.** Kit API Listeria (BioMérieux, codice 10300).

### *Analisi sensoriale ed addestramento del panel*

La valutazione organolettica delle olive da tavola è fondamentale per definirne una classificazione sulla base dei parametri di qualità, ed il Consiglio Oleico Internazionale ha sviluppato la metodologia ed i criteri necessari per l'analisi sensoriale sulle olive da tavola [8].

L'addestramento dei giudici ha previsto un periodo di formazione che ha avuto lo scopo di favorire l'uso della terminologia e l'identificazione e quantificazione dei descrittori sensoriali.

I giudici sono stati addestrati all'identificazione delle fermentazioni anomale (zapateria, fermentazione butirrica e fermentazione putrida) mediante degli standard di riferimento, quali l'acido cicloesanoico, l'acido butirrico ed il 2-mercaptoetanololo, e ad altri difetti (cotto, rancido, muffa, metallico, terra, saponoso...). Inoltre, i giudici sono stati addestrati alla quantificazione dei 3 descrittori gustativi (acido, salato, amaro) e dei 3 descrittori cinestetici (durezza, fibrosità, croccantezza). Per l'identificazione e quantificazione dei descrittori cinestetici sono state utilizzate matrici alimentari quali il Leerdammer e la carota per il descrittore durezza, la mela Granny Smith e la parte centrale dell'ananas per il descrittore fibrosità ed infine le pesche sciropate ed il sedano per

l'identificazione della croccantezza. Ciascun descrittore è stato valutato mediante l'ausilio di una scheda dove ogni attributo è stato valutato su una scala continua lineare 1-11 cm dove 1 corrisponde all'assenza della percezione e 11 alla massima percezione (Fig. 6).

**COI OLIVE** S

Assessor: NI Nicoletta Timpanaro    Tray: 1

**862**

### PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI NEGATIVE

**Fermentazione anomala**

1 ————— 11

Fermentazione Putrida ◯    Fermentazione Butirrica ◯    Zapateria ◯

**Altri difetti**

1 ————— 11

Muffa ◯    Rancido ◯    Cotto ◯    Saponoso ◯    Metallico ◯    Terra ◯    Vino/Aceto ◯

### PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI GUSTATIVE

**Salato**

1 ————— 11

**Amaro**

1 ————— 11

**Acido**

1 ————— 11

### PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI CINESTETICHE

**Durezza**

1 ————— 11

**Fibrosita\***

1 ————— 11

**Croccantezza**

1 ————— 11

**Figura 6.** Scheda di valutazione olive da mensa

### *Svolgimento dell'analisi sensoriale su olive da tavola secondo standard COI*

I campioni di olive da tavola sono stati posti nei bicchieri di assaggio a temperatura ambiente, tra i 20 e i 25 °C, e sono state collocate circa tre olive ricoperte dalla salamoia (in base alla grandezza della drupa), quindi il bicchiere è stato coperto con un vetrino da orologio, al fine di agevolare l'emissione della componente aromatica proveniente dalla salamoia nella fase di valutazione dell'odore del campione. È stato chiesto di assaggiare un campione per volta, bevendo dell'acqua frizzante tra un campione e l'altro, con una pausa di circa 5 minuti prima di procedere con il campione successivo. Ciascun campione è stato codificato mediante codici a tre cifre generati dal software.

### *Analisi statistica dei dati*

L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita con un'analisi della varianza (ANOVA) a una via e il test post-hoc HSD di Tukey per la separazione delle medie utilizzando il software statistico IBM SPSS Statistics for Windows, versione 20 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

## **Risultati e discussione**

Le analisi microbiologiche effettuate sui campioni commerciali nel corso dei quattro anni (Tabelle 1, 2, 3, 4) hanno mostrato l'assenza di muffe micotossigene (terreno AFPA), con l'eccezione di un solo lotto di Nocellara del Belice trattata col metodo Castelvetro, nel primo anno di campionamento (Tab. 1), in cui si è registrata una carica molto bassa (2,2 Log UFC/mL in una sola delle repliche). *Clostridium perfringens* (terreno OPSP) è risultato sempre assente in tutti i campionamenti dei quattro anni. I coliformi totali (terreno CCA) sono assenti solo nei campioni del secondo anno, probabilmente perché il pH avrà raggiunto valori bassi in tempi più rapidi o perché l'azienda avrà seguito in modo più peculiare le buone pratiche di lavorazione secondo standard igienici. In tutti gli altri campionamenti i coliformi raggiungono cariche comunque basse, tranne con i metodi Castelvetro e californiano, dove raggiungono il valore massimo di 5,97 Log UFC/g nel metodo californiano (Tab. 4). Tra i coliformi nel terreno CCA è stata registrata, tramite reazione colorimetrica, una bassa carica di *Escherichia coli* pari a  $6 \times 10^2$  UFC/mL in un solo lotto della cultivar Nocellara del Belice nel primo anno. La popolazione dei coliformi in genere scompare nelle olive e nelle salamoie solo se il pH si acidifica fino a livelli di sicurezza (<4,5) in tempi brevi. Infatti, se la

diminuzione del pH durante i primi giorni della fermentazione non è abbastanza rapida, il deterioramento delle olive può insorgere rapidamente, a causa di Enterobacteriaceae e altri gruppi di microbi che possono raggiungere alte densità cellulari [9]. La cv. Nocellara del Belice trattata col metodo Castelvetro, inoltre, ha presentato valori di pH superiori rispetto alle altre cultivar e quasi sempre superiori ai parametri di sicurezza; in particolare, nei lotti del primo anno (Tab. 1) sono state riscontrate cariche microbiche potenzialmente pericolose per il consumatore a causa della presenza di stafilococchi coagulasi positivi (terreno MSA). Stesso risultato è stato ottenuto nel terzo anno (Tab. 3) con le olive Conservolea con metodo californiano, anche se con valori più bassi. Nell'ultimo anno di campionamento (Tab. 4) i valori di pH sono stati tutti al di sopra della soglia di sicurezza ad eccezione delle olive trattate con metodo sivigliano, dato correlato ad un probabile uso di acidificanti prima del confezionamento, che dimostra che i prodotti sono stati ben condizionati dal produttore. Tirando le somme risultano al di sopra della soglia di pH di sicurezza 3/12 dei campioni del primo e del secondo anno, e 9/12 dei campioni del terzo e del quarto anno. Dai risultati ottenuti si evidenzia quindi la necessità di controllare il pH delle salamoie per garantire un prodotto sicuro per il consumatore. Il pH acido, infatti, è il primo ostacolo che può contenere enormemente le cariche microbiche e soprattutto i patogeni.

Nelle Tabelle 1-4 si può notare anche una certa variabilità tra i lotti, che quindi non possono essere considerati come repliche dello stesso prodotto confezionato. Questo dato avvalorava il fatto che ancora oggi in Italia, le piccole e medie imprese spesso non riescono a standardizzare il metodo ossia a replicare la sequenza delle procedure lungo tutta la filiera.

Dal punto di vista microbiologico, come atteso, le cultivar trattate con metodo Castelvetro e sivigliano hanno evidenziato cariche microbiche più simili ed un'incidenza maggiore di microorganismi patogeni (Tab. 1 e 2); mentre differenze significative sono state registrate in confronto alle cultivar trattate con metodo naturale, in particolare per: batteri lattici, carica mesofila totale, e stafilococchi coagulasi positivi. Negli ultimi due campionamenti (Tab. 3 e 4), invece, il metodo Castelvetro ha mostrato dati più simili al californiano.

Dagli isolati ottenuti dal terreno ALOA, una trentina di ceppi (n. 34) potenzialmente appartenenti a *L. monocytogenes* caratterizzati da colonie con alone opaco, sono state sottoposti a kit API Listeria. I profili fermentativi ottenuti attraverso il kit hanno permesso di identificare i ceppi analizzati nei seguenti cluster: il 64% ha mostrato un profilo conforme a *Listeria welshimeri*, il 21,5% a *Listeria seelingeri/ivanovii*, il 7% *Listeria grayi* ed il 7% a *Listeria ivanovii*. Nelle olive in salamoia, non è difficile trovare ceppi di *Listeria* spp., ma è comunque difficile trovarle a densità



cellulari elevate [5]. Questo risultato potrebbe essere correlato all'attività antimicrobica dei composti fenolici e all'azione antagonista della microflora dominante [10]. In ogni caso, essendo patogeni capaci di svilupparsi anche in condizioni di refrigerazione, è bene sempre effettuare il monitoraggio delle cariche e dell'incidenza. In un recente lavoro di Redding et al. [11] è stato valutato l'effetto del pH sulla sopravvivenza di *L. monocytogenes* in succhi di frutta e di vegetali. Una leggera riduzione di *L. monocytogenes* è stata osservata nei succhi con pH 4,1 (pomodoro) e pH 3,9 (mango), mentre nessuna conta di *L. monocytogenes* è stata recuperata da succhi con pH  $\leq 3,8$ . Questo valore dovrebbe spingere i produttori a considerare il pH di sicurezza non più  $< 4,5$  ma  $< 4,0$  proprio per evitare la crescita di alcuni patogeni come *Listeria* spp. Nel contempo questo è un pH di sicurezza anche verso altri patogeni.

Sebbene la valutazione della conta mesofila aerobia totale, non sia inclusa in tutte le diverse linee guida relative agli alimenti, in realtà questi microorganismi sono utilizzati come indicatori della qualità microbiologica complessiva dei processi di produzione degli alimenti. Nella maggioranza dei campioni questo parametro è  $> 10^6$  UFC/mL oppure UFC/g, tranne che con il metodo naturale (Tab. 1 e 2), e con il sivilgiano (Tab. 3) dove è azzerato dall'effetto della soda.

**Tabella 1.** Caratterizzazione microbiologica delle cultivar: Nocellara del Belice, Bella di Cerignola, Nocellara etnea e Itrana bianca.

Primo anno	Nocellara del Belice Metodo Castelvetro		Bella di Cerignola Metodo stigliano		Nocellara etnea Metodo naturale (schiacciate)			Itrana bianca Metodo naturale			
	339/20	415/20	402/20	074/20	135/20	217/20	233/20	259/20	492/19	499/19	502/19
Terreno:	Lotto:										
MRS	6,09±0,12ab	5,91±0,06bc	6,20±0,04a	6,07±0,10ab	5,97±0,02b	5,72±0,02c	6,02±0,03ab	5,01±0,01e	3,00±0,00f	3,00±0,00f	3,00±0,00f
PCA	7,38±0,03a	7,32±0,03a	6,29±0,02b	5,10±0,21de	4,90±0,01ef	5,33±0,04d	3,87±0,03g	4,00±0,00g	0,00±0,00h	4,81±0,05f	4,06±0,08g
SAB	7,38±0,05a	7,02±0,08ab	7,25±0,07a	6,09±0,12bcde	5,86±0,02cdef	5,00±0,00f	5,72±0,16cdef	5,47±0,01def	5,21±0,72ef	6,24±0,34bcd	5,84±0,01cdef
CCA	3,39±0,04c	4,30±0,42b	5,21±0,13a	0,00±0,00f	0,00±0,00f	0,00±0,00e	1,60±0,00d	2,85±0,00d	2,66±0,00f	1,24±0,00f	0,00±0,00f
MSA	7,53±0,07ab	7,49±0,02b	7,65±0,06a	2,00±0,06c	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	2,00±0,00c
OPSP	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
AFPA	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
ALOA	2,54±0,51a	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,48±0,00bc	0,75±0,21b	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c
pH	6,02±0,03b	6,06±0,03b	6,40±0,14a	4,51±0,01c	4,52±0,01c	3,78±0,01e	3,78±0,03e	3,85±0,07de	4,03±0,01d	4,00±0,03d	3,99±0,01d

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di Log UFC/mL di salamoia. Differenti lettere sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie per P≤0,01. Nr=non rilevati, carica assente o <1 Log UFC/mL. Legenda dei terreni di coltura: MRS=batteri lattici; PCA=conta mesofila aerobia; SAB=lieviti e muffe; CCA=coliformi; MSA=stafilococchi coagulasi +; OPSP=clostridi solfito-riduttori; AFPA=muffe micotossigene; ALOA=*Listeria* spp.

**Tabella 2.** Caratterizzazione microbiologica delle cultivar: Nocellara del Belice, Bella di Cerignola, Nocellara etnea e Itrana bianca.

Secondo Anno	Nocellara del Belice Metodo Castelvetro		Bella di Cerignola Metodo svigliano		Nocellara etnea Metodo naturale			Itrana bianca Metodo naturale			
	Terreno:	Lotto:	049/20	074/20	161/20	217/20	233/20	259/20	492/19	499/19	502/19
MRS	7,26±0,08a	402/20	5,50±0,39bc	5,96±0,51b	4,85±0,00cd	4,04±0,06de	3,88±0,03de	4,10±0,14d	2,00±0,00f	3,07±0,10e	3,07±0,10e
PCA	7,41±0,04a	5,45±0,63bc	5,54±0,04b	5,34±0,04b	4,85±0,00bcd	5,25±0,33bc	4,94±0,03bcd	4,54±0,33cde	3,54±0,09ef	2,76±0,03f	4,02±0,05de
SAB	6,49±1,26a	3,84±0,09cde	3,57±0,55de	0,00±0,00f	3,04±0,06de	5,57±0,04ab	5,34±0,06abc	5,32±0,03abc	2,42±0,1fe	4,56±0,09bce	4,10±0,06bcd
CCA	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
MSA	5,14±0,09b	0,00±0,00g	4,30±0,00c	0,0±0,0g	0,30±0,00f	5,30±0,00a	0,00±0,00g	2,13±0,00e	3,30±0,00d	0,0±0,0g	0,0±0,0g
OPSP	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
AFPA	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
ALOA	0,50±0,00d	0,80±0,00bc	0,15±0,21ed	0,63±0,00d	1,12±0,06ab	0,84±0,12bc	1,36±0,25bc	0,98±0,21a	0,83±0,00cd	0,93±0,16ab	0,60±0,17bc
pH	4,15±0,01c	5,11±0,03b	5,00±0,03b	4,20±0,00c	3,9±0,14de	3,78±0,00d	3,78±0,03d	3,70±0,28d	4,03±0,01de	4,00±0,00de	3,99±0,01de

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di Log UFC/mL di salamoia. Differenti lettere sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie per P≤0,01. Nr=non rilevati, carica assente o <1 Log UFC/mL. Legenda dei terreni di coltura: MRS=batteri lattici; PCA=conta mesofila aerobia; SAB=lieviti e muffe; CCA=coliformi; MSA=stafilococchi coagulasi +; OPSP=clostridi solfito-riduttori; AFPA=muffe micotossigene; ALOA=*Listeria* spp.

**Tabella 3.** Caratterizzazione microbiologica delle cultivar: Nocellara del Belice, Bella di Cerignola, Conservolea nera e Hojiblanca nera.

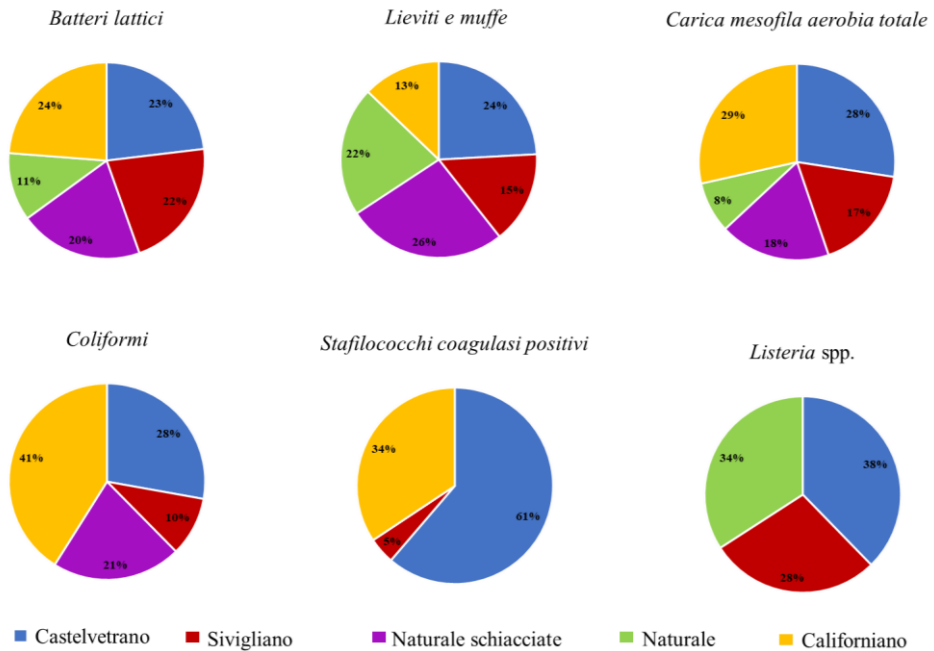
Terzo Anno	Nocellara del Belice Metodo Castelvetro		Bella di Cerignola Metodo svigliano		Conservolea nera Metodo californiano		Hojiblanca nera Metodo californiano (denocciolate)			
	408/21	474/21	032/21	341/21	047/22	024/22	056/22	188/22	002/22	498/22
<b>Terreno:</b>	<b>Lotto:</b>									
MRS	6,50±0,04a	6,59±0,28a	6,64±0,16a	6,49±0,55a	4,68±0,03b	5,99±0,30a	6,85±0,29a	6,28±0,12a	6,88±0,10a	6,41±0,59a
PCA	6,88±0,35abc	6,47±0,16c	6,50±0,07bc	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	7,34±0,14ab	7,00±0,05abc	7,37±0,16a	6,47±0,59c
SAB	4,72±0,13a	4,59±0,02a	4,68±0,10a	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00d	3,32±0,13b	2,45±0,17c	2,57±0,13c	0,00±0,00d
CCA	3,91±0,06b	4,37±0,75b	4,34±0,22b	0,00±0,00d	0,00±0,00d	0,00±0,00c	2,48±0,13a	5,78±0,19ab	4,78±0,02a	5,19±0,36b
MSA	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	6,14±0,09a	5,80±0,12b	6,04±0,03a	0,00±0,00c
OPSP	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
AFPA	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
ALOA	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
pH	5,60±0,14c	5,55±0,14c	5,40±0,14c	3,98±0,03e	3,95±0,01e	3,93±0,01e	6,43±0,03a	6,08±0,04b	6,13±0,01ab	4,60±0,07d

I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di Log UFC/mL di salamoia. Differenti lettere sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie per P≤0,01. Nr=non rilevati, carica assente o <1 Log UFC/mL. Legenda dei terreni di coltura: MRS=batteri lattici; PCA=conta mesofilia aerobia; SAB=lieviti e muffe; CCA=coliformi; MSA=stafilococchi coagulasi +; OPSP=clostridi solfito-riduttori; AFPA=muffe micotossigene; ALOA=Listeria spp.

**Tabella 4.** Caratterizzazione microbiologica delle cultivar: Nocellara del Belice, Bella di Cerignola, Conservolea nera e Hojiblanca nera.

Quarto Anno	Nocellara del Belice Metodo Castelvetrano		Bella di Cerignola Metodo sivigliano		Conservolea nera Metodo californiano			Hojiblanca nera Metodo californiano			
	408/21	474/21	032/21	326/21	341/21	GR2177a	GR2177b	GR2177c	498/21	182/22	002/22
<b>Terreno:</b>											
<b>MRS</b>	6,29±0,01cd	6,32±0,03bcd	6,40±0,13bc	6,36±0,08bcd	6,22±0,02cde	7,76±0,23a	5,91±0,01de	5,77±0,23e	6,56±0,14bc	5,30±0,00f	6,76±0,02b
<b>PCA</b>	6,86±0,01cd	6,48±0,09d	5,89±0,16ef	5,85±0,07ef	6,07±0,10e	7,25±0,01b	6,71±0,15cd	7,08±0,01bc	6,61±0,01d	5,60±0,24f	7,66±0,00a
<b>SAB</b>	3,23±0,32b	3,21±0,30b	3,30±0,42b	3,58±0,01b	3,24±0,01b	3,46±0,03b	2,73±0,19b	3,27±0,17b	5,15±0,21a	5,22±0,10a	3,31±0,01b
<b>CCA</b>	2,77±0,01e	2,72±0,17e	3,34±0,06d	3,41±0,16d	3,45±0,21d	4,95±0,00c	5,97±0,00b	5,69±0,14b	5,68±0,11b	4,56±0,01c	6,28±0,00a
<b>MSA</b>	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
<b>OPSP</b>	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
<b>AFPA</b>	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
<b>ALOA</b>	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
<b>pH</b>	6,40±0,00g	6,52±0,00f	6,33±0,01h	4,56±0,00i	4,37±0,01i	6,83±0,01d	6,93±0,00c	6,76±0,00c	7,01±0,00b	7,04±0,00a	6,77±0,00e

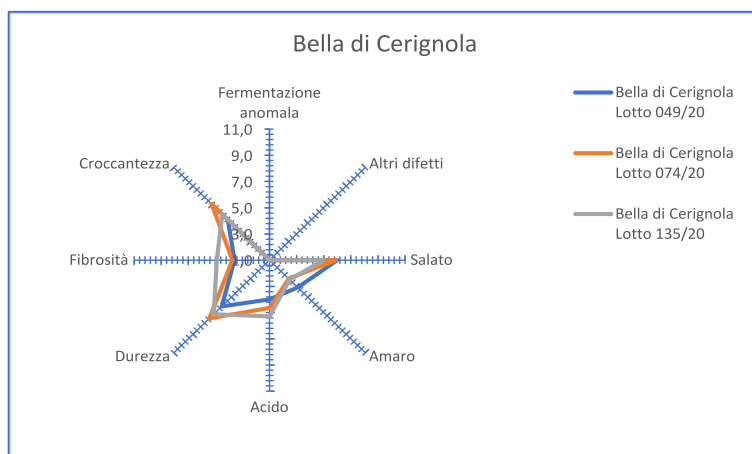
I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di Log UFC/mL di salamoia. Differenti lettere sulla stessa riga indicano una differenza statisticamente significativa tra le medie per P≤0,01. Nr=non rilevati, carica assente o <1 Log UFC/mL. Legenda dei terreni di coltura: MRS=batteri lattici; PCA=conta mesofilia aerobia; SAB=lieviti e muffe; CCA=coliformi; MSA=stafilococchi coagulasi +; OPSP=clostridi solfito-riduttori; AFPA=muffe micotossigene; ALOA=*Listeria* spp.



**Figura 7.** Distribuzione percentuale delle popolazioni microbiche analizzate: normalizzate e separate per microorganismo.

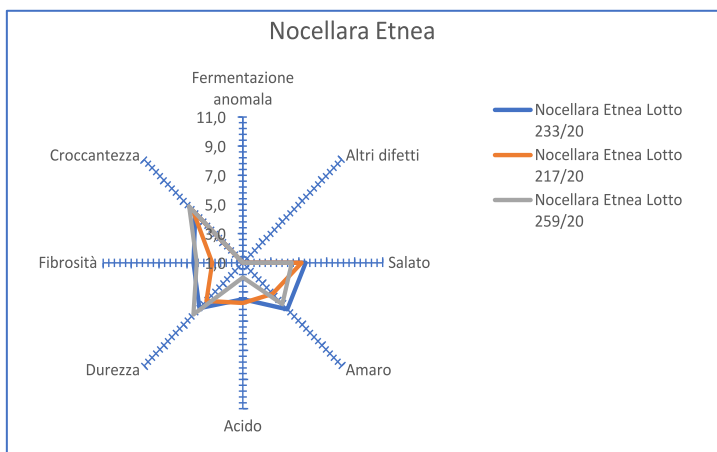
Nella Figura 7 sono mostrati i grafici della distribuzione percentuale delle popolazioni microbiche analizzate dopo essere state normalizzate e separate per target di microorganismo, ossia in base ai terreni selettivi utilizzati. Questa immagine grafica aiuta a comprendere come il totale di ogni popolazione microbica sia suddiviso tra le olive in base ai metodi di trasformazione. La distribuzione più uniforme risulta essere quella della popolazione dei batteri lattici e di lieviti e muffe. Mentre, già a partire dalla conta mesofila aerobia, che è un indice igienico generico, fino ai patogeni, la distribuzione comincia a differenziarsi. Come già riportato in studi precedenti [7], le differenze microbiologiche in base al metodo di trasformazione sono già prevedibili, visto l'impatto che un mezzo chimico aggressivo come la soda può avere sulle olive e sulla successiva difficoltà a standardizzare il pH. Tuttavia, in questi casi, occorre effettuare un condizionamento delle olive nella fase successiva alla deamarizzazione e dei monitoraggi fino alla distribuzione del prodotto.

L'analisi sensoriale effettuata sui campioni commerciali nel corso del I campionamento ha interessato le cultivar Bella di Cerignola ottenuta con il metodo Sivigliano, la Nocellara Etnea ottenuta con fermentazione naturale e l'Itrana Bianca ottenuta con fermentazione naturale. Non è stata oggetto di valutazione sensoriale invece la cv. Nocellara del Belice trattata col metodo Castelvetrano, in quanto dalle valutazioni microbiologiche il campione non è risultato idoneo per la valutazione sensoriale. Della cv. Bella di Cerignola è stato valutato il lotto 049/20, il lotto 074/20 ed il lotto 135/20 e la valutazione sensoriale dei descrittori ha permesso di ottenere il profilo sensoriale dei campioni commerciali (Fig. 8). Il lotto 049/20 si è differenziato dagli altri due per una maggiore percezione di amaro, il lotto 074/20 per una maggiore durezza e croccantezza ed infine il lotto 135/20 è stato percepito più acido e fibroso ed il meno salato.



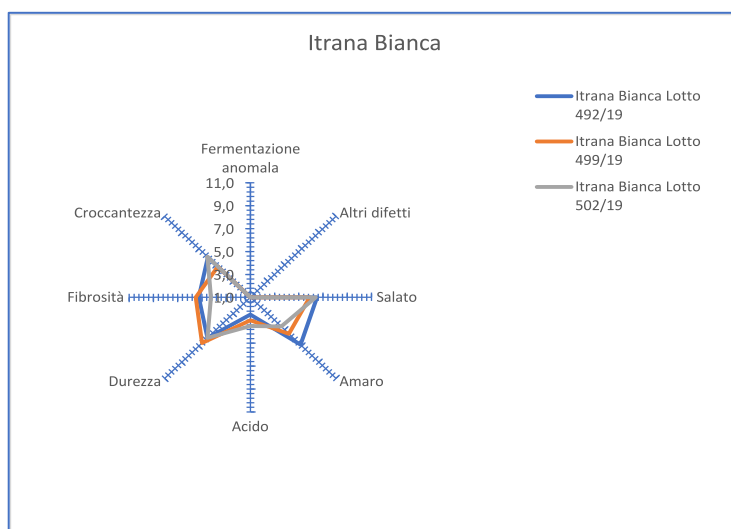
**Figura 8.** Profilo sensoriale della cv. Bella di Cerignola (I campionamento)

Della cv. Nocellara Etnea è stato valutato il lotto 233/20, il lotto 217/20 ed il lotto 259/20, ed il profilo (Fig. 9) ha evidenziato che il lotto 233/20 è stato identificato come il più amaro, il lotto 217/20 è stato percepito come il meno duro e fibroso, il lotto 259/20 è stato indicato dai giudici come il meno acido ed il meno salato.



**Figura 9.** Profilo sensoriale della cv. Nocellara Etnea (I campionamento)

Della cv. Itrana bianca (fig. 10) il lotto 492/19 è stato evidenziato come il più amaro ed il meno acido, il lotto 499/19 si è differenziato per una maggiore durezza ed una minore croccantezza rispetto agli altri lotti ed infine il lotto 502/19 è stato evidenziato come il più acido ed il meno fibroso.

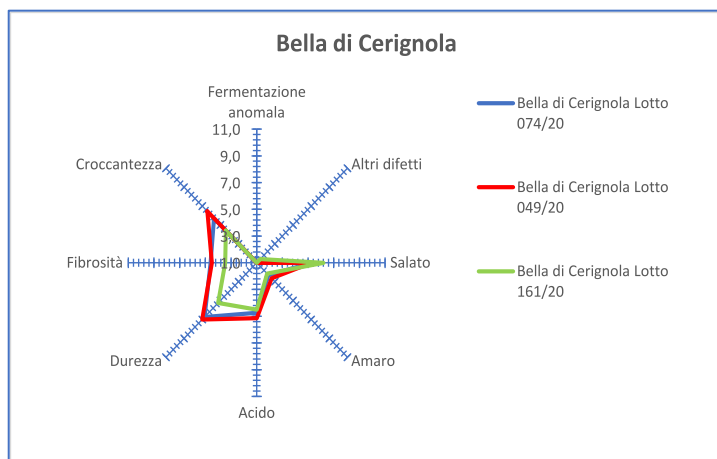


**Figura 10.** Profilo sensoriale della cv. Itrana Bianca (I campionamento)



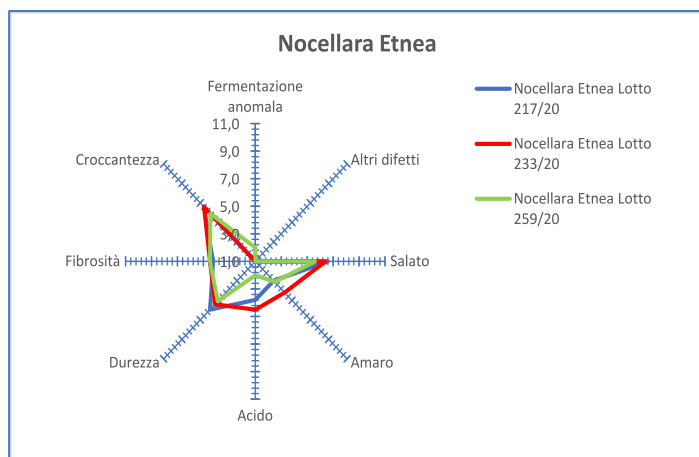
In tutti i campioni valutati nel I campionamento non sono state evidenziate fermentazioni anomale ed altri difetti.

L'analisi sensoriale effettuata sui campioni commerciali nel corso del II campionamento ha interessato le cultivar Bella di Cerignola ottenuta con il metodo Sivigliano, Nocellara Etnea ed Itrana Bianca ottenuta con fermentazione naturale e la Nocellara del Belice ottenuta con il metodo Castelvetro. Della cv. Bella di Cerignola (Fig. 11) sono stati valutati i lotti 049/20, 074/20 ed il lotto 161/20 e l'analisi del profilo sensoriale ha evidenziato che il lotto 161/20 si è differenziato per le caratteristiche cinestetiche, infatti, ha presentato i valori più bassi di durezza, fibrosità e croccantezza, inoltre è stato percepito come il più salato; invece, i profili dei lotti 049/20 e 074/20 sono pressoché simili. Solo nel lotto 161/20 è stato evidenziato dai giudici un lieve sapore riconducibile al vino/aceto.



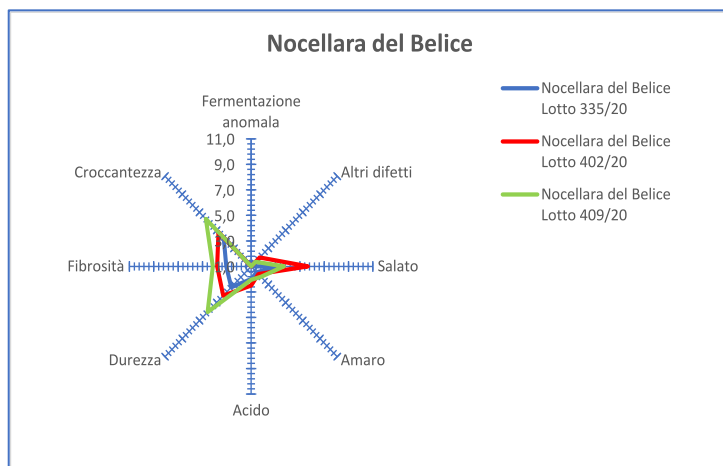
**Figura 11.** Profilo sensoriale della cv. Bella di Cerignola (II campionamento)

Della cv. Nocellara Etnea (Fig. 12) è stato valutato il lotto 233/20, il lotto 217/20 ed il lotto 259/20, e l'analisi sensoriale dei campioni ha evidenziato nel lotto 259 la presenza di una lieve fermentazione anomala (fermentazione putrida), inoltre, ha presentato il livello più basso di croccantezza e più bassa percezione di acido. Il lotto 233/20 ha presentato un maggiore livello di acido e amaro.



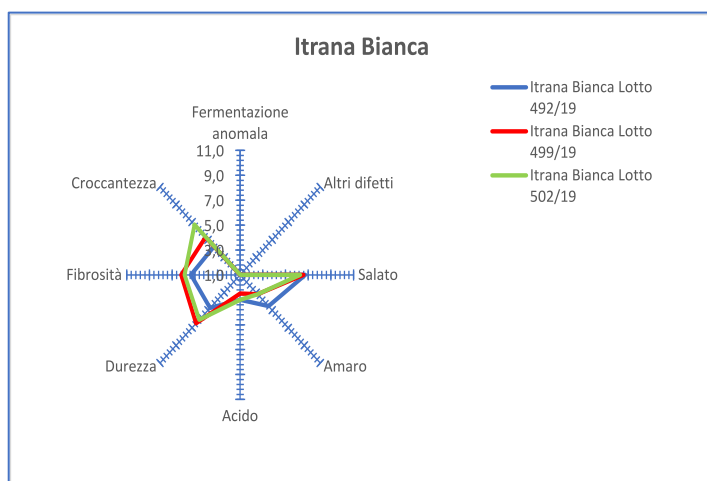
**Figura 12.** Profilo sensoriale della cv. Nocellara Etnea (Il campionamento)

Della cv. Nocellara del Belice (Fig. 13) sono stati valutati 3 lotti, il lotto 335/20, il lotto 402/20 ed il lotto 409/20. Nessuno dei tre lotti ha presentato fermentazioni anomale principali però nei lotti 402/20 e 409/20 è stato evidenziato da parte dei giudici un sapore riconducibile alla sensazione di cotto. I lotti si sono essenzialmente differenziati nei descrittori cinestetici ed il campione 409/20 ha presentato i livelli più elevati di durezza, croccantezza e fibrosità. Il lotto 402/20 è stato percepito come il più salato.



**Figura 13.** Profilo sensoriale della cv. Nocellara del Belice (Il campionamento)

Infine, sono stati valutati il lotto 492/19, il lotto 499/19 ed il lotto 502/19 della cv. Itrana Bianca (Fig. 14). I campioni non hanno presentato fermentazioni anomale o altri difetti riconducibili ad alterazioni durante il processo fermentativo. Il lotto 502/19 si è differenziato per il maggiore livello di amaro ma anche per la minore durezza, fibrosità e croccantezza. Il lotto 502/19 è risultato il campione con maggiore croccantezza.

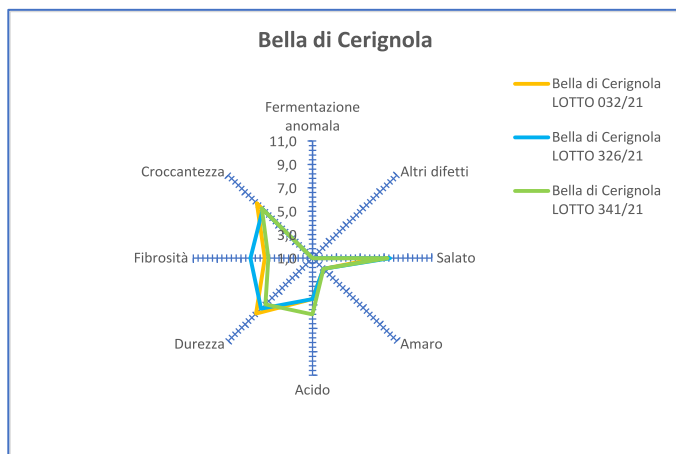


**Figura 14.** Profilo sensoriale della cv. Itrana Bianca (II campionamento)

L'analisi sensoriale per il III campionamento è stata effettuata sulla cv. Bella di Cerignola trasformata con il metodo Sivigliano, Nocellara del Belice ottenuta con il metodo Castelvetro e sulla Hojiblanca nera denocciolata ottenuta con il metodo Californiano. Non è stata valutata la cv. Conservolea nera perché all'apertura dei campioni si è evidenziata una fermentazione anomala riconducibile alla fermentazione putrida. La fermentazione putrida si verifica solitamente nella prima fase della fermentazione ed è causata dall'elevata concentrazione di sostanze fermentescibili e dagli alti valori di Ph che determinano lo sviluppo di batteri del genere *Clostridium*.

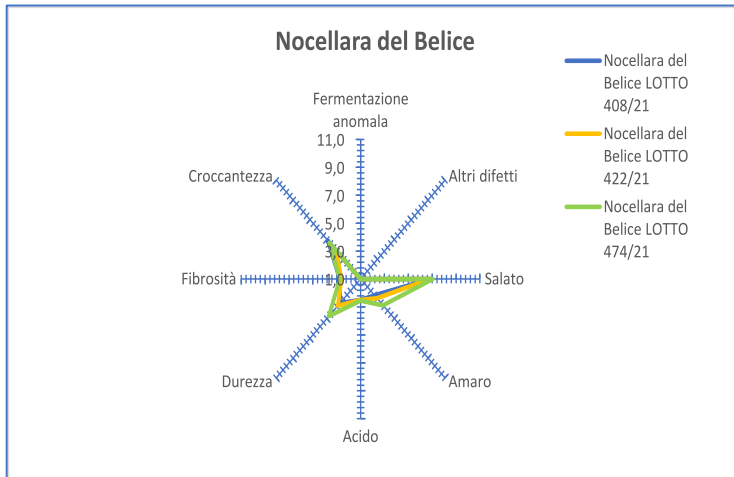
Della cv. Bella di Cerignola (Fig. 15) sono stati valutati i lotti 032/21, 326/21 ed il lotto 341/21 e l'analisi del profilo sensoriale ha evidenziato che il lotto 341/21 si è

differenziato dagli altri campioni perché percepito come più acido, il lotto 032/21 ha presentato una maggiore durezza e croccantezza ed è stato valutato come il meno salato; il lotto 326/21 ha presentato una maggiore fibrosità.



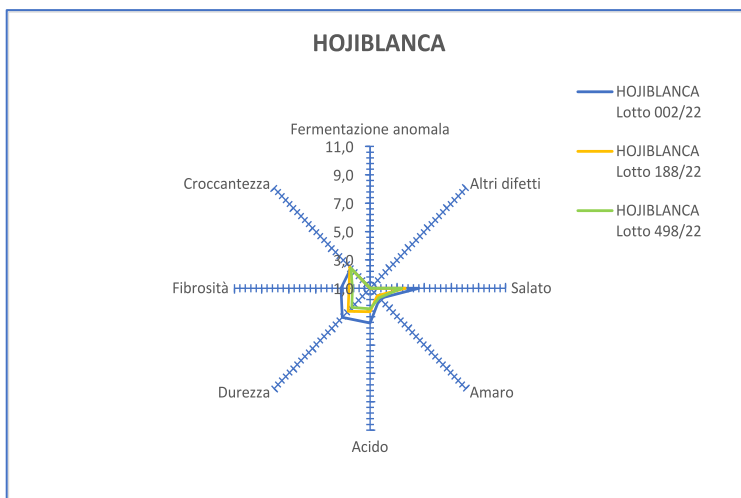
**Figura 15.** Profilo sensoriale della cv. Bella di Cerignola (III campionamento)

Il profilo sensoriale dei lotti della cv. Nocellara del Belice (Fig. 16) non hanno presentato moltissime differenze solo il lotto 474/21 è stato valutato dai giudici come più amaro e più duro ed il lotto 422/21 si è differenziato per una minore croccantezza. Tutti i lotti non hanno presentato fermentazioni anomale o altri difetti.



**Fig. 16.** Profilo sensoriale della cv. Nocellara del Belice (III campionamento)

L'ultimo campione valutato nel terzo campionamento è stato la cv. Hojiblanca nera (Fig. 17), e nello specifico, l'unico lotto che si è differenziato rispetto agli altri due è stato il lotto 002/22 che ha presentato una maggiore acidità, durezza e fibrosità rispetto agli altri lotti ed è stato valutato anche come più salato.

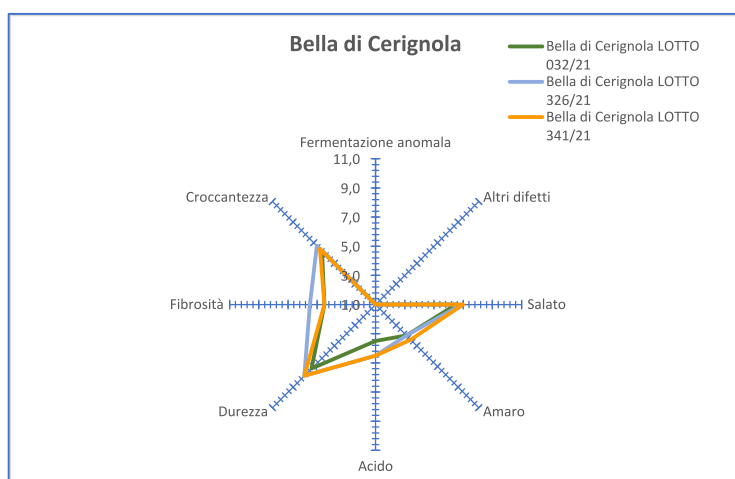


**Figura 17.** Profilo sensoriale della cv. Hojiblanca (III campionamento)

Inoltre, in tutti i campioni valutati nel III campionamento non sono state evidenziate fermentazioni anomale o altri difetti.

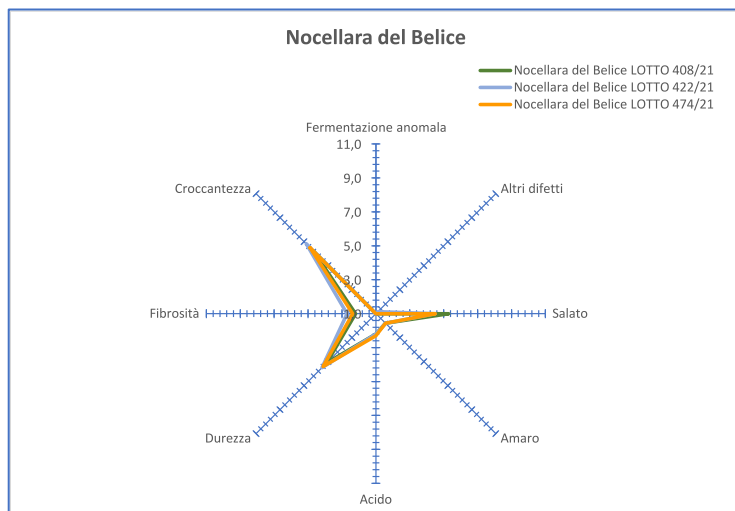
In riferimento al IV campionamento è stata effettuata l'analisi sensoriale su 2 cultivar di olive da mensa, la Bella di Cerignola ottenuta con il metodo Sivigliano e la Nocellara del Belice ottenuta con il metodo Castelvetrano. Non sono stati invece valutati i campioni della cv. Hojiblanca nera denocciolata ottenuta con il metodo Californiano, ed i campioni della cv. Conservolea nera in quanto non ritenuti sicuri dal punto di vista microbiologico, in base ai risultati ottenuti dalle conte microbiche su terreni selettivi.

I lotti della cv. Bella di Cerignola (Fig. 18) non hanno presentato moltissime differenze solo il lotto 326/21 ha presentato una maggiore fibrosità ed il lotto 032/21 ha presentato una minore acidità, per il resto dei descrittori si evidenzia una quasi sovrapposizione dei profili.



**Figura 18.** Profilo sensoriale della cv. Bella di Cerignola (IV campionamento)

Per quanto riguarda la cv. Nocellara del Belice (Fig. 19) si evidenzia una maggiore percezione del salato nel lotto 408/21. Solo il lotto 422/21 ha presentato una lieve percezione del difetto riconducibile al sapore di cotto.



**Figura 19.** Profilo sensoriale della cv. Nocellara del Belice (IV campionamento)

## Conclusioni

Il monitoraggio chimico e microbiologico delle olive da tavola è di fondamentale importanza per garantire la sicurezza e la qualità del prodotto finito destinato al consumo umano. Attraverso il monitoraggio, è possibile individuare eventuali contaminazioni da agenti chimici o batteri patogeni che potrebbero causare gravi problemi di salute ai consumatori. Nel caso in cui i risultati del monitoraggio indichino un aumento del pH o un'alta presenza di microrganismi indesiderati, agenti di *spoilage* o potenziali patogeni, è necessario intervenire tempestivamente per ridurre tali parametri e salvaguardare la qualità del prodotto. Inoltre, il monitoraggio costante dei parametri chimici e microbiologici durante i trattamenti di deamarizzazione permette di individuare i problemi e di correggere le eventuali incongruenze nel processo produttivo, andando a rilevare i punti critici del processo. Infine, il monitoraggio del pH e dei parametri microbiologici durante i trattamenti delle olive da tavola può fornire importanti informazioni per la valutazione e l'ottimizzazione del processo produttivo, con l'obiettivo di migliorare la qualità del prodotto finale e di garantirne la competitività sul mercato globale.

Le caratteristiche sensoriali di un prodotto alimentare sono uno dei fattori più importanti per valutarne la qualità dello stesso. L'analisi sensoriale effettuata sui campioni commerciali di olive da mensa nel corso dei quattro anni ha mostrato una certa variabilità tra i lotti, che quindi non ci ha permesso di considerare gli stessi

come repliche delle cultivar oggetto di studio. L'analisi sensoriale effettuata, inoltre, ha permesso di evidenziare la variabilità che il prodotto può subire durante il processo di lavorazione e che differenti tempi di fermentazione ed i microorganismi presenti nel prodotto finito sono delle variabili fortemente condizionate dai trattamenti di deamarizzazione e dealcalizzazione, dalle condizioni della salamoia (contenuto di sale, pH iniziale e temperatura), ma anche dalla *cultivar* delle olive e dall'ambiente che le circonda. Ecco perché i **processi fermentativi spontanei** delle olive da mensa **non sono completamente prevedibili** e, dal punto di vista produttivo, **questo determina una certa variabilità del prodotto finale e persino potenziali perdite di alcuni lotti a causa di alterazioni indesiderate**.

Per questi motivi, si comincia a fare uso di colture starter cioè colture microbiche selezionate che determinano processi fermentativi conosciuti. L'introduzione di colture *starter* riduce la proliferazione dei microorganismi patogeni e l'eventuale sviluppo di alterazioni indesiderate, riducendo i tempi di produzione e migliorando la qualità igienica e sensoriale del prodotto finale [7].

## Bibliografia

1. Romeo F.V., and Muzzalupo I., 2015. Chapter 3 - Technological aspects. Table olive and olive oil processing. In: Agricultural and food biotechnologies of *Olea europaea* and stone fruit. p.109-160, Bentham Science Publishers LTD, Sharjah, U.A.E., ISBN: 978-1-60805-993-5
2. Heperkan D., 2013. Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Front. Microbiol.*, 4, pp. 1-11.
3. Benincasa C., Muccilli S., Amenta M., Perri E., and Romeo F.V., 2015. Phenolic trend and hygienic quality of green table olives fermented with *Lactobacillus plantarum* starter culture. *Food Chem.*, 186, 271-276.
4. Spyropoulou K.E., Chorianopoulos N.G., Skandamis, P.N. Nychas G.J.E., 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives (*Conservolea* variety) supplemented with different carbon sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 66, pp. 3-11.
5. Caggia C., Randazzo C. L., Salvo M., Romeo F., and Giudici P., 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in green table olives. *J. Food Protec.*, 10, 2189–2194. Doi: 10.4315/0362-028X-67.10.2189
6. Franzetti L., Scarpellini M., Vecchio A., and Planeta D., 2011. Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Ann. Microbiol.* 61, 843–851. Doi: 10.1007/s13213-011-0205-x



7. Romeo F. V., Piscopo A., Mincione A., and Poiana M., 2012. Quality evaluation of different typical table olive preparations (cv Nocellara del Belice). *Grasas y Aceites*, 63, 19–25. Doi: 10.3989/gya.058511
8. International Olive Council (IOC). Method Sensory analysis of table olives. IOC/OT/MO Doc. No 1/Rev 3 June 2021, Madrid.
9. Lanza B., 2013. Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Frontiers in Micro.*, 4(91), 1-7. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00091
10. Tataridou M., Kotzekidou P., 2015. Fermentation of table olives by oleuropeinolytic starter culture in reduced salt brines and inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Micro.*, 208, 122-130. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.001
11. Redding M., Bolten S., Gu G., Luo Y., Micallef S.A., Millner P., and Nou X., 2023. Growth and inactivation of *Listeria monocytogenes* in sterile extracts of fruits and vegetables: Impact of the intrinsic factors pH, sugar and organic acid content. *Int. J. Food Micro.*, 386, 110043.

# Ruolo del rame esogeno nella formazione di clorofilline rameiche che determinano i processi di rinverdimento delle olive prodotte mediante il metodo Castelvetro.

G. Pastore\*, F. Natella, A. Aguzzi, P. Gabrielli, N. Nardo, R. Ambra

Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Economia Agraria - Centro di Ricerca per l'Alimentazione e la Nutrizione - Roma

## Introduzione

Tra le 500 specie della famiglia *delle Oleaceae*, l'olivo (*Olea europaea* L.) è l'unico che produce frutti commestibili. Tuttavia, i frutti appena raccolti non sono commestibili a causa del sapore estremamente amaro conferito dalla presenza di secoiridoidi, principalmente oleuropeina, demetiloleuropeina e ligstroside [1]. I metodi comunemente adottati per deamarizzare le olive sono finalizzati a idrolizzare questi composti amari attraverso reazioni di idrolisi con la formazione di composti non amari quali, tra gli altri, idrossitirosolo, oleoside-11-metil estere, e gli agliconi del ligstroside e dell'oleuropeina [2]. Tuttavia, come conseguenza delle variazioni di pH che si hanno durante il processo di deamarizzazione, le clorofille subiscono una serie di trasformazioni che vanno a modificare negativamente il colore delle drupe, rendendole meno appetibili per il consumatore [3]. In particolare, si ha una parziale degradazione delle clorofille a e b in derivati più idrosolubili [4], per azione delle clorofillasi endogene che innescano reazioni di defitilazione e/o reazioni di ossidazione che possono causare l'allomerizzazione dell'anello isociclico della struttura formando derivati fitil-chlorin e fitil-rhodin [5] che, con la sostituzione del  $Mg^{++}$  con  $2H^+$  nel gruppo cromoforo, virano il colore verso toni tendenti al giallo [3]. Questi aspetti interessano particolarmente le olive deamarizzate con il metodo Castelvetro, olive molto apprezzate dai consumatori per il loro colore verde brillante.

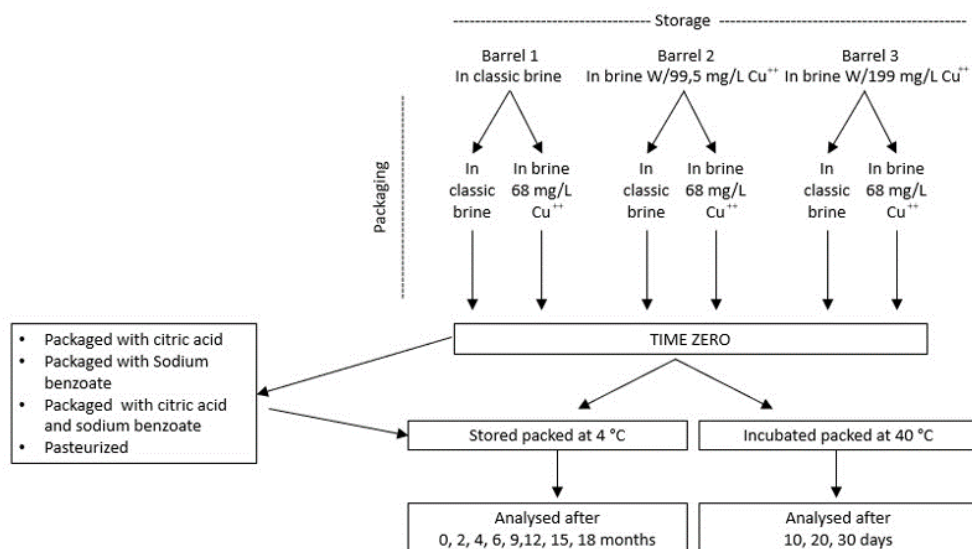
Importante è il fatto che un effetto rinverdente può verificarsi in una certa misura a seguito dell'inserimento di metalli che possono essere naturalmente presenti nelle olive ( $Zn^{++}$  o  $Cu^{++}$ ) all'interno dell'anello porfirinico della clorofilla, reazioni che portano alla formazione di complessi di colore verde che sono oltretutto più stabili dei composti originali e più resistenti agli acidi e al calore [6]. A questo riguardo, Aparicio-Ruiz e colleghi hanno riportato che la concentrazione di  $Cu^{2+}$  endogeno è già sufficiente per complessare i derivati della clorofilla in modo da determinare il rinverdimento delle olive [7], mentre, al contrario, Gandul-Rojas col suo team [8]

ha concluso la sua ricerca sostenendo che il rame endogeno non è sufficiente per ottenere la colorazione delle drupe. In ogni caso, nella pratica, l'abitudine di favorire il processo di rinverdimento incrementando la quantità di rame nelle olive attraverso trattamenti agricoli mediante sali di rame è largamente diffusa tra i produttori con il reale intento di preservare il colore delle drupe [5].

La nostra ricerca ha studiato l'andamento nel tempo della formazione dei derivati della clorofilla in olive deamarizzate col metodo Castelvetro e conservate in fusti con salamoia alcalina tradizionale o arricchita con quantità crescenti di rame e successivamente confezionate in salamoia acida (anche in questo caso arricchita o meno con Sali di rame) seguendone l'evoluzione per 18 mesi. Parallelamente è stato studiato l'effetto sui derivati della clorofilla della presenza di conservanti, e si è messo a punto un protocollo che possa essere predittivo della formazione di composti rameici.

## Disegno sperimentale

Fig 1: Disegno sperimentale



390 kg di olive (cultivar Nocellara) sono state deamarizzate con il metodo Castelvetro (per due settimane) e stoccate in tre fusti di plastica da 220 litri di volume (Figura 1). Alla salamoia (80 L) di due fusti sono stati aggiunti rispettivamente 7,97 e 15,94 g di rame sottoforma di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Dopo 3 mesi, le olive sono state confezionate in buste di plastica contenenti ciascuna 400 g di olive immerse in 250 ml di Salamoia al 4% di NaCl a pH 3,0. In metà delle confezioni la salamoia è stata arricchita di rame (68 mg/L di  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ottenendo così 6 diversi campioni con le sei combinazioni possibili: salamoia [classica]/[basso-rame]/[alto-rame] nei fusti e salamoia [classica]/[con-rame] nelle confezioni. A partire dai sei campioni, sono stati inoltre ottenuti sottocampioni aggiungendo, al momento del confezionamento, (1) 3,9 g di acido citrico monoidrato, (2) 1,7 g di benzoato di sodio e (3) 0,87 g di benzoato di sodio e 2,93 g di acido citrico monoidrato, o (4) pastorizzando le confezioni per 8 minuti in acqua a 80°C.

Infine, al fine di testare la possibilità di prevedere la formazione di clorofilline rameiche, sottocampioni sono stati mantenuti in incubatore a 40 °C per 10, 20 o 30 giorni.

I campioni sono stati analizzati al tempo 0 (al confezionamento) e dopo 2, 4, 6, 9, 12, 15 e 18 mesi. Infine, le capacità di rinverimento rame-indotto delle olive sono state testate anche successivamente, su olive immagazzinate nei fusti e poi confezionate in assenza di Cu, e conservate a 4 °C per 18 mesi, prolungando l'incubazione in salamoia a 4 °C per 10, 20 o 40 giorni, previa aggiunta di rame (13,5 e 27 mg  $\text{Cu}^{++}$  nelle confezioni contenenti 400 g di olive e 250 ml di salamoia).

## Risultati

### *Il rame nelle olive*

Il rame contenuto naturalmente nelle olive in studio è risultato particolarmente basso ( $2,9 \pm 0,2$  mg/kg) (tabella 1). Nei due fusti con le salamoie arricchite rispettivamente con 99,5 e 199 mg/L di rame, ovviamente la concentrazione di rame è risultata aumentata, raggiungendo un valore di  $23,2 \pm 0,4$  e  $49,0 \pm 0,8$  mg/kg. L'aggiunta di rame nella salamoia utilizzata per il confezionamento in buste ha ulteriormente aumentato il contenuto nelle olive, che ha raggiunto il valore più alto ( $80,2 \pm 6,7$  mg/kg) nelle olive immagazzinate nel fusto nel quale erano stati aggiunti 199 mg/L di  $\text{Cu}^{++}$  confezionate con la salamoia a sua volta arricchita con 68 mg/L di  $\text{Cu}^{++}$  (la quantificazione è stata eseguita 4 mesi dopo l'imballaggio, rimanendo costante anche alla successiva verifica dopo 6 mesi).

Table 1: Copper content of the olives (mg/kg) after 4 months storage in barrels and after further 4 months packaging

		After storage in barrels	After 4 month packaging	
			Packaging Brine	
			Classic	Enriched 65 mg Cu/L
Storage Brine	Classic	2.92 ± 0.23	2.17 ± 0.04	39.76 ± 1.29
	Enriched 88.5 mg Cu/L	23.17 ± 0.39	21.85 ± 1.28	61.91 ± 1.64
	Enriched 177 mg Cu/L	48.99 ± 0.80	38.50 ± 0.56	80.19 ± 6.74

### *Derivati della clorofilla nei 3 mesi di conservazione nei fusti*

La tabella 2 riporta i quantitativi di clorofille e loro derivati presenti nelle olive deamarizzate e stoccate per tre mesi nei fusti con salamoia alcalina (pH 10) fino al confezionamento. In tabella sono inoltre riportate le immagini delle olive al termine del periodo dalle quali si evidenzia la differenza del colore, ancora verde nelle olive conservate in salamoia arricchita con rame, e tendente al verde chiaro/giallo in quelle conservate in salamoia "tradizionale". Dopo la conservazione in fusti, la quantità totale dei derivati non rameici presenti nelle olive dei tre fusti non differiva in modo quantitativamente significativo (61,0 vs 64,0 vs 72,1 mg/kg, Tabella 2), mentre, al contrario, importanti differenze tra le olive nei diversi fusti sono state rilevate riguardo la presenza di molecole che hanno mantenuto il magnesio nell'anello porfirinico (clorofilla a e b) dopo lo stoccaggi nei fusti, la cui quantità è risultata raddoppiata nelle olive confezionate in buste con salamoia arricchita con Cu rispetto a quelle conservate nella salamoia classica. Ciò può essere spiegato dalla maggiore feofitinizzazione effettivamente riscontrata nelle olive con la salamoia classica, ma è in parte anche dovuta a una maggiore migrazione delle clorofille dalla polpa delle olive alla salamoia nei fusti contenenti Cu rispetto a quelle prive di Cu, come dimostrato dalla maggiore concentrazione di clorofille a e b nella salamoia del fusto privo di Cu (dati non mostrati). Questo fenomeno è stato presumibilmente favorito da una leggera ma significativa perdita di tessitura riscontrata nelle drupe conservate nella salamoia Cu-free (9,1±2,6 Vs 10,4± 2,0 e 11,9± 3,5 N/cm<sup>2</sup> rispettivamente nel fusto 2 e 3 (p<0,005)).

Table 2:

Chlorophylls and their derivatives at the end of the storage period (mg/kg)



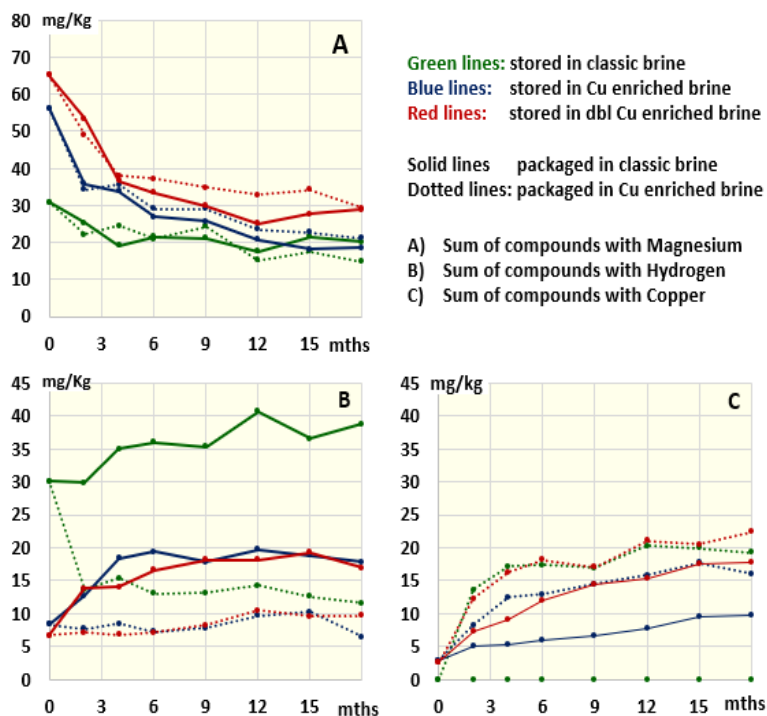
	Stored in classic brine	Stored in 99.5 mg Cu mg/L enriched brine	Stored in 199 mg Cu mg/L enriched brine
Chlorophyll a	14.7	26.4	30.3
Chlorophyll b	16.2	29.2	35.0
15 <sup>2</sup> Me phytyl Rhodin <i>g</i> <sub>7</sub> ester	7.8	nd	nd
15 <sup>2</sup> Me phytyl Chlorin <i>e</i> <sub>6</sub> ester	12.4	2.0	0.8
Pheophytin a	3.9	1.8	1.8
Pheophytin b	0.6	nd	nd
Pyropheophytin a	0.8	0.3	0.2
Pheophorbide a	4.6	4.3	4.0
<b>Total non-Cu molecules</b>	<b>61.0</b>	<b>64.0</b>	<b>72.1</b>
Cu 15 <sup>2</sup> Me phytyl Rhodin <i>g</i> <sub>7</sub> ester	nd	0.2	0.1
Cu Pyro phorbeide a	nd	0.4	0.3
Cu 15 <sup>2</sup> Me phytyl chlorin <i>e</i> <sub>6</sub> ester	nd	1.7	1.8
Cu-pheophytin a	nd	0.5	0.4
Cu pyropheophytin a	nd	0.1	0.1
<b>Total Cu derivatives</b>	<b>nd</b>	<b>2.9</b>	<b>2.7</b>

In generale, tuttavia, coerentemente con il fatto che la feofitizzazione avviene principalmente a pH basso, la formazione di derivati delle clorofille nei fusti (con salamoia a pH 10) è stata piuttosto limitata (Tabella 2), e probabilmente dovuta a reazioni favorite dal calore prodotto durante il trattamento alcalino delle drupe [4], con la formazione di feofitine a e b, 15<sup>2</sup>-Me-phytyl Rhodin *g*<sub>7</sub> ester e 15<sup>2</sup>-Me phytyl Chlorin *e*<sub>6</sub> ester, originati in seguito alla perdita di Mg da Mg-15<sup>2</sup>-Me-phytyl Chlorin *e*<sub>6</sub> ester e Mg-15<sup>2</sup>-Me-phytyl Rhodin *g*<sub>7</sub> ester, molecole a loro volta precedentemente originatesi in reazioni di allomerizzazione dell'anello isociclico rispettivamente delle clorofille a e b, reazioni promosse in ambiente alcalino dall'attività di clorofillasi endogene (12). Dal punto di vista cromatico, come evidenziato dalle immagini riportate in tabella 2, il colore delle olive conservate in salamoie arricchite con rame è risultato significativamente “più verde brillante” rispetto a quelle conservata nel fusto con salamoia “tradizionale”, grazie alla

maggior quantità di clorofille (a e b) e alla formazione di (se pur pochi) derivati rameici.

*Derivati della clorofilla nelle olive durante il confezionamento a 18 mesi*

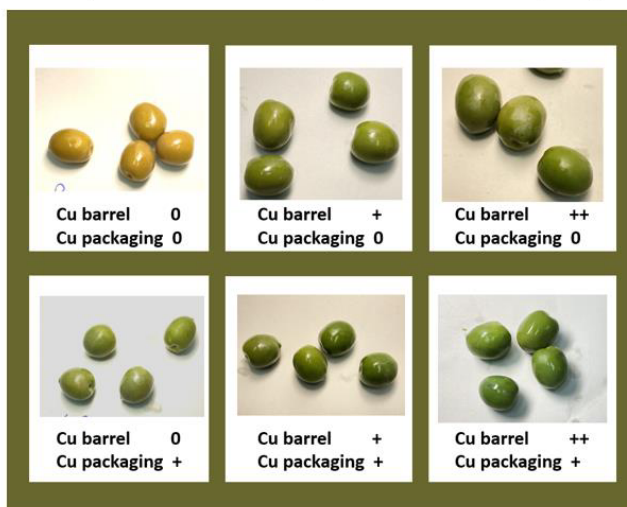
**Figure 2** Time trend of the concentrations of compounds containing Mg, H and Cu as a function of the composition of the storage and packaging brine.



La figura 2 mostra l'andamento dei derivati della clorofilla nelle olive nei 18 mesi di conservazione a 4 °C successivi al confezionamento in salamoia tradizionale o in salamoia arricchita con  $\text{Cu}^{2+}$ . Per una visione globale, i diversi derivati sono stati raggruppati in base alla presenza nell'anello porfirinico di Mg (figura 2A), H (figura 2B) o Cu (figura 2C). I composti contenenti Mg (clorofilla a e b) (Figura 2A) hanno subito una forte diminuzione nei primi 4 mesi di conservazione per poi continuare lentamente a diminuire raggiungendo un plateau intorno al 12° mese. Tale

diminuzione è dovuta alla sostituzione della salamoia (da alcalina ad acida) che ha indotto la sostituzione del  $Mg^{++}$  con  $2H^+$  nell'anello porfirinico, determinando quindi l'aumento delle molecole feofitinizzate (figura 2B) o, nel caso in cui conservate in salamoia contenente rame, dei loro derivati rameici (figura 2C). Come già riportato, le molecole contenenti idrogeno sono risultate essere particolarmente abbondanti nelle olive precedentemente stoccate nei fusti con salamoia tradizionale, e hanno continuato ad aumentare nelle olive confezionate con la salamoia Cu-free (linea verde continua in figura 2.B). Tale aumento è dovuto al protrarsi del processo di feofitinizzazione, favorito dall'ambiente acido della salamoia di confezionamento e spiega l'ulteriore ingiallimento delle olive, osservato dopo 18 mesi di conservazione (Figura 3). Interessante è il comportamento delle olive confezionate nella salamoia arricchita con rame (linea verde tratteggiata in figura 2.B) nelle quali questi composti sono drasticamente diminuiti nei primi due mesi di conservazione, determinando parallelamente un aumento dei derivati contenenti Cu (linea verde tratteggiata in Figura 2C). Parimenti, le olive provenienti dai fusti con salamoia arricchita (linee blu e rosse) hanno evidenziato una diminuzione delle due clorofille (Fig 2.A), bilanciata da un aumento dei composti con idrogeno (linee continue in Fig 2B) nelle confezioni contenenti salamoia classica e da composti con rame (linee tratteggiate in Fig 2C) nelle confezioni contenenti salamoia arricchita con Cu.

Figure 3: Olives colour according to the type of brine (enriched or not with Cu) of the barrels and the packages





Per quanto riguarda i derivati del rame (Figura 2-C), essendo particolarmente basso il contenuto di rame endogeno nelle olive deamarizzate (2-3 mg/kg, tabella 1), nelle olive conservate nei fusti e confezionate con salamoie Cu-free non sono stati rilevati derivati rameici. Al contrario, nelle salamoie acide arricchite di rame l'aumento dei derivati rameici è stato costante per i primi 15 mesi di conservazione, con aumenti nettamente superiori già nei primi due mesi di confezionamento rispetto a quanto osservato nei 3 mesi nei fusti con salamoia arricchita di rame, ma in ambiente alcalino.

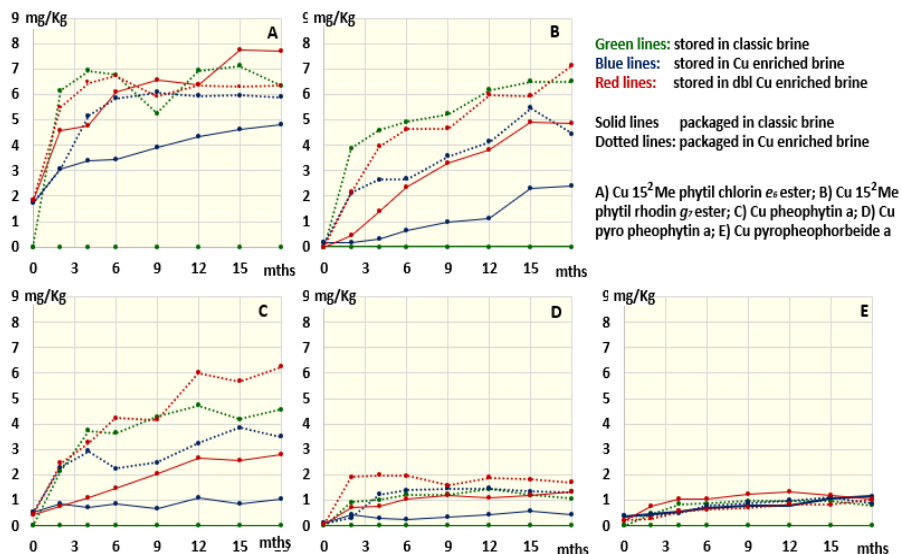
Interessante notare che il passaggio alle confezioni acide è stato associato ad un aumento dei derivati del rame anche nelle olive confezionate con salamoia Cu-free, ma provenienti dai fusti con salamoie alcaline arricchite di rame, segno del fatto che nei fusti avevano assorbito rame nella propria polpa che però, solo dopo il passaggio nell'ambiente acido della salamoia è riuscito a entrare nella struttura delle feofitine, con un aumento tempo-dipendente dei derivati del rame e in maniera proporzionale al contenuto di rame nelle drupe (Tabella 1 e Figura 2.C, linea blu continua vs linea rossa continua).

E' da notare che l'aumento dei derivati rameici riscontrato nelle olive provenienti dal fusto privo di rame e poi confezionate in presenza di rame (linea verde tratteggiata in figura 2C) è equivalente a quello riscontrato nelle olive proveniente dai fusti contenenti salamoia arricchita (linee blu e rosse tratteggiate in figura 2C), in quanto la maggior parte delle molecole provenienti dal fusto Cu-free sono già feofitinizzate e quindi "pronte" per l'inclusione del rame durante il successivo confezionamento.

La figura 4 mostra l'andamento delle singole molecole contenenti rame (Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl Rhodin *g*<sub>7</sub>, Cu-15<sup>2</sup>-Me-chlorin *e*<sub>6</sub> estere, Cu-feofitina, Cu-piro-feofitina e Cu-feoforbide). Come accennato in precedenza, nessuna di queste molecole è presente nei campioni di olive in cui non è stato aggiunto rame (linee verdi continue figura 4 A, B, C, D, E).

Nelle olive conservate in salamoie contenenti rame esogeno (fusti e/o confezioni) (linee blu e rosse, e linea verde tratteggiata), i derivati rameici più abbondanti sono risultati essere il Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl Rhodin *g*<sub>7</sub> e Cu-15<sup>2</sup>-Me-chlorin *e*<sub>6</sub> estere, con minori quantità di Cu-feofitina, Cu-piro-feofitina e Cu-feoforbide.

**Figure 4** Time trend of the concentrations of copper derivatives as a function of the composition of the storage and packaging brine.



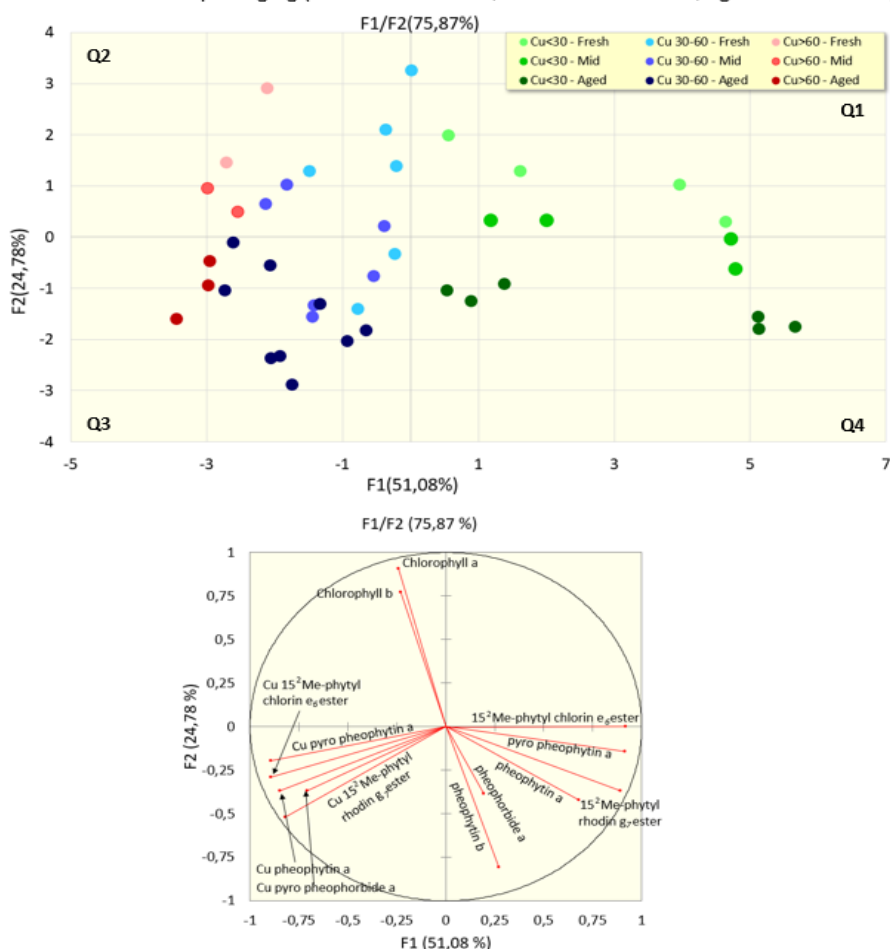
In particolare, per la feofitina rameica e il Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl Rhodin *g*<sub>7</sub>, l'aumento è principalmente legato alla presenza di Cu<sup>++</sup> nelle confezioni (linee tratteggiate) piuttosto che nei fusti (linee continue), a conferma che l'inserzione di rame e il conseguente inverdimento, sono più efficienti nell'ambiente acido delle confezioni piuttosto che in quello alcalino dei fusti. La differenza cromatica tra le olive provenienti dai fusti con la salamoia classica, ma confezionati in salamoia acida con e senza arricchimento con il rame è evidente in figura 3.

Una visione globale dei processi di rinverdimento la si può avere attraverso una analisi dei componenti principali (PCA) eseguita sulle concentrazioni medie dei composti identificati raggruppandoli in base al tempo di conservazione (fresco: 2-4 mesi; medio: 6-9 mesi; stagionato: 12-18 mesi) e la quantità di rame al momento del prelievo (Basso: <=30 mg/kg; medio: 31-60 mg/kg; alto: >60 mg/Kg).

Le prime due componenti (che spiegano il 67,29% della varianza totale) (Fig. 5) e indicano chiare differenze tra i campioni; i campioni possono essere discriminati sull'asse delle X per la presenza di rame, con olive con basso livello di rame (punti verdi) nel quadrante uno e quattro dello score plot (Figura 5A) e campioni con livello medio e alto di rame (rispettivamente punti blu e rossi) nel quadrante due e tre (con aumento dei valori negativi sull'asse delle X all'aumentare della concentrazione di rame (punti rossi)). Sull'asse delle Y, invece, si evidenzia il trend

legato al tempo di conservazione, con i campioni di olive “giovani” (con i punti con i colori più chiari) nel primo e secondo quadrante del plot, e le olive “più vecchie” (colori più scuri) nei quadranti negativi. Il loading plot (Figura 5B) sottolinea che i composti che contribuiscono in modo particolare alla componente 2 sono le clorofille a e b, mentre il tempo determina la perdita di magnesio con produzione di feofitine, 15<sup>2</sup>-Me-phytyl-chlorin e<sub>6</sub> e 15<sup>2</sup> Me-phytyl-rhodin g<sub>7</sub> esteri in assenza di rame (nella parte destra del loading plot) o dei loro derivati rameici in presenza di rame (tutti presenti nel quadrante tre del grafico).

Figure 5: Score and loading plots of a Principal Component Analysis on data grouped on the basis of the content of copper in the drupes (<30; 30-60; >60 mg/Kg) and the time of conservation in the packaging (Fresh: <=4 months; middle: 6-9 months; aged >=12 months)



### Trattamento con additivi

Poiché le modifiche che si verificano nelle molecole di clorofilla durante la conservazione possono essere anche dovute a reazioni ossidative, è stato testato il potenziale effetto sulla formazione di queste molecole di conservanti antiossidanti/chelanti aggiungendo a parte delle confezioni di olive acido citrico e acido benzoico, aggiunti singolarmente o in combinazione. Contrariamente a quanto osservato da Sanchez e colleghi [9], abbiamo notato un leggero effetto inibente dell'acido citrico sulla formazione di cu-derivati, nelle olive provenienti dal fusto con la salamoia classica e confezionate con salamoia arricchita (-12% in media nell'intero periodo, tabella 3), mentre nessun effetto è stato osservato sulle olive confezionate già contenenti Cu-derivati (provenienti dal fusto con salamoia con aggiunta di Cu). Al contrario, la presenza di acido citrico ha determinato un ulteriore aumento della perdita di molecole contenenti magnesio in tutti i campioni (-56%), e, in particolare, in quelli provenienti da salamoie arricchite con Cu sia in fusto che confezionate (-72%), determinando un forte aumento delle feofitine (+123% nell'intero periodo rispetto a campioni confezionati senza conservanti). Diversamente dall'acido citrico, l'incubazione con acido benzoico (tabella 3) è stata associata ad un leggero aumento (rispetto alle olive non trattate) sia dei composti che hanno mantenuto il magnesio nella loro molecola, che per quelli che lo hanno sostituito col rame, a discapito ovviamente delle feofitine con l'idrogeno al centro dell'anello porfirinico. La combinazione di acido citrico e acido benzoico ha determinato una perdita di composti del Mg simile a quella osservata con acido citrico, ma risultando nella formazione di una maggiore quantità di molecole contenenti rame, con valori simili a quelli ottenuti con il solo acido benzoico (Tab 3).

Table 3: % impact of the presence of preservatives on the presence Mg, H and Cu compounds after 18 months packaging

Barrel brine	Packaging brine	Citric Acid		Benzoic acid		Benzoic + citric acid	
		Mg comp.	Cu comp.	Mg comp.	Cu comp.	Mg comp.	Cu comp.
Cu-free	Cu-Added	-56%	-12%	14%	12%	-57%	6%
Cu-Added	Cu-Added	-72%	2%	5%	13%	-57%	18%
all samples		-57%	-9%	1%	3%	-56%	8%

Una seconda PCA è stata elaborata per valutare il comportamento dei due conservanti. Dato che l'analisi è finalizzata a verificare se tali trattamenti influissero sulla formazione di Cu-derivati nel tempo, essa è stata effettuata considerando solo i campioni confezionati da più di 6 mesi (Figura 6).

Figure 6: Score and loading plots of a Principal Component Analysis on data grouped on the basis of the content of copper in the drupes (<30; 30-60; >60 mg/Kg) and the presence of preservatives in the packaging

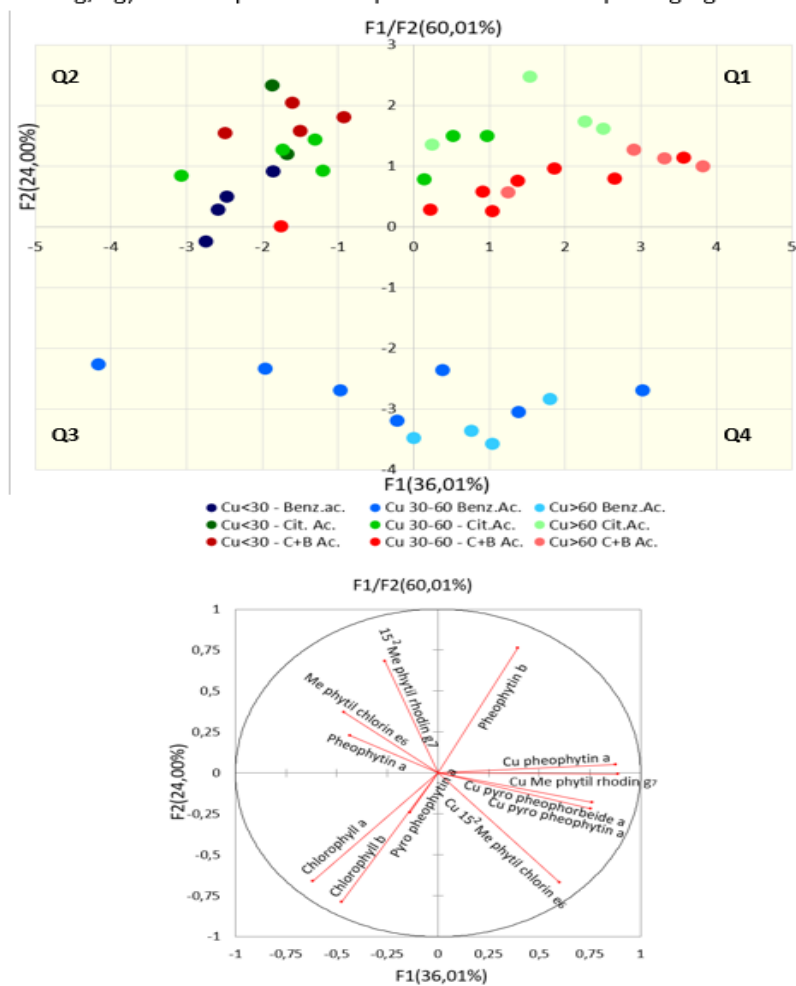
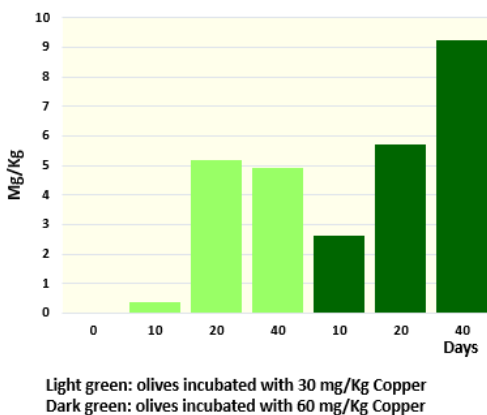


Figure 7: increase in copper compounds in the olives after 10 20 and 40 days following the addition of 30 or 60 mg/Kg of copper in the packaging.



Il primo dato evidenziato dallo score plot (Figura 6A) è che la presenza di acido benzoico e/o citrico non sembra avere influenza sulle olive con basse quantità di rame (punti di colore più scuro), che si comportano, dopo 6 mesi, in modo pressoché simile, con tutti i punti concentrati nel quadrante 2 del plot. Al contrario, tra le olive contenenti quantità medie ed elevate di rame, quelle le cui salamoie erano arricchite con acido benzoico (punti blu in figura) si sono chiaramente

differenziate rispetto a quelle che sono state confezionate in salamoia arricchita con acido citrico (etichette verdi) sull'asse delle Y, componente alla quale contribuiscono principalmente le clorofille, come indicato dal loading plot riportato in figura 6B.

I punti relativi al trattamento combinato con acido benzoico e citrico (etichette rosse nello score plot) si pongono in una area intermedia, rispecchiando tuttavia molto chiaramente un comportamento simile a quello determinato dall'acido citrico, con tutti i punti localizzati nella parte positiva della seconda componente.

Il loading plot (Figura 6B) indica che le clorofille contribuiscono principalmente nella seconda componente mentre i componenti feofitinizzati (nei quadranti 1 e 4) e Cu-derivati (nei quadranti 1 e 3).

### Regreening

Oltre alla capacità del rame di prevenire la perdita del colore verde durante un trattamento preventivo, è stata testata la capacità del rame di indurre un efficace rinverdimento delle drupe "anziane" già ingiallite inserendo nelle confezioni ormai conservate da 18 mesi a 4 °C 30 e 60 mg di rame per Kg, e conservandole per ulteriori 10, 20 e 40 giorni.

In figura 7 sono riportati gli incrementi di derivati rameici (Cu-15<sup>2</sup>- Me-phytyl-rhodin-g<sub>7</sub> ester, Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl-chlorin-e<sub>6</sub> ester e Cu-feofitina) che raggiungono un plateau intorno ai 5 mg/Kg dopo 20 giorni con l'aggiunta di 30 mg/Kg di rame mentre arrivano a oltre i 9 mg/Kg dopo 40 giorni quando l'aggiunta di rame è

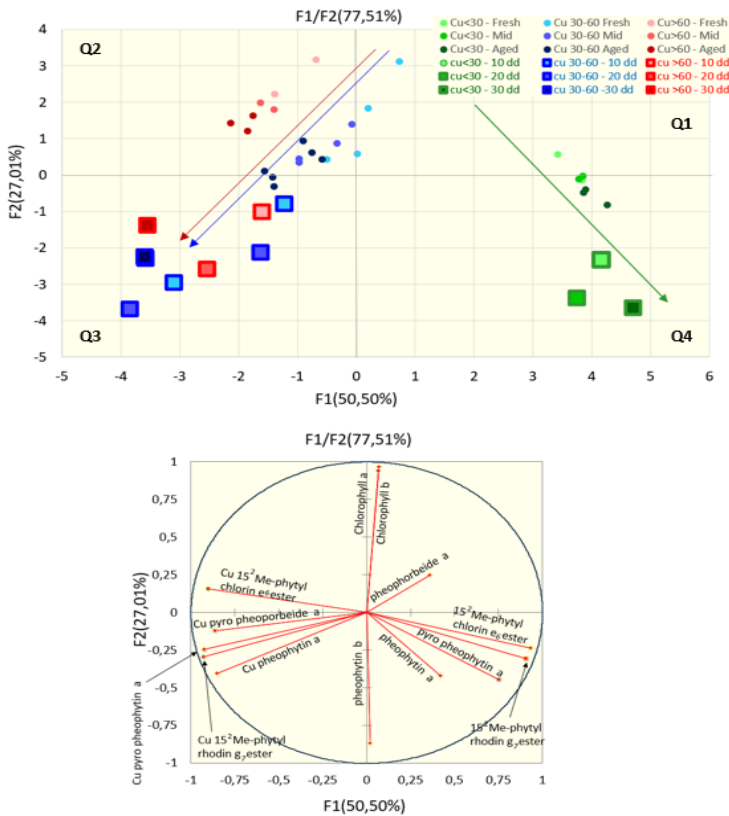
doppia.

*Diagnosi precoce della formazione delle clorofilline*

Infine, al fine di verificare la possibilità di prevedere la formazione di clorofilline di rame, le olive appena dopo il confezionamento sono state mantenute in un incubatore a 45 °C per 10, 20 o 30 giorni.

Già dopo 10 giorni di riscaldamento i derivati del rame si sono formati in quantità pari al 100 al 120% di quelli riscontrati nelle olive dopo 18 mesi di conservazione a 4 °C per quanto riguarda quelle conservate e confezionate in salamoia arricchita di Cu, e in quantità superiori al 160% per quelle conservate nei fusti con salamoia tradizionale e confezionate in salamoia arricchita di Cu.

Figure 8: Score and loading plots of a Principal Component Analysis on data grouped on the basis of the content of copper in the drupes and the time of conservation in the packaging as compared to samples incubated at 45 °C for 10, 20 and 30 days



La reale capacità predittiva della formazione di derivati rameici delle clorofille della incubazione a 45 gradi per brevi periodi è confermata ancora una volta dalla PCA. In Figura 8 A è riportato lo score plot nel quale i punti piccoli rappresentano i risultati delle analisi condotte nei 18 mesi sui campioni provenienti dai fusti e poi confezionati senza o con l'arricchimento di rame, mentre i quadrati rappresentano i campioni posti in stufa per 10, 20 e 30 giorni appena dopo il confezionamento. Risulta chiaramente evidente il diverso comportamento delle olive povere di rame (punti e quadrati verdi) da quelle a medio (punti e quadrati blu) e alto (punti e quadrati rossi) contenuto di rame. Tenendo in considerazione che i punti che rappresentano i campioni conservati a 4 °C sono riportati con la colorazione chiara per i campioni "freschi" e scura per i campioni conservati oltre 12 mesi, risulta evidente il trend (indicato dalle frecce) che indica come i campioni a basso contenuto di rame tendano a passare con il passare del tempo dal quadrante 1 al quadrante 4 (freccia verde) esattamente nella direzione dove sono presenti i campioni tenuti in stufa (quadrati verdi), analogamente i campioni con medio e alto contenuto di rame col passare del tempo tendono a passare dal quadrante 2 al quadrante 3 seguendo la direzione nella quale si trovano i campioni tenuti in stufa (quadrati rossi e blu).

## Conclusioni

In conclusione, il rame endogeno, molto basso nelle olive da noi studiate, non è sufficiente per produrre derivati rameici in quantità rilevabili e, di conseguenza, alcun rinverdimento naturale. Come atteso, derivati rameici si sono formati nelle olive immagazzinate e/o confezionate in salamoia arricchita con rame con un aumento dei Cu-derivati più rapido e/o maggiore quando il rame è stato aggiunto nella salamoia delle confezioni, dove l'ambiente acido ha favorito il processo di feofitinizzazione necessario per l'inserimento del rame. Nello specifico, sono stati rilevati Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl-chlorin e<sub>6</sub> ester, Cu-15<sup>2</sup>-Me-phytyl-rhodin g<sub>7</sub> ester, Cu-pheophytin a, Cu-pyropheophytin a, Cu-pyropheophorbide che hanno determinato una evidente conservazione del verde delle olive rispetto a quelle conservate e/o confezionate in salamoia classica non arricchita. Come indicato da una PCA, durante il processo di invecchiamento delle olive è stato evidenziato un chiaro andamento nel comportamento dei campioni in funzione del tempo e della presenza di rame nelle salamoie. Una seconda evidenza riscontrata riguarda il fatto che l'aggiunta di rame non solo è in grado di "mantenere" il colore verde brillante delle olive di Castelvetro durante il medio-lungo periodo di conservazione, ma è efficace anche su quelle già ingiallite, conservate a 4°C per 18 mesi. Infine, mediante PCA abbiamo dimostrato che l'incubazione delle olive in stufa a 45 °C è uno strumento rapido e altamente predittivo della formazione dei derivati della



clorofilla durante la conservazione.

## Bibliografia

1. Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G., and Morozzi G., 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J Chromatogr A* 2004, *1054*, 113–127.
2. Ambra R., Natella F., Bello C., Lucchetti S., Forte V., and Pastore G., 2017. Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods. *Food Res. Int.* 2017, *100*, doi:10.1016/j.foodres.2017.07.027.
3. Gandul-Rojas B., Roca M., and Gallardo-Guerrero L., 2012. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant). *LWT - Food Sci. Technol.* 2012, *46*, 311–318, doi:10.1016/j.lwt.2011.09.012.
4. Berlanga-Del Pozo M, Gallardo-Guerrero L., and Gandul-Rojas B, 2020. Influence of alkaline treatment on structural modifications of chlorophyll pigments in NaOH-treated table olives preserved without fermentation. *Foods* 2020, *9*, 1–17, doi:10.3390/foods9060701.
5. Gandul-Rojas B., and Gallardo-Guerrero L., 2018. Pigment changes during preservation of green table olive specialities treated with alkali and without fermentation: Effect of thermal treatments and storage conditions. *Food Res. Int.* 2018, *108*, 57–67, doi:10.1016/j.foodres.2018.03.022.
6. Humphrey A.M., 1980. Chlorophyll. *Food Chem.* 1980, *5*, 57–67, doi:10.1016/0308-8146(80)90064-3.
7. Aparicio-Ruiz R., Riedl K.M., and Schwartz S.J., 2011. Identification and quantification of metallo-chlorophyll complexes in bright green table olives by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry quadrupole/time-of-flight. *J. Agric. Food Chem.* 2011, *59*, 11100–11108, doi:10.1021/jf201643s.
8. Gandul-Rojas B., Roca M., and Gallardo-Guerrero L., 2016. Chlorophylls and carotenoids in food product from olive tree. In *Products from Olive tree*, Boskou, D., Ed., InTech, 2016, pp. 68–97.
9. Sánchez A.H., Romero C., de Castro A., Rejano L., and Brenes M., 2016. Assays to control the development of the green staining alteration in Spanish-style green olives of the Gordal variety. *J. Sci. Food Agric.* 2016, *96*, 4032–4036, doi:10.1002/jsfa.7598.

# Valutazione di colture starter di ceppi selezionati di batteri lattici (LAB) e lieviti killer in fermentazioni su scala di laboratorio di olive da tavola (*Olea europaea* L.) cv. *Leccino*

G. F. Bencresciuto\*, C. Mandalà, C. A. Migliori e L. Bardi

CREA Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni Agroalimentari, 10135 Torino, Italia

## Introduzione

Le olive sono ricche in composti fenolici, che contribuiscono in modo significativo al gusto e alla consistenza e conferiscono al frutto proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e antibatteriche [1]; il più abbondante fra questi, l'oleuropeina, è responsabile del sapore tipicamente amaro del frutto post-raccolta. La deamarizzazione delle olive, necessaria per ottenere olive da tavola, può essere raggiunta mediante processi fermentativi, sfruttando l'azione di microrganismi autoctoni presenti nelle olive e nella pianta in grado di idrolizzare l'oleuropeina. Durante la maturazione e la fermentazione delle olive, oleuropeina e ligstroside, altro importante composto fenolico, vengono idrolizzati grazie all'azione di  $\beta$ -glucosidasi ed esterasi, per rilasciare acido elenoico, idrossitirosolo (3,4 DHPEA) e tirosolo (p-HPEA), composti con proprietà anticancro, cardioprotettive e antimicrobiche [2]. La fermentazione naturale prevede l'immersione delle olive, per 8-10 mesi, in una soluzione al 6-10% di NaCl. Le popolazioni microbiche di batteri lattici (LAB) e lieviti hanno un ruolo fondamentale nelle fermentazioni naturali grazie alla loro abilità di crescere in elevate concentrazioni di NaCl e di conferire proprietà sensoriali positive e stabilità al prodotto finale, oltre che di promuovere la deamarizzazione; trasformando gli zuccheri in metaboliti secondari (acido lattico, acido acetico e altri composti minori), portano all'acidificazione progressiva della salamoia, che garantisce una maggiore conservabilità del prodotto finale prevenendo la crescita di microorganismi che causano fenomeni di spoilage (deterioramento dei frutti), e conferiscono un buon sapore al frutto. I lieviti, oltre a contribuire alla deamarizzazione, possono promuovere la crescita dei LAB e inibire

la crescita di lieviti e muffe indesiderati se dotati della capacità di produzione di tossine killer, ma possano anche essere causa di spoilage (per es. “gas-pockets” e “softening”) [3]. In molti processi industriali è diffuso l’utilizzo di colture starter di ceppi selezionati, allo scopo di avviare il processo di trasformazione e di assicurarne l’esito tecnologico. La produzione industriale di olive nere e verdi viene effettuata principalmente mediante fermentazione spontanea, senza aggiunta di colture starter, e pertanto la qualità del prodotto non è prevedibile nè controllabile e risulta influenzata dalla microflora autoctona, dalle condizioni fisico-chimiche, dalle varietà di olive, dai substrati fermentescibili e dal contenuto di sale [4]. La presenza di ceppi microbici e di metaboliti indesiderati può portare ad una fermentazione anomala e ad un prodotto finale non conforme. Data l’importanza economica delle olive da tavola, il controllo della fermentazione con ceppi selezionati di LAB e lieviti permetterebbe di ottenere un prodotto finale migliore, di inibire il deterioramento causato da microrganismi indesiderati o patogeni, e di ridurre i tempi di deamarizzazione. Alcuni ceppi microbici sono stati isolati e testati come starter per la fermentazione delle olive: tra le specie di LAB, ceppi di *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*, mentre tra i lieviti i più utilizzati sono ceppi di *Wickerhamomyces anomalus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida boidinii* [5]. Negli ultimi anni, gli studi si sono concentrati sull’impiego di lieviti killer per sfruttare la loro attività antagonista contro altri microrganismi dannosi grazie alla produzione di tossine killer.

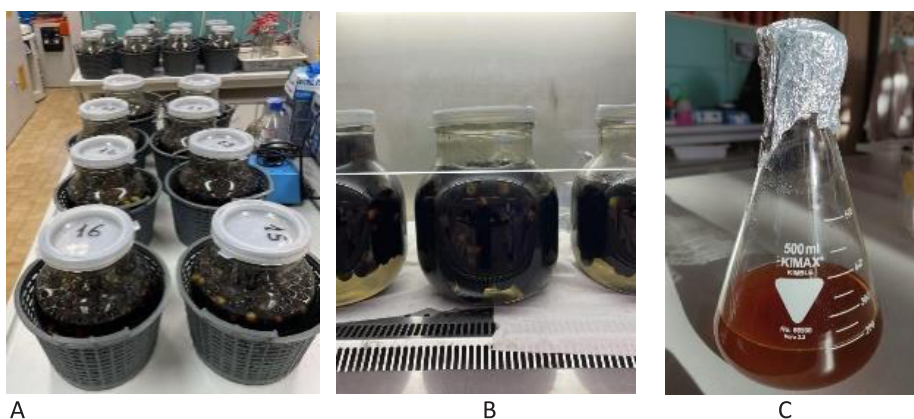
Nel presente lavoro sono stati impiegati due ceppi di lievito selezionati: *Wickerhamomyces anomalus* Wa1 e *Saccharomyces cerevisiae* Sc24, della Collezione dell’Università degli studi di Sassari, precedentemente caratterizzati per la loro attività killer e la capacità di deamarizzazione, per valutare le loro potenzialità nell’ottenere un buon prodotto finale evitando pretrattamenti di olive, sale eccessivo nelle salamoie e ulteriori additivi e conservanti. A tal fine, olive cv. *Leccino* sono state fermentate in salamoia con inoculi di ceppi di lievito, da soli o associati, in consociazione o in successione, al ceppo di *Lactobacillus plantarum* B51 della Collezione del CREA IT di Pescara, comparate con fermentazioni spontanee.

## Materiali e metodi

### *Allestimento delle fermentazioni e colture starter*

Sono state allestite prove di fermentazione utilizzando damigiane da 5 L (Fig. 1) in cui sono state poste 2.5 kg di olive cv. *Leccino* (azienda Ficacci, Castelmadama, RM) in 2 L di salamoia sterilizzata (8% NaCl (w/v)).

Due ceppi selezionati di lieviti killer oleuropeinolitici (Collezione dell'Università di Sassari), *W. anomalus* (Wa1) e *S. cerevisiae* (Sc24), e un ceppo selezionato di *L. plantarum* (B51) (collezione CREA-IT, Pescara) sono stati utilizzati come colture starter. Sono state allestite precolture (Fig. 1) di *L. plantarum* in MRS (24h a 30°C) e di *S. cerevisiae* e *W. anomalus* in YEPD (28°C per 48h), successivamente adattate negli stessi terreni di coltura a concentrazioni crescenti di NaCl (3% e 6%). Le cellule di lieviti e batteri sono state raccolte per centrifugazione (3500 rpm a 15 C per 15 minuti), poi inoculate in salamoia sterile (8% NaCl) per ottenere una popolazione iniziale di  $10^6$  CFU/mL in ogni giara.



**Figura 1.** Damigiane utilizzate per prove di fermentazione (A, B) ed esempio di precoltura dei ceppi selezionati (C).

Sono state confrontate sette diverse tesi: (i) fermentazione spontanea (SP) (ii) fermentazione inoculata con *L. plantarum* B51 (LP), (iii) fermentazione inoculata con *W. anomalus* (WA), (iv) fermentazione inoculata con *L. plantarum* e *S. cerevisiae* in consociazione (MIX1), (v) fermentazione con inoculo in successione di *L. plantarum* seguito dopo un mese da *S. cerevisiae* (LY1), (vi) fermentazione con inoculo di *L. plantarum* e *W. anomalus* in consociazione (MIX2), (vii) fermentazione

con inoculo in successione di *L. plantarum* seguito un mese dopo da *W. anomalus* (LY2). Tutte le tesi sono state eseguite in triplicato (tre giare per tesi) e le fermentazioni condotte a temperatura ambiente (tra 19°C e 25°C) per 188 giorni.

Dal giorno della messa in salamoia (T0) a cadenza prestabilita (dopo 16, 23, 40, 63, 70, 77, 84, 105, 140, 188 giorni) sono stati effettuati campionamenti di salamoia (10 mL) utilizzati sia per determinare la concentrazione delle popolazioni microbiche, sia per l'analisi dell'andamento del pH e del profilo di sostanze fenoliche, zuccheri, polialcoli ed acidi organici. Le determinazioni chimico-fisiche sono state effettuate anche su campioni di olive prelevati nel corso dell'intera prova.

#### *Analisi microbiologiche*

Le principali popolazioni microbiche delle salamoie sono state analizzate dal T0 a fine fermentazione utilizzando i seguenti protocolli:

- LAB, semina su MRS agar, incubazione a 28 °C per 5 giorni.
- Lieviti e muffe, semina su 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count plates, incubazione a 28°C per 5 giorni.
- Enterobatteri, semina su 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plates, incubazione a 37°C per 24h.
- Aerobi totali mesofili, semina su 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plates, incubazione a 37°C per 48h.

Dalle piastre 3M™ Petrifilm™ Yeast and Mold Count plates sono stati effettuati isolamenti di colonie fungine, trasferite su PDA per la caratterizzazione morfologica.

#### *Profilo fenolico di salamoia e olive*

Salamoie e olive sono state caratterizzate per la concentrazione dei tre principali composti fenolici: oleuropeina, tirosolo e idrossitirosolo. Le salamoie sono state filtrate (filtri 0,45 µm, Nylon) e diluite due volte con una miscela metanolo/acqua acidificata (80/20 v:v). Inoltre, ad ogni punto di campionamento sono state prelevate 20 olive da ogni damigiana che sono state denocciate e utilizzate per l'estrazione delle sostanze fenoliche seguendo il metodo di Ambra et al. [1]. Estratti di olive e campioni di salamoia sono stati analizzati con tecnica HPLC seguendo il metodo descritto in Bleve et al. [6], utilizzando un HPLC Jasco BS-997, con colonna Supelco RPC18 (250 mm 4,6 mm, 5 µm). Tutte le analisi sono state eseguite in

triplicato. I composti fenolici sono stati quantificati utilizzando curve di calibrazione di standard fenolici.

#### *Zuccheri e alcoli*

Glucosio, fruttosio, mannitolo, sorbitolo, etanolo e glicerolo in salamoia filtrata ed estratti di olive ottenuti secondo il metodo di Fibiani et al [7] sono stati analizzati mediante analisi cromatografica con HPLC (Jasco PU-980, Jasco, Tokyo, Giappone) dotato di un rivelatore ad indice di rifrazione (Jasco RI530), combinato con un Sistema di acquisizione dati Chromnav versione 3.32, utilizzando una colonna per carboidrati Aminex HPX-87C column (300 × 7.8 mm, 9 µm, Bio-Rad, Hercules, USA) mantenuta a 80 °C. È stata usata acqua ultrapura come fase mobile, con un flusso di 0,7 mL/min.

#### *Acidi organici*

L'analisi degli acidi organici è stata effettuata su campioni di salamoia filtrati (0,45 µm, nylon). È stata utilizzato un sistema HPLC Agilent serie 1200 accoppiato a un rivelatore UV/Vis con rilevamento a 214 nm. La colonna utilizzata era una colonna Repromer H+ 300 × 8 mm, 9 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Germany), mantenuta a 63°C. La fase mobile era H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM, con un flusso di 0,5 mL/min.

#### *Analisi statistica*

Sui dati ottenuti è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) ed il test LSD post-hoc ( $p$  value  $\leq 0.05$ ), confrontando le differenze tra tesi ad ogni campionamento (Software ORIGIN (OriginPro, Versione 2022)).

## **Risultati e discussione**

#### *Analisi microbiologica e pH*

L'andamento di crescita dei lieviti ha mostrato una grande variabilità, probabilmente dovuta ad alte e non costanti temperature di fermentazione (Tab.1). In particolare al giorno 40 dalla messa in salamoia si è registrata una minore crescita di lieviti totali nelle tesi in cui sono stati inoculati ceppi di lievito killer selezionati, con differenze statisticamente significative solo per LY1, dove *S. cerevisiae* è stato aggiunto solo 10 giorni prima dell'analisi, e, in misura minore, anche in MIX1, dove *S. cerevisiae* è stato aggiunto simultaneamente con *L. plantarum* 40 giorni prima; ciò potrebbe essere attribuito ad un'inibizione della crescita dei lieviti autoctoni indotta dai ceppi killer inoculati che, a causa della

minore adattabilità alle salamoie rispetto ai lieviti autoctoni, hanno una più lunga *lag-phase*. Nelle tesi inoculate con *W. anomalus* (WA, MIX2 e LY2) la crescita dei lieviti era leggermente maggiore rispetto alle tesi inoculate con *S. cerevisiae*; ciò ha portato ad ipotizzare una migliore capacità di adattamento di *W. anomalus* alle salamoie, o la sua minore attività killer rispetto a *S. cerevisiae*. Al giorno 70, la più alta concentrazione di lieviti si è registrata nelle tesi LY (1 e 2) ed SP, e al giorno 77 nelle tesi LP, WA, MIX1, MIX2 e LY2. L'andamento dei lieviti ha mostrato dopo il giorno 77 una graduale diminuzione, più rapida per la tesi SP. Le più alte concentrazioni di cellule di lievito determinate sono state quelle delle tesi MIX1 e LY2 al giorno 77. In generale, i risultati hanno mostrato una crescita maggiore per *W. anomalus* quando aggiunto in sequenza a *L. plantarum*, e per *S. cerevisiae* quando aggiunto in consociazione con *L. plantarum*, seppure non siano state rilevate differenze significative. Ciò potrebbe indicare una migliore sinergia tra *S. cerevisiae* e LAB.

**Tabella 1.** Lattobacilli, lieviti, batteri aerobici totali ed enterobatteri nelle salamoie delle diverse tesi. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento. ND: non determinato.

Giorno	40	63	70	77	84	105	140	188
Tesi	Lattobacilli (CFU/mL)							
SP	6.43x10 <sup>7</sup> <sub>abc</sub>	4.57x10 <sup>7</sup> <sub>abc</sub>	2.03x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.73x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	4.10x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.90x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.60x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.33x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
LP	7.57x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	7.00x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.30x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.63x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	2.13x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.57x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.10x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
WA	3.90x10 <sup>7</sup> <sub>bc</sub>	8.67x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.47x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.10x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	2.17x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	2.00x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.53x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.67x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
MIX1	4.63x10 <sup>7</sup> <sub>bc</sub>	2.53x10 <sup>7</sup> <sub>c</sub>	1.63x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	9.67x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	1.73x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.77x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.50x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	4.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
LY1	3.60x10 <sup>7</sup> <sub>c</sub>	2.50x10 <sup>7</sup> <sub>c</sub>	1.57x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.90x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.53x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.33x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.40x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	8.33x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
MIX2	9.40x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.53x10 <sup>7</sup> <sub>c</sub>	1.60x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.80x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.43x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.17x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.47x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	9.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
LY2	5.33x10 <sup>7</sup> <sub>bc</sub>	2.85x10 <sup>7</sup> <sub>bc</sub>	2.40x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.15x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	3.15x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.20x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.65x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	6.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>
	Lieviti (CFU/mL)							
SP	7.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	9.00x10 <sup>5</sup> <sub>b</sub>	4.57x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	4.47x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.57x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	1.10x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.00x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	1.00x10 <sup>5</sup> <sub>ab</sub>
LP	5.00x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.00x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.20x10 <sup>6</sup> <sub>c</sub>	5.57x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.43x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.77x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	6.33x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	0.00 <sub>b</sub>
WA	4.67x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	3.47x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	2.60x10 <sup>6</sup> <sub>abc</sub>	4.80x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.23x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.40x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.00x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	0.00 <sub>b</sub>
MIX1	2.00x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.33x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	3.67x10 <sup>6</sup> <sub>abc</sub>	6.13x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	5.27x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.47x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.37x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.00x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
LY1	1.00x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	1.40x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	4.80x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	4.60x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.87x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.57x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.33x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	0.00 <sub>b</sub>
MIX2	3.00x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	4.17x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.43x10 <sup>6</sup> <sub>bc</sub>	3.57x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.07x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	8.33x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	4.67x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	0.00 <sub>b</sub>
LY2	3.33x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	3.83x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	5.70x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	6.13x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.60x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	1.87x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	5.00x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	3.33x10 <sup>4</sup> <sub>ab</sub>
	Mesofili (CFU/mL)							
SP	4.63x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.73x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.70x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.37x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.00x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.73x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.63x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.70x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>
LP	4.57x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.53x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.13x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	3.70x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.80x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	2.60x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.77x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.17x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>
WA	4.33x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	3.20x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.60x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	2.17x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.87x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.03x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.10x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	5.67x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>
MIX1	2.87x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	8.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.07x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.20x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	1.27x10 <sup>7</sup> <sub>abc</sub>	1.93x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.53x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.00x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>
LY1	2.43x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	6.00x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	6.33x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	1.03x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	7.67x10 <sup>6</sup> <sub>c</sub>	2.43x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.47x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.53x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>
MIX2	7.67x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	3.80x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	9.67x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	9.67x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	6.67x10 <sup>6</sup> <sub>c</sub>	1.03x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.87x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.60x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>
LY2	3.93x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	4.27x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	1.10x10 <sup>7</sup> <sub>ab</sub>	1.00x10 <sup>7</sup> <sub>b</sub>	8.00x10 <sup>6</sup> <sub>bc</sub>	1.30x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	2.30x10 <sup>7</sup> <sub>a</sub>	9.00x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>
	Enterobatteri (CFU/mL)							
SP	ND	ND	ND	1.20x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.63x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	2.70x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.37x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	5.90x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
LP	ND	ND	ND	2.70x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.90x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	2.47x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.27x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.47x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
WA	ND	ND	ND	2.30x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.23x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.20x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.17x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.83x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
MIX1	ND	ND	ND	1.53x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.63x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	4.30x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.37x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.37x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
LY1	ND	ND	ND	1.10x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	1.10x10 <sup>6</sup> <sub>ab</sub>	3.45x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.33x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.17x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
MIX2	ND	ND	ND	8.67x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>	1.77x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	2.27x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.37x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.95x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>
LY2	ND	ND	ND	1.40x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	2.73x10 <sup>6</sup> <sub>b</sub>	5.23x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	4.27x10 <sup>6</sup> <sub>a</sub>	3.60x10 <sup>5</sup> <sub>a</sub>



I LAB mostrano una veloce ed elevata crescita all'inizio della fermentazione con un trend decrescente durante il resto del processo fermentativo (Tab.1). Al giorno 40 i LAB raggiungono una concentrazione cellulare compresa tra  $3.6 \times 10^7$  CFU/mL (LY1) e  $9.4 \times 10^7$  CFU/mL (MIX2). In generale, la concentrazione cellulare più alta di LAB è stata rilevata al giorno 40 nella tesi con inoculo di *L. plantarum* e *W. anomalus* in consociazione (MIX2) ed al giorno 63 nella tesi inoculata con *W. anomalus* (WA). Nonostante un positivo effetto dell'inoculo di *W. anomalus* (da solo o in consociazione con *L. plantarum*), questi risultati hanno evidenziato che l'aggiunta di colture starter di lieviti non ha migliorato la crescita dei LAB rispetto alla fermentazione spontanea come invece descritto da Lanza et al. [8]; questo risultato, così come l'andamento anomalo rispetto a quello descritto da Bleve et al. [3] dove la crescita dei lab inizia al giorno 135 ed aumenta fino alla fine della fermentazione, senza mai scomparire, sono probabilmente associabili ad una più alta temperatura di fermentazione.

**Tabella 2.** Valori di pH delle salamoie durante la fermentazione. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento. ND: non determinato.

Giorno	16	23	40	63	70	77	84	105	140	188
Tesi	pH									
SP	4.43 <sub>a</sub>	4.41 <sub>a</sub>	4.74 <sub>a</sub>	4.90 <sub>abc</sub>	5.09 <sub>ab</sub>	5.20 <sub>b</sub>	5.32 <sub>bc</sub>	5.78 <sub>ab</sub>	7.03 <sub>a</sub>	7.08 <sub>a</sub>
LP	4.40 <sub>ab</sub>	4.37 <sub>ab</sub>	4.63 <sub>b</sub>	4.90 <sub>bc</sub>	5.14 <sub>a</sub>	5.25 <sub>ab</sub>	5.43 <sub>ab</sub>	6.11 <sub>a</sub>	6.60 <sub>b</sub>	6.81 <sub>bc</sub>
WA	4.38 <sub>bc</sub>	4.38 <sub>ab</sub>	4.63 <sub>b</sub>	4.99 <sub>a</sub>	5.14 <sub>a</sub>	5.38 <sub>a</sub>	5.55 <sub>a</sub>	6.01 <sub>a</sub>	6.65 <sub>b</sub>	6.90 <sub>ab</sub>
MIX1	4.37 <sub>cd</sub>	4.38 <sub>ab</sub>	4.60 <sub>b</sub>	4.94 <sub>ab</sub>	4.98 <sub>bc</sub>	5.13 <sub>bc</sub>	5.26 <sub>bc</sub>	5.56 <sub>bc</sub>	6.43 <sub>b</sub>	6.76 <sub>c</sub>
LY1	4.37 <sub>c</sub>	4.35 <sub>b</sub>	4.54 <sub>c</sub>	4.78 <sub>d</sub>	4.93 <sub>c</sub>	5.03 <sub>c</sub>	5.17 <sub>c</sub>	5.54 <sub>bc</sub>	6.50 <sub>b</sub>	6.68 <sub>cd</sub>
MIX2	4.34 <sub>d</sub>	4.36 <sub>ab</sub>	4.51 <sub>c</sub>	4.83 <sub>cd</sub>	4.93 <sub>c</sub>	5.02 <sub>c</sub>	5.14 <sub>c</sub>	5.45 <sub>bc</sub>	6.37 <sub>b</sub>	6.60 <sub>de</sub>
LY2	4.39 <sub>bc</sub>	4.38 <sub>ab</sub>	4.53 <sub>c</sub>	4.83 <sub>cd</sub>	4.90 <sub>c</sub>	5.02 <sub>c</sub>	5.13 <sub>c</sub>	5.35 <sub>c</sub>	6.46 <sub>b</sub>	6.48 <sub>e</sub>

Per quanto concerne le *Enterobacteriaceae*, l'andamento rilevato è risultato in contrasto con quanto verificato in letteratura. Gli enterobatteri, considerati microrganismi indesiderati, possono essere presenti nelle fasi iniziali, ma di solito scompaiono subito dopo la crescita dei LAB e dei lieviti [3]. Nel presente lavoro, le concentrazioni cellulari di enterobatteri sono aumentate durante la fermentazione dal giorno 77 al giorno 140 per poi diminuire al giorno 188 (Tab. 1). La loro crescita non è stata impedita dai LAB e/o dall'inoculo dei lieviti e questa crescita inaspettata è associabile all'aumento anomalo del pH [9]: difatti, il pH è sceso rapidamente a

valori compresi tra 4.37 (LY1) e 4.43 (SP) nella seconda settimana di fermentazione, in concomitanza con la crescita dei lattobacilli che sono cresciuti rapidamente raggiungendo elevate concentrazioni cellulari (Tab.2), ma poi i valori sono aumentati fino a raggiungere il valore medio di 5.02 al giorno 70 e quasi la neutralità (valore medio 6.76) al termine della fermentazione. Differenze significative tra le tesi sono comunque state riscontrate fin dall'inizio, con pH inferiore nelle tesi inoculate rispetto alla fermentazione spontanea; queste differenze sono diventate gradualmente più pronunciate, evidenziando un pH inferiore nelle tesi con inoculi di lieviti e ceppi di LAB (MIX1, LY1, MIX2, LY2), con i valori più bassi rilevati nelle tesi MIX2 e LY2 all'ultimo campionamento.

### Profilo chimico

La composizione degli zuccheri e dei polialcoli della polpa di olive grezze ha un ruolo fondamentale nell'andamento della fermentazione e nello sviluppo di popolazioni microbiche. Le differenze tra cultivar sono probabilmente legate al genotipo e a differenti condizioni ambientali. I dati delle olive grezze hanno mostrato che il glucosio rappresentava lo zucchero più abbondante (9477.74 ppm) seguito dal fruttosio (615.80 ppm). Tra i polialcoli, il mannitolo ha mostrato la concentrazione più alta (3619.97 ppm), mentre la concentrazione di sorbitolo registrata è stata molto inferiore (92.41 ppm).

Durante la fermentazione, il contenuto di zuccheri delle olive è diminuito rapidamente (Tab. 3), in particolare il glucosio è stato consumato più velocemente in SP, mentre nella tesi LY2 il monosaccaride consumato più rapidamente è stato il fruttosio. Al giorno 40, il glucosio è stato quasi completamente consumato (96% in media), mentre il fruttosio era ancora presente, con concentrazioni più basse riscontrate in MIX1, LY1, MIX2 e LY2. Al giorno 105 in tutte le tesi il contenuto di zuccheri è risultato quasi azzerato; tracce di fruttosio erano presenti in LP, MIX2 e LY2 e di glucosio in SP.

Tra i polialcoli, il sorbitolo ha subito una immediata forte diminuzione, mentre il mannitolo ha mostrato un forte calo tra il giorno 23 ed il giorno 40 (valori più alti in LP e più bassi in SP), con valori quasi azzerati al giorno 105 in tutte le tesi (Tab.4). Al giorno 105 i risultati hanno mostrato una concentrazione elevata di etanolo nelle olive, in particolare nelle tesi LP e WA. Le concentrazioni di sorbitolo e glicerolo hanno mostrato la stessa tendenza raggiungendo valori pari a zero al giorno 105 per poi nuovamente aumentare dal giorno 140 (Tab. 4).

Nelle salamoie sono state trovate solo tracce di zuccheri durante l'intero processo fermentativo (Tab. 5). Glucosio e fruttosio sono stati trovati in concentrazioni più elevate durante l'ultimo campionamento rispettivamente nelle tesi MIX2 e LY2. I polialcoli sono stati riscontrati nelle salamoie a concentrazioni maggiori rispetto agli zuccheri (Tab. 5), in particolare per il mannitolo al giorno 16 (valore medio 2405.53 ppm) e al giorno 105 (valore medio 1521.34 ppm), per il sorbitolo al giorno 188 (valore medio 594.94 ppm). Il glicerolo non è stato rilevato nelle salamoie, mentre l'etanolo ha mostrato un andamento crescente raggiungendo concentrazioni elevate, mediamente di 45.87 ppm al giorno 16 e 180.58 ppm al giorno 188 (Tab. 7).

**Tabella 3.** Concentrazioni di zuccheri nella polpa delle olive Leccino in SP o fermentazione controllata, misurata mediante analisi HPLC. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

Giorno	23	40	105	140	188
Tesi	Glucosio (ppm)				
SP	1336.53 ± 30.22 <sub>f</sub>	264.96 ± 5.08 <sub>c</sub>	5.14 ± 4.06 <sub>ab</sub>	225.35 ± 64.80 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
LP	2678.28 ± 89.35 <sub>ab</sub>	589.65 ± 138.75 <sub>b</sub>	0.73 ± 0.73 <sub>b</sub>	20.60 ± 1.27 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
WA	2370.15 ± 74.86 <sub>cd</sub>	886.36 ± 209.44 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	18.90 ± 3.25 <sub>b</sub>	17.17 ± 7.52 <sub>a</sub>
MIX1	2091.05 ± 104.84 <sub>e</sub>	231.74 ± 17.91 <sub>c</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	12.64 ± 0.94 <sub>b</sub>	9.27 ± 2.12 <sub>ab</sub>
LY1	2730.10 ± 38.10 <sub>a</sub>	172.82 ± 7.96 <sub>c</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	4.93 ± 0.72 <sub>b</sub>	3.80 ± 0.55 <sub>b</sub>
MIX2	2472.06 ± 34.42 <sub>bc</sub>	217.64 ± 18.48 <sub>c</sub>	1.38 ± 0.20 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
LY2	2204.15 ± 108.27 <sub>de</sub>	212.25 ± 3.30 <sub>c</sub>	10.17 ± 4.36 <sub>a</sub>	2.54 ± 0.37 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
	Fruttosio (ppm)				
SP	425.31 ± 11.99 <sub>ab</sub>	234.09 ± 3.06 <sub>a</sub>	1.05 ± 0.87 <sub>b</sub>	37.69 ± 14.64 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>
LP	366.63 ± 33.94 <sub>ab</sub>	377.97 ± 52.56 <sub>a</sub>	5.62 ± 0.87 <sub>b</sub>	1.92 ± 0.56 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>
WA	379.57 ± 13.07 <sub>ab</sub>	248.65 ± 114.49 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	17.52 ± 2.73 <sub>b</sub>
MIX1	468.63 ± 59.45 <sub>a</sub>	60.56 ± 7.77 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	3.29 ± 0.73 <sub>b</sub>	44.27 ± 3.28 <sub>a</sub>
LY1	374.99 ± 7.21 <sub>ab</sub>	83.75 ± 9.93 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	2.91 ± 0.69 <sub>b</sub>	6.24 ± 2.15 <sub>c</sub>
MIX2	359.85 ± 12.16 <sub>ab</sub>	42.41 ± 20.16 <sub>b</sub>	21.93 ± 6.53 <sub>b</sub>	12.01 ± 4.14 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>
LY2	287.43 ± 118.51 <sub>b</sub>	53.84 ± 8.28 <sub>b</sub>	63.09 ± 19.98 <sub>a</sub>	20.09 ± 10.27 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>

Nelle olive il mannitolo era circa 25% degli zuccheri totali e dei polialcoli, il più abbondante dopo il glucosio (65%). La scomparsa del mannitolo al giorno 105, in corrispondenza dell'aumento dell'etanolo, è probabilmente ascrivibile allo sviluppo di microrganismi in grado di utilizzare mannitolo come fonte di carbonio e energia, fra cui sono compresi microrganismi tipicamente presenti in olive e salamoie,

come diverse *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli*), LAB eterofermentanti, lieviti (tra cui *Saccharomyces* spp.), funghi (compreso *Fusarium* spp.) e altri batteri (compreso *Staphylococcus aureus*) [9], (Tab. 4). Elevate concentrazioni di mannitolo potrebbero aver causato la presenza di enterobatteri in quantità elevate e di muffe: dal giorno 63 in poi, infatti, sono state osservate muffe, che raggiungevano una significativa abbondanza durante la fase finale della fermentazione; dall'isolamento e con la caratterizzazione morfologica delle muffe è stata rilevata la presenza di *Fusarium* spp., muffe responsabili di "softening" delle olive così come *Penicillium* spp. e *Aspergillus niger*. Non sono state rilevate differenze significative tra le tesi, ad eccezione dell'ultimo campionamento (giorno 188), in cui le muffe in MIX1 erano significativamente inferiori rispetto alla tesi LP. Anche la presenza di *Fusarium solani*, specie maggiormente presente tra le muffe del genere *Fusarium* spp. rilevate, potrebbe quindi essere associata a una più alta concentrazione di mannitolo ed aver favorito una modifica tra le popolazioni microbiche durante la fermentazione a favore di microrganismi mannitolo-catabolizzanti; questo composto è correlato a un meccanismo della pianta di risposta agli stress ambientali legati al cambiamento climatico, come l'aumento di stress idrico. Questo risultato potrebbe essere un ottimo punto di partenza per studi successivi, perché le maggiori concentrazioni di mannitolo potrebbero portare alla presenza di patogeni, come *S. aureus* o *E. coli*, o di altri microrganismi di deterioramento. Questi microrganismi potrebbero anche essere responsabili di concentrazioni molto elevate di etanolo nelle salamoie (Tab. 7) e nelle olive il giorno 105 (Tab. 4), corrispondente al più alto sviluppo di muffe ed enterobatteri (Tab. 1).

**Tabella 4.** Concentrazioni di alcoli nella polpa delle olive durante la fermentazione spontanea (SP) o controllata, misurata mediante analisi HPLC. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

<b>Giorno</b>	<b>23</b>	<b>40</b>	<b>105</b>	<b>140</b>	<b>188</b>
<b>Tesi</b>	<b>Mannitolo (ppm)</b>				
SP	2841.82 ± 184.23 <sub>bc</sub>	330.47 ± 15.47 <sub>b</sub>	1.03 ± 0.52 <sub>a</sub>	107.09 ± 13.69 <sub>b</sub>	66.47 ± 20.02 <sub>b</sub>
LP	2721.22 ± 443.95 <sub>c</sub>	881.01 ± 406.13 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>d</sub>	666.53 ± 20.87 <sub>a</sub>
WA	4248.15 ± 117.43 <sub>a</sub>	533.65 ± 12.23 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>d</sub>	608.07 ± 111.80 <sub>a</sub>
MIX1	4205.16 ± 192.19 <sub>a</sub>	613.97 ± 89.47 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	99.60 ± 10.39 <sub>b</sub>	123.15 ± 16.39 <sub>b</sub>
LY1	3505.10 ± 184.46 <sub>ab</sub>	460.93 ± 31.92 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	66.89 ± 5.74 <sub>c</sub>	103.76 ± 19.62 <sub>b</sub>
MIX2	3146.29 ± 29.75 <sub>bc</sub>	445.93 ± 51.91 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	166.02 ± 6.45 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
LY2	2539.49 ± 361.20 <sub>c</sub>	466.11 ± 72.69 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	183.03 ± 9.68 <sub>a</sub>	43.10 ± 7.92 <sub>b</sub>
	<b>Sorbitolo (ppm)</b>				
SP	37.29 ± 13.06 <sub>ab</sub>	125.09 ± 3.96 <sub>bcd</sub>	0.13 ± 0.08 <sub>a</sub>	808.75 ± 39.18 <sub>a</sub>	90.20 ± 9.68 <sub>c</sub>
LP	27.99 ± 5.01 <sub>ab</sub>	97.59 ± 0.44 <sub>cd</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	321.37 ± 41.25 <sub>bc</sub>	46.20 ± 5.41 <sub>d</sub>
WA	36.42 ± 5.99 <sub>ab</sub>	59.67 ± 27.49 <sub>d</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	402.61 ± 54.24 <sub>bc</sub>	113.06 ± 0.20 <sub>b</sub>
MIX1	66.90 ± 16.76 <sub>a</sub>	211.87 ± 39.55 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	235.62 ± 75.17 <sub>c</sub>	198.39 ± 8.32 <sub>a</sub>
LY1	18.58 ± 7.61 <sub>b</sub>	201.85 ± 10.38 <sub>bc</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	432.52 ± 46.01 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>e</sub>
MIX2	16.25 ± 2.69 <sub>b</sub>	337.44 ± 84.51 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	290.22 ± 88.32 <sub>bc</sub>	16.42 ± 4.77 <sub>e</sub>
LY2	41.03 ± 26.42 <sub>ab</sub>	177.08 ± 8.37 <sub>bc</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>	479.53 ± 86.09 <sub>b</sub>	10.22 ± 4.86 <sub>e</sub>
	<b>Etanolo (ppm)</b>				
SP	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	467.75 ± 132.03 <sub>d</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
LP	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	822.96 ± 32.33 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
WA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	851.71 ± 78.11 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
MIX1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	598.26 ± 50.76 <sub>bcd</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
LY1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	773.19 ± 40.86 <sub>abc</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
MIX2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	576.26 ± 23.88 <sub>cd</sub>	0.00 ± 0.00	41.49 ± 5.33 <sub>a</sub>
LY2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	535.13 ± 102.12 <sub>d</sub>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>b</sub>
	<b>Glicerolo (ppm)</b>				
SP	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>	0.00 ± 0.00	1342.62 ± 287.81 <sub>a</sub>	2362.26 ± 496.59 <sub>a</sub>
LP	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 <sub>c</sub>	0.00 ± 0.00	1331.19 ± 52.87 <sub>a</sub>	1487.78 ± 150.80 <sub>bc</sub>
WA	0.00 ± 0.00	470.96 ± 156.54 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00	1353.50 ± 156.54 <sub>a</sub>	950.54 ± 137.67 <sub>cd</sub>
MIX1	0.00 ± 0.00	740.64 ± 228.03 <sub>b</sub>	0.00 ± 0.00	1726.35 ± 49.04 <sub>a</sub>	1792.01 ± 77.12 <sub>ab</sub>
LY1	0.00 ± 0.00	880.76 ± 74.01 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00	1681.73 ± 207.55 <sub>a</sub>	450.85 ± 32.96 <sub>de</sub>
MIX2	0.00 ± 0.00	1221.38 ± 274.93 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00	1345.29 ± 137.99 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>e</sub>
LY2	0.00 ± 0.00	858.80 ± 73.42 <sub>ab</sub>	0.00 ± 0.00	1368.59 ± 205.04 <sub>a</sub>	0.00 ± 0.00 <sub>e</sub>

**Tabella 5.** Concentrazioni di glucosio, fruttosio, mannitolo e sorbitolo nelle salamoie durante la fermentazione. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

Giorno	16	105	140	188
<b>Tesi</b>	<b>Glucosio (ppm)</b>			
SP	11.50±5.91 <sub>ab</sub>	63.23±34.65 <sub>a</sub>	47.99±37.00 <sub>a</sub>	118.00±34.20 <sub>c</sub>
LP	28.05±9.50 <sub>a</sub>	45.86±21.24 <sub>ab</sub>	78.34±25.44 <sub>a</sub>	170.00±36.79 <sub>bc</sub>
WA	17.38±3.70 <sub>ab</sub>	30.76±17.80 <sub>ab</sub>	55.13±20.33 <sub>a</sub>	201.20±22.54 <sub>abc</sub>
MIX1	24.71±9.29 <sub>ab</sub>	29.26±7.94 <sub>ab</sub>	24.92±1.92 <sub>a</sub>	159.20±32.27 <sub>bc</sub>
LY1	27.97±6.03 <sub>a</sub>	33.29±4.92 <sub>ab</sub>	41.36±7.82 <sub>a</sub>	226.80±45.18 <sub>ab</sub>
MIX2	6.10±2.68 <sub>b</sub>	4.02±3.98 <sub>b</sub>	45.76±18.18 <sub>a</sub>	278.40±29.33 <sub>a</sub>
LY2	10.67±4.27 <sub>ab</sub>	21.93±12.29 <sub>ab</sub>	46.35±9.19 <sub>a</sub>	185.20±6.44 <sub>abc</sub>
	<b>Fruttosio (ppm)</b>			
SP	15.02±14.95 <sub>bc</sub>	5.78±2.88 <sub>ab</sub>	1.53±1.43 <sub>b</sub>	0.00±0.00 <sub>b</sub>
LP	39.28±0.74 <sub>a</sub>	6.51±5.54 <sub>ab</sub>	15.63±15.58 <sub>b</sub>	0.00±0.00 <sub>b</sub>
WA	21.15±9.77 <sub>abc</sub>	4.59±3.73 <sub>ab</sub>	3.94±3.75 <sub>b</sub>	0.00±0.00 <sub>b</sub>
MIX1	28.85±2.59 <sub>ab</sub>	55.55±38.02 <sub>a</sub>	24.80±14.04 <sub>b</sub>	0.00±0.00 <sub>b</sub>
LY1	28.25±3.75 <sub>ab</sub>	0.26±0.17 <sub>b</sub>	61.01±12.50 <sub>a</sub>	0.00±0.00 <sub>b</sub>
MIX2	5.30±5.21 <sub>c</sub>	43.75±35.36 <sub>a</sub>	33.37±7.80 <sub>ab</sub>	115.20±92.25 <sub>ab</sub>
LY2	24.95±0.55 <sub>abc</sub>	34.32±15.80 <sub>a</sub>	33.17±14.12 <sub>ab</sub>	187.20±95.73 <sub>a</sub>
	<b>Mannitolo (ppm)</b>			
SP	1605.27±1173.02 <sub>bc</sub>	453.29±189.47 <sub>b</sub>	340.79±41.78 <sub>a</sub>	0.00±0.00
LP	4435.11±195.73 <sub>a</sub>	1384.47±689.57 <sub>b</sub>	84.39±83.92 <sub>b</sub>	0.00±0.00
WA	2743.54±1703.33 <sub>abc</sub>	265.33±175.42 <sub>b</sub>	232.28±85.07 <sub>ab</sub>	0.00±0.00
MIX1	4263.16±630.34 <sub>ab</sub>	1131.72±816.58 <sub>b</sub>	206.97±75.24 <sub>ab</sub>	0.00±0.00
LY1	1863.39±965.28 <sub>abc</sub>	1289.76±1193.38 <sub>b</sub>	225.06±105.27 <sub>ab</sub>	0.00±0.00
MIX2	578.11±291.75 <sub>c</sub>	4007.63±162.08 <sub>a</sub>	156.49±38.14 <sub>ab</sub>	0.00±0.00
LY2	1350.17±430.59 <sub>c</sub>	2117.20±1087.23 <sub>ab</sub>	23.73±13.44 <sub>b</sub>	0.00±0.00
	<b>Sorbitolo (ppm)</b>			
SP	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.485.20±2218.101 <sub>ab</sub>
LP	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	6.9222.80±1151.479 <sub>a</sub>
WA	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	7.134.80±374.7505 <sub>a</sub>
MIX1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	6.990.00±1337.846 <sub>a</sub>
LY1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.552.40±1210.026 <sub>ab</sub>
MIX2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.2000.40±488.0982 <sub>ab</sub>
LY2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.322.00±730.2356 <sub>b</sub>

Il sorbitolo (Tab. 4, Tab. 5) era presente solo in tracce nelle olive grezze, mentre è comparso solo a fine fermentazione nella salamoia. Diversi lieviti possono produrre sorbitolo, compresi i lieviti che solitamente crescono durante la fermentazione delle olive, come *Candida boidinii* e *S. cerevisiae*, mentre i LAB non producono sorbitolo, anche se alcuni di loro possono catabolizzarlo (come *L. plantarum*) [10].

Pertanto, l'aumento del sorbitolo nelle salamoie a fine fermentazione potrebbe essere probabilmente attribuito al suo accumulo in cellule di lievito come una forma di protezione dallo stress osmotico, seguita dal rilascio durante la lisi cellulare anche indotta da enzimi idrolitici prodotti da muffe. Infine, tra i polialcoli, il glicerolo, rilevato solo nelle olive e non in salamoia, potrebbe probabilmente derivare da processi idrolitici nelle olive e dal rilascio di prodotti di degradazione nella salamoia (Tab. 4).

Acido citrico, malico e succinico si trovano tipicamente come costituenti nelle olive [6]. Le concentrazioni di acido citrico si sono mantenute su livelli molto bassi nelle salamoie durante tutta la fermentazione, ma un aumento è stato osservato all'ultimo campionamento. Il citrato può essere prodotto anche da muffe: questo potrebbe spiegare il suo progressivo aumento (Tab. 6). Anche l'acido succinico (Tab. 6) può essere prodotto da microrganismi solitamente presenti nella fermentazione delle olive, come lieviti, *Enterobacteriaceae* e *Propionibacteriaceae*: l'andamento delle concentrazioni ha mostrato una alta variabilità, probabilmente da ricercare nell'interazione tra i metabolismi delle diverse popolazioni microbiche. Valori bassi sono stati rilevati al giorno 16, seguiti da un aumento; nei giorni 105 e 140 le concentrazioni medie erano più elevate mentre sono in seguito diminuite al giorno 188, tranne che nella tesi LY2.

**Tabella 6.** Concentrazioni di acido citrico, acido malico e acido succinico nelle salamoie. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

Giorni	16	105	140	188
<b>Tesi</b>	<b>Acido citrico (ppm)</b>			
SP	31.81± 17.78abc	75.02± 21.74ab	65.69± 0.96abc	238.4± 58.42a
LP	18.48± 2.59bc	43.34± 4.25bc	108.86± 30.90a	286.4±45.73a
WA	54.60± 12.08a	102.43± 14.64a	28.34± 15.82c	307.2± 53.52a
MIX1	26.53± 11.49abc	68.60± 34.48ab	41.84± 8.50bc	296± 37.42a
LY1	10.12± 2.07c	0.00± 0.00c	62.61± 13.35abc	272± 32.83a
MIX2	11.84± 2.39c	50.69± 18.68abc	76.91± 10.09ab	340.8± 33.60a
LY2	41.05± 2.90ab	48.22± 9.95abc	52.71± 9.84bc	318.4± 26.92a
	<b>Acido malico (ppm)</b>			
SP	949.87±414.14a	126.72±113.54ab	3.05±1.31a	28.8±13.86a
LP	726.53±114.62ab	64.12±41.30ab	0.00±0.00a	14.4±2.77a
WA	1075.54±297.87a	111.94±109.92ab	0.00±0.00a	14.4±4.80a
MIX1	1000.38±178.68a	17.31±8.66b	16.90±8.99a	36.8±6.97a
LY1	903.88±215.39ab	0.00±0.00b	4.63±1.25a	35.2±12.50a
MIX2	415.07±16.74b	414.01±365.08a	16.13±3.26a	17.6±4.23a
LY2	759.26±149.47ab	385.73±121.90a	15.49±5.23a	49.6±26.92a
	<b>Acido succinico (ppm)</b>			
SP	20.53±11.80a	311.89±73.35ab	249.63±92.07a	92.40±22.39ab
LP	0.00±0.00a	304.19±7.39ab	262.31±133.56a	13.20±3.65b
WA	14.67±4.23a	238.19±70.45ab	183.99±95.03a	16.80±0.60b
MIX1	0.00±0.00	106.04±17.89bc	207.61±27.55a	22.8±9.82b
LY1	0.00±0.00a	0.00±0.00c	107.14±56.35a	30±6.26b
MIX2	29.33±19.40a	362.12±41.19a	267.67±18.34a	97.8±54.69ab
LY2	11.00±6.35a	180.62±100.36abc	114.84±75.05a	150.6±53.81a

L'acido malico è stato rilevato nelle salamoie già il giorno 16, poi è diminuito fino a quasi scomparire il giorno 140. La rapida scomparsa dell'acido malico (Tab.6) è facilmente correlabile al metabolismo dei LAB, che sono in grado di metabolizzarlo. Acido lattico, acetico e piruvico, insieme all'etanolo (Tab. 7), sono i principali prodotti della fermentazione degli zuccheri da parte dei LAB; questi sono stati rilevati alle più alte concentrazioni il giorno 16, poi è stata osservata una diminuzione. L'acido lattico (Tab. 7) nelle fermentazioni di olive ha un ruolo fondamentale nel mantenere un pH acido che eviti la formazione di microrganismi agenti di spoilage. Nel presente lavoro i risultati hanno mostrato la sua diminuzione e la diminuzione degli acidi organici in generale, in concomitanza con un pH molto



elevato. Questo potrebbe essere attribuito alla comparsa di muffe dal giorno 63, quando è anche iniziato l'aumento del pH; infatti, dove la concentrazione degli acidi risultava più alta, il pH è risultato più basso.

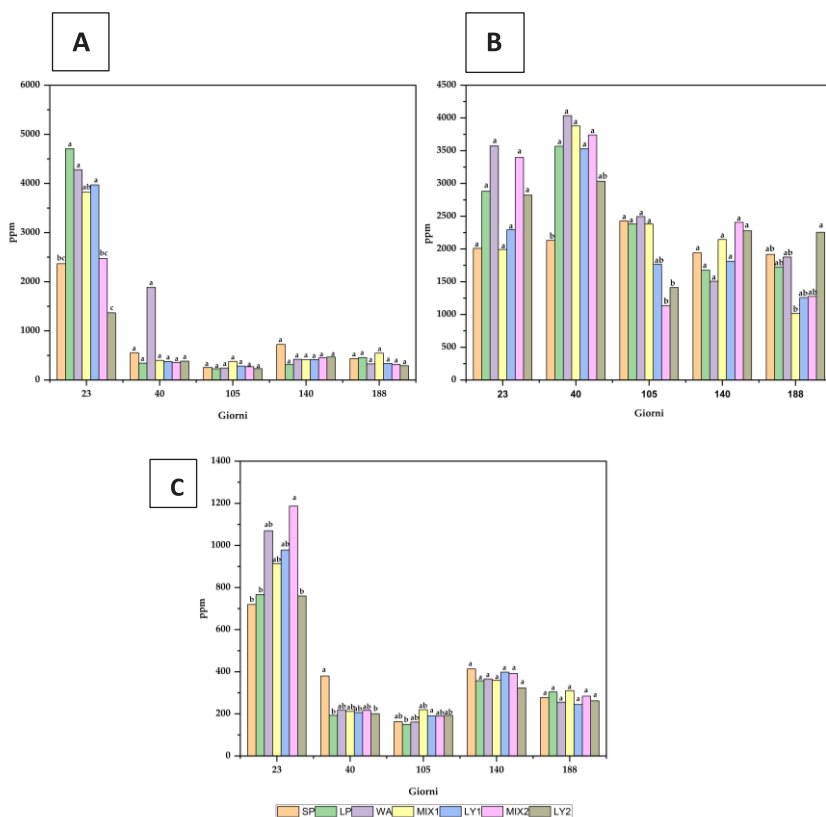
**Tabella 7.** Concentrazioni di acido lattico (A), acido acetico (B) e acido piruvico (C) ed etanolo (D) nelle salamoie durante le fermentazioni. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

Giorno	16	105	140	188
<b>Tesi</b>	<b>Acido lattico (ppm)</b>			
SP	3808.57±1739.29 <sub>a</sub>	1324.19±144.06 <sub>ab</sub>	320.58±232.11 <sub>ab</sub>	156.80±56.14 <sub>a</sub>
LP	2217.75±28.63 <sub>ab</sub>	253.07±134.00 <sub>c</sub>	92.76±52.18 <sub>b</sub>	68.80±16.24 <sub>ab</sub>
WA	4100.25±1128.45 <sub>a</sub>	916.51±383.81 <sub>bc</sub>	58.52±46.66 <sub>b</sub>	123.20±8.47 <sub>ab</sub>
MIX1	2572.21±302.92 <sub>ab</sub>	1427.68±607.58 <sub>ab</sub>	690.13±347.22 <sub>a</sub>	113.6±45.56 <sub>ab</sub>
LY1	2493.82±252.68 <sub>ab</sub>	1216.60±55.53 <sub>ab</sub>	210.52±121.04 <sub>ab</sub>	97.6±12.50 <sub>ab</sub>
MIX2	1207.10±106.23 <sub>b</sub>	2098.04±106.91 <sub>a</sub>	682.53±384.01 <sub>a</sub>	44.8±11.20 <sub>b</sub>
LY2	2000.46±57.26 <sub>ab</sub>	1228.97±268.14 <sub>ab</sub>	432.79±423.80 <sub>ab</sub>	115.2±55.43 <sub>ab</sub>
	<b>Acido acetico (ppm)</b>			
SP	12801.73±4000.02 <sub>bc</sub>	3746.45±1453.53 <sub>b</sub>	3163.09±194.44 <sub>ab</sub>	4194±739.32 <sub>b</sub>
LP	24220.35±1033.60 <sub>abc</sub>	8015.41±3492.60 <sub>b</sub>	3492.06±108.03 <sub>a</sub>	4822.8±185.64 <sub>ab</sub>
WA	32819.01±14261.59 <sub>a</sub>	2342.49±1027.05 <sub>b</sub>	3148.20±186.98 <sub>abc</sub>	5317.2±540.83 <sub>ab</sub>
MIX1	30089.11±6307.98 <sub>ab</sub>	6904.41±3555.60 <sub>b</sub>	3053.89±378.47 <sub>abc</sub>	4826.4±193.16 <sub>ab</sub>
LY1	10673.96±3631.18 <sub>c</sub>	9086.00±6885.73 <sub>b</sub>	2477.86±79.21 <sub>c</sub>	5852.4±719.45 <sub>a</sub>
MIX2	5875.03±984.36 <sub>c</sub>	26520.63±5062.97 <sub>a</sub>	2836.17±68.69 <sub>abc</sub>	5623.2±209.83 <sub>ab</sub>
LY2	9909.68±2293.55 <sub>c</sub>	12030.70±5066.71 <sub>b</sub>	2774.35±321.90 <sub>bc</sub>	5064±414.13 <sub>ab</sub>
	<b>Acido piruvico (ppm)</b>			
SP	656.30±218.08 <sub>ab</sub>	60.26±13.01 <sub>a</sub>	28.31±28.31 <sub>a</sub>	7.000±2.65 <sub>b</sub>
LP	436.00±83.79 <sub>b</sub>	43.69±22.08 <sub>a</sub>	0.00±0.00 <sub>a</sub>	12.000±3.46 <sub>b</sub>
WA	956.21±214.08 <sub>a</sub>	46.27±13.91 <sub>a</sub>	17.03±15.76 <sub>a</sub>	20.000±1.00 <sub>b</sub>
MIX1	951.32±198.00 <sub>a</sub>	49.10±42.92 <sub>a</sub>	36.10±18.36 <sub>a</sub>	15.000±6.24 <sub>b</sub>
LY1	597.30±136.49 <sub>ab</sub>	54.78±51.84 <sub>a</sub>	19.27±8.83 <sub>a</sub>	8.000±1.00 <sub>b</sub>
MIX2	394.55±22.37 <sub>b</sub>	35.31±17.69 <sub>a</sub>	30.29±3.97 <sub>a</sub>	16.000±5.57 <sub>b</sub>
LY2	634.69±158.84 <sub>ab</sub>	28.97±15.03 <sub>a</sub>	6.01±3.23 <sub>a</sub>	50.000±24.33 <sub>a</sub>
	<b>Etanolo (ppm)</b>			
SP	37789.55±16159.34 <sub>a</sub>	27752.30±12887.17 <sub>bc</sub>	73701.91±1709.42 <sub>a</sub>	165605.40±25072.18 <sub>a</sub>
LP	52132.31±5564.88 <sub>a</sub>	18571.44±8274.42 <sub>c</sub>	76015.87±2798.30 <sub>a</sub>	184057.20±6465.98 <sub>a</sub>
WA	47940.31±18318.67 <sub>a</sub>	28421.58±15663.95 <sub>abc</sub>	78752.49±2514.62 <sub>a</sub>	179542.80±3139.59 <sub>a</sub>
MIX1	31323.51±7736.99 <sub>a</sub>	53859.41±2141.87 <sub>ab</sub>	49285.71±7210.69 <sub>b</sub>	181540.80±1200.12 <sub>a</sub>
LY1	50668.13±13541.64 <sub>a</sub>	44441.84±8488.94 <sub>abc</sub>	46767.60±2825.88 <sub>b</sub>	191800.80±5153.80 <sub>a</sub>
MIX2	41861.12±3373.27 <sub>a</sub>	57245.50±6901.01 <sub>a</sub>	54370.80±142.78 <sub>b</sub>	191457.00±7583.33 <sub>a</sub>
LY2	59400.89±571.96 <sub>a</sub>	37283.38±6748.50 <sub>abc</sub>	46592.74±11467.70 <sub>b</sub>	170069.40±19903.49 <sub>a</sub>

Lo scopo finale principale della fermentazione è quello di deamarizzare le olive; come previsto, nel prodotto finale si è registrata una profonda diminuzione del contenuto di oleuropeina (Tab. 8) sia nelle salamoie che nella polpa di oliva. I valori di oleuropeina in salamoia sono diminuiti gradualmente durante i sei mesi di fermentazioni, con significative differenze tra le tesi in quasi tutti i campionamenti. La percentuale più alta di riduzione è stata registrata per tutte le tesi tra il giorno 105 e il giorno 140 dopo l'inizio della prova. La tesi MIX1 ha mostrato il contenuto più basso, mentre SP ha avuto il più alto livello di oleuropeina nella salamoia alla fine del processo, con un valore simile a MIX2. Questi risultati permettono di ipotizzare che l'uso di *S. cerevisiae* abbia avuto un effetto positivo sull'idrolisi dell'oleuropeina. Questo risultato è confermato da altri lavori, dove le fermentazioni controllate hanno permesso una deamarizzazione più efficace rispetto alla fermentazione spontanea [4]. In contrasto con l'andamento dell'oleuropeina, l'idrossitirosolo nelle salamoie (Tab. 8) è gradualmente aumentato in quasi tutte le tesi fino al giorno 105. Tra i giorni 105 e 140 si osserva una diminuzione delle tesi SP, WA e MIX2, mentre per LP e MIX1 è stato registrato un aumento significativo. Al termine della fermentazione i valori erano tutti simili senza differenze significative. Il tirosolo (Tab. 8) ha mostrato un andamento simile all'idrossitirosolo nelle salamoie con una crescita graduale fino al giorno 105, dove il valore più alto è stato mostrato dalla tesi WA seguita da una diminuzione al giorno 140. Tra il giorno 140 e 188, le tesi SP, LP, WA e MIX1 hanno mostrato un aumento del loro contenuto in tirosolo. Durante quasi tutto il processo fermentativo, SP è stata la tesi con concentrazioni più basse di tirosolo. Invece, alla fine della fermentazione, le tesi SP, WA, LP e MIX1 hanno mostrato valori più alti di tirosolo.

**Tabella 8.** Concentrazioni di oleuropeina aglicone, idrossitirosole e tirosolo nelle salamoie durante la fermentazione. Lettere diverse indicano differenze significative tra diverse tesi ( $p \leq 0.05$ ) allo stesso tempo di campionamento.

Giorno	16	23	40	70	84	105	140	188
<b>Oleuropeina (ppm)*</b>								
SP	1361.92±71.65 <sup>bc</sup>	2985.83±737.17 <sup>a</sup>	1658.64±563.94 <sup>a</sup>	1139.44±13.44 <sup>a</sup>	567.27±10.20 <sup>b</sup>	752.13±87.00 <sup>b</sup>	13.11±0.37 <sup>a</sup>	17.68±0.28 <sup>a</sup>
LP	2336.57±259.00 <sup>a</sup>	2641.44±492.95 <sup>ab</sup>	1268.92±220.59 <sup>a</sup>	1400.17±298.98 <sup>a</sup>	1145.70±134.96 <sup>a</sup>	1448.64±170.58 <sup>a</sup>	17.61±4.40 <sup>ab</sup>	15.89±0.44 <sup>ab</sup>
WA	2112.12±341.48 <sup>ab</sup>	1315.85±285.72 <sup>c</sup>	1179.68±36.48 <sup>a</sup>	1397.94±301.62 <sup>a</sup>	1105.42±186.19 <sup>a</sup>	1563.74±106.69 <sup>a</sup>	14.02±1.11 <sup>a</sup>	13.90±0.44 <sup>ab</sup>
MIX1	1946.59±509.02 <sup>ab</sup>	1607.94±302.05 <sup>bc</sup>	2349.53±1253.9 <sup>a</sup>	1330.05±324.10 <sup>a</sup>	1046.83±112.4622 <sup>a</sup>	1448.98±120.00 <sup>a</sup>	12.52±0.66 <sup>a</sup>	12.52±0.19 <sup>b</sup>
LY1	1921.60±37.66 <sup>ab</sup>	1753.92±206.02 <sup>bc</sup>	2334.17±1151.5 <sup>a</sup>	1318.13±249.66 <sup>a</sup>	968.85±127.08 <sup>a</sup>	1265.72±87.72 <sup>a</sup>	13.70±1.70 <sup>a</sup>	13.78±0.81 <sup>ab</sup>
MIX2	807.13±58.61 <sup>c</sup>	799.92±85.77 <sup>c</sup>	2297.78±167.2 <sup>a</sup>	1330.11±219.93 <sup>a</sup>	864.78±49.85 <sup>ab</sup>	1353.43±220.74 <sup>a</sup>	14.68±2.37 <sup>a</sup>	18.42±1.7 <sup>a</sup>
LY2	1509.39±104.62 <sup>bc</sup>	1671.44±131.58 <sup>bc</sup>	3651.96±1302.9 <sup>a</sup>	1311.43±182.25 <sup>a</sup>	866.05±29.91 <sup>ab</sup>	1263.50±181.79 <sup>a</sup>	14.70±1.37 <sup>a</sup>	15.00±3.64 <sup>ab</sup>
<b>Idrossitirosole (ppm)*</b>								
SP	1299.80±50.4 <sup>a</sup>	1272.40±494.7 <sup>ab</sup>	2362.99±219.7 <sup>ab</sup>	2714.90±342.6 <sup>a</sup>	2695.78±96.2 <sup>ab</sup>	3427.20±111.8 <sup>a</sup>	1974.54±528.1 <sup>a</sup>	262.67±449.1 <sup>a</sup>
LP	822.04±252.9 <sup>ab</sup>	1594.17±211.3 <sup>ab</sup>	2351.27±138.7 <sup>ab</sup>	2652.44±152.2 <sup>a</sup>	2088.15±160.8 <sup>b</sup>	1426.54±638.4 <sup>c</sup>	2723.81±178.7 <sup>a</sup>	1797.23±643.9 <sup>a</sup>
WA	967.18±197.9 <sup>ab</sup>	1814.78±113.5 <sup>a</sup>	2282.89±45.4 <sup>ab</sup>	2890.93±69.2 <sup>a</sup>	2797.18±145.9 <sup>ab</sup>	2982.70±250.8 <sup>ab</sup>	2158.16±312.5 <sup>a</sup>	2372.27±93.0 <sup>a</sup>
MIX1	1349.04±61.7 <sup>a</sup>	1696.42±76.3 <sup>ab</sup>	2484.78±124.8 <sup>ab</sup>	2344.24±503.4 <sup>a</sup>	2289.55±364.9 <sup>ab</sup>	2593.13±206.6 <sup>abc</sup>	2950.96±120.5 <sup>a</sup>	2556.07±231.4 <sup>ab</sup>
LY1	1002.58±395.2 <sup>ab</sup>	1387.93±137.3 <sup>ab</sup>	2242.94±25.2 <sup>b</sup>	2499.20±19.3 <sup>a</sup>	2133.82±416.3 <sup>ab</sup>	2765.66±269.7 <sup>ab</sup>	2694.06±350.4 <sup>a</sup>	2192.83±448.5 <sup>ab</sup>
MIX2	771.32±260.4 <sup>ab</sup>	1075.86±187.0 <sup>b</sup>	2436.60±38.5 <sup>ab</sup>	2530.47±240.7 <sup>a</sup>	2297.62±190.4 <sup>ab</sup>	2797.07±24.6 <sup>ab</sup>	2189.25±280.9 <sup>a</sup>	2871.71±131.5 <sup>a</sup>
LY2	513.00±259.8 <sup>b</sup>	1274.50±210.4 <sup>ab</sup>	2709.62±264.3 <sup>a</sup>	2313.75±237.7 <sup>a</sup>	2914.88±319.1 <sup>a</sup>	2215.19±585.0 <sup>bc</sup>	2098.56±347.3 <sup>a</sup>	2660.96±519.8 <sup>a</sup>
<b>Tirosolo (ppm)*</b>								
SP	820.84±154.94 <sup>a</sup>	546.78±170.45 <sup>b</sup>	797.18±58.31 <sup>a</sup>	862.63±78.74 <sup>c</sup>	1395.01±41.14 <sup>a</sup>	1485.84±55.07 <sup>c</sup>	491.71±23.78 <sup>a</sup>	781.64±146.96 <sup>a</sup>
LP	307.12±24.30 <sup>bc</sup>	700.90±86.15 <sup>ab</sup>	753.10±69.41 <sup>a</sup>	1099.56±57.69 <sup>b</sup>	1195.95±1.29 <sup>bc</sup>	1011.56±84.19 <sup>d</sup>	462.48±36.15 <sup>a</sup>	708.80±111.73 <sup>ab</sup>
WA	237.12±12.14 <sup>c</sup>	947.72±25.63 <sup>a</sup>	739.39±13.66 <sup>a</sup>	1135.89±29.58 <sup>b</sup>	1265.56±15.17 <sup>b</sup>	2134.89±66.87 <sup>a</sup>	506.24±11.54 <sup>a</sup>	779.92±96.74 <sup>a</sup>
MIX1	596.29±208.33 <sup>ab</sup>	689.93±106.34 <sup>ab</sup>	792.51±16.87 <sup>a</sup>	1117.93±30.86 <sup>b</sup>	1276.26±9.81 <sup>b</sup>	1855.11±68.78 <sup>b</sup>	581.86±75.63 <sup>a</sup>	754.16±110.54 <sup>a</sup>
LY1	858.80±7.62 <sup>a</sup>	840.88±8.89 <sup>ab</sup>	740.67±5.92 <sup>a</sup>	1101.74±14.48 <sup>b</sup>	1141.06±68.07 <sup>c</sup>	1709.45±17.92 <sup>b</sup>	518.61±38.70 <sup>a</sup>	457.40±20.63 <sup>bc</sup>
MIX2	840.22±3.45 <sup>a</sup>	709.32±90.53 <sup>ab</sup>	768.57±19.30 <sup>a</sup>	1116.15±20.21 <sup>b</sup>	1008.44±24.91 <sup>d</sup>	1837.72±38.66 <sup>b</sup>	496.30±42.54 <sup>a</sup>	427.98±17.24 <sup>c</sup>
LY2	741.87±79.56 <sup>a</sup>	613.63±179.25 <sup>ab</sup>	418.49±19.30 <sup>b</sup>	1342.84±3.10 <sup>a</sup>	1246.10±22.39 <sup>b</sup>	1128.73±4.03 <sup>d</sup>	463.06±46.80 <sup>a</sup>	406.93±16.28 <sup>c</sup>



**Figura 2.** Concentrazioni di oleuropeina (A), idrossitirosolo (B) e tirosolo (C) nella polpa delle olive durante le fermentazioni, misurate mediante analisi HPLC. Lettere diverse indicano differenze significative (LSD) tra diverse tesi ( $p \leq 0,05$ ) ad ogni campionamento.

Per quanto riguarda i valori di oleuropeina nelle polpe, le diverse tesi non hanno influenzato il livello finale di oleuropeina. I dati riportati in Fig. 2 evidenziano infatti una diversa velocità di idrolisi e/o solubilizzazione di oleuropeina tra le tesi solo all'inizio della fermentazione. Alla fine della fermentazione non si sono riscontrate differenze significative tra le diverse tesi. Nelle polpe di olive, il contenuto di idrossitirosolo ha mostrato un aumento solo tra il primo e il secondo campionamento per tutte le tesi, ad eccezione di SP, che ha mostrato valori costanti fino alla fine della prova. Dopo il terzo campionamento, si è verificata una diminuzione lineare dei livelli di idrossitirosolo per tutte le tesi tranne MIX2 e LY2, che hanno mostrato un contenuto più elevato nell'ultimo campionamento rispetto a quello precedente. Infine, il tirosolo nelle olive ha mostrato una diminuzione in

tutte le tesi tra primo e secondo campionamento. Fatta eccezione per SP, che mostra una profonda diminuzione tra il secondo e il terzo campionamento, le altre tesi hanno mantenuto valori costanti fino al giorno 140, che ha mostrato un leggero aumento. Passando dai valori iniziali che vanno tra 719 ppm (SP) e 1187 ppm (MIX2) a valori compresi tra 244 ppm (LY1) e 310 ppm (MIX1), è stato dimostrato che questo fenolo è in grado di passare in salamoia in tutte le tesi senza differenze significative tra di loro.

Come riportato da Lanza et al. [2], il contenuto di idrossitirosolo in olive deamarizzate è la conseguenza di un equilibrio tra la solubilizzazione di questa molecola dalla polpa alla salamoia e l'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina effettuata dai LAB. Nonostante una diminuzione di idrossitirosolo durante la fermentazione, la quantità residua di questa molecola, compresa tra 1000 ppm e 2254 ppm, conferisce al prodotto finale significativi effetti nutraceutici oltre ad attività antiossidante e anti-radicalica. La tesi LY2 ha mostrato il più alto contenuto di idrossitirosolo, evidenziando un effetto sinergico di LAB e *W. anomalus* nella produzione di questa preziosa molecola.

## Conclusioni

L'utilizzo di colture starter è una strategia importante per controllare l'andamento e l'esito delle fermentazioni delle olive e può concorrere ad evitare l'utilizzo di eccessive quantità di sale. Nel presente lavoro, nonostante in tutte le tesi le fermentazioni abbiano raggiunto rapidamente valori bassi di pH e un buon livello di deamarizzazione, si sono poi verificati un progressivo aumento del pH ed una crescita eccessiva di microrganismi indesiderati causa di spoilage, come *Enterobacteriaceae* e muffe. L'aggiunta di starter microbici ha parzialmente ridotto l'aumento del pH, in particolare evidenziando una sinergia positiva tra LAB e lieviti inoculati, ma dopo sei mesi di fermentazione le salamoie hanno raggiunto un valore anomalo di pH, quasi neutro. La crescita eccessiva di microrganismi indesiderati potrebbe essere stata indotta dalle alte temperature invernali e dalla disponibilità di alte fonti di carbonio come il mannitolo, la cui concentrazione nelle olive può aumentare in seguito a stress ambientali e siccità. Il possibile ruolo del cambiamento climatico sulla qualità e sicurezza degli alimenti fermentati potrebbe essere oggetto di studi successivi. Un possibile effetto positivo sul valore nutraceutico delle olive, dovuto ai lieviti inoculati con LAB, può essere associato con una presenza significativa nel prodotto finale di idrossitirosolo, che, essendo una molecola terapeutica contro malattie degenerative e cardiovascolari, conferisce un elevato valore nutraceutico alle olive. Ulteriori studi sulle diverse

combinazioni di ceppi di lieviti e lattobacilli selezionati potrebbero permettere di ottenere prodotti con alto valore nutraceutico.

## Bibliografia

1. R. Ambra, F. Natella, C. Bello, S. Lucchetti, V. Forte, and G. Pastore, 2017. "Phenolics fate in table olives (*Olea europaea* L. cv. Nocellara del Belice) debittered using the Spanish and Castelvetro methods," *Food Res. Int.*, vol. 100, no. July, pp. 369–376, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.027.
2. B. Lanza, M. Zago, S. Di Marco, G. Di Loreto, M. Cellini, F. Tidona, B. Bonvini, M. Bacceli, and N. Simone, 2020. "Single and multiple inoculum of lactiplantibacillus plantarum strains in table olive lab-scale fermentations," *Fermentation*, vol. 6, no. 4, 2020, doi: 10.3390/fermentation6040126.
3. G. Bleve, M. Tufariello, M. Durante, E. Perbellini, F.A. Ramires, F. Grieco, M.S. Cappello, S. De Domenico, G. Mita, M. Tasioula-Margari, and A.F. Logrieco, 2014. "Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. OCT, pp. 1–18, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00570.
4. A. Chytiri, M. Tasioula-Margari, G. Bleve, V. G. Kontogianni, A. Kallimanis, and M. G. Kontominas, 2019. "Effect of different inoculation strategies of selected yeast and LAB cultures on Conservolea and Kalamàta table olives considering phenol content, texture, and sensory attributes," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 100, no. 3, pp. 926–935, 2019, doi: 10.1002/jsfa.10019.
5. E. Medina, A. García, C. Romero, A. De Castro, and M. Brenes, 2009. "Study of the anti-lactic acid bacteria compounds in table olives," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 7, pp. 1286–1291, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.01950.x.
6. G. Bleve, M. Tufariello, M. Durante, F. Grieco, F.A. Ramires, G. Mita, M. Tasioula-Margari, and A.F. Logrieco, 2015. "Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters," *Food Microbiol.*, vol. 46, pp. 368–382, 2015, doi: 10.1016/j.fm.2014.08.021.
7. M. Fibiani, D. Paolo, F. Leteo, G. Campanelli, V. Picchi, G. Bianchi, and R. Lo Scalzo, 2022. "Influence of year, genotype and cultivation system on nutritional values and bioactive compounds in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)," *Food Chem.*, vol. 389, no. January, p. 133090, 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133090.
8. B. Lanza, S. Di Marco, M. Bacceli, M.G. Di Serio, G. Di Loreto, M. Cellini, and N. Simone, 2021. "Lactiplantibacillus plantarum used as single, multiple, and mixed starter combined with candida boidinii for table olive fermentations: Chemical,

textural, and sensorial characterization of final products," *Fermentation*, vol. 7, no. 4, 2021, doi: 10.3390/fermentation7040239.

9. J. Wang, Y. M. Kim, H. S. Rhee, M. W. Lee, and J. M. Park, "Bioethanol production from mannitol by a newly isolated bacterium, *Enterobacter* sp. JMP3," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 199–206, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.012.

10. K. Zarour and P. L., Nuria Vieco, A. Pérez-Ramos, M. Náchter-Vázquez, M.L. Mohedano, *Food Ingredients Synthesized by Lactic Acid Bacteria*. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-811520-6/00004-0.

# Ocratossina A e Aflatossine: valutazione adattamento del test ELISA alla “matrice olive”

**A. Cammerata\*<sup>1</sup>, V. Del Frate<sup>1</sup>, T. Monforte<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari Via Manziana, 30, 00189 Roma

<sup>2</sup> Agenzia delle Dogane e dei Monopoli- Direzione regionale per la Sicilia- Laboratorio analisi e servizi chimici - Laboratorio chimico di Palermo- Via F. Crispi, 143 - Palermo

## Introduzione

Nelle Regioni del bacino mediterraneo l'oliva (*Olea europaea L.*) e i suoi derivati rivestono un'importanza strategica quanto a produzione, consumo e commercio. In quest'area, infatti, si concentra la quasi totalità della produzione mondiale di olio d'oliva con Italia, Spagna e Grecia che detengono più dell'80% dell'*output* totale. Una corretta conservazione e sanificazione di questi prodotti, soprattutto nella fase antecedente l'immagazzinamento delle merci, rappresentano il giusto approccio preventivo per evitare che le micotossine contaminino irrimediabilmente la materia prima.

La presenza di micotossine negli alimenti costituisce infatti, sia per l'uomo che per gli animali, un importante problema igienico-sanitario che va gestito perché, a posteriori, non esiste un metodo efficace per rimuovere tale contaminazione. Si consideri che le micotossine sono prodotti secondari del metabolismo fungino piuttosto stabili e quindi resistenti ai trattamenti di decontaminazione. Per questo motivo, una volta prodotte, tendono a permanere sul substrato anche in assenza del fungo produttore.

Le olive da tavola costituiscono un tipo di materia prima non esente dal rischio di contaminazione da parte di funghi potenzialmente tossigeni (in grado cioè di produrre composti tossici come le micotossine in una o più fasi del ciclo produttivo).

Le olive possono essere contaminate da un'ampia varietà di specie fungine, comprese quelle potenzialmente tossigene appartenenti ai generi *Aspergillus* (es.:



*A. flavus* e *A. parasiticus*, produttori di aflatossine e *A. ochraceus*, produttore di ocratossina A) e *Penicillium* (es.: *P. verrucosum*, produttore di ocratossina A) [1, 2, 3, 4] (Fig. 1).

Ai fini del miglioramento della qualità igienico-sanitaria del prodotto finale e della protezione del consumatore, è fondamentale ottimizzare le fasi del processo di trasformazione, come tutela alla salvaguardia dal rischio di esposizione all'assunzione di metaboliti tossici attraverso il consumo di olive da tavola contaminate.

L'insieme delle aflatossine di tipo B1, B2, G1 e G2, metaboliti fungini secondari altamente tossici verso gli animali e l'uomo per le caratteristiche di cancerogenicità, genotossicità e mutagenicità, è stato classificato dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) come "carcinogeniche per l'uomo" (Group 1) mentre l'ocratossina A, marcatamente nefrotossica, è stata classificata come "possibile carcinogenico per l'uomo" (Group 2B) [5].

Le aflatossine (AFLA) sono composti organici molto stabili e quindi particolarmente resistenti alla degradazione e ai sistemi di detossificazione di tipo fisico e chimico delle derrate. L'azione tossica sugli organismi animali è dovuta principalmente all'interazione di queste molecole con gli acidi nucleici cellulari, con conseguenti effetti dannosi soprattutto a carico della loro integrità, della sintesi proteica e della regolazione dell'espressione genica. Per tali motivi questo tipo di micotossine, in particolare l'aflatoxina B1, hanno caratteristiche di mutagenicità e teratogenicità e sono considerate i più potenti agenti carcinogeni di origine naturale [6].

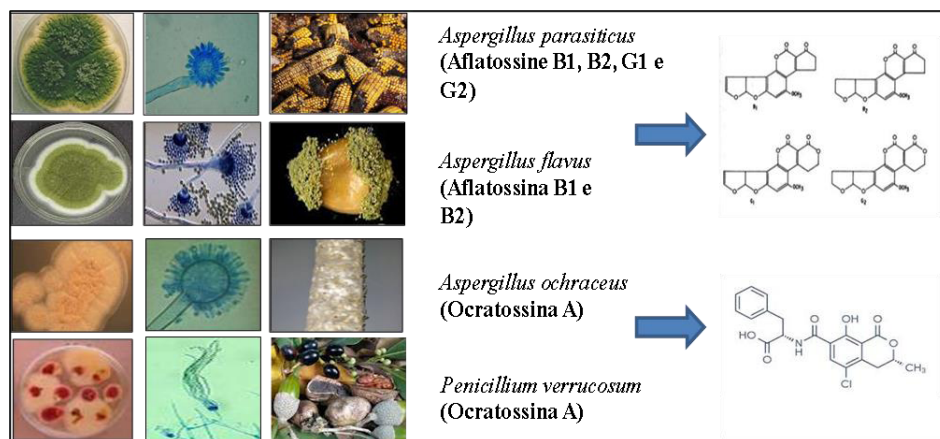
Il gruppo delle ocratossine comprende nove micotossine; tra queste, l'ocratossina A (OTA) è la molecola meglio caratterizzata e con tossicità più elevata. Sono molecole solubili in solventi organici polari e in soluzioni debolmente basiche. Possono essere prodotte su numerosi tipi di alimenti (tra questi anche le olive, sia prima che dopo la raccolta) a seguito di contaminazione da parte dei funghi potenzialmente produttori. I livelli massimi ammissibili di ciascun tipo di micotossina sono regolamentati negli alimenti dalla normativa europea [7, 8].

Nel prodotto "olive da mensa", l'insorgenza di cariche microbiologiche elevate e la crescita di microrganismi patogeni e potenzialmente produttori di micotossine,

hanno suggerito lo spunto per poter individuare una tecnica rapida per l'identificazione della qualità igienico-sanitaria del prodotto stesso (anche se i metodi di elezione per l'identificazione e la determinazione della concentrazione di micotossine sono generalmente di tipo cromatografico - HPLC, GC, ecc.). Tuttavia, anche i metodi di tipo immunoenzimatico (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* - ELISA) possono essere impiegati nella fase preliminare di *screening* dei campioni contaminati per poi procedere con le metodiche cromatografiche di conferma.

L'attività di ricerca, svolta nei laboratori del Centro CREA-IT di Roma nell'ambito del progetto DEAOOLIVA, è stata appunto incentrata sulla valutazione dell'applicabilità del metodo ELISA per la rilevazione delle due micotossine più diffuse nelle derrate alimentari: le aflatossine e l'ocratossina A (potenziali contaminanti anche delle olive).

Si è provveduto, pertanto, alla messa a punto del metodo di estrazione delle micotossine sopracitate, partendo dalle olive da tavola per ottenere una pasta di olive dalla quale si è valutata la concentrazione delle ocratossine e aflatossine attraverso l'uso di kit commerciali.



**Figura 1.** Aflatossine e ocratossina A e i principali funghi produttori.

## Materiali e metodi

Le prove sono state condotte sui seguenti campioni, forniti al nostro laboratorio dalla ditta Ficacci (4 invii ogni sei mesi per 3 lotti) e successivamente stoccati in cella frigorifera a 4°C, così da preservarne la conservazione:

1° invio

- Nocellara del Belice (metodo Castel Vetrano) n. dei lotti (335/20-402/20-409/20)
- Nocellara Etna (metodo Naturale) n. dei lotti (217/20-233/20-259/20)
- Bella di Cerignola (metodo Sivigliano) n. dei lotti (A-B-C senza identificazione)
- Itrana Bianca (metodo Naturale) n. dei lotti (492/19-499/19-502/19)

2° invio

- Nocellara del Belice (metodo Castel Vetrano) n. dei lotti (335/20-402/20-409/20)
- Nocellara Etna (metodo Naturale) n. dei lotti (217/20-233/20-259/20)
- Bella di Cerignola (metodo Sivigliano) n. dei lotti (049/20-074/20-161/20)
- Itrana Bianca (metodo Naturale) n. dei lotti (492/19-499/19-502/19)

3° invio:

- Nocellara del Belice (metodo Castel Vetrano) n. dei lotti (408/21-422/21-474/21)
- Corservolea Nera (metodo californiano 1° essiccazione) n. dei lotti (024/22-047/22-056/22)
- Bella di Cerignola (metodo Sivigliano) n. dei lotti (033/21-326/21-341/21)
- Itrana Bianca (metodo californiano denoccolato) n. dei lotti (002/2-182/22-498/21)

4° invio:

- Nocellara del Belice (metodo Castel Vetrano) n. dei lotti (408/21-422/21-474/21)
- Hojiblanca Nera (metodo californiano denoccolato) n. dei lotti (002/22-182/22-498/22)
- Bella di Cerignola (metodo Sivigliano) n. dei lotti (033/21-326/21-341/21)
- GR 2177 (metodo californiano denoccolato) n. dei lotti (un solo lotto)

Come da protocollo, per tutti i campioni è stato effettuato un campionamento

rappresentativo da cui sono state ottenute paste di olive utili per l'estrazione e le analisi delle micotossine (Ocratossine e Aflatossine). Le paste di olive sono state ottenute attraverso l'uso di due strumenti: Ultra Turrax (IKA mod. T18 digital) ed un macinacaffè commerciale. Dopo l'omogeneizzazione, il campione è stato suddiviso in due falcon: una per le analisi con il metodo ELISA; l'altra per l'invio all'Agenzia Dogane Monopoli di Palermo che ha effettuato le analisi sulle due micotossine attraverso il metodo ufficiale in HPLC.

Per il metodo ELISA sono stati utilizzati i seguenti kit ELISA del tipo diretto-competitivo: Veratox<sup>®</sup> for Aflatoxin (Neogen, product 8030), AgraQuant<sup>®</sup> Total Aflatoxin 4/40 ELISA kit (Romer Labs, article number 100002098/100002099), Veratox<sup>®</sup> for Ochratoxin (Neogen, product 8610), AgraQuant<sup>®</sup> Ochratoxin 2/40 ELISA kit (Romer Labs, article number 100002102/100002103).

Le prove di recupero da matrici fortificate con quantità note di micotossina sono state effettuate con l'uso di soluzioni standard (STD): AFLATOXIN B1 (BIOPURE<sup>®</sup>) 2 ug/ml x 1 ml (cod. 10003652), Mix 5 AFLATOXINS (BIOPURE<sup>®</sup>, 0,25 ug/ml x1 ml (cod. 10003657) e OCHRATOXIN A 10 ug/ml (BIOPURE<sup>®</sup>) x 1 ml (cod. 10003658); sono stati utilizzati inoltre i seguenti solventi organici: diclorometano - CAS 75-09-2 (grado analitico RPE o ACS, Honeywell) e metanolo - CAS 67-56-1 (≥ 99.8%, AnalaR NORMAPUR<sup>®</sup> ACS, VWR); l'acqua deionizzata è stata ottenuta tramite un'apparecchiatura di deionizzazione in continuo (Water Purification System Zeener Power I, Human Corporation, Seoul, Korea). I dati di assorbanza sono stati ottenuti con l'uso di un lettore per micropiastre (Sirio-S Microplate Reader (SEAC, Radim Group, Firenze, Italia)). La fase di essiccazione dei campioni è stata effettuata con il Rotavapor Büchi (mod. T-114). Per la filtrazione sono stati usati i filtri Whatman n. 1 (Ø 100 mm). L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il software R Core Team 9 (pacchetto "Agricolae"), per lo sviluppo delle analisi ANOVA e per la preparazione dei grafici [9, 10].

## **Risultati e discussione**

Nella fase preliminare è stata ottimizzata la preparazione del campione per la successiva fase di estrazione secondo le metodiche dei kit. In particolare, sono state allestite prove in parallelo sia su campioni sottoposti a schiacciamento manuale nel mortaio fino ad ottenere una pasta grossolana, ma sufficientemente omogenea, che su campioni ridotti a "pasta" di olive tramite macinazione

meccanica a bassa temperatura. Quest'ultimo tipo di macinazione è stato effettuato attraverso l'uso di due apparecchiature (Ultraturrax e macinacaffè commerciale) al fine di valutare con quale delle due si ottenesse la migliore condizione operativa (consistenza della pasta di olive e facilità di pulizia dell'apparecchiatura): la scelta è ricaduta sul macinacaffè commerciale. Le prove sono state effettuate su tre campioni commerciali che hanno dimostrato la migliore efficienza dell'uso della "pasta" di olive soprattutto in relazione alla minore grandezza delle particelle di matrice ottenute, caratteristica che favorisce una maggiore rappresentatività dei singoli sub-campionamenti per le analisi successive. Per quanto riguarda la determinazione dell'ocratossina A, dai risultati ottenuti sui "bianchi" nei test preliminari non sono state rilevate interferenze nel riconoscimento antigene-anticorpo per entrambi i kit utilizzati; i livelli di assorbanza ottenuti sono stati nettamente al di sotto del limite di quantificazione dei metodi (Veratox<sup>®</sup>: LOQ= 2 µg/kg; AgraQuant<sup>®</sup>: LOQ= 2 µg/kg). A conferma della mancanza di interferenti per l'anticorpo specifico, sono state allestite delle prove di fortificazione direttamente sugli estratti ottenuti secondo le metodiche.

Tuttavia, il passaggio successivo relativo alle prove di recupero sui suddetti campioni di pasta di olive verdi, addizionate con quantità note di ocratossina A, non ha dato risultati soddisfacenti, o comunque paragonabili a quelli riscontrati sugli estratti fortificati e i valori ottenuti non hanno dato il riscontro atteso (recupero %  $\leq 40\%$ ) per entrambi i kit.

La scarsa capacità di estrazione della micotossina è stata attribuita all'inefficacia, per questo tipo di matrice, della miscela di solventi utilizzata nei due kit. Pertanto, si è proceduto ad una revisione della metodica sia nelle procedure di estrazione che nella sostituzione della miscela di solventi organici per il trattamento dei campioni, una volta uniti alla miscela medesima. Tenuto conto dell'elevato contenuto in grassi vegetali della matrice "olive", è stato ritenuto opportuno impiegare dei solventi con una maggiore forza estraente rispetto all'alcol metilico diluito (70% v/v come riportato nelle metodiche), che invece è evidentemente sufficiente per altri tipi di matrici con caratteristiche diverse da quelle delle olive. La scelta, dunque, è ricaduta sull'uso del diclorometano come principale estraente. Sono state quindi effettuate prove preliminari di recupero dell'ocratossina A secondo la metodica modificata, utilizzando sempre gli stessi campioni commerciali. I risultati sono stati incoraggianti, con recuperi compresi tra il 55% e il

75%.

I risultati parziali sopra riportati, seppur riferiti ad un numero limitato di campioni, hanno messo in evidenza una differenza nella *performance* dei due kit riguardo sia i valori percentuali di recupero calcolati, che sulla dispersione dei valori stessi intorno alla media, confermata con le ripetizioni successive.

Per quanto riguarda la determinazione delle aflatossine totali, i risultati ottenuti sugli stessi campioni non fortificati (“bianchi”) hanno dimostrato, per entrambi i kit utilizzati, che la matrice “olive” non produce interferenze nel riconoscimento antigene-anticorpo e che, nel caso specifico, si traduce in livelli di assorbanza nettamente al di sotto del limite di quantificazione dei metodi (Veratox®: LOQ= 5 µg/kg; AgraQuant®: LOQ= 4 µg/kg).

A riprova della mancanza di interferenti per l’anticorpo specifico, sono state allestite delle prove di fortificazione degli estratti ottenuti secondo le metodiche e i risultati hanno confermato, anche in questo caso, un buon riscontro delle concentrazioni ottenute rispetto a quelle attese.

Nella valutazione dei risultati è stato tenuto conto delle diverse caratteristiche di specificità degli anticorpi utilizzati nei due differenti kit; in particolare, per quanto riguarda il kit Veratox® la specificità di reazione è maggiore nei confronti delle aflatossine B1 e B2 mentre per quanto riguarda l’AgraQuant® la percentuale di specificità verso le quattro aflatossine si articola come segue: AFLA B1 = 100%, AFLA B2 = 65%, AFLA G1 = 70% e AFLA G2 = 42%.

Le prove di recupero su campioni di pasta di olive verdi, addizionati con quantità note di aflatossine totali (20µg/kg di ciascuna delle 4 AFLA o singolarmente B1) ed effettuate secondo le modalità indicate nelle due metodiche utilizzate, hanno dimostrato una sufficiente efficacia della miscela di solventi (alcol metilico al 70% v/v in acqua) usati nell’estrazione delle micotossine con valori intorno al 55% sulle aflatossine totali (n. 3 campioni), mentre per l’aflatoxina B1 si è arrivati al 76% (n.1 campione). Tuttavia, applicando le stesse condizioni di estrazione OTA (nuova metodica) si è proceduto ad una verifica di recupero, anche per l’aflatoxina B1, per concentrazioni comprese tra 6 e 10 µg/kg. Dai risultati è emerso che, nel caso dell’AgraQuant®, le nuove condizioni di estrazione migliorano il recupero dell’AFLA B1 in confronto a quelle indicate in metodica (MetOH 70%) arrivando a superare il 90% (n. 6 campioni). Anche nel caso del Veratox® è stato ottenuto un buon recupero sugli stessi campioni e per lo stesso intervallo di concentrazione (70% circa) che conferma la validità di estrazione del metodo modificato (in

Diclorometano).

Un altro aspetto sottoposto a valutazione, riguardo l'ottimizzazione del metodo di preparazione dei campioni, ha interessato il confronto tra due tipi di trattamento del campione una volta unito al solvente di estrazione. In particolare, campioni di pasta di olive fortificati con quantità note di ocratossina A e preparati in parallelo, sono stati sottoposti sia a omogeneizzazione ad alta velocità per 1 minuto sia a passaggio su vortex (30 Hz) per 3 minuti. I risultati riferiti a concentrazioni comprese nell'intervallo tra 20 e 100 µg/kg (n =4) hanno dimostrato la non significatività ( $p < 0,05$ ) delle differenze di recupero finale di micotossina ottenute.

A conferma dei risultati ottenuti fino ad ora, sono state allestite ulteriori prove (utilizzando la metodica modificata per l'estrazione delle aflatossine e delle ocratossine) su alcuni campioni, del primo invio, forniti dalla ditta Ficacci e utili allo scopo del progetto.

Successivamente, le analisi immunoenzimatiche testate su 4 kit (2 per le OTA e 2 per le AFLA), sono state confrontate con il metodo di riferimento in HPLC mostrando una buona risposta sui negativi. Nello specifico, la situazione dei falsi positivi rimane piuttosto alta per quanto concerne le ocratossine, circa il 50% per il kit Veratox<sup>®</sup> e circa il 40 % per quello AgraQuant<sup>®</sup> (fermo restando che i negativi risultano confermati) mentre, sulle aflatossine, con il kit della Veratox<sup>®</sup>, si è ottenuto circa il 3% di falsi positivi rispetto al metodo ufficiale, invece con il kit dell'AgraQuant<sup>®</sup> circa il 30%.

A livello statistico, la concentrazione delle micotossine è stata processata con analisi della varianza (ANOVA), dopo i test preliminari di normalità ed omoschedasticità valutati sui campioni analizzati col metodo ELISA. Le concentrazioni OTA ed AFLA sono state studiate indipendentemente; per le Ocratossine si è rilevata una significatività nella differenza tra le medie delle Varietà e dei Metodi con  $p\text{-value} < 0.001$  (Tab.1 e Tab.2), mentre i due kit e le ripetizioni non hanno mostrato differenze statisticamente significative; per le Aflatossine si è rilevata una significatività nelle differenze sia tra le medie delle Varietà e dei Metodi,  $p\text{-value} < 0.001$ , che nei valori rilevati dai due Kit (Tab.3 e Tab.4). Le ripetizioni non hanno mostrato comunque differenze statisticamente significative, confermando la buona ripetibilità delle analisi.

## Conclusioni

Per quanto riguarda gli aspetti tecnici e pratici della presente ricerca, l'impiego dell'ELISA risponde senz'altro alle nuove necessità di riduzione dei costi di produzione, dei tempi di risposta e, soprattutto, all'esigenza di avere criteri di lettura oggettivi e confrontabili. Le sue *performance*, infatti, in termini di elevata sensibilità diagnostica, lo rendono particolarmente indicato come test di *screening* da impiegare nel corso di programmi di controllo (soprattutto nelle prime fasi di valutazione dove un risultato negativo eviterebbe il ricorso alla più approfondita e costosa analisi con metodo HPLC) circa la presenza o meno di contaminazione da micotossine nelle olive e nei loro derivati.

Le analisi condotte sulla pasta di olive hanno indicato che i due kit ELISA (Veratox® e AgraQuant®), utilizzati per la valutazione della concentrazione delle due micotossine (aflatossine e ocratossine), non sono completamente comparabili, ma sono in grado di rilevare e quantificare le micotossine nei vari campioni forniti. Vista la complessità della matrice alimentare oggetto dello studio, è stato fondamentale effettuare un corretto campionamento al fine di superare l'incertezza dei risultati divergenti ottenuti dai kit.

Dai nostri dati si è dimostrato che ci si può aspettare una certa variabilità all'interno dei kit, data dall'affinità anticorpo-antigene, pur confermando l'affidabilità dei test sui valori negativi.

L'importanza di aver revisionato la metodica per il trattamento dei campioni e di aver utilizzato il diclorometano come principale estraente sta nell'ottenimento del miglior recupero in percentuale, nella matrice inoculata, di ocratossine e aflatossine.

In conclusione, il metodo ELISA può essere utilizzato come metodo di *screening* iniziale, per valutare la presenza o l'assenza delle micotossine.

Solo qualora i campioni analizzati dovessero risultare positivi, si ritiene di dover effettuare un'analisi più specifica con la determinazione delle micotossine in HPLC.



**Tabella 1. ANALISI CONCENTRAZIONE OCRATOSSINA A**

Differenza significativa fra le varietà. Varietà: (Nocellara del Belice; Conservolea Nera; Itrana Bianca; Hojiblanca Nera) < (Bella di Cerignola; Nocellara Etnea). Note: Test: Anova. Ripetizioni (n=3)

<b>Casi</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Media quadratica</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Varietà	107.857	6	17.976	8.422	<0.001
Kit	0.743	1	0.743	0.348	0.556
Ripetizioni	1.429	3	0.476	0.223	0.880
Varietà * kit	39.009	6	6.501	3.046	0.006
Residui	783.299	367	2.134		

**Tabella 2. ANALISI CONCENTRAZIONE OCRATOSSINA A**

Differenza significativa fra i metodi e i kit (n=3). Metodi: (Castelvetrano; Californiano 1° essiccazione; Californiano denocciolata; Denocciolata) < (Naturale; Sivigliano). Kit: Veratox® e AgraQuant®. Ripetizioni (n=3).

<b>Casi</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Media quadratica</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Metodo	32,39	5	6.478	2.981	0.012
Kit	8.32	1	8.315	3.827	0.051
Ripetizioni	1.43	3	0.476	0.219	0.883
Metodo * kit	96.06	5	19.213	8.843	<0.001
Residui	801.71	369	2.173		

**Tabella 3. ANALISI CONCENTRAZIONE AFLATOSSINE**

Differenza significativa fra le varietà (n=3). Varietà: Itrana Bianca > (Bella di Cerignola; Conservolea Nera; Nocellara del Belice; Nocellara Etnea). Differenza significativa fra i kit: Veratox<sup>®</sup> > AgraQuant<sup>®</sup>; Test: Anova. Ripetizioni (n=3)

<b>Casi</b>	<b>Somma dei quadrati*</b>	<b>df</b>	<b>Media quadratica</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Varietà	36.553	6	6.092	5.323	<0.001
Kit	27.421	1	27.421	23.959	<0.001
Ripetizioni	1.676	3	0.559	0.488	0.691
Varietà * kit	25.228	6	4.205	3.674	0.001
Residui	420.040	367	1.145		

**Tabella 4. ANALISI CONCENTRAZIONE AFLATOSSINE**

Differenza significativa fra i metodi e i kit (n=3). Metodi: (Californiano denocciolata; Sivigliano; Californiano I essicazione) > (Naturale; Castelvetro). Differenza significativa fra i kit: Veratox<sup>®</sup> > AgraQuant<sup>®</sup>. Ripetizioni (n=3)

<b>Casi</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>df</b>	<b>Media quadratica</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Metodo	25.95	5	5.190	4.397	<0.001
Kit	38.14	1	38.141	32.309	<0.001
Ripetizioni	1.68	3	0.559	0.473	0.701
Metodo * kit	20.26	5	4.051	3.432	0.005
Residui	435.61	369	1.181		

**Bibliografia**

1. Bavaro S. L., Susca A., Frisvad J.C., Tufariello M., Chytiri A., Perrone G., Mita G., Logrieco A. F., and Bleve G., 2017. Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives *Frontiers in Microbiology* 8:1356, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01356.
2. Medina-Pradas E., and Arroyo-López F.N., 2015. Presence of toxic microbial

metabolites in table olives. *Front. Microbiol.* 6:873. doi: 10.3389/000000000000/fmicb.2015.00873.

3. Franzetti L., Scarpellini M., Vecchio A., Planeta D., 2011. Microbiological and safety evaluation of green table olives marketed in Italy. *Ann. Microbiol* 61:843–851 DOI10.1007/s13213-011-0205-x.

4. Ghitakou S., Koutras K., Kanellou E., Markaki P., 2006. Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. *Food Microbiology* 23, 612–621.

5. IARC Monographs, Volumes 1–119, last update: 28 June 2017.

6. Galvano F., Ritieni A., Piva G., Pietri A., 2005. Mycotoxins in the human food chain. In: Diaz D, editor. *Mycotoxins Blue Book*. Nottingham: Nottingham University Press. 2005. p 187.

7. European Commission (2006). Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. In: *Official Journal of the European Union*, L 364/5.

8. European Commission (2007). Commission regulation of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products, 1126/2007/EC. In: *Official Journal of the European Union*, L 255/14.

9. R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

10. De Mendiburu F., 2021. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.3-5, <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.

# Caratterizzazione della texture di olive da tavola mediante test meccanici-acustici

G. Cortellino\*, S. Paccani, F. Lovati, M. Grassi, M. Vanoli

CREA Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Milano

## Introduzione

L'oliva da tavola è ampiamente diffusa per il consumo umano in tutto il mondo. Il suo utilizzo, sia come snack, accompagnando bevande alcoliche e analcoliche, sia come alimento ad alto valore nutritivo, è esteso in tutti i mercati, soprattutto in Europa e negli Stati Uniti.

La texture, con l'aspetto, l'aroma e le proprietà nutrizionali rappresenta uno dei quattro principali fattori che definiscono la qualità di un alimento; essa origina da diverse proprietà fisiche piuttosto che da una singola, dipendendo dalla struttura cellulare e da come questa risponde alle forze applicate [1]. In particolare, per le olive da tavola la texture gioca un ruolo chiave nel caratterizzare le diverse tipologie di prodotto in commercio e nell'influenzare l'accettabilità del consumatore. Quindi, c'è molto interesse nell'individuare una procedura oggettiva per valutare questo parametro qualitativo che simuli il più possibile l'impressione soggettiva.

La texture è un attributo multiparametrico e deriva dai diversi livelli della struttura dell'alimento: macroscopica, microscopica, molecolare. La texture dei prodotti ortofrutticoli è fortemente influenzata dalle proprietà chimiche, fisiche e strutturali delle pareti cellulari, le quali attraverso l'adesione a quelle adiacenti, forniscono resistenza e protezione. Le dimensioni della parete cellulare e dalla lamella mediana, unitamente al turgore cellulare determinano le proprietà meccaniche della drupa.

I test strumentali possono rilevare e quantificare solo alcuni parametri fisici che poi devono essere interpretati in termini di percezione sensoriale. La texture viene rilevata da diversi sensi, i più importanti sono quelli del tatto e della pressione [1].

Test meccanici sono stati messi a punto da diversi autori per valutare i diversi aspetti della texture. La letteratura di settore riporta che sono stati applicati

prevalentemente test meccanici di compressione, il più comune dei quali si basa sull'utilizzo di un puntale del diametro di 1 cm che comprime ortogonalmente un'oliva posizionata orizzontalmente sul piano dello strumento con una forza (0,5 - 1 kg) e un tempo definiti (15-30 secondi). Il parametro acquisito è la deformazione subita dalla drupa, che aumenta con lo stadio di maturazione [2] e con il processo di deamarizzazione [3], indicando un ammorbidimento del frutto. Catania et al. [4] hanno sottoposto la drupa a una compressione utilizzando un piatto del diametro di 16 mm e una velocità costante di 0,125mm/s, registrando la forza necessaria a raggiungere il valore limite di 200 N per evitare di rompere il nocciolo. Con questo metodo, gli autori hanno osservato un aumento progressivo della forza necessaria per comprimere la drupa man mano che si procede verso il nocciolo, dimostrando che lo strato più interno vicino al nocciolo è costituito da una polpa più consistente e che lo strato esterno, a contatto con la salamoia è più morbido. Tutti questi metodi sono stati applicati alla drupa intera, mentre Mafra et al. [2] hanno utilizzato un test di compressione per valutare la consistenza della polpa interna misurando la forza necessaria per inserire un puntale del diametro di 2 mm alla profondità di 5 mm direttamente nel mesocarpo di un frutto tagliato trasversalmente e posizionato verticalmente sul piano dello strumento. Lanza e Amoruso [5] hanno utilizzato un particolare test denominato "Texture Profile Analysis - TPA", che consiste in una doppia compressione della drupa, che permette l'acquisizione contemporanea di diversi parametri, quali durezza, elasticità, coesività, adesività, gommosità, masticabilità.

La texture di un prodotto è percepibile non solo mediante recettori meccanici ma anche uditivi. Negli anni Sessanta studiando i segnali acustici (ampiezza e tempo) prodotti durante la masticazione per un'ampia gamma di frequenze, è stato introdotto il concetto che le sensazioni uditive sono connesse con la percezione della texture. Vickers e Bourne [6] furono i primi a formulare una teoria psicoacustica della croccantezza.

Le caratteristiche strutturali del tessuto cellulare hanno un grande impatto sui suoni prodotti quando un alimento viene morso. I prodotti umidi sono composti da cellule turgide con pareti cellulari elastiche. Il turgore è creato dalla pressione del liquido contenuto internamente sulla parete [6]. Quando le cellule vengono rotte, il contenuto si espande rapidamente e viene prodotta un'onda di pressione sonora. Questo suono è responsabile della percezione della croccantezza. Tuttavia, la

croccantezza non è solo correlata al livello di umidità del contenuto cellulare, ma anche a come le cellule aderiscono fra di loro.

Per esempio, quando una mela croccante viene morsa, viene creato un certo suono dalla rottura sia delle cellule sia della lamella mediana che le collega. Quando si addenta una mela non croccante e farinosa, un debole suono deriva solo dalla rottura della lamella mediana, in quanto le cellule non si rompono ma scivolano fra di loro. Questo fenomeno è dovuto principalmente alla solubilizzazione della pectina e alla conseguente perdita di forza che collega le cellule. L'emissione acustica è stata descritta come uno strumento analitico complementare per la rilevazione della croccantezza della mela [7]. Cortellino et al. [8] hanno utilizzato con successo il test meccanico-acustico per valutare i cambiamenti di consistenza in mele di IV gamma. Le tecniche di misurazione del suono, prevalentemente distruttive, consistono nella registrazione dei suoni prodotti dalla compressione strumentale di sonde o durante la masticazione.

Nell'ambito del Progetto DEAOLIVA sono stati applicati alcuni test strumentali meccanici-acustici al fine di migliorare la valutazione strumentale della texture di olive da mensa, con particolare attenzione alla caratteristica della croccantezza.

## **Materiale e metodi**

### ***Materia prima***

Per queste prove sono stati utilizzati campioni commerciali (Fig. 1), forniti dall'azienda Romeo Ficacci srl (Castel Madama, RM) in buste contenenti la propria salamoia di conservazione. I campioni si differenziavano per cultivar, metodo di lavorazione e temperatura di conservazione. Per ogni cultivar sono stati analizzati tre differenti lotti. Le specifiche di ogni tesi sono riportate in Tab. 1.

**Tabella 1.** Cultivar, metodi lavorazione, temperatura di conservazione e codice lotti dei campioni commerciali di olive da tavola analizzati

Cultivar	Metodo di lavorazione	Temperatura Conservazione	Lotto
Bella di Cerignola	Sivigliano	Ambiente	135/2020 049/2020 074/2020
Itrana Bianca	Naturale	Ambiente	499/2019 492/2019 202/2019
Nocellara del Belice	Castelvetrano	Refrigerata	402/2020 339/2020 415/2020
Nocellara Etna	Naturale	Ambiente	259/2020 233/2020 217/2020



**Figura 1.** Campioni commerciali di olive da tavola

### ***Analisi della texture***

Le analisi della texture sono state eseguite mediante tre test di compressione (ago, puntale, TPA) su 20 olive con nocciolo per ciascun lotto, per un totale di 60 frutti per cultivar. L'analisi mediante test di compressione/taglio (Kramer Shear Press) è stata eseguita su 50 g di olive denocciolate, per sei repliche per lotto per un totale di 12 repliche per cultivar.

### *Test di compressione con ago e puntale*

Per i test di compressione con ago e puntale (Fig. 2 e 3) è stato utilizzato lo strumento TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Godalming, UK) dotato di una cella di carico da 50 N e di un rilevatore di emissioni acustiche (AED, Stable Micro Systems). Sono state utilizzate due differenti sonde: una del diametro di 2 mm, con forma appuntita simile ad un “ago”, e l'altra con diametro di 4 mm di forma cilindrica simile a un “puntale”. Le sonde sono state fatte scendere fino a perforare l'oliva.

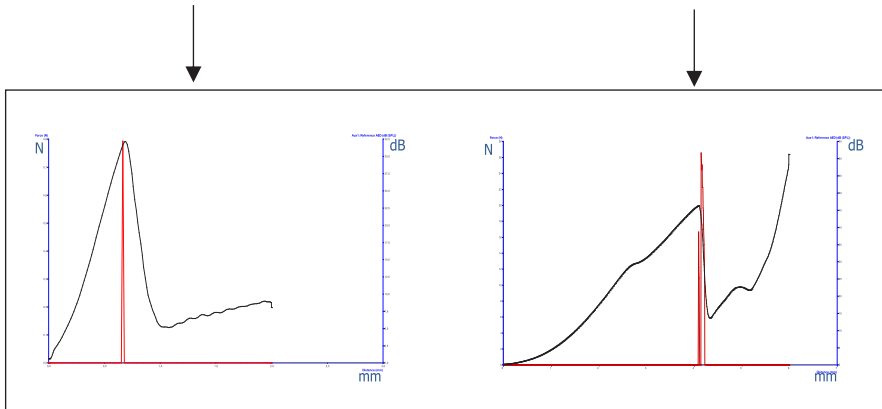
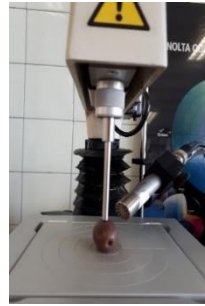
Per misurare la pressione sonora, un microfono (Tipo 4188-A-021, Brüel & Kjær), posizionato a circa 1 cm di distanza dal campione, è stato collegato all'AED. Per la calibrazione del sistema è stato utilizzato il calibratore sonoro Brüel & Kjær Tipo 4231 a livelli di pressione sonora di 94 e 114 dB a 1000Hz. Le caratteristiche meccaniche e acustiche sono state estratte dai dati utilizzando il software Texture Exponent 32 (Stable Micro Systems). Tutti i test sono stati eseguiti in un laboratorio privo di speciali dispositivi di insonorizzazione a temperatura ambiente. Le curve forza/spostamento e suono/spostamento sono state acquisite simultaneamente.

Dalla curva di forza sono stati estratti i seguenti parametri: *durezza* corrispondente alla forza massima (durezza, N), *fratturabilità* corrispondente alla distanza (mm) alla quale si verifica la forza massima, *indice di rigidità* corrispondente alla pendenza della curva di forza ( $dF/dS$ , N/mm) e *lavoro* necessario per perforare l'oliva (Area, Nxmm). Dalla curva sonora sono stati estratti il numero di picchi acustici e il loro livello di pressione acustica (SPL espressa in dB)





**Figura 2.** Test di compressione con ago (sx) e puntale (ds)

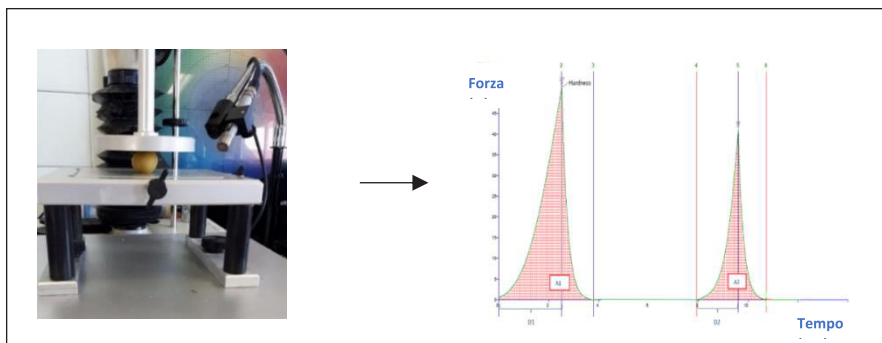


**Figura 3.** Profilo meccanico (forza/N vs. spostamento/mm; nero) e acustico (livello di pressione del suono/dB vs spostamento/mm; rosso) ottenuto mediante compressione di un'oliva con un ago (sx) e con un puntale (ds).

### *Texture Profile Analysis (TPA)*

Per questo test, come per i precedenti, è stato utilizzato lo strumento TA-XT Plus Texture Analyzer. Le olive sono state sottoposte ad un doppio ciclo di compressione, intervallato da una pausa di 2 sec, utilizzando come sonda un piatto del diametro di 75 mm (Fig. 4). Il frutto viene compresso per il 15% della sua dimensione iniziale con una velocità di 1 mm/sec. Con questo test non è stato acquisito il profilo acustico, poiché la lieve compressione implica che la drupa non produca picchi acustici. Dal profilo meccanico (Fig. 4) si ottengono i seguenti parametri: *durezza* (N - forza massima registrata nel primo ciclo di compressione);

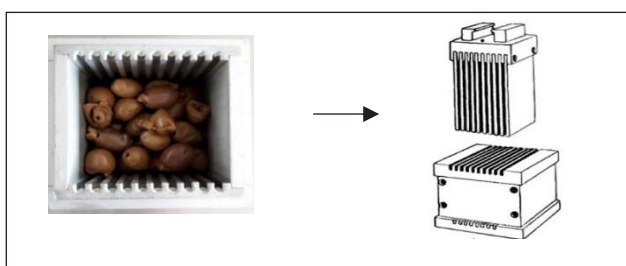
*elasticità* (rapporto fra le distanze  $D_2/D_1$ ); *coesività* (rapporto tra le aree  $A_2/A_1$ ); *gommosità* (durezza x coesività) e *masticabilità* (durezza x coesività x elasticità)



**Figura 4.** TPA e relativo profilo meccanico ottenuto mediante doppia compressione di un'oliva.

#### *Test Kramer Shear-Press*

Per la prova di compressione/taglio è stato utilizzato un dinamometro (Instron, mod. 4301, UK), con un sistema di Shear Press, dotata di una cella inferiore di compressione-scorrimento contenente il campione e di una parte superiore a multi-lame (Fig. 5). L'unità di taglio a 5 lame si muove a velocità costante (100 mm/min) attraverso il materiale da testare, comprimendo, tagliando ed estraendo il campione attraverso la piastra base forata. Il risultato acquisito è la forza necessaria per estrarre il campione ed il risultato è espresso come N/g campione. Questo test è molto utilizzato nell'industria alimentare poiché è quello che meglio simula la masticazione di un prodotto.



**Figura. 5** Cella di Kramer

### ***Analisi sensoriale***

Le olive sono state sottoposte anche ad analisi sensoriale. Per ogni serie di assaggi (3 serie, 4 cv/1 lotto), nella medesima mattinata sono state organizzate due sessioni di assaggio, in ciascuna delle quali sono stati presentati 2 campioni in ordine randomizzato e codificati mediante un numero di tre cifre. Gli assaggi sono stati effettuati a temperatura ambiente utilizzando bicchieri standard codificati, nei quali i campioni erano immersi nella salamoia di conservazione.

Le caratteristiche sensoriali delle olive da mensa sono state valutate da un panel di 10 assaggiatori, in accordo con quanto descritto dallo standard *COI/OT/MO No. 1/Rev.2 Method for the sensory analysis of table olives* [9]. Il metodo prevede la valutazione di attributi e difetti negativi (fermentazione putrida/butirrica, zapateria, etc), caratteristiche gustative (salato, amaro, acido) e di texture (durezza, fibrosità, croccantezza). La scheda presenta delle scale non strutturate di 10 cm di lunghezza, i cui estremi corrispondono a 1 (non percezione) e a 11 (massima percezione), dove l'assaggiatore indica l'intensità di ogni descrittore.

Precedentemente il panel era stato opportunamente selezionato ed addestrato secondo il protocollo descritto da Lanza & Amoroso [10], che prevede l'utilizzo di standard di riferimento, individuati in due concentrazioni (attributi gustativi) o due prodotti (attributi di texture), i cui valori mediani sono rispettivamente posizionati nella parte bassa e alta della scala.

Per l'elaborazione dei dati sensoriali, è stato utilizzato il metodo descritto nell'allegato 1 del *COI/OT/MO/Doc.No.1/Rev.2* [9] per calcolare la mediana (Me).

### ***Analisi statistica***

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software Statgraphics v.5.2 (Manugistic Inc., Rockville, MD, USA). È stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) (significatività: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ) e il test di Tukey per determinare le differenze statisticamente significative ( $P \leq 0,05$ ) tra le medie, indicate nei risultati con lettere diverse. I risultati, eccetto quelli relativi all'analisi sensoriale, sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

## Risultati e discussione

Le caratteristiche di texture sono determinate sia dalla cultivar che dal metodo di deamarizzazione alla quale sono sottoposte le olive. La combinazione cultivar/metodo ha un'influenza altamente significativa su tutti i parametri meccanici acquisiti mediante i tre test strumentali.

Relativamente al test di compressione con ago, considerate le dimensioni molto ridotte e la forma appuntita della sonda utilizzata, oltretutto il tracciato meccanico ottenuto (Fig. 3), che vede un rapido incremento seguito da un altrettanto rapido decremento della forza, si può ragionevolmente ipotizzare che i parametri acquisiti siano riconducibili alle caratteristiche della buccia piuttosto che della polpa.

I risultati indicano che la cv Itrana Bianca, se comparata con le altre cv, si distingue per la durezza della buccia più elevata (Tab. 2) e per il più elevato lavoro necessario per perforarla. La medesima cv risulta caratterizzata anche dal più alto valore di fratturabilità e da un indice di rigidità medio. La cv Nocellara Etnea, presenta anch'essa un indice di fratturabilità elevato, che in questo caso è dovuto al fatto che l'oliva presentandosi già spaccata fa sì che il nocciolo non sia bloccato all'interno della polpa, interferendo con la valutazione di alcuni parametri di texture. La Bella di Cerignola e la Nocellara Etnea si evidenziano rispettivamente per la maggiore e minore rigidità della buccia. Nel complesso la Bella di Cerignola e la Nocellara del Belice, eccetto che per l'indice di rigidità, presentano caratteristiche molto simili.

I parametri acquisiti mediante test meccanico con puntale (Tab. 3), considerate le dimensioni e la forma cilindrica della sonda, il tracciato meccanico che presenta un incremento della forza meno rapido rispetto al test con ago, possono essere ricondotti alla somma delle caratteristiche della buccia e della polpa.

**Tabella 2.** Parametri meccanici e n° di olive che producono eventi acustici/ 60 frutti valutati mediante test di compressione con ago

Campione	Durezza (N)	Fratturabilità (mm)	Lavoro (N*mm)	Indice di rigidità (N/mm)	n° olive
Bella di Cerignola	0,53 ± 0,09 a	0,65 ± 0,07 a	0,13 ± 0,03 a	0,79 ± 0,13 c	-
Itrana Bianca	0,80 ± 0,13 b	1,27 ± 0,29 b	0,39 ± 0,08 c	0,66 ± 0,21 b	5
Nocellara del Belice	0,52 ± 0,09 a	0,74 ± 0,10 a	0,15 ± 0,04 a	0,68 ± 0,14 b	-
Nocellara Etnea	0,53 ± 0,14 a	1,21 ± 0,26 b	0,29 ± 0,11 b	0,44 ± 0,13 a	1
Significatività	***	***	***	***	

In particolare, si evidenziano delle differenze per il parametro durezza e lavoro rispetto a quanto riscontrato per il test con ago, in quanto la cv Bella di Cerignola presenta il valore più alto per entrambi i parametri, anche se non statisticamente diversi dai rispettivi dell'Itrana Bianca. Questi risultati sono indicativi di una struttura più compatta della polpa. I dati riguardanti l'indice di rigidità rispecchiano i trend evidenziati nel test con ago.

Dall'analisi di entrambi i tracciati meccanico-acustici (Fig. 3) si può notare che il picco acustico è rilevato in corrispondenza della forza massima: questa simultaneità suggerisce la possibilità che il suono sia prodotto dalla rottura della buccia. Con la compressione con ago un numero estremamente (n=6) limitato di frutti produce un evento acustico (Tab. 2), mentre con il puntale (Tab. 3) si registra un numero maggiore (n=43). La cv Itrana Bianca risulta essere quella che produce il maggior numero di suoni, in particolare con il test con puntale, estremamente superiore a tutti gli altri campioni. Al contrario la Bella di Cerignola non produce alcun suono con entrambi i test, mentre Nocellara del Belice e Nocellara Etnea si comportano in modo simile producendo pochissimi eventi solo con il puntale.

**Tabella 3.** Parametri meccanici e n° di olive che producono eventi acustici/ 60 frutti valutati mediante test di compressione con puntale

Campione	Durezza (N)	Fratturabilità (mm)	Lavoro (N*mm)	Indice di rigidità (N/mm)	n° olive
Bella di Cerignola	18,72 ± 3,10 c	3,49 ± 0,62 b	31,98 ± 8,87 b	5,43 ± 1,01 c	-
Itrana Bianca	17,19 ± 3,36 c	4,02 ± 0,63 c	30,26 ± 5,55 b	4,44 ± 1,36 b	30
Nocellara del Belice	13,26 ± 3,06 b	2,80 ± 0,38 a	18,01 ± 5,69 a	4,72 ± 1,02 b	6
Nocellara Etnea	10,42 ± 3,75 a	5,22 ± 1,04 d	27,76 ± 12,97 b	2,00 ± 0,68 a	7
Significatività	***	***	***	***	

Il test TPA valuta i parametri sostanzialmente relativi alla texture della polpa della drupa. I valori riscontrati per la durezza valutata mediante TPA rispecchiano solo in parte quanto osservato con il test con puntale, in quanto la cv Bella di Cerignola si conferma la più dura, mentre l'Itrana Bianca si dimostra meno dura rispetto alla Nocellara del Belice, contrariamente a quanto osservato con il test con puntale (Tab. 4). Ciò è dovuto al fatto che il test con il puntale valuta la texture della buccia e della polpa insieme mentre la TPA valuta solo la polpa. Questa considerazione avvala ulteriormente l'ipotesi che la cv Itrana Bianca sia caratterizzata da una buccia più consistente. Inoltre, la Bella di Cerignola risulta anche la più gommosa e richiede maggior forza per essere masticata (Tab. 4). La cv Nocellara Etnea risulta la meno dura, la più elastica, la meno gommosa e richiede la minor forza per la masticazione (Tab. 4): come già evidenziato precedentemente, la polpa fratturata interferisce con la valutazione delle caratteristiche di texture, in particolare quelle analizzate mediante TPA.

**Tabella 4.** Parametri valutati mediante TPA

Campione	Durezza (N)	Elasticità	Coesività	Gommosità (N)	Masticabilità (N)
Bella di Cerignola	57,49 ± 13,04 d	0,51 ± 0,04 a	0,48 ± 0,02 b	27,52 ± 6,82 c	14,11 ± 4,06 d
Itrana Bianca	26,80 ± 9,98 b	0,79 ± 0,13 b	0,52 ± 0,06 c	13,51 ± 3,95 b	10,26 ± 2,00 c
Nocellara del Belice	36,52 ± 8,19 c	0,55 ± 0,04 a	0,41 ± 0,03 a	14,94 ± 3,77 b	8,29 ± 2,72 b
Nocellara Etnea	6,59 ± 2,64 a	1,01 ± 0,23 c	0,58 ± 0,08 d	3,74 ± 1,27 a	3,70 ± 1,33 a
Significatività	***	***	***	***	***

La Kramer Shear-press, essendo un tipo di test che prevede sia la compressione che il taglio, valuta le caratteristiche di texture della drupa date dall'insieme della polpa e della buccia. Inoltre, considerato che questo test viene effettuato su olive denocciolate, permette un reale confronto della cv Nocellara Etnea (caratterizzata da olive spaccate) con le altre cv. La cv Bella di Cerignola risulta la più consistente, la cv Nocellara del Belice e la cv Nocellara Etnea presentano valori simili e inferiori rispetto alle altre cultivar, mentre la cv Itrana bianca mostra caratteristiche intermedie (Tab. 5). Nel complesso i risultati confermano il trend evidenziato dai dati delle durezza ottenute con il test di compressione con il puntale, eccetto la cv Nocellara Etnea, che, risulta simile alla Nocellara del Belice.

**Tabella 5.** Durezza valutata mediante test meccanico Kramer Shear-Press

Campione	Durezza (N/g campione)
Bella di Cerignola	42,94 ± 2,84 c
Itrana Bianca	38,24 ± 2,94 b
Nocellara del Belice	26,37 ± 1,37 a
Nocellara Etnea	24,71 ± 2,75 a
Significatività	***

Per quanto riguarda l'analisi sensoriale, si riportano solo i risultati relativi alle caratteristiche di texture: durezza, fibrosità e croccantezza (Tab. 6). I parametri considerati risultano significativamente influenzati dalla cultivar/metodo di processo, eccetto la fibrosità che è giudicata piuttosto simile dagli assaggiatori.

Gli assaggiatori individuano la Bella di Cerignola come la più dura e la Nocellara Etnea come la meno dura, mentre le altre due cv risultano caratterizzate da una durezza intermedia. Relativamente al parametro croccantezza, eccetto la Nocellara Etnea che è stata giudicata la meno croccante, le altre cv mostrano valori simili, con la cv Itrana Bianca caratterizzata da un valore medio inferiore ma non significativamente differente dalle altre due cv.

**Tabella 6.** Valutazione sensoriale della texture. Dati espressi come media delle mediane relative ai tre lotti.

<b>Campione</b>	<b>Durezza</b>	<b>Fibrosità</b>	<b>Croccantezza</b>
Bella di Cerignola	6,41±0,78 b	4,73±0,51 a	5,03±0,24 b
Itrana Bianca	4,46±1,31 ab	4,86±0,66 a	4,68±0,61 b
Nocellara del Belice	4,84±0,58 ab	3,63±0,67 a	5,92±1,05 b
Nocellara Etnea	3,39±0,47 a	4,54±0,68 a	2,96±0,20 a
Significatività	**	ns	**

Considerato che la cv Itrana ha prodotto il maggior numero di suoni ma non è risultata la più croccante, non sembra esserci correlazione fra questi due parametri. Inoltre, la produzione di suoni non sembra essere correlata neanche con il parametro durezza, in quanto la Bella di Cerignola, giudicata più dura non ha emesso alcun suono. Poiché le olive Itrana sono risultate caratterizzate da un valore di durezza, valutata mediante test con ago e quindi relativa alla buccia, più elevata, si può ipotizzare che la produzione di eventi acustici sia correlata alla texture della buccia, piuttosto che della polpa. La scheda dell'analisi sensoriale, definita dall'organismo internazionale COI ed adottata in questo studio, prevede la valutazione della drupa nella sua interezza senza riportare alcun parametro



specifico per la buccia. Conseguentemente questo aspetto ha ostacolato l'individuazione di possibili correlazioni fra quanto evidenziato dai risultati acustici e l'aspetto sensoriale.

## Conclusioni

Il nuovo approccio meccanico-acustico proposto in questo studio ha fornito dei primi risultati interessanti, in particolare per la valutazione della texture della buccia. Si ritiene che siano necessari ulteriori approfondimenti che prevedano l'applicazione di questa metodica su un più ampio spettro di varietà/metodi di lavorazione e l'utilizzo di una scheda per l'analisi sensoriale opportunamente modificata.

## Bibliografia

1. Szczesniak A.S., 2002. Texture is a sensory property. *Food Qual. Pref.* 13, 215–225.
2. Mafra I., Lanza B., Reis A., Marsilio V., Campestre C., De Angelis M., Coimbra M.A., 2001. Effect of ripening on texture, microstructure and cell wall polysaccharide composition of olive fruit (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.* 111, 439-447.
3. Lanza B., Di Serio M.G., Iannucci E., Russi F., Marfisi P., 2010. Nutritional, textural and sensorial characterisation of Italian table olives (*Olea europaea* L. cv. 'Intosso d'Abruzzo'). *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 67-74.
4. Catania P., Vallone M., Planeta D., Febo P., 2015. Instrumental evaluation of the texture of cv. Nocellara del Belice olives. *Riv. Ital. Sostanze Grasse. Vol XCII*
5. Lanza B., Amoruso F., 2018. Measurement of kinaesthetic properties of in-brine table olives by microstructure of fracture surface, sensory evaluation and texture profile analysis (TPA). *J. Sci. Food. Agric.* 98, 4142-4150.
6. Vickers Z., Bourne C., 1976. A psychoacoustical theory of crispness. *J. Food Sci.* 41(5), 1158-1164.
7. Costa F., Cappellin L., Longhi S., Guerra W., Magnago P., Porro D., Soukoulis C., Salvi S., Velasco R., Biasioli F., Gasperi F., 2011. Assessment of apple (*Malus x domestica* Borkh.) fruit texture by a combined acoustic-mechanical profiling strategy. *Postharvest Biol. Technol.* 61, 21-28.

8. Cortellino G., Piazza L., Spinelli L., Torricelli A., Rizzolo A., 2017. Influence of maturity degree, modified atmosphere and anti-browning dipping on texture changes kinetics of fresh-cut apples. *Postharvest Biol. Technol.* 124, 137-146.
9. IOC. 2011. Method for the sensory analysis of table olives. COI/OT/MODoc. No 1/rev.2. Madrid, Spain, International Olive Oil Council.
10. Lanza B., Amoruso F., 2020. Panel performance, discrimination power of descriptors, and sensory characterization of table olive samples. *J. Sens. Stud.* 35 (12)

# Caratterizzazione sensoriale di olive e patè del commercio

**M. Bacceli\*, N. Simone e B. Lanza**

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Via Nazionale S.S. 602 Km 51 +355, CEPAGATTI (PE)

## Introduzione

Il patè di olive verdi o nere è un prodotto commerciale molto diffuso in Italia, tipico della tradizione culinaria mediterranea, derivante da olive deamarizzate, sottoposte a denocciolatura, triturazione a bassa temperatura e all'aggiunta di olio extra-vergine di oliva in misura variabile (10% circa) e talvolta di spezie (ad esempio origano, peperoncino, finocchietto, timo, maggiorana). Esso viene utilizzato principalmente come condimento per insaporire i primi piatti di pasta, oppure può essere usato come crema da spalmare su tartine o bruschette.

Essendo le olive da tavola ricche di sostanze antiossidanti e nutraceutiche [1], il patè di olive si sta sempre più affermando non solo per il suo ruolo gastronomico, ma anche per i suoi effetti benefici sulla salute umana. Recenti studi ne hanno valutato il suo potenziale nutraceutico anche in formulazione rinforzata, mediante aggiunta di acqua di vegetazione [2].

Produrre patè di olive è relativamente semplice, e questo lo rende un prodotto ampiamente proposto da molte aziende, anche se poco si conosce in merito al suo profilo nutrizionale e sensoriale che è strettamente legato alle numerose varietà di olive da tavola italiane, allo stadio di maturazione e al metodo utilizzato per la deamarizzazione. E poco si conosce anche riguardo alle preferenze del consumatore relativamente alle caratteristiche cinestetiche cioè legate alla texture dell'alimento. Gli aspetti relativi alla consistenza e alla struttura dei cibi risultano, infatti, estremamente interessanti per i consumatori, in quanto divenuti parte integrante dell'apprezzabilità di un prodotto alimentare, tanto che la texture

impatta significativamente (più del 30%) sulla preferenza di un alimento. Cambiamenti nella texture di un cibo possono inoltre influenzare la percezione del flavor attraverso la via olfattiva [3]. Le proprietà texturali rappresentano, quindi, veri e propri fattori critici nel determinare la percezione della qualità di un alimento.

Nell'ambito del WP4 del Progetto DEAOLIVA, il nostro gruppo di ricerca si è, dunque, posto come obiettivo quello di caratterizzare il patè di olive dal punto di vista sensoriale e texturale allo scopo di valorizzare tale prodotto emergente che tanto interessa la filiera olivicola.

## **Materiali e metodi**

### *Campionamento*

I patè di olive sono stati forniti dalla ditta Ficacci Olive Co. (Castel Madama RM), in misura di n. 5 varietà differenti, quali Bella di Cerignola, Nocellara del Belice, Hojiblanca, Nocellara etnea e Itrana. I campioni di patè sono stati inviati in quattro momenti diversi durante tutta la durata del progetto, a partire da dicembre 2020 fino a dicembre 2022.

### *Analisi sensoriale*

Presso il CREA-IT di Pescara è operante dal 2006 un Comitato di assaggio per le olive da tavola, riconosciuto dal Consiglio Oleicolo Internazionale (COI).

Sulla base di tale expertise, è stata messa a punto un foglio di profilo che fosse applicabile ai patè di olive. I descrittori sono stati identificati e approvati a seguito del classico iter procedurale per la stesura di una scheda di valutazione sensoriale, ovvero:

- ricerca bibliografica su lavori svolti su alimenti similari;
- attività di gruppo volta all'identificazione di tutti gli attributi sensoriali che possono riguardare il prodotto;
- eliminazione degli attributi troppo generici o ridondanti e validazione degli attributi rimanenti [4].

Nel foglio di profilo del pat , come nel foglio di profilo delle olive da tavola (COI/OT/MO No.1/Rev.3 June2021) [5], la parte superiore   incentrata sugli attributi negativi (fermentazione putrida, fermentazione butirrica, zapateria, fermentazione alcolica-acetica, muffa, cotto, saponoso, metallico, rancido). Tra i difetti riscontrabili, si   voluto dare risalto al difetto di rancido, che pu  derivare, oltre che dall'olio presente nel frutto, anche dall'olio aggiunto nella preparazione del pat .

Abbiamo poi gli attributi olfattivo-gustativi (salato, amaro, acido, piccante, fruttato, astringente, aromatico), che riguardano non solo le caratteristiche proprie delle olive, ma anche quelle che potrebbero derivare da eventuali additivi aggiunti.

Nell'ultima parte   stato inserito il gruppo degli attributi cinestetici (consistenza, fibrosit , coesivit , adesivit , fluidit , oleosit , masticabilit , granulosit ).

Per misurare l'accettabilit  del prodotto   stata utilizzata una scala edonica facciale a 5 punti, consistente nello scegliere una delle faccine stilizzate a seconda del gradimento, dalla pi  contrariata (corrispondente a punteggio 1) alla pi  sorridente (corrispondente a punteggio 5) [6].

In Fig. 1   mostrato il foglio di profilo impiegato per gli assaggi.

Di seguito viene riportato il "Glossario sensoriale per il pat " con le definizioni dei descrittori utilizzati.

## GLOSSARIO SENSORIALE PER IL PAT 

### SENSAZIONI NEGATIVE:

- **Fermentazione putrida:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di fermentazioni anomale, che ricorda l'odore della materia organica in decomposizione (fogna, uova marce, odore di zolfo)
- **Fermentazione butirrica:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di fermentazioni anomale, che ricorda il burro o il formaggio
- **Zapateria:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di fermentazioni anomale, che ricorda il cuoio marcio
- **Fermentazione alcolica-acetica:** sensazione olfattivo-gustativa percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di fermentazioni alcoliche anomale ad opera di lieviti o batteri eterofermentanti, che ricorda il vino o l'aceto.

- **Muffa:** sensazione olfattivo-gustativa percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di olive attaccate da muffe
- **Cotto:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di olive che hanno subito un riscaldamento troppo prolungato e/o intenso al momento della pastorizzazione o della sterilizzazione. Ricorda la verdura cotta o lo zucchero caramellato
- **Saponoso:** sensazione olfattivo-gustativa che ricorda il sapone. La sensazione di sapone o di liscivia si riscontra soprattutto nelle olive trattate con soda (Sistema Sivigliano e Castelvetro) e non sufficientemente sciacquate o consumate poco dopo la deamarizzazione
- **Metallico:** sensazione olfattivo-gustativa che ricorda i metalli. La sensazione di metallico è provocata dalla presenza di ioni ferro. Si riscontra soprattutto nelle olive annerite per ossidazione e addizionate di sali ferrosi, quali il gluconato o il lattato ferroso, utilizzati come stabilizzanti del colore (Sistema Californiano e olive nere al forno).
- **Rancido:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di olive che hanno subito un processo di irrancidimento

**FOGLIO DI PROFILO PER L'ASSAGGIO DI PATE' DI OLIVE**

**PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI NEGATIVE**

Fermentazione anomala (precisare) \_\_\_\_\_

putrida  butirrica  zapateria  alcolica-acetica

Altri difetti (precisare) \_\_\_\_\_

muffa  cotto  saponoso  metallico

Rancido \_\_\_\_\_

**PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI OLFATTIVO/ GUSTATIVE**

Salato \_\_\_\_\_

Amaro \_\_\_\_\_

Acido \_\_\_\_\_

Piccante \_\_\_\_\_

Fruttato \_\_\_\_\_

Astringente (allappante) \_\_\_\_\_

Aromatico (speziato) \_\_\_\_\_

**PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI CINESTETICHE**

Consistenza \_\_\_\_\_

Fibrosità \_\_\_\_\_

Coesività (pastosità) \_\_\_\_\_

Adesività (collosità) \_\_\_\_\_

Fluidità (solubilità) \_\_\_\_\_

Oleosità \_\_\_\_\_

Masticabilità \_\_\_\_\_

Granulosità \_\_\_\_\_

Nome assaggiatore:

Codice campione:

Data:

GRADIMENTO:



**Figura 1.** Foglio di profilo messo a punto per l'assaggio di paté di olive dal Comitato di assaggio di olive da tavola del CREA-IT di Pescara.

## SENSAZIONI OLFATTIVO/GUSTATIVE:

- **Salato:** sensazione percepibile prevalentemente nella zona latero-anteriore della lingua. È associata alle soluzioni acquose addizionate di cloruro di sodio e quindi alla concentrazione delle salamoie di fermentazione o di confezionamento
- **Amaro:** sensazione percepibile prevalentemente alla base della lingua, associata alla presenza di sostanze amare, principalmente polifenoli. Può quindi essere più intensa in preparazioni in cui la deamarizzazione, incompleta, non avviene per via chimica bensì per via microbiologica (Sistema Greco o al naturale).
- **Acido:** sensazione percepibile prevalentemente nella zona latero-posteriore della lingua. La sensazione di acido definisce il sapore associato agli acidi naturalmente presenti (es: acido tartarico, malico o citrico) o prodotti durante la fermentazione lattica ad opera di batteri lattici omo ed eterofermentanti (es: acido lattico, acido acetico), ma può dipendere anche da un utilizzo non appropriato di acidi quali correttori di acidità o antiossidanti (es: acido citrico, acido ascorbico). La sensazione di acido si riscontra anche in quelle olive la cui preparazione prevede l'aggiunta di aceto (es: olive Kalamata).
- **Piccante:** sensazione tattile pungente (pizzicore) simile ad un bruciore ma senza essere associata alle alte temperature. La sensazione viene causata da alcune sostanze chimiche capaci di stimolare direttamente i recettori del calore presenti sulle mucose (in questo caso della gola) con cui entrano in contatto. È associata principalmente alle olive ancora verdi. Ma può dipendere anche dall'olio aggiunto. O da spezie piccanti (ad esempio peperoncino)
- **Fruttato:** insieme delle sensazioni olfattive percepite per via diretta e/o retronasale, dipendenti dalla varietà delle olive e caratteristiche di frutti sani e freschi, sia verdi che maturi
- **Astringente (allappante):** secchezza della cavità orale indotta dalla perdita di capacità lubrificante della saliva, caratterizzata da contrazione delle gengive, rugosità sulla lingua, netta diminuzione della salivazione
- **Aromatico (speziato):** sensazione olfattiva diretta e/o retronasale dovuta allo sprigionamento di sostanze aromatiche di origine vegetale dalle spezie che vengono aggiunte (ad esempio origano, finocchietto, timo, maggiorana). In alcuni casi possono essere sostanze aromatiche tipiche della varietà di olive utilizzata.



#### SENSAZIONI CINESTETICHE:

- **Consistenza:** attributo meccanico relativo alla resistenza che un alimento oppone alla deformazione. Viene valutata attraverso la percezione della forza necessaria per comprimere l'alimento nell'apparato boccale
- **Fibrosità:** attributo relativo alla percezione della forma e dell'orientamento delle particelle allungate dell'alimento (fibre vegetali). Viene valutata attraverso la percezione delle fibre tra la lingua e il palato durante la masticazione
- **Coesività (pastosità):** tendenza, durante la masticazione, a formare una massa compatta difficilmente deglutibile
- **Adesività (collosità):** descrive il grado di aderenza di un alimento ai denti e/o al palato durante la masticazione
- **Fluidità (solubilità):** sensazione che misura la rapidità con cui l'alimento si fonde con la saliva
- **Oleosità:** sensazione legata alla percezione di una patina di materia grassa untuosa che riveste la superficie del cavo orale durante la masticazione e permane fino a fine masticazione
- **Masticabilità:** attributo meccanico relativo al numero di masticazioni necessarie per ridurre un alimento ad una consistenza tale da permetterne la deglutizione
- **Granulosità:** sensazione tattile percepibile al palato dovuta alla presenza di particelle (grani) nella struttura dell'alimento

Per quanto riguarda l'addestramento degli assaggiatori, abbiamo scelto di utilizzare prodotti alimentari di riferimento che avessero una qualità costante e che fossero prontamente disponibili ovunque nel mondo.

Relativamente alle sensazioni negative e a quelle olfattivo/gustative ci siamo basati sull'esperienza pregressa nel campo delle olive da tavola e dell'olio di oliva ed abbiamo quindi utilizzato una serie di sostanze chimiche, quali: 2-mercaptoetanololo, acido butirrico e acido cicloesancarbossilico per il riconoscimento delle *fermentazioni anomale*, olio di oliva rancido per il difetto di *rancido*, e NaCl, chinina e acido lattico per valutare rispettivamente le sensazioni di *salato*, *amaro* e *acido*.

Per le caratteristiche cinestetiche, invece, si è optato per standard riconducibili a “cibi solidi” (Fig.2): i formaggi Philadelphia e Leerdammer per valutare la *consistenza*, le pesche sciroppate e l’ananas sciroppato per la *fibrosità*, la fetta biscottata e la mollica di pane per la *coesività/pastosità*, lo yogurt magro e il burro di arachidi per l’*adesività/collosità*, il rosso d’uovo sodo e la maionese per la *fluidità/solubilità*, il latte intero e la margarina per l’*oleosità*, la banana e la prugna secca per la *masticabilità* e l’*hummus di ceci* e il *cous cous* per la *granulosità*. Il metodo identifica due prodotti di riferimento le cui mediane si collocano una nella parte bassa (con valori della mediana compresi tra 2.0 e 3.0) e una nella parte alta (con valori della mediana compresi tra 8.0 e 10.0) della scala (Fig. 3).



Figura 2. Coppie di standard scelti per ciascun descrittore e loro presentazione.

### STANDARD DEI DESCRITTORI CINESTETICI DEL PATE'
















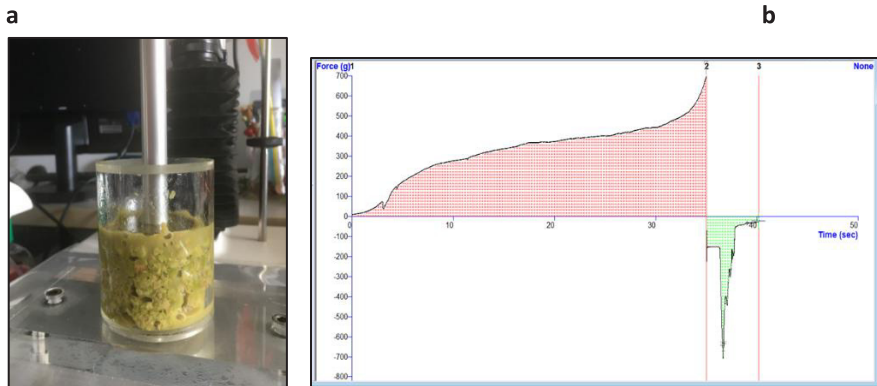
<b>CONSISTENZA</b>	 Formaggio Philadelphia 2	 Formaggio Leerdammer 10
<b>FIBROSITA'</b>	 Pesca sciroppata 2	 Ananas sciroppato 8
<b>COESIVITA'</b>	 Fetta biscottata 2	 Mollica di pane in cassetta 9
<b>ADESIVITA'</b>	 Yogurt magro 2	 Burro di arachidi 10
<b>FLUIDITA'</b>	 Tuorlo di uovo sodo 3	 Maionese Calvè 10
<b>OLEOSITA'</b>	 Latte vaccino intero 2	 Margarina 10
<b>MASTICABILITA'</b>	 Banana 2	 Prugne secche denocciolate 10
<b>GRANULOSITA'</b>	 Hummus di ceci 3	 Cous-cous 9

Figura 3. Coppie di standard e relativi valori di intensità espressi come mediana.



**Figura 4.** Texture Analyser in funzione mentre estrude un patè di olive (a) ed esempio di grafico ottenuto da test (b).

### *Analisi texturale*

L'analisi texturale è stata eseguita con Texture Analyser TA.XT.PlusC™ (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK), effettuando un test di “estrazione di ritorno” (Back Extrusion), che utilizza una sonda a disco del diametro di 4 cm (P/40) e un contenitore cilindrico in plexiglass del diametro di 5 cm dove viene posto il campione di patè. Il pistone a disco esegue una prova di compressione spingendo il campione verso il basso fin quando il prodotto viene estruso verso l'alto e intorno al bordo del disco (Fig.4a).

Il segnale rilevato dallo strumento viene trasmesso ad un PC attraverso apposito software proprietario (Texture Exponent Connect 32 bit). Il segnale ricevuto viene processato e rappresentato graficamente in un grafico forza/tempo, come mostrato nell'esempio in Fig.4b.

I parametri considerati dallo strumento per il test di estrusione di ritorno sono i seguenti:

- compattezza (firmness),
- consistenza (consistency)
- coesività (cohesivness)
- lavoro di coesione (work of cohesion)

La *compattezza* è la forza massima necessaria alla sonda per inserirsi nel campione. È una proprietà che descrive un prodotto moderatamente resistente alla deformazione; nel grafico è dato dal picco (positivo) di forza massima. Maggiore è la compattezza, più il campione sarà solido.

La *consistenza* è una proprietà texturale correlata alla compattezza, allo spessore e alla viscosità di un materiale liquido o semi-solido e nel grafico forza/tempo è rappresentato dall'area che sottende la curva positiva. Si tratta di un parametro utile nel momento in cui si va a mescolare un cibo fluido o semifluido con un cucchiaino o un dito.

La *coesività* misura la forza necessaria alla sonda per staccarsi dal campione e descrive la tendenza di un prodotto ad attaccarsi. L'attrazione intermolecolare attraverso la quale gli elementi di un materiale sono tenuti insieme ne determina la sua coesività, ossia la forza con la quale un prodotto mantiene fortemente unite le sue molecole. Questa è correlata alla viscosità interna ed è solitamente determinata dalla misura della quantità di forza necessaria a rimuovere una parte dalla massa globale del prodotto. Il miele, ad esempio, ha una bassa coesività perché è necessaria un'estensione considerevole di una parte di prodotto dal suo corpo principale. Nel grafico forza/tempo, la coesività rappresenta il picco negativo inferiore. A valori più negativi corrispondono campioni più coesivi.

Il *lavoro di coesione* è un indice di viscosità, dato dall'area che sottende la curva negativa nel grafico; più è alto, più indica un campione resistente alla risalita del pistone, fornendo così informazioni su viscosità e coesività del prodotto analizzato.

### *Analisi statistica dei dati*

L'analisi statistica dei dati sensoriali è stata condotta valutando mediana, coefficiente di variazione robusto percentuale e deviazione standard robusta, facendo riferimento al programma statistico specifico per le olive da tavola fornito nel metodo COI (COI/OT/MO/Doc.1/Rev.3 Annex 3: Sensory analysis of table olives-computer program), così da ottenere i profili sensoriali relativi.

Per l'analisi statistica dei dati texturali è stato usato il software gratuito PAleontological STatistics Version 4.10 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo).

## Risultati e discussione

I profili sensoriali dei paté sono stati ottenuti tenendo conto di tutti i descrittori valutati nel foglio di profilo e sono presentati in forma di radar, distinti in base alla cultivar di appartenenza, sovrapposti uno sull'altro (Fig.5).

Nessuno dei campioni è risultato difettato. I campioni maggiormente percepiti come salati sono stati quelli di Nocellara del Belice in modo del tutto inatteso, dal momento che solitamente le olive di partenza vengono trasformate con metodo Castelvetro, che prevede solitamente la conservazione per tempi brevi in acqua o salamoia leggera [1, 7]. È possibile, quindi, che per prolungarne la shelf life, le olive siano state poste a lungo in salamoia abbastanza concentrata (>5%) prima di essere sottoposte alla trasformazione in paté, risultando così più salate.

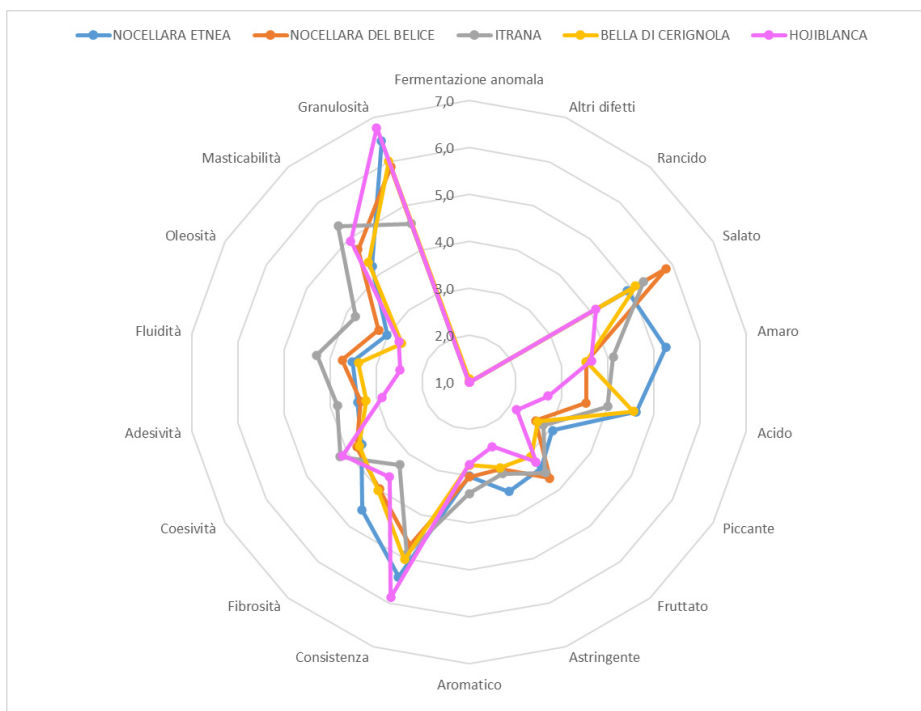
I patè più amari sono risultati quelli di Nocellara etnea e questo può essere dovuto al fatto che si tratta di campioni ottenuti da olive che vengono raccolte precocemente per poi essere tagliate e schiacciate, e che presentano una consistenza elevata della polpa e una certa resistenza alla concia, per cui il processo di deamarizzazione può risultare meno efficace.

Sul piano olfattivo/gustativo, i patè di Hojiblanca sono risultati i più bilanciati, dal momento che esprimono valori piuttosto vicini dei vari descrittori, rispetto alle altre varietà; sono risultati, inoltre, i meno acidi, probabilmente a causa del processo di trasformazione (Metodo Californiano) che subiscono le olive di partenza, che prevede aggiunta di gluconato o lattato ferroso, sostanze che potrebbero ridurre la percezione del sapore acido.

A livello texturale, i patè di Hojiblanca sono risultati quelli con maggiore consistenza e granulosità e con minori fluidità e adesività, quindi più compatti e con maggiore presenza di granuli, tanto da fondersi più difficilmente con la saliva e da aderire maggiormente ai denti e al palato durante la masticazione.

I patè di Itrana sono risultati quelli con maggiore coesività, probabilmente per il fatto che le olive di partenza hanno consistenza più pastosa, perciò, il paté derivante si presenta molto coeso.

I patè di Bella di Cerignola si caratterizzano maggiormente dal punto di vista olfattivo/gustativo rispetto a quello texturale, i cui descrittori presentano valori piuttosto bassi, soprattutto a livello di "oleosità", trattandosi di una varietà con un bassissimo contenuto di olio, tanto da potersi considerare a singola attitudine.

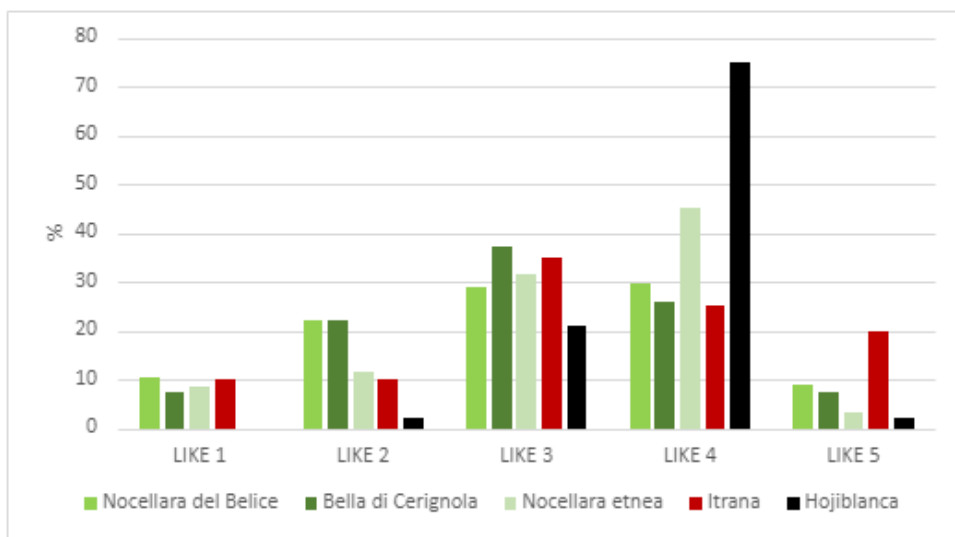


**Figura 5.** Radar ottenuti dai risultati cumulativi degli assaggi dei campioni di patè, sovrapposti e distinti per cultivar.

Dall'analisi delle manifestazioni di gradimento espresse dagli assaggiatori (Fig.6) si può notare che i patè di varietà Hojiblanca sono stati quelli maggiormente graditi, registrando la più alta percentuale (maggiore del 75%) di gradimento pari a 4 della scala edonica a 5 punti.

Anche i patè di Nocellara etnea hanno riportato un elevato gradimento (valore 4) da parte di quasi la metà (45%) degli assaggiatori, raggiungendo il 77% considerando la fascia di gradimento inferiore (valore 3). I patè di Nocellara del Belice, Bella di Cerignola e Itrana invece sono risultati i meno apprezzati, riportando un più basso valore di accettabilità, anche considerando la somma dei valori 3 e 4, pari a circa il 60% circa degli assaggiatori.





**Figura 6.** Gradimento del prodotto.

Per quanto riguarda i parametri texturali, dall'analisi statistica univariata ANOVA a due vie, emergono diverse differenze tra i vari tipi di patè (Tab.1).

**Tabella 1.** Valori di media, DS e ANOVA ottenuti dal test texturale "estrusione di ritorno".

	Firmness (g)	Consistency (g/sec)	Cohesiveness (g)	Work of Cohesion (g/sec)
Nocellara del Belice	2600,48 (286,42) a	44379,18 (11666,80) a	-695,74 (150,64) a	-719,72 (226,43) a
Bella di Cerignola	6513,95 (1006,36) bc	72989,2 (30418,06) bc	-829,46 (443,01) bc	-934,39 (574,48) ab
Itrana	2170,29 (775,11) acd	32693,32 (6903,52) acd	-741,31 (227,71) acd	-724,23 (56,06) acd
Nocellara etnea	6309,97 (806,03) bcde	69483,23 (16394,43) acde	-1095,85 (576,68) bcde	-667,85 (422,09) abef
Hojiblanca	8284,12 (1523,32) bcde	88283,62 (18857,78) acde	-1140,81 (287,99) acde	-957,54 (197,70) acdf

La compattezza dei patè di Nocellara del Belice risulta statisticamente molto diversa da quella dei patè di Bella di Cerignola, di Nocellara etnea e di Hojiblanca e più vicina, invece, a quella dell'Itrana. Tale risultato è probabilmente spiegabile dal fatto che i patè di Bella di Cerignola, Nocellara etnea e Hojiblanca sono più solidi e necessitano quindi di una forza maggiore per essere deformati rispetto al patè di Nocellara del Belice.

La consistenza dei patè di Bella di Cerignola è statisticamente paragonabile a quella di tutti i patè, tranne che a quella dei patè di Nocellara del Belice.

Anche in termini di coesività, le principali differenze riguardano i patè di Nocellara del Belice rispetto agli altri, dal momento che risulta essere il patè meno coesivo,

quindi con una minore adesione tra le sue molecole. Tale rilievo può essere dovuto al fatto che la polpa delle olive di varietà Nocellara del Belice è piuttosto consistente, compatta e dura, generando così un patè più difficilmente separabile dalla sonda.

## **Armonizzazione tra comitati di assaggio di olive da tavola**

Sempre nell'ambito del WP4 – Task 4.2 “Caratterizzazione sensoriale”, al fine di valutare la performance dei comitati di assaggio per le olive da tavola coinvolti nel Progetto e creare sinergie durature in un'ottica di “skill improvement”, è stato effettuato un ring-test su n.10 campioni di olive del commercio, forniti dalla ditta Ficacci Olive Co. (Castel Madama RM), appartenenti a n. 4 varietà differenti (Bella di Cerignola, Nocellara del Belice, Nocellara etnea e Itrana).

Per l'analisi dei risultati è stata adottata la procedura COI valida per l'olio di oliva vergine, adattata al caso specifico. I comitati di assaggio coinvolti sono stati:

- Comitato di assaggio per le olive da tavola del CREA-IT sede di Pescara (guidato dalla Dott.ssa Barbara Lanza)
- Comitato di assaggio per le olive da tavola del CREA-OFA sede di Acireale (guidato dalla Dott.ssa Nicolina Timpanaro)
- Comitato di assaggio per le olive da tavola del CREA-IT sede di Milano (guidato dalla Dott.ssa Giovanna Cortellino)

È stato, quindi, calcolato lo z-score mediante la seguente formula:

$$z\text{-score} = (Me\ panel - Me\ PE) / \sigma$$

dove *Me panel* è la mediana attribuita da un panel al descrittore specifico, *Me PE* è la mediana attribuita allo stesso descrittore dal Comitato di assaggio ufficiale del CREA-IT di Pescara e  $\sigma$  è il “sigma target” calcolato sulla base dei dati storici del COI per l'olio di oliva vergine ed il suo valore è 0,7. Uno z-score  $\leq 2$  (in valore assoluto) indica una corretta valutazione; uno  $2 < z\text{-score} \leq 3$  (in valore assoluto) indica una valutazione accettabile; z-score  $> 3$  (in valore assoluto) indica invece una valutazione non corretta.

Si è scelto di confrontare i risultati dell'assaggio organolettico da parte dei due comitati di assaggio coinvolti con quelli ottenuti dal Comitato di assaggio del CREA-IT di Pescara, essendo quest'ultimo un comitato di assaggio riconosciuto dal COI (Consiglio Oleicolo Internazionale).

In Tab. 2 sono riportati i valori di Z-Score ottenuti.

Tab.2 – Valori Z-Score ottenuti

Campioni	FERM. AN.	SALATO	AMARO	ACIDO	DUREZZA	FIBROSITA'	CROCCANTEZZA
<u>Bella di Cerignola</u> <u>049/20</u>							
PE-ACI	0,0	1,4	1,0	0,3	0,4	-1,1	-1,1
PE-MI	0,0	-1,9	-0,1	-1,4	0,0	0,4	-1,9
<u>Nocellara etnea 233/20</u>							
PE-ACI	0,0	1,4	1,9	-0,3	1,3	0,7	1,7
PE-MI	0,1	1,0	4,3	0,9	-1,9	1,6	-2,1
<u>Nocellara etnea 217/20</u>							
PE-ACI	0,0	1,6	-0,3	-0,6	1,3	-0,6	2,1
PE-MI	0,0	2,1	4,0	-0,1	0,1	1,0	-2,3
<u>Itrana bianca</u> <u>492/19</u>							
PE-ACI	0,0	1,3	3,6	-4,0	1,0	0,6	0,1
PE-MI	0,0	1,3	2,4	-2,6	-0,1	0,7	-1,1
<u>Bella di Cerignola</u> <u>161/20</u>							
PE-ACI	0,0	1,7	-1,3	-0,3	1,6	-0,1	-0,1
PE-MI	0,1	-0,1	0,0	-3,4	1,7	0,7	0,6
<u>Itrana bianca</u> <u>499/19</u>							
PE-ACI	0,0	2,4	-2,3	-2,6	2,6	2,0	-0,3
PE-MI	0,0	-0,4	-0,4	0,0	1,1	2,4	-0,4
<u>Bella di Cerignola</u> <u>032/21</u>							
PE-ACI	0,0	2,1	-1,1	-1,9	4,0	0,6	3,0
PE-MI	0,0	1,6	-0,4	-2,1	2,4	0,6	-0,4
<u>Nocellara del Belice 408/21</u>							
PE-ACI	0,0	4,0	0,0	-0,3	0,7	-1,0	0,9
PE-MI	0,0	1,1	-1,7	-1,4	1,9	-1,1	1,0
<u>Bella di Cerignola</u> <u>326/21</u>							
PE-ACI	0,0	1,9	0,7	-1,4	4,1	-0,6	1,0
PE-MI	0,0	-1,4	-1,6	-2,4	2,6	0,0	-1,3
<u>Nocellara del Belice 422/21</u>							
PE-ACI	0,0	-1,6	-2,6	-4,4	0,3	-0,7	0,1
PE-MI	0,0	1,7	-2,3	-3,3	-1,7	1,1	-2,1

Da un'analisi preliminare dei dati si può osservare l'allineamento tra i Comitati nell'individuazione dei difetti (assenza di fermentazioni anomale), rilevando valori di z-score prossimi allo 0. Valori corretti ( $z\text{-score} \leq 2$ ) o al più accettabili ( $2 < z\text{-score} \leq 3$ , evidenziati in giallo nella tabella) si evidenziano per i descrittori fibrosità e croccantezza, suggerendo un buon allineamento per il riconoscimento delle sensazioni cinestetiche (eccetto per la durezza). La durezza e le sensazioni gustative (salato, amaro e acido) necessiterebbero invece di un addestramento con standard di riferimento [8].

## Bibliografia

1. Lanza B., 2012. Nutritional and sensory quality of table olives. Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy (Ed. I. Muzzalupo), InTech, Rijeka, Croatia, 343-372. [ISBN: 978-953-51- 0883-2]
2. Cavallo P., Dini I., Sepe I., Galasso G., Fedele F.L., Sicari A., Bolletti Censi S., Gaspari A., Ritieni A., Lorito M., Vinale F., 2020. An Innovative Olive Pâté with Nutraceutical Properties. *Antioxidants*, 581, 1-13
3. Nishinara, K. New texture modifiers for food, interactions among different food hydrocolloids and their potential 537 of application. *Kagaku to Seibutsu* 1996, 34, 197-204.
4. Lanza B., Simone N., Bacceli M., 2022. L'ANALISI SENSORIALE DEL PATÈ DI OLIVE: PROPOSTA DI UN FOGLIO DI PROFILO CON VALIDAZIONE DI PARAMETRI ATTRAVERSO ANALISI TEXTURALE. Atti VII Convegno Nazionale SISS – 27-29/4/2022, Matera
5. Metodo COI/OT/MO No 1/Rev.3/2021.
6. Guinard J-X., 2001. "Sensory and consumer testing with children", in: *Trends in Food Science and Technology* 11, 2001, pp. 273–283
7. Lanza B., Poiana M, 2020. Olive da tavola: tecnologia. Collana Divulgativa dell'Accademia Nazionale dell'Olivo e dell'Olio, Vol. XX, [ISSN 2281-4930].
8. Lanza B., Amoruso F. 2020. Panel performance, discrimination power of descriptors, and sensory characterization of table olive samples. *Journal of Sensory Studies*, 35: e12542.

# Caratterizzazione chimico/nutrizionale di olive del commercio

Luciana Di Giacinto, Maria Gabriella Di Serio\*, Paolo del Re, Lucia Giansante

Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Ingegneria e Trasformazioni agroalimentari, Via Nazionale S.S. 602 Km 51 +355, CEPAGATTI (PE)

## Introduzione

Le olive da tavola sono considerate alimenti con alto valore nutrizionale, presenti nella dieta mediterranea con numerosi effetti benefici sulla salute. Il loro consumo è in continuo aumento soprattutto da parte dei consumatori sempre più attenti alla salute.

Le olive da tavola contengono acqua, grassi, carboidrati, proteine, fibre, sostanze pectiche, vitamine, fenoli, acidi organici e sostanze minerali, e possono essere considerate dal punto di vista nutrizionale un alimento completo [1], [2]. L'alto contenuto di lipidi, in prevalenza acidi grassi monoinsaturi (acido oleico), ha un'azione preventiva soprattutto nell'insorgenza delle patologie cardiovascolari. La presenza di composti biologicamente attivi come le sostanze fenoliche è importante in quanto queste ultime, insieme ad altri composti (tocoferoli e vitamine) sono responsabili della stabilità ossidativa, delle caratteristiche organolettiche e della prevenzione di diverse malattie.

La presenza nel nostro territorio di svariate cultivar con buoni requisiti agronomici e merceologici in grado di tipicizzare la produzione regionale e nazionale permette di aver sul mercato diversi prodotti trasformati con caratteristiche diverse. La scelta della cultivar è più complessa rispetto alle olive da olio in quanto diversi fattori, quali le caratteristiche biologiche e agronomiche del frutto e il tipo di procedimento industriale di trasformazione e conservazione, possono influenzarla [1]. La caratterizzazione dal punto di vista nutrizionale e sensoriale delle olive da tavola prodotte da aziende di trasformazione operanti in diverse realtà del territorio, oltre che ad essere importante per la tutela della salute, è necessaria al fine di garantire ai consumatori un'adeguata informazione. Nel nostro territorio, le tante cultivar impiegate nella produzione di olive da tavola, i diversi sistemi di

trasformazione e i vari punti critici legati a questi ultimi, fanno sì che ci sia poca uniformità del prodotto.

Con l'entrata in vigore del Reg. UE 1169/2011 e s.m.i. (G.U. dell'Unione Europea n. L 304 del 22/11/2011) relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, c'è l'obbligo di apposizione della dichiarazione nutrizionale degli alimenti. Per i primi due anni è stata facoltativa, mentre a partire dal 13 dicembre 2016 è stata resa obbligatoria permettendo così al consumatore di effettuare scelte consapevoli sull'acquisto dei prodotti alimentari. In particolare, con il suddetto regolamento si impone di fornire informazioni sul valore energetico (kj, kcal), grassi (g), acidi grassi saturi (g), carboidrati (g), zuccheri (g), proteine (g), sale (g) - nell'ottica di facilitare il consumatore nella comprensione delle informazioni fornite in etichetta, è stato sostituito nel regolamento il termine "sodio" con "sale" - tutti espressi per 100 grammi di porzione edibile o polpa di olive. Tali informazioni potrebbero anche essere riferite ad una porzione giornaliera (serving size), ovvero la quantità di prodotto consumata da una persona, cioè circa 10 olive di media pezzatura tenendo conto anche del peso del nocciolo. Alle suddette informazioni è possibile aggiungere alcuni elementi facoltativi, come il contenuto di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi (g), polioli (g), amido (g), fibre (g), vitamine o sali minerali presenti nell'allegato XIII parte A.

Nell'ambito delle attività previste nel Progetto "DEAOLIVA", in particolare nella linea di ricerca WP4-Task 4.3, sono state condotte analisi sulle principali varietà di olive da mensa (Bella di Cerignola trasformate con il metodo Sivigliano, Hojiblanca denocciolate trasformate con il metodo Californiano, Itrana e Nocellara etnea trasformate con metodo naturale, Nocellara del Belice trasformate con metodo Castelvetro) al fine di caratterizzarle dal punto di vista chimico-nutrizionale.



## BELLA DI CERIGNOLA

La Bella di Cerignola è considerata una delle migliori cultivar di olive da tavola italiane e nel 2000 ha ottenuto la registrazione europea come Denominazione di Origine Protetta “La Bella della Daunia DOP”, mentre nel 2002 si è costituito il consorzio di tutela. Le olive vengono raccolte i primi di ottobre per la trasformazione delle verdi e alla fine di ottobre per quelle nere. Per le olive verdi il processo di trasformazione è il “metodo Sivigliano”.

Dopo la calibratura vengono trattate con una soluzione di liscivia alcalina a concentrazione variabile da 1-3%. Il trattamento viene seguito all'interno di appositi recipienti ricoprendo totalmente i frutti con soluzione fino a quando la soluzione sodica non è penetrata nelle olive per 2/3-3/4 dello spessore della polpa. La durata del trattamento alcalino oscilla dalle 7 alle 10 ore a seconda della concentrazione della soda e della temperatura. Successivamente vengono eseguiti dei lavaggi, il primo si effettua lasciando le olive sotto il getto d'acqua corrente per 15-20 minuti, successivamente si effettua un secondo lavaggio dopo 2-3 ore e altri 3-4 lavaggi nelle seguenti 24-48 ore. In seguito, vengono fatte fermentare per 30-60 giorni in salamoia (8-10%). La concentrazione iniziale di salamoia tende a diminuire rapidamente a causa di fenomeni osmotici che si stabiliscono tra il frutto e la soluzione salina, per questo motivo dopo 4-5 giorni si consiglia l'aggiunta di sale in modo da ripristinare la concentrazione iniziale. Al termine di un processo ben condotto il pH dovrebbe avere un valore di circa 3.8-4.0. Le olive prodotte possono essere conservate in salamoia, eventualmente previa pastorizzazione.

### METODO SIVIGLIANO

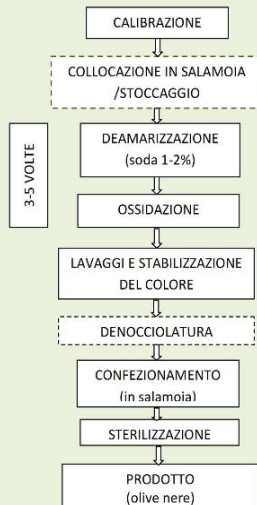


## HOJIBLANCA

La varietà Hojiblanca è originaria della Spagna, molto diffusa nella zona centrale dell'Andalusia. Le caratteristiche del frutto, come il calibro medio-alto e l'ottima consistenza della polpa, consentono di utilizzarla, oltre che per la produzione di olio, anche per la produzione di olive da tavola. Il metodo di trasformazione maggiormente impiegato per questa varietà è il californiano che prevede trattamenti ripetuti con soda,

solitamente da tre a cinque, ad una concentrazione del 1-2%. Tra due trattamenti successivi con la soluzione di alcali, i frutti vengono lavati mediante immersione in acqua e sottoposti a trattamenti ossidativi insufflando aria sotto pressione nella massa di acqua e olive. La durata di questi trattamenti ossidativi è variabile e può raggiungere le 12 ore. Al fine di accelerare il processo ossidativo si possono aggiungere sali di manganese (lattato o gluconato). Successivamente vengono eseguiti dei lavaggi al fine di abbassare il pH. Per la fissazione del colore si aggiunge gluconato o lattato ferroso immergendo per una decina di ore le olive in apposita soluzione. Il prodotto ottenuto può essere confezionato in salamoia ad una concentrazione del 2-4% e sottoposto a sterilizzazione.

### METODO CALIFORNIANO





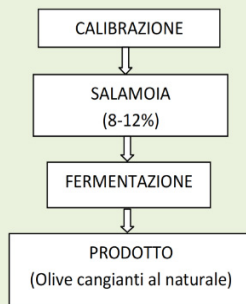
### ITRANA

L'itrana è una cultivar a duplice attitudine, diffusissima nella provincia di Latina, prende nome dal comune di Itri ed è comunemente conosciuta come "Oliva Bianca". Le olive maturano tardivamente e in modo scalare, permettendo agli olivicoltori di prolungare il periodo di raccolta e diversificare due tipologie di olive: quelle "bianche", raccolte tra novembre e dicembre, quando hanno raggiunto le dimensioni finali e una colorazione verde o leggermente inviaita, e quelle "nere", raccolte a maturazione completa nel periodo febbraio-marzo.

Nel metodo naturale la concentrazione di salamoia

utilizzata varia dall' 8 al 12%, con il tipo di preparazione e tende a diminuire in seguito all'assorbimento a carico del frutto. Questo processo, essendo completamente biologico, è più lungo in quanto le olive non sono trattate con soda ed il rilascio delle sostanze fermentescibili attraverso la cuticola risulta più lento. In una fermentazione ben condotta, i gruppi microbici presenti sono lieviti e batteri lattici. Il prodotto fermentato, preparato in diversi modi a seconda delle tradizioni locali, viene collocato in una nuova salamoia con concentrazione del 5-6%. Il pH deve essere corretto a valori di sicurezza < 4.6 mediante acidi organici.

#### METODO NATURALE



### NOCELLARA DEL BELICE

Le olive della cultivar Nocellara del Belice, cultivar diffusa nella valle del Belice, trasformate con il "metodo Castelvetrano" vengono raccolte precocemente tra fine settembre e inizio ottobre, quando hanno una pezzatura ben definita e un colore verde uniforme. La calibratura è un'operazione fondamentale, in quanto permette una penetrazione uniforme della soda all'interno del frutto. Il trattamento di deamarizzazione viene realizzato collocando le olive in fusti di plastica riempiti con una soluzione sodica (2.5-3.5 °Bè) a cui, dopo una notte di

trattamento alcalino, viene aggiunto sale marino di Trapani macinato 5-8 kg per recipiente. Il sale può essere aggiunto all'inizio o entro le dodici ore successive per far acquistare alle olive un maggior sapore di soda, secondo il mercato cui è destinato il prodotto. Le olive sono pronte al consumo dopo 8-10 giorni. Prima di essere avviate al consumo vengono sottoposte a lavaggi per eliminare residui di soda. Con questo tipo di processo si ottiene un prodotto definito "dolce", in quanto le olive al consumo si presentano con una bassa concentrazione di sale, di colore verde brillante, che tende a sfumare verso il giallo. Questo tipo di prodotto, con pH elevato, viene conservato in ambiente refrigerato (4-7°C).

#### METODO CASTELVETRANO







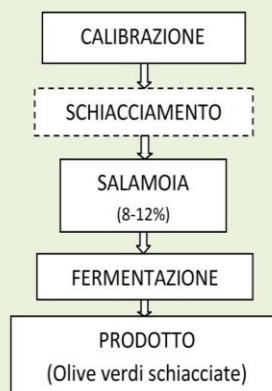
## NOCELLARA ETNEA

La Nocellara Etnea è una cultivar autoctona siciliana a duplice attitudine, estesa soprattutto nella zona centrale e orientale della Sicilia. Le drupe sono uniformi, di pezzatura grande e con un rapporto tra nocciolo e polpa molto elevato. Queste caratteristiche rende tale cultivar una delle migliori per la produzione di olive da tavola verdi.

Le olive da tavola in commercio di questa varietà usualmente vengono ottenute

con il “metodo naturale schiacciate”, che consiste in una rottura parziale per schiacciamento leggero della polpa, mediante l'utilizzo di macchine schiacciatrici apposite, accelerando così il processo di scambio e la perdita dell'amaro. Successivamente vengono messe in una salamoia con concentrazione variabile dall'8 al 12% e fatte fermentare. Il prodotto finito prima della vendita al dettaglio viene collocato in una nuova salamoia con concentrazione del 5-6%, confezionato e pastorizzato.

### METODO NATURALE SCHIACCIAITE



## Materiali e metodi

La caratterizzazione chimico-nutrizionale è stata effettuata sulle olive da tavola delle varietà: Bella di Cerignola (metodo sivigliano), Hojiblanca denocciolata (metodo Californiano), Itrana (metodo naturale), Nocellara del Belice (metodo Castelvetro), Nocellara etnea (metodo naturale schiacciate). I campioni analizzati sono stati forniti dalla ditta produttrice in convenzione, che per ognuno dei cinque campionamenti ha provveduto all'invio di 3 lotti di olive da 2 kg ciascuno per ogni varietà con relativa salamoia di stoccaggio. Nel caso delle olive Itrana e Nocellara etnea i lotti spediti sono stati gli stessi della prima campionatura, mentre per le altre tre varietà i lotti sono stati in parte differenti. Le olive della Nocellara del Belice sono state stoccate in ambiente refrigerato, in quanto facilmente deteriorabili, mentre le altre sono state conservate a temperatura ambiente.

## **Determinazioni sul frutto**

### *Determinazione del rapporto polpa/nocciolo*

Sui campioni sono state determinate le principali caratteristiche carpologiche: peso dell'oliva intera, peso del nocciolo e della polpa e rapporto polpa/nocciolo.

### *Determinazione dell'umidità e della sostanza secca*

I campioni di polpa, dopo denocciolatura, sono stati essiccati in stufa a 105°C per 24 h, fino ad arrivare a peso costante.

### *Determinazione delle ceneri*

La determinazione delle ceneri è stata effettuata secondo quanto riportato nei Rapporti ISTISAN 96/34. Il metodo prevede l'incenerimento di una aliquota di campione alla temperatura di  $550\text{ C}^\circ \pm 10\text{ C}^\circ$  fino a completa combustione della sostanza organica ed al raggiungimento di una massa costante.

### *Determinazione del contenuto in olio*

Il contenuto di olio è stato determinato mediante estrazione con solvente (etere di petrolio 40-60°C) per 6 ore in apparecchio Soxhlet utilizzando il residuo secco precedentemente ottenuto dalla polpa essiccata e viene espresso in g/100 g di porzione edibile. Inoltre, l'olio ottenuto è stato recuperato ed utilizzato per la determinazione della composizione acidica, sterolica e degli alcoli.

### *Contenuto in proteine*

La determinazione del contenuto di proteine (espresso in g/100 g di p.e.) viene effettuata secondo quanto riportato nella norma ISO 1871: 2009 mediante apparecchio Kjeldahl.

### *Contenuto in carboidrati*

Il contenuto di carboidrati totali (g/100 g di p.e.) è stato calcolato sottraendo a 100 l'umidità, le ceneri, i grassi e le proteine.

### *Valore energetico*

Il valore energetico, espresso in kilojoule (kJ) e in chilocalorie (kcal), viene calcolato tenendo conto dell'apporto di ciascun nutriente usando dei coefficienti di

conversione riportati nell'allegato XIV del Regolamento UE N. 1169/2011 e s.m.i. relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori.

#### *Determinazione della concentrazione salina*

La concentrazione salina viene determinata mediante titolazione della polpa con una soluzione di nitrato di argento ( $\text{AgNO}_3$ ) 0.1 N fino al punto di equilibrio della reazione evidenziato dal viraggio dell'indicatore cromato di potassio dal giallo all'arancione.

#### *Contenuto in fibra alimentare*

La determinazione della fibra alimentare totale, espresso in g/100g di p.e., prevede una serie di digestioni del campione tramite enzimi termostabili ( $\alpha$ -amilasi, proteasi e amiloglucosidasi), simulanti il reale processo digestivo a carico degli alimenti che si realizza nel tratto digerente umano e degli animali, seguite da precipitazione, filtrazione e recupero del residuo costituito dalla fibra insolubile e da quella solubile, in accordo con la metodica ufficiale A.O.A.C. 985.29. Il contenuto in fibra alimentare totale è dato dalla somma delle due frazioni.

#### *Composizione fenolica della polpa*

La determinazione della composizione fenolica in HPLC sulla polpa di olive, espressa in mg/kg, è stata eseguita aggiungendo come standard interno 1ml di acido siringico 0.015 mg/mL in metanolo secondo il metodo descritto nel Documento COI/T20/Doc 29/2009.

### **Determinazioni sull'olio**

Sulle olive da tavola, al fine di valutare la composizione chimica della frazione saponificabile e insaponificabile, si è proceduti alla microestrazione dell'olio in laboratorio. Le olive sono state prima snocciolate manualmente, triturate con macinino e messe in un bagnetto in agitazione ad una temperatura di  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  per 30 min (gramolatura). Successivamente l'estrazione dell'olio è stata effettuata mediante centrifuga refrigerata, al fine di evitare il riscaldamento della pasta, a 3500 rpm per 30 minuti ad una temperatura di  $10^\circ\text{C}$ . L'olio surnatante è stato recuperato e analizzato [3]. Le analisi condotte sull'olio sono state le seguenti: contenuto in clorofilla, contenuto in tocoferoli, composizione fenolica e contenuto in alchil esteri. Mentre per la determinazione della composizione acidica,

composizione sterolica e della frazione alcolica è stato utilizzato l'olio estratto dalle olive con apparecchio Soxhlet.

#### *Contenuto in clorofilla*

La determinazione del contenuto di clorofilla sull'olio estratto, espresso in mg/kg, è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica nel visibile (metodo AOCS Cc 13c-50).

#### *Contenuto in tocoferoli*

La determinazione del contenuto di tocoferoli, espresso in mg/kg, prevede l'utilizzo della cromatografia liquida ad alta risoluzione HPLC accoppiata ad un rivelatore UV, su colonna a fase inversa. La preparativa del campione viene eseguita pesando un 1g di olio in un matraccio da 10 ml e successivamente portato a volume con acetone. L' $\alpha$ -tocoferolo (0.32  $\mu$ g/10  $\mu$ L) viene usato come standard esterno.

#### *Composizione fenolica*

La determinazione del contenuto di fenoli, espresso in mg/kg, prevede l'utilizzo della cromatografia liquida ad alta risoluzione HPLC accoppiata ad un rivelatore UV, su colonna a fase inversa. La preparativa del campione viene eseguita pesando 2.5 g di olio in un pallone da 50 ml e aggiunto di 500  $\mu$ l di standard interno (acido siringico 0.015 mg/ml). La determinazione dei composti fenolici, espressi in mg/kg, sull'olio è stata eseguita secondo il metodo COI/T.20/Doc N.29/2009.

#### *Contenuto di alchil esteri (AE)*

La determinazione del contenuto di alchil esteri, espressi in mg/kg, è stata eseguita secondo quanto riportato nel metodo COI/T.20/Doc. n. 28.

#### *Composizione acidica*

La determinazione prevede una transesterificazione degli acidi grassi legati alla glicerina con metanolo in ambiente basico e una conseguente analisi degli esteri metilici formati in gascromatografia. Da questa analisi è possibile dedurre il contenuto percentuale di grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi importante sia per la caratterizzazione del prodotto, che nella realizzazione dell'etichetta nutrizionale.

### *Composizione e contenuto totale degli steroli e composizione e contenuto degli alcoli*

La determinazione degli steroli e della frazione alcolica è stata effettuata sull'olio secondo il metodo COI/T.20/ Doc. N. 26.

## **Risultati e discussione**

Le caratteristiche merceologiche delle olive da tavola sono importanti al fine di valutare l'attitudine di una varietà alla produzione e al metodo di lavorazione più opportuno da utilizzare e che ne esalti le caratteristiche. In Tabella 1 sono state riportate alcuni parametri studiati nei campioni delle cinque varietà. Le olive, secondo la norma commerciale COI (COI/OT/NC n.1 2004), sono calibrate secondo il numero di frutti in un chilogrammo. La calibratura è obbligatoria non solo per le olive intere, ma anche per le snocciolate e farcite. La percentuale di polpa, che nel frutto dovrebbe essere non inferiore all'80%, è maggiore di tale percentuale nella Bella di Cerignola (88%), Nocellara del Belice (87%) e Nocellara etnea (86%), mentre per l'Itrana raggiunge l'80%. Il rapporto polpa/nocciolo (P/N), permette di classificare le olive da tavola in tre tipologie: "buone" (P/N pari a 4), "molto buone" (P/N prossimo a 5) e "ottime" (P/N superiore a 6) [4]. In media nei campioni analizzati le olive che presentano un rapporto polpa/nocciolo (P/N) ottimale sono: la Bella di Cerignola (7.6), Nocellara del Belice (6.8) e Nocellara etnea (6.0), mentre per l'Itrana tale rapporto è comunque buono (4.3) [5]. Il contenuto di olio è risultato maggiore nella Nocella etnea, con una media del 24.3%, seguita dall'Itrana, con il 22.4%, dalla Nocellara del Belice con il 19.6%, mentre valori più bassi si sono riscontrati per la Hojiblanca e la Bella di Cerignola rispettivamente con il 15.0% e il 14.6%.

**Tabella 1.** Valori medi dei principali parametri merceologici e chimico-fisici del frutto.

	Bella di Cerignola	Hojiblanca	Itrana	Nocellara del Belice	Nocellara etnea
N° olive/Kg	93	-	270	185	200
Peso medio olive (g)	10.8±1.0	-	3.7±0.8	5.4±0.6	5.0±0.5
Parte edibile (% polpa)	88.0±1.1	-	80.0±1.3	87.0±1.7	86.0±0.9
Polpa/Nocciolo (P/N)	7.6±0.8	-	4.3±0.5	6.8±0.8	6.0±0.4
Umidità %	76.0±1.6	76.0±0.5	66.0±1.9	72.0±1.8	66.0±0.4
Sostanza secca %	24.0±1.6	24.0±0.5	34.0±1.9	28.0±1.8	34.0±0.4
Contenuto di olio %	14.6±0.6	15.0±0.9	22.4±2.9	19.6±1.1	24.3±3.6

In tabella 2 sono riportati i valori nutrizionali delle cinque varietà. Le varietà Bella di Cerignola e Hojiblanca presentano un valore energetico inferiore alle altre varietà, rispettivamente 157 e 169 kcal per 100 grammi di p.e., che in riferimento ad una dieta di 2000 kcal per una persona adulta di corporatura media e che svolge una limitata attività fisica, rappresentano circa l'8% del totale. Le olive dalla cv. Itrana, trasformate con il metodo naturale allo stadio di maturazione invaiate e le olive della cv. Nocellara etnea trasformate con il metodo naturale schiacciate verdi, presentano i valori energetici più alti; rispettivamente di 239 kcal e di 247 kcal, pari a circa il 12% di una dieta di 2000 kcal; mentre le olive della cv. Nocellara del Belice "metodo Castelvetro" verdi, presentano un valore medio di 198 kcal, inferiori alle precedenti (circa 10%).

**Tabella 2.** Tabelle nutrizionali dei diversi prodotti (Valori medi).

Nutriente g/100g di porzione edibile	Bella di Cerignola (sivigliano)	Hojiblanca (californiano denocciolate)	Itrana (naturale)	Nocellara del Belice (Castelvetro)	Nocellara etnea (naturale schiacciate)
Valore energetico (kj)	645	697	986	814	1019
Valore energetico (kcal)	157	169	239	198	247
Grassi (g)	14.6	15.0	22.4	19.6	24.3
di cui:					
- saturi (g)	2.9	2.8	3.4	3.7	4.8
- monoinsaturi (g)	10.2	11.3	17.4	14.3	17.4
- polinsaturi (g)	1.5	0.9	1.6	1.6	2.1
Carboidrati (g)	3.4	5.3	6.4	2.9	4.6
di cui:					
- zuccheri (g)	0.3	0.1	0.2	0.2	0.1
Fibre (g)	3.1	3.9	3.1	2.6	2.8
Proteine (g)	1.2	1.2	1.4	1.0	1.3
Sale (g)	3.3	3.3	5.1	3.0	4.0

Nei campioni analizzati (Tabella 2), le olive da tavola con il più basso contenuto in sostanze grasse sono risultate quelle della Bella di Cerignola e Hojiblanca con valori medi di 14.6 g/100 g e 15.0 g/100 g, mentre i valori più alti sono stati riscontrati per la Nocellara etnea con il 24.3 g/100 g p.e. e l'Itrana 22.4 g/100 g.

Nelle tabelle nutrizionali sono state riportate le quantità espresse in g/100 g p.e. di acidi grassi monoinsaturi (MUFA), i più abbondanti, acidi grassi saturi (SFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA). Le composizioni acidiche, valori medi degli acidi grassi, delle diverse olive sono riportate in tabella 3. L'importanza nutrizionale dell'olio e delle olive da tavola è fortemente legata alla composizione acidica, caratterizzata da un alto contenuto di acidi grassi insaturi e un basso contenuto di saturi.

**Tabella 3.** Composizione acidica dei diversi prodotti. I valori riportati sono espressi come medie  $\pm$  deviazione standard.

Acidi Grassi (%)	Bella di Cerignola (sivigliano)	Hojiblanca (californiano denocciolate)	Itrana (naturale)	Nocellara del Belice (Castelvetro)	Nocellara etnea (naturale)
acido miristico (C14:0)	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
acido palmitico (C16:0)	15.25 $\pm$ 0.79	15.17 $\pm$ 1.87	12.92 $\pm$ 1.00	14.61 $\pm$ 1.41	16.19 $\pm$ 3.59
acido palmitoleico (C16:1)	0.76 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.11	1.07 $\pm$ 0.01	1.27 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.16
acido eptadecanoico (C17:0)	0.22 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.08
acido eptadecenoico (C17:1)	0.28 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.11
acido stearico (C18:0)	3.42 $\pm$ 0.13	2.66 $\pm$ 0.46	1.95 $\pm$ 0.09	3.61 $\pm$ 0.41	3.17 $\pm$ 0.56
acido oleico (C18:1)	68.82 $\pm$ 1.39	74.20 $\pm$ 1.95	76.12 $\pm$ 1.38	71.19 $\pm$ 1.03	69.57 $\pm$ 4.19
acido linoleico (C18:2)	9.40 $\pm$ 1.48	5.11 $\pm$ 1.95	6.42 $\pm$ 0.73	7.41 $\pm$ 1.19	8.25 $\pm$ 2.48
acido arachico (C20:0)	0.58 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.03	0.56 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.06
acido linolenico (C18:3)	0.77 $\pm$ 0.20	0.60 $\pm$ 0.37	0.68 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.22	0.48 $\pm$ 0.16
acido eicosenoico (C20:1)	0.25 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.03
acido behenico (C22:0)	0.16 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02
acido lignoceric (C24:0)	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02
$\Sigma$ SFAs	19.72 $\pm$ 0.85	18.65 $\pm$ 2.12	15.38 $\pm$ 1.05	19.04 $\pm$ 1.53	20.22 $\pm$ 3.36
$\Sigma$ MUFAs	70.11 $\pm$ 1.37	75.64 $\pm$ 1.83	77.52 $\pm$ 1.33	72.78 $\pm$ 1.02	71.05 $\pm$ 4.10
$\Sigma$ PUFAs	10.17 $\pm$ 1.65	5.72 $\pm$ 2.31	7.09 $\pm$ 0.79	8.18 $\pm$ 1.39	8.73 $\pm$ 2.53

È ampiamente dimostrato come un consumo costante di questi prodotti favorisca un abbassamento del colesterolo “cattivo” (LDL) ed un contestuale innalzamento di quello “buono” (HDL) aiutando a prevenire le malattie cardiovascolari e l’arteriosclerosi. Tra gli acidi grassi l’acido oleico, il più abbondante, sembra favorire la secrezione pancreatica e biliare, indispensabile per l’assorbimento lipidico. Nelle cinque varietà studiate troviamo una differenza nella composizione acidica e conseguentemente nei rapporti tra i diversi acidi grassi (Tabella 3). La varietà che presenta una maggiore quantità di MUFA è l’Itrana con il 77.52% seguita dalla Hojiblanca con 75.64%, mentre quella con il contenuto più basso è la Bella di Cerignola con 70.11%. La maggior percentuale dei SFA è presente nella varietà Nocellara etnea con il 20.22%, seguita dalla Bella di Cerignola e dalla Nocellara del Belice con una quantità che si aggira rispettivamente del 19.72 e 19.04%, mentre per l’Hojiblanca e l’Itrana tale contenuto è pari a 18.65 e 15.38%. Ritornando alla tabella 2, per ciò che riguarda il contenuto in carboidrati nelle olive, esso è basso e tende a diminuire ulteriormente durante la fermentazione ad opera dei








microrganismi presenti. Nei campioni analizzati la Nocellara del Belice presenta un contenuto in carboidrati più basso (2.9 g/100 g p.e.), mentre i più alti valori sono stati riscontrati nell'Itrana con circa 6.4 g/100 g p.e.

Buono il contenuto di fibre presenti, importante soprattutto per le funzioni intestinali, con valori di circa 3.0/100 g p.e. in tutti i campioni analizzati, ad eccezione della Nocellara del Belice (2.6 g/100 g p.e.). Le olive verdi, in generale, presentano un contenuto di fibra maggiore delle nere. Il contenuto di proteine, come riportato in altri lavori [1], è di circa 1.0-1.4g/100g di p.e. Le proteine rappresentano costituenti cellulari che svolgono azione strutturale e funzionale nelle cellule, nonostante la bassa quantità presente in questo prodotto, esse contengono molti aminoacidi essenziali importanti dal punto di vista nutrizionale [4]. Il contenuto di sale è piuttosto alto nell'Itrana (5.1 g/100 g p.e.), seguita dalla Nocellara etnea (4.0g/100 g p.e.), Hojiblanca e Bella di Cerignola (3.3g/100 g p.e.) e Nocellara del Belice (3.0g/100 g p.e.).

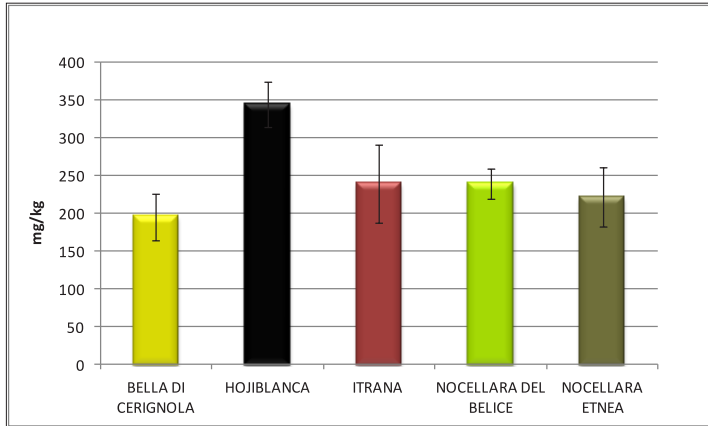
Nella tabella 4 sono stati espressi in percentuale i valori degli elementi energetici e di determinati elementi nutritivi menzionati nella tabella di cui alla parte B dell'allegato XIII nel Regolamento 1169/2011 e s.m.i. nei diversi prodotti, tenendo conto dei valori nutritivi di riferimento (V.N.R.) di assunzione di un adulto medio (8400 kJ/2000 kcal).

**Tabella 4.** Contributo all'assunzione giornaliera di un adulto medio, riferito a 100 g di olive da tavola, degli elementi energetici e nutritivi ivi presenti.

 <b>Bella di Cerignola</b>	<b>Energia</b> kcal/ kj 8%	<b>Grassi</b> 21%	<b>Acidi grassi saturi</b> 15%	<b>Carboidrati</b> 1%	<b>Zuccheri</b> 0%	<b>Proteine</b> 2%	<b>Sale</b> 55%
 <b>Hojiblanca</b>	<b>Energia</b> kcal/kj 8%	<b>Grassi</b> 21%	<b>Acidi grassi saturi</b> 14%	<b>Carboidrati</b> 2%	<b>zuccheri</b> 0%	<b>Proteine</b> 2%	<b>Sale</b> 55%
 <b>Itrana</b>	<b>Energia</b> Kcal/kj12%	<b>Grassi</b> 32%	<b>Acidi grassi saturi</b> 17%	<b>Carboidrati</b> 2%	<b>zuccheri</b> 0%	<b>Proteine</b> 3%	<b>Sale</b> 85%
 <b>Nocellara del Belice</b>	<b>Energia</b> kcal/kj10%	<b>Grassi</b> 28%	<b>Acidi grassi saturi</b> 19%	<b>Carboidrati</b> 1%	<b>zuccheri</b> 0%	<b>Proteine</b> 2%	<b>Sale</b> 50%
 <b>Nocellara etnea</b>	<b>Energia</b> kcal/kj12%	<b>Grassi</b> 35%	<b>Acidi grassi saturi</b> 24%	<b>Carboidrati</b> 2%	<b>zuccheri</b> 0%	<b>Proteine</b> 3%	<b>Sale</b> 67%

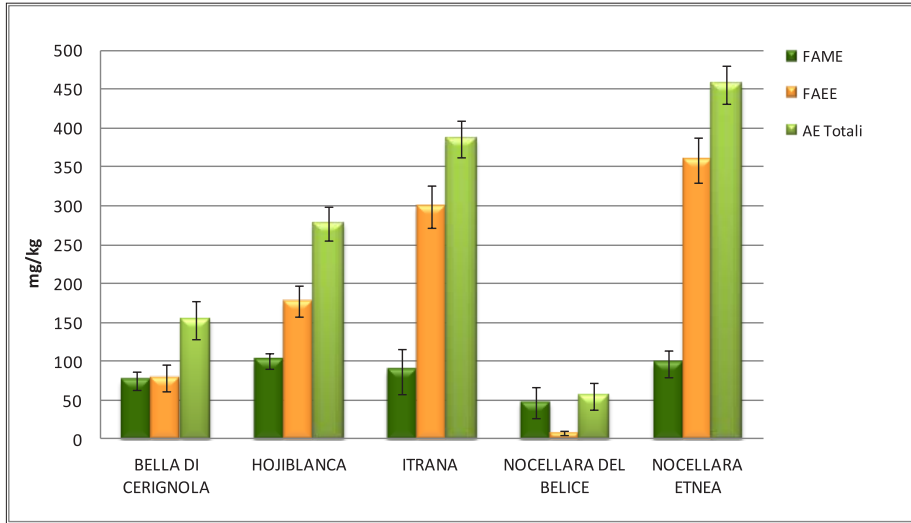
La descrizione chimico, chimico-fisica delle olive da tavola è stata completata con l'analisi di alcuni altri parametri qualitativi effettuata sull'olio estratto da esse. Il contenuto di pigmenti clorofillici maggiore è stato riscontrato nella varietà Hojiblanca trasformata con il metodo californiano con un valore medio di 92 mg/kg, mentre nelle varietà Itrana e Nocellara etnea si aggira rispettivamente sui 17 mg/kg e 16 mg/kg, seguita dalla Nocellara del Belice con 15 mg/kg e dalla Bella di Cerignola con il valore medio più basso di 12 mg/kg.

I tocoferoli (Figura 1) rappresentano il 2-3% della frazione insaponificabile ed esplicano una duplice azione, in quanto presentano un'attività vitaminica e un'azione antiossidante. Il più rappresentativo è l' $\alpha$ -tocoferolo che costituisce il 90% e la sua concentrazione sembra essere correlata agli alti livelli di clorofille e alla concomitante richiesta di disattivazione dell'ossigeno singoletto. Il contenuto più alto di tocoferoli si è riscontrato nella varietà Hojiblanca (344 mg/kg), il contenuto più basso (196 mg/kg) nella varietà Bella di Cerignola. Per tutte le altre varietà studiate il contenuto di tocoferoli è superiore ai 200 mg/kg.



**Figura 1.** Contenuto di tocoferoli nell'olio dei diversi prodotti.

Il contenuto di alchil esteri (AE), etil esteri (FAEE) e metil esteri (FAME) degli acidi grassi (Figura 2), che prendono origine dalla combinazione degli acidi grassi liberi rispettivamente con alcol etilico e metilico [6], nelle cinque varietà studiate è differente in quanto legato anche al sistema di lavorazione adottato. Infatti, come riportato in un precedente studio [7] nelle olive al naturale il contenuto totale di alchil esteri potrebbe essere maggiore a causa del lento processo fermentativo, con maggiore variabilità di microflora spontanea che si può sviluppare e dare origine ad eventuali difetti, mentre le olive da tavola ottenute con trattamenti alcalini presentano una minore quantità di questi composti. Le varietà con il più alto contenuto di AE totali sono state la Nocellara etnea e l'Itrana trasformate al naturale (456.3 e 386.6 mg/kg), seguite dalla Hojiblanca trasformata con il metodo californiano (277.4 mg/kg). Per la Bella di Cerignola e la Nocellara del Belice i valori sono stati inferiori (153.4 e 55.2 mg/kg).



**Figura 2.** Contenuto delle diverse frazioni degli AE nei diversi prodotti.

Nelle olive tra i componenti minori dell'insaponificabile troviamo fitosteroli ( $\beta$ -sitosterolo, stigmasterolo, campesterolo), alcoli alifatici, alcoli triterpenici e sostanze fenoliche.

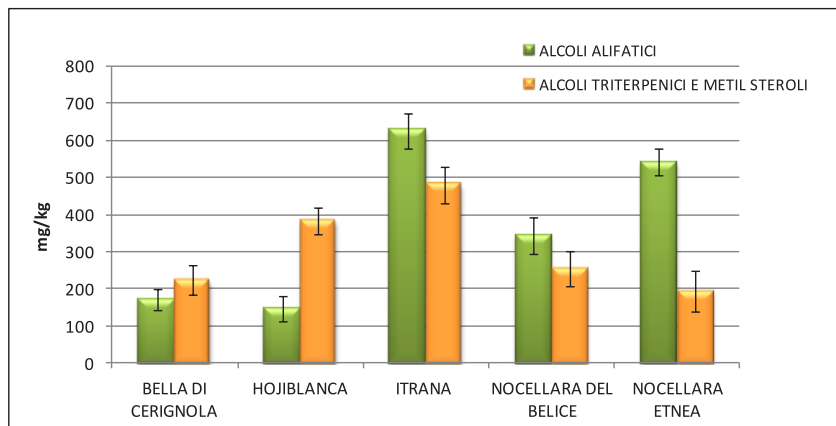
Gli steroli, composti ad alto peso molecolare, risultano quantitativamente tra i più importanti dopo gli idrocarburi e oltre che in forma libera possono trovarsi in forma esterificata con acidi grassi. Gli steroli maggiormente presenti e che caratterizzano le varietà studiate sono il  $\beta$ -sitosterolo, il campesterolo, il clerosterolo, lo stigmasterolo, e il  $\Delta$ -5-Avenasterolo (Tabella 5).

In media la Nocellara del Belice e la Nocellara etnea presentano un identico valore di  $\beta$ -sitosterolo (circa 87%) e risultano simili anche nel contenuto di steroli totali (934 e 906 mg/kg). Nell'Hojiblanca il contenuto di  $\beta$ -sitosterolo risulta il più alto (90.7%) con un contenuto totale di steroli di circa 1137 mg/kg. Nella Bella di Cerignola e nell'Itrana la quantità di  $\beta$ -sitosterolo è rispettivamente di 90.4% e 89.5%, mentre il contenuto di steroli totali è 1273 mg/kg e 1133 mg/kg. In Figura 3 è riportata la composizione alcolica alifatica e triterpenica delle olive. Gli alcoli alifatici superiori ( $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{26}$  e  $C_{28}$ ) rappresentano lo 0.5% della frazione in saponificabile e una buona parte sono esterificati con acidi grassi a formare le cere. L'Itrana e la Nocellara etnea presentano un più alto contenuto di alcoli alifatici (626 e 541 mg/kg). A formare questa frazione sono soprattutto  $C_{26}$  e  $C_{28}$  in quantità di circa 200 mg/kg. Gli alcoli triterpenici ed i metil steroli, una classe di composti

molto complessa, sono presenti in quantità variabili tra 190 e 500 mg/kg circa (più abbondanti nella varietà Itrana e Hojiblanca). I principali costituenti sono  $\beta$ -amirina, butirrospermolo, 24-metilen-cicloartanolo, cicloartenolo e citrostadienolo.

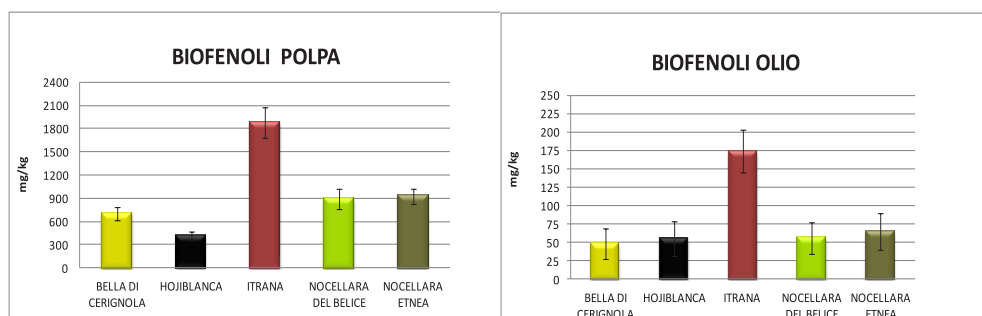
**Tabella 5.** Composizione sterolica dei diversi prodotti. I valori riportati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

Steroli (%)	Bella di Cerignola (sivigliano)	Hojiblanca (californiano)	Itrana (naturale)	Nocellara del Belice (Castelvetrano)	Nocellara etnea (naturale)
Colesterolo	0.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.1
Brassicasterolo	0.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.3
24-Metilencolesterolo	0.4 $\pm$ 1.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2
Campesterolo	3.3 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.4
Campestanolo	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1
Stigmasterolo	2.0 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.9
$\Delta$ -7-Campesterolo	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.2
$\Delta$ -5,23-Stigmastadienolo	0.3 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.4
Clerosterolo	0.8 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.4
$\beta$ -Sitosterolo	90.4 $\pm$ 1.2	90.7 $\pm$ 0.9	89.5 $\pm$ 2.7	87.4 $\pm$ 1.3	87.4 $\pm$ 1.5
Sistostanolo	0.5 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2
$\Delta$ -5-Avenasterolo	0.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 1.5	3.4 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.6
$\Delta$ -5,24-Stigmastadienolo	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3
$\Delta$ -7-Stigmastenolo	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	0.0 $\pm$ 0.0
$\Delta$ -7-Avenasterolo	0.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
$\beta$ -Sitosterolo app.	93.2 $\pm$ 1.0	94.6 $\pm$ 0.5	95.1 $\pm$ 0.7	93.1 $\pm$ 0.4	92.6 $\pm$ 0.5
Steroli totali (mg/kg)	1273 $\pm$ 303	1137 $\pm$ 268	1133 $\pm$ 268	934 $\pm$ 187	906 $\pm$ 329



**Figura 3.** Composizione della frazione alcolica dei diversi prodotti.

Le olive sono estremamente ricche di fenoli, in particolare contengono l'oleuropeina, demetileuropeina e ligustroside, secoiridoidi glucosidici che, oltre ad essere responsabili della sensazione gustativa di amaro, molte ricerche hanno dimostrato possedere importanti proprietà salutistiche [8]. Qualsiasi metodo di trasformazione per la produzione di olive da tavola ha l'obiettivo primario della rimozione dell'amaro attraverso la sua idrolisi mediante mezzi chimici di deamarizzazione o con metodi biologici. Attraverso la deamarizzazione chimica della drupa si ottengono, con l'idrolisi dell'oleuropeina in acido elenolico, glucosio e idrossitirosolo, tutti composti non amari. La deamarizzazione biologica non riesce a diminuire il livello di amaro allo stesso livello del sistema chimico, di conseguenza, le olive mantengono un amaro più spiccato che spesso viene apprezzato dal consumatore.



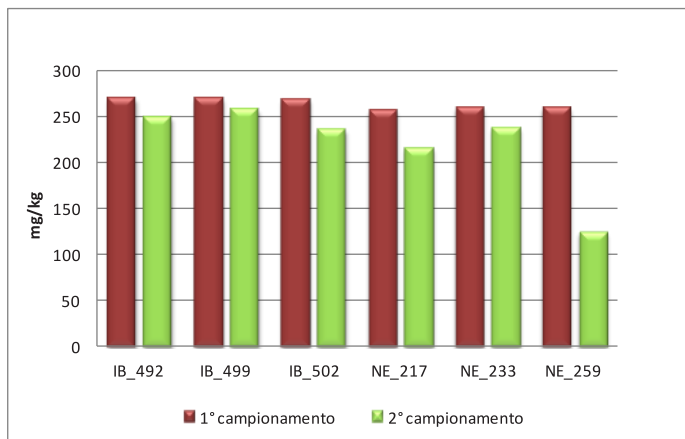
**Figura 4.** Contenuto di biofenoli totali presenti nei diversi prodotti.

La varietà, stadio di maturazione delle olive, tipo di trasformazione influiscono sul contenuto e tipologia di sostanze fenoliche presenti nel prodotto [9], [10]. In Figura 4 viene riportato il contenuto di fenoli totali presente nella polpa e nell'olio delle cinque varietà. Il contenuto maggiore di fenoli, sia nella polpa che nell'olio, si ritrova nell'Itrana "al naturale" (1881 mg/kg polpa - 175 mg/kg olio) e Nocellara etnea "al naturale schiacciate" (925 mg/kg polpa - 65 mg/kg olio). Mentre le varietà che hanno subito un processo chimico di deamarizzazione presentano un contenuto di fenoli totali inferiore sia nella polpa che nell'olio: Bella di Cerignola (706 mg/kg e 49 mg/kg), Hojiblanca (414 mg/kg e 55 mg/kg olio) e Nocellara del Belice (894 mg/kg e 56 mg/kg).

### **Evoluzione di alcuni parametri qualitativi e chimici nelle olive da tavola Itrana e Nocellara etnea trasformate al naturale**

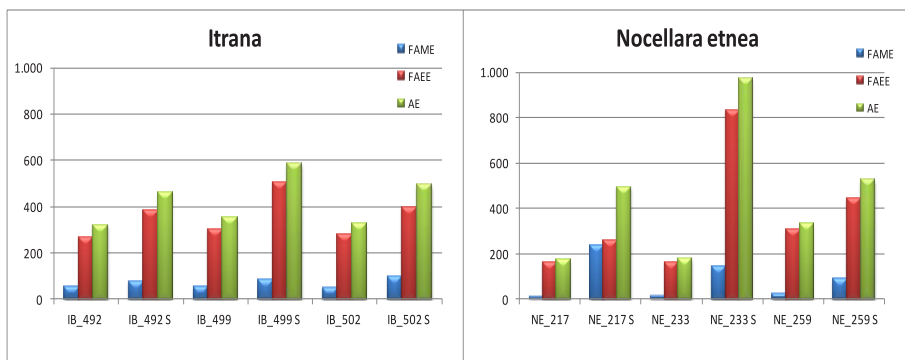
Nei due campionamenti eseguiti a distanza di sette mesi, appartenenti agli stessi lotti di olive da tavola Itrana (IB\_492, IB\_499, IB\_502) e Nocellara etnea (NE\_233, NE\_259, NE\_217), stoccati in magazzino a temperatura ambiente nei fusti di approvvigionamento, sono state riscontrate delle variazioni, se pur lievi, dei parametri qualitativi.

Nella varietà Itrana, le olive del primo campionamento presentano in media un valore di umidità del 67%, un contenuto di ceneri del 3.4% e un contenuto di olio del 19.5%, mentre nel secondo campionamento l'umidità tende a diminuire con un valore di 66 %, il contenuto di ceneri e di olio aumentano rispettivamente del 4.2 % e 22.4 %. Per la varietà Nocellara etnea, le olive del primo campionamento presentano in media un valore di umidità del 70% e nel secondo del 63%, il contenuto di ceneri rimane all'incirca uguale tra i due campionamenti (3.1 vs 3.3%), mentre il contenuto di olio tende ad aumentare (20.5 vs 26.9%). Come è possibile osservare nella Figura 5 il tempo di stoccaggio ha un effetto negativo sul contenuto degli antiossidanti presenti: la quantità di tocoferoli diminuisce ma non in modo drastico, ad eccezione del campione NE\_259 dove il contenuto di tocoferoli si riduce da circa 260 a 125 mg/kg.



**Figura 5.** Contenuto di tocoferoli nell'olio estratto dalle cultivar Itrana e Nocellara etnea trasformate al naturale.

Nella Figura 6 sono riportati i valori di FAME, FAEE e di AE nel primo e secondo campionamento. In entrambe le varietà in tutti i lotti sono stati riscontrati valori più alti di FAME e soprattutto di FAEE nei campioni dopo sette mesi di stoccaggio.

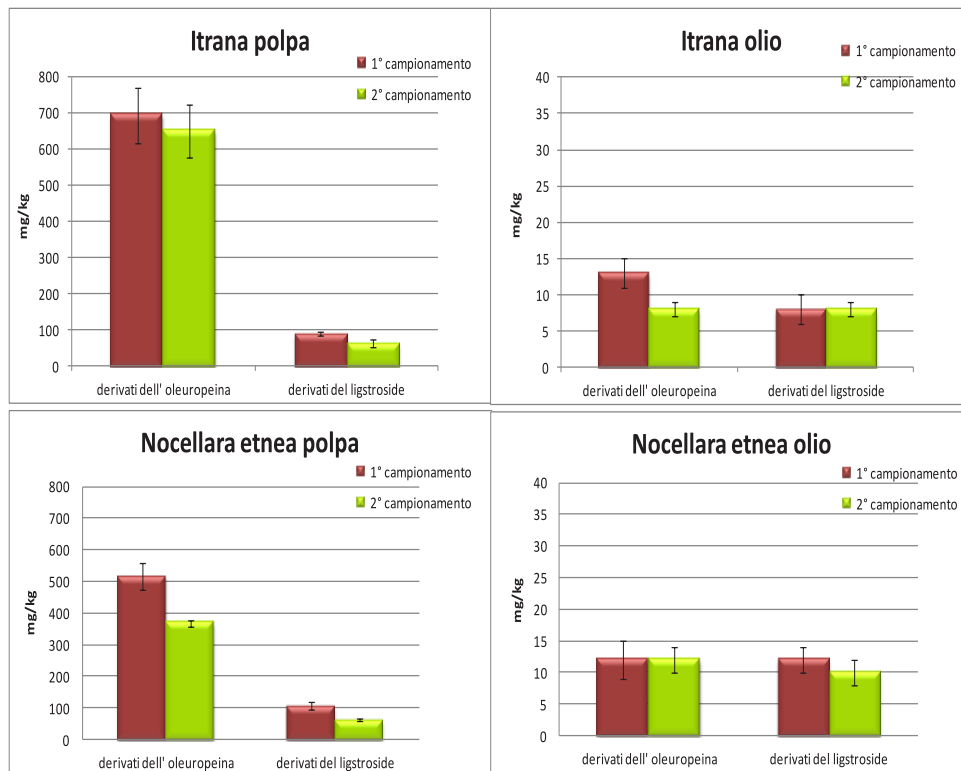


**Figura 6.** Variazione del contenuto di alchil esteri e sue frazioni nell'olio estratto dalle varietà Itrana e Nocellara etnea

Nella Figura 7 sono riportate le medie nei lotti del primo e secondo campionamento dei derivati dell'oleuropeina e del ligustroside nelle due varietà. Nell'Itrana i derivati dell'oleuropeina (idrossitirosolo, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e 3,4-DHPEA-EA,H) sia nella polpa che nell'olio diminuiscono, mentre i derivati del ligustroside (tirosolo, p-HPEA-EDA, p-HPEA-EA, p-HPEA,-EA,H) si riducono nella polpa e nell'olio rimangono invariati. Anche per quanto riguarda la varietà



Nocellara etnea si verifica una diminuzione di tali derivati nella polpa e nell'olio rimangono stabili.



**Figura 7.** Variazione del contenuto di secoiridoidi nelle varietà Itrana e Nocellara etnea

## Conclusioni

Le analisi condotte sui diversi campioni di olive da tavola delle cinque varietà: Bella di Cerignola, Hojiblanca, Itrana, Nocellara del Belice e Nocellara etnea, hanno permesso una caratterizzazione dal punto di vista chimico/nutrizionale del prodotto finale. Per ciascuna varietà è stata realizzata un'etichetta nutrizionale, relativa alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, resa obbligatoria con il regolamento UE 1169/2011 e s.m.i. Tutte le varie tipologie di olive, seppur differenti, sono risultate avere un alto valore nutritivo: quantità di MUFA

predominante tra gli acidi grassi, alto contenuto di fibre e di sostanze antiossidanti. Inoltre, dalle misurazioni carpologiche, caratterizzanti la varietà, tutti i campioni appartenenti a ciascuna tipologia di prodotto sono risultati abbastanza uniformi per ciò che riguarda le dimensioni, la percentuale di polpa, rapporto polpa/nocciolo e contenuto di olio.

## Bibliografia

1. Lanza B., Di Serio M.G., Iannucci E., and Russi F., 2012. Analisi nutrizionale e sensoriale delle olive da tavola nell'ambito delle attività previste dal Regolamento CE n.867/2008. Sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità e qualità dell'olio di oliva e delle olive da tavola, 2012, 85-96.
2. Accardi G., Aiello A., Gargano V., Gambino C.M., Caracappa S., Marineo S., Vesco G., Carru C., Zinellu A., Zarcone M., Caruso C., and Candore G., 2016. Nutraceutical effects of table green olives: a pilot study with Nocellara del Belice olives. *Immunity & Ageing* 2016, 13:11.
3. Lanza B., Di Marco S., Bacceli M., Di Serio M.G., Di Loreto G., Cellini M., and Simone N., 2021. *Lactiplantibacillus plantarum* used as single, multiple, and mixed starter combined with *Candida bordini* for table olive fermentations: chemical, textural, and sensorial characterization of final products. *Fermentation* 2021, 7, 239.
4. Cappello A., and Poiana M., 2005. Le olive da tavola in Sicilia: produzione di qualità. Castelvetro, stampato nel novembre 2005.
5. Lanza B., Di Serio M.G., and Iannucci E., 2013. Effects of maturation and processing technologies on nutritional and sensory qualities of Itrana table olives. *Grasas Y Aceites*, 2013, 64, 272-284.
6. Di Giacinto L., Di Loreto G., Di Serio M.G., Giansante L., Faberi A., Marianella R.M., Ricchetti L., Perri E., Serraiocco A., and Vito R., 2014. Monitoraggio degli alchil esteri (AE) nell'olio extra vergine di olive "MONITORALCHIL" Risultati dell'attività sperimentale 2012-2014.
7. Lanza B., Di Serio M.G., and Di Giacinto L., 2016. Fatty-acid alkyl esters in table olives in relation to abnormal fermentation and poorly conducted technological treatments. *Grasas Aceites* 2016, 67 (2) DOI: 10.3989/gya.0630152

8. Covas M.I., 2009. Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in human: reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology* 2009, 16, 216-218.
9. Chabane F.A., Tamendjari A., Rovellini P., Romero C., and Medina E., 2021. Chemical parameters and antioxidant activity of turning color natural-style table olives of the Sigoise cultivar. *Grasas y Aceites*, 2021,72 (3)
10. Soler-Rivas C., Espín J. C., and Wichers H. J., 2000. Review Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1013-1023.

# LAVORI SCIENTIFICI REALIZZATI NELL'AMBITO DEL PROGETTO DEAOOLIVA

## SU RIVISTE INTERNAZIONALI:

1. Bacceli, M., Simone, N., Lanza, B., Cichelli, A. A novel approach for the characterization of the textural properties of table olives: acoustic compression related to sensory analysis. **Foods**, 2023, 12, 241. DOI: 10.3390/foods12020241
2. Lanza, B., Di Marco, S., Bacceli, M., Di Serio, M.G., Di Loreto, G., Cellini, M., Simone, N. *Lactiplantibacillus plantarum* used as single, multiple, and mixed starter combined with *Candida boidinii* for table olive fermentations: Chemical, textural, and sensorial characterization of final products. **Fermentation**, 2021, 7 (4), art. no. 239, DOI: 10.3390/fermentation7040239
3. Lanza, B., Zago, M., Di Marco, S., Di Loreto, G., Cellini, M., Tidona, F., Bonvini, B., Bacceli, M., Simone, N. Single and multiple inoculum of *Lactiplantibacillus plantarum* strains in table olive lab-scale fermentations. **Fermentation**, 2020, 6 (4), art. no. 126, DOI: 10.3390/fermentation6040126
4. Lanza, B., Cellini, M., Di Marco, S., D'amico, E., Simone, N., Giansante, L., Pompilio, A., Di Loreto, G., Bacceli, M., Del Re, P., Di Bonaventura, G., Di Giacinto, L., Aceto, G.M. Olive pâté by multi-phase decanter as potential source of bioactive compounds of both nutraceutical and anticancer effects. **Molecules**, 2020, 25 (24), art. no. 5967, DOI: 10.3390/molecules25245967
5. Lanza, B., Marco, S.D., Simone, N., Di Marco, C., Gabriele, F. Table olives fermented in iodized sea salt brines: Nutraceutical/sensory properties and microbial biodiversity. **Foods**, 2020, 9 (3), art. no. 301, DOI: 10.3390/foods9030301
6. Ortenzi L., Figorilli S., Costa C., Pallottino F., Violino S., Pagano M., Imperi G., Manganiello R., Lanza B., Antonucci F. A machine vision rapid method to determine the ripeness degree of olive lots. **Sensors**, 2021, 21: 2940.

7. Salvucci G., Pallottino F., De Laurentiis L., Del Frate F., Manganiello R., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Bassotti B., Violino S., Ortenzi L., Antonucci F. Fast olive quality assessment through RGB images and advanced Convolutional Neural Network modeling. **European Food Research and Technology**, 2022, 248(5): 1395-1405.
8. Bencresciuto, G. F., Mandalà, C., Migliori, C. A., Cortellino, G., Vanoli, M., Bardi, L. Assessment of starters of Lactic Acid Bacteria and killer yeasts: selected strains in lab-scale fermentations of table olives (*Olea europaea* L.) cv. Leccino. **Fermentation**, 2023, 9, no. 2: 182. DOI: 10.3390/fermentation9020182
9. Manganiello, R., Pagano, M., Nucciarelli, D., Ciccoritti, R., Tomasone, R., Di Serio M.G., Giansante, L., Del Re, P., Servili, M., Veneziani, G. Effects of ultrasound technology on the qualitative properties of Italian Extra Virgin Olive Oil. **Foods**, 2021, 10(11), 2884. DOI: 10.3390/foods10112884
10. Natella, F., Pastore, G., Aguzzi, A., Gabrielli, P., Nardo, N., Ambra, R. The fate of the chlorophyll derivatives in olives preserved and/or packaged in presence of exogenous copper. **Molecules**, 2023, 28, 4250. DOI: 10.3390/molecules28104250

#### **SU RIVISTE DIVULGATIVE:**

11. Lanza, B.; Simone, N.; Bacceli, M. L'analisi sensoriale di olive e patè. **Olivo e Olio**, 2022, 1: 39-43.

#### **IN ATTI DI CONVEGNI:**

1. Simone N., Bacceli M., Lanza B. Factors that affect Italian consumers' table olive consumption behaviour. **EUROSENSE 2020, 13-16/12/2020, Rotterdam**
2. Bacceli M., Simone N., Lanza B. Social communication: brief investigation about social media use by some typical food industries in Abruzzo region (Italy) **EUROSENSE 2020, Rotterdam 13-16 December 2020**
3. Lanza B., Bacceli M., Simone N. Rheological and sensory approaches to characterize table olive texture **EUROSENSE 2020, 13-16/12/2020, Rotterdam**
4. Lanza B., Simone N., Bacceli M. L'analisi sensoriale delle olive da tavola: proposta di perfezionamento del metodo COI con validazione dei parametri

attraverso analisi texturale. **Atti VII Convegno Nazionale SISS – 27-29/4/2022, Matera**

5. Lanza B., Simone N., Bacceli M. L'analisi sensoriale del paté di olive: proposta di un foglio di un profilo con validazione di parametri attraverso analisi texturale. **Atti VII Convegno Nazionale SISS – 27-29/4/2022, Matera**

6. Bacceli M., Di Marco S., Vecchiotti G., Di Loreto G., Cellini M., Di Marco C., Simone N., Lanza B. Fermentazioni spontanee e guidate di olive della cv. "Grossa di Cassano" a diversi stadi di maturazione: valutazione texturale e sensoriale. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

7. Vecchiotti G., Di Marco S., Bacceli M., Di Loreto G., Cellini M., Simone N., Lanza B. Fermentazione guidata di olive della cv. "Itrana" con aggiunta di starter misto. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

8. Pistorio E., Timpanaro N., Foti P., Mangiameli S., Bacceli M., Lanza B., Romeo F. V. Monitoraggio della qualità igienica di olive da tavola commerciali. Poster 71, abstract pp. 141, **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

9. Manganiello R., Ortenzi L., Violino S., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Costa C., Pallottino F., Lanza B., Antonucci F. Approcci di machine learning per la selezione qualitativa real-time di diversi stadi di lavorazione di olive da mensa. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

10. Ortenzi L., Violino S., Figorilli S., Vasta S., Tocci F., Antonucci F., Costa C., Pallottino F. Machine learning e IA a supporto del settore olivicolo-oleario. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

11. Salvucci G., Pallottino F., Costa C., De Laurentiis L., Del Frate F., Manganiello R., Tocci F., Vasta S., Figorilli S., Bassotti B., Violino S., Ortenzi L., Antonucci F. Valutazione della qualità delle olive tramite immagini RGB e modellazione avanzata di una rete neurale convoluzionale. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

12. Cortellino G., Paccani S., Lovati F., Grassi M., Bacceli M., Lanza B., Vanoli M. Test meccanico-acustico: un nuovo approccio per valutare la texture di olive da

tavola. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

**13.** Vanoli M., Paccani S., Lovati F., Grassi M., Lanza B., Cortellino G. Il naso elettronico e la qualità sensoriale delle olive da tavola. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

**14.** Bencresciuto G.F., Mandalà C., Cerullo A., Migliori C.A., Monaco S., Mannazzu I., Bardi L. Prove di deamarizzazione controllata di olive da tavola con ceppi selezionati di LAB e lieviti killer. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

**15.** Manganiello R., Ciccoritti R., Tomasone R., Cedrola C., Pagano M. Progettazione di un dispositivo prototipale per il monitoraggio step-by-step dei parametri di fermentazione delle olive da mensa. **Atti V Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio – 26-28/10/2022, Alghero (SS)**, ISBN 978-88-903404-7-5.

