

ALDO CORSETTI\*, MARIA SCHIRONE\*, GIORGIA PERPETUINI\*,  
AURORA CIARROCCI\*, ROSANNA TOFALO\*, GIOVANNA SUZZI\*

## La gestione della fermentazione nella produzione dell'Itrana da mensa

L'Itrana è una cultivar di olivo originaria e tipica della provincia di Latina, regione Lazio, riconosciuta nel 2009 zona DOP "Colline Pontine", che dà un frutto utilizzato per produrre olive da mensa e olio extravergine di oliva (Unaprol, 2011). È nota anche con i nomi di "Oliva di Gaeta", "Oliva Grossa", "Trana" ed "Esperia". La coltivazione della cv. Itrana comprende una superficie complessiva di 9.500 ha, pari al 76% dell'area olivicola pontina, estendendosi dal Comune di Castelforte al Comune di Rocca Massima, interessando la zona collinare del sistema orografico dei Monti Ausoni, Lepini e Aurunci. La produzione media annuale della cv. Itrana è pari a 5.000 tonnellate, di cui l'85% viene venduta subito dopo la raccolta, mentre la restante parte viene destinata alla produzione di olive a fermentazione spontanea. Negli ultimi anni, si è rilevato un costante aumento delle aziende agricole che, oltre a produrre, trasformano, confezionano e vendono le olive. Sul territorio inoltre, sono presenti una decina di imprese di trasformazione e diversi intermediari di mercato, con propria capacità di stoccaggio. La maggiore produzione di olive della cv. Itrana "Gaeta" è concentrata nei comuni di Itri, Cori, Rocca Massima e Sonnino e i soggetti interessati sono organizzati in ditte individuali o in cooperative (Itri e Sonnino) (Unaprol, 2011).

Uno degli aspetti più rilevanti nella preparazione delle olive da mensa è il processo di deamarizzazione, consistente nell'allontanamento dell'oleuropeina, responsabile di sapore amaro del frutto e di esercitare anche un'azione antibatterica (Servili et al., 2006). Nelle fermentazioni naturali la deamarizzazione biologica delle drupe dipende dalle attività enzimatiche di alcuni batteri lattici (LAB) e tra questi le specie riscontrate con maggiore frequenza sono *Lacto-*

\* *Facoltà di BioScienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, Università di Teramo*

*bacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* (Hurtado et al., 2012; Corsetti et al., 2012; Tofalo et al., 2014). I LAB costituiscono la parte preponderante del microbiota delle olive fermentate spontaneamente e attraverso la produzione di acido lattico acidificano il prodotto permettendone il prolungamento del tempo di conservazione. Le condizioni principali per la riuscita di un'ottima fermentazione lattica sono: la presenza di una sufficiente quota di carboidrati fermentescibili, una ridotta pressione parziale di ossigeno durante la fermentazione, la conservazione del prodotto e un'adeguata resistenza all'inibizione da polifenoli (Corsetti et al., 2012). La fermentazione spontanea non è facilmente prevedibile né controllabile e porta spesso all'ottenimento di prodotti con caratteristiche reologiche e sensoriali non sempre riproducibili e standardizzabili. La mancata standardizzazione del processo fermentativo può, in particolare, comportare problemi sia dal punto di vista della sicurezza alimentare (per esempio sviluppo di microrganismi patogeni) che dal punto di vista della qualità sensoriale del prodotto (comparsa di fenomeni alterativi e di deterioramento) (Lanza e Corsetti, 2009). In questo contesto, in maniera sempre più urgente, si sta imponendo la necessità di "assistenza tecnica" alle aziende per controllare e migliorare il processo produttivo.

Per ottenere un prodotto di alta qualità risulta necessario conoscere la composizione e la dinamica dei gruppi microbici nelle olive da mensa, e può essere utile ricorrere all'aggiunta di microrganismi selezionati. Un'appropriata formulazione di colture starter, infatti, previene i fenomeni di *spoilage* da parte di microrganismi alteranti, inibisce la crescita di microrganismi patogeni e garantisce un processo controllabile e standardizzato e, in definitiva, un prodotto privo di difetti (Corsetti et al., 2012). Al fine di poter selezionare/individuare adeguate colture starter è necessario:

- conoscere le caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche del prodotto finito;
- conoscere la struttura della popolazione microbica e della sua biodiversità;
- valutare le attitudini tecnologiche dei ceppi;
- validare i ceppi selezionati in fermentazioni su scala di laboratorio e impianto pilota prima di passare all'applicazione industriale.

In un recente studio, Tofalo et al. (2012) hanno caratterizzato olive da mensa di sei differenti cultivar italiane (Itrana bianca, Itrana nera, Peranzana, Nocellara del Belice, Cellina di Nardò e Bella di Cerignola) al termine della fermentazione, con l'obiettivo di selezionare colture starter da applicare per la produzione di olive da mensa. I principali gruppi microbici rilevati nelle cv. Itrana bianca e Itrana nera sono riportati in tabella 1.

GRUPPI MICROBICI (LOG CFU/ML)	CULTIVAR	
	Itrana bianca	Itrana nera
Carica mesofila aerobia	6,70±0,29*	6,17±0,53
Lieviti	6,67±0,44	6,71±0,21
Lattobacilli mesofili	6,56±0,31	6,25±0,21
Enterococchi	3,69±0,05	3,59±0,01

Tab. 1 *Principali gruppi microbici rilevati nelle salamoie delle cv. Itrana bianca e nera*  
 Legenda: \*I risultati sono espressi come media ± deviazione standard

CULTIVAR	ACIDI ORGANICI				PH
	ACIDO LATTICO	ACIDO ACETICO	ACIDO PROPIONICO	ACIDO SUCCINICO	
Itrana bianca	113,05±0,78*	47,0±0,71	0,75±0,08	6,05±0,21	4,24±0,01
Itrana nera	126,35±0,64	41,55±0,49	0,79±0,01	7,15±0,49	4,09±0,03

Tab. 2 *Valori di pH e concentrazione (mM) di acido lattico, acetico, propionico e succinico nelle cv. analizzate*

Legenda: \*I risultati sono espressi come media ± deviazione standard

Non si osservano differenze significative tra le due cultivar analizzate. In particolare, il rapporto tra LAB e lieviti è abbastanza simile, anche se i lieviti presentano una maggiore resistenza alle alte concentrazioni saline e ai composti fenolici rispetto ai LAB che sono fondamentali per il corretto andamento del processo fermentativo (Arroyo-Lopez et al., 2008; Hurtado et al., 2012). *Enterobacteriaceae* e stafilococchi coagulasi negativi sono risultati non rilevabili ( $<10^2$  ufc/ml) nei campioni analizzati (dati non mostrati). Inoltre, le salamoie dei campioni analizzati si sono caratterizzate per l'assenza dei patogeni ricercati, ossia *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157:H7. Generalmente, microrganismi della famiglia degli enterobatteri, sono presenti durante le prime fasi della fermentazione, ma diminuiscono nel tempo fino a scomparire completamente al termine di un processo fermentativo ben condotto (Garrido Fernández et al., 1997; Hurtado et al., 2008).

In tabella 2 sono riportati i valori di pH e il contenuto in acidi organici nelle cultivar di Itrana bianca e nera (Tofalo et al., 2012).

Le salamoie di entrambe le cultivar presentano valori di pH al di sotto di 4,5 a fine fermentazione: questa caratteristica è importante al fine di assicurare la stabilità microbiologica del prodotto durante la conservazione. Nel caso di mancato raggiungimento di tale valore di pH, alcuni produttori utilizzano come correttori acido lattico, in combinazione con acido citrico e acido ascorbico (Lanza e Corsetti, 2009).

Per quanto riguarda gli acidi organici, l'acido lattico è quello presente in maggiori quantità, in particolare con valori pari a 113 mM e 126 mM nelle

cv. Itrana bianca e Itrana nera, rispettivamente. La variabilità nel contenuto di acido lattico è dovuta a diversi fattori come il contenuto di zuccheri fermentescibili, la capacità acidificante dei ceppi, fattori intrinseci ed estrinseci legati al processo fermentativo (Tofalo et al., 2012).

L'acido propionico è presente a basse concentrazioni: se il suo contenuto fosse elevato, il frutto potrebbe essere caratterizzato da un sapore di cuoio marcio e non commestibile. Tale alterazione è nota col nome “*Zapatera*” (Rejano Navarro et al., 1978). Differenze si evidenziano anche nel contenuto di acido acetico e succinico mettendo in risalto che le due cultivar analizzate sono influenzate da specifiche caratteristiche compositive.

Nel conoscere la composizione microbica di un prodotto fermentato è di fondamentale importanza utilizzare metodi in grado di discriminare e identificare in modo attendibile le varie specie microbiche/ceppi presenti. Tradizionalmente, la diversità microbica è determinata mediante metodi coltura-dipendenti che prevedono l'impiego di substrati selettivi/differenziali e l'ottenimento di colture pure. Questo approccio, non sempre è appropriato per lo studio di comunità microbiche complesse, poiché determina solo i microrganismi coltivabili che rappresentano una piccolissima percentuale presente nell'ecosistema studiato, non fornendo informazioni complete sul profilo delle diversità microbiche esistenti. Ciò ha portato allo sviluppo di tecniche coltura-indipendenti che si basano principalmente sull'analisi diretta degli acidi nucleici (DNA e RNA), permettendo di ottenere un quadro completo della popolazione microbica senza la necessità di coltivare/isolare i singoli componenti che spesso si trovano in uno stato vitale ma non coltivabile (Giraffa e Neviani, 2001). Tra le principali metodiche usate per lo studio della biodiversità e delle dinamiche delle popolazioni microbiche, si annoverano la PCR-DGGE/TGGE (*Polymerase Chain Reaction Denaturing/Thermal Gradient Gel Electrophoresis*). Attualmente queste tecniche sono largamente applicate in microbiologia alimentare e ambientale per l'identificazione di specie non coltivabili da alimenti o da suoli, per valutare l'impatto di batteri probiotici nel microbiota gastrointestinale umano e per la determinazione della qualità microbiologica dei prodotti fermentati (Ercolini, 2004).

In tabella 3 è rappresentata una mappa microbica in cui sono evidenziate la complessità del microbiota di alcune cultivar analizzate, in cui coesistono microrganismi appartenenti a più di cinque specie diverse, come nel caso della cv. Itrana nera (Tofalo et al., 2013; Tofalo et al., 2014).

L'impiego di metodi coltura-dipendenti ha evidenziato che *L. plantarum* e *L. pentosus* sono le specie dominanti in tutte le salamoie delle cultivar analizzate. Le altre specie identificate sono *E. durans*, *L. casei*, *L. helveticus* e *L.*

SPECIE	CULTIVAR					
	ITRANA BIANCA	ITRANA NERA	PERANZANA	NOCELLARA DEL BELICE	CELLINA DI NARDÒ	BELLA DI CERIGNOLA
<i>Lactobacillus plantarum</i>	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b
<i>Lactobacillus pentosus</i>	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b
<i>Lactobacillus fermentum</i>			a/b			a/b
<i>Lactobacillus helveticus</i>					a/b	
<i>Lactobacillus casei</i>	a	a		a	a	
<i>Enterococcus durans</i>	a/b				a/b	a/b
<i>Gluconobacter oxydans</i>			b	b	b	b
$\alpha$ - <i>proteobacterium</i>			b	b	b	b
<i>Lactococcus</i> sp.					b	
<i>Lactobacillus</i> sp.	b	b	b	b	b	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b	a/b
<i>Pichia galeiformis</i>						
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>					a	
<i>Candida boidinii</i>			a		a	
<i>Candida ishiwadae</i>			a	a	a	
<i>Pichia galeiformis</i>				a		
<i>Candida stellimalicola</i>	b					
<i>Pichia membranifaciens</i>				b		b
<i>Candida ethanolica</i>	b					

Tab. 3 Mappa microbica delle diverse cultivar di olive da mensa

Legenda: a, microrganismi rilevati mediante substrati selettivi/differenziali; b, microrganismi rilevati mediante PCR-DGGE

*fermentum*. L'impiego della PCR-DGGE ha confermato la dominanza di *L. pentosus* nelle salamoie studiate e ha permesso di individuare anche specie non coltivabili come *Gluconobacter oxydans* e  $\alpha$ -*proteobacterium*.

Per quanto riguarda i lieviti, l'impiego di substrati sintetici ha mostrato che *S. cerevisiae* è la specie dominante in tutte le cultivar. Le altre specie identificate sono: *P. galeiformis*, *W. anomalus*, *C. boidinii* e *C. ishiwadae*. *Candida stellimalicola*, *P. membranifaciens* e *C. ethanolica* sono rilevate, invece solo tramite la tecnica PCR-DGGE. Tale approccio ha permesso di indivi-

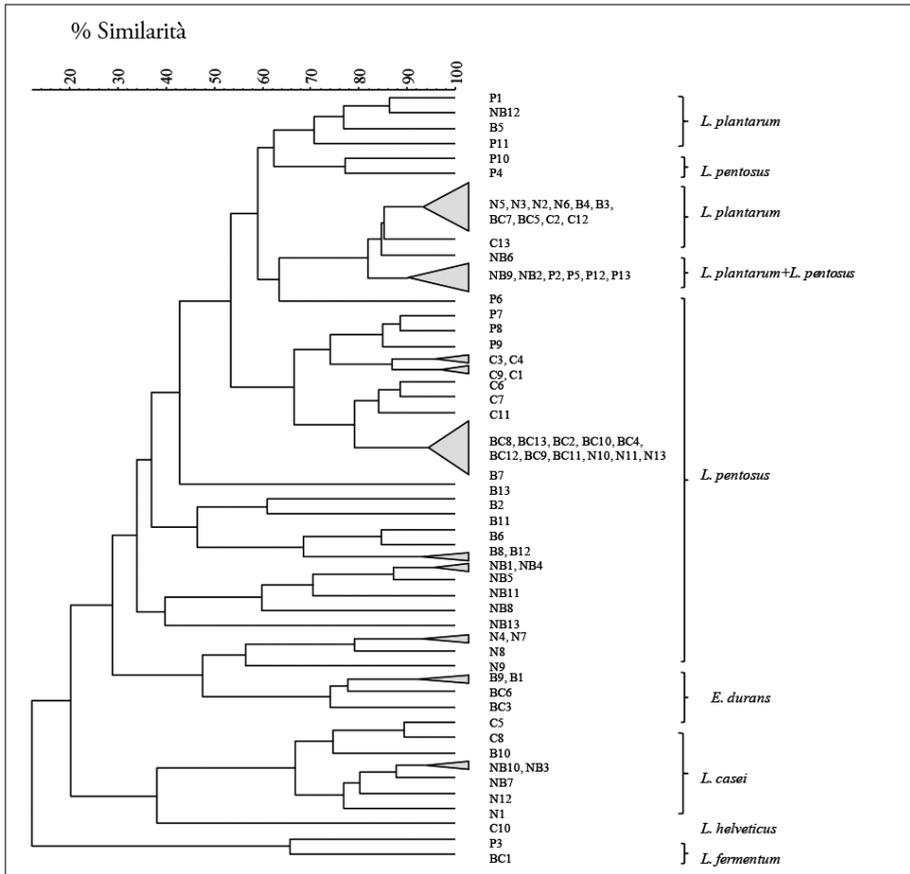


Fig. 1 Dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili elettroforetici ottenuti mediante rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> per gli isolati di batteri lattici

duare anche microrganismi Gram-negativi non coltivabili che possono essere responsabili del deterioramento delle olive da mensa in quanto provocano modificazioni del pH, delle caratteristiche della salamoia e del frutto stesso, con conseguente compromissione dei requisiti minimi di sicurezza e di qualità del prodotto.

In uno studio recente, Tofalo et al. (2014) hanno eseguito una tipizzazione con rep-PCR (*ripetitive extragenic palindromic PCR*) per determinare la relazione intercorrente tra gli isolati di LAB. Le relazioni tra i profili ottenuti sono mostrate nel dendrogramma in figura 1. Considerando una similarità arbitraria del 70% sono stati individuati 22 clusters, di cui 11 costituiti da un unico ceppo. Tale tecnica è stata molto utile per differenziare specie strettamente correlate quali *L. plantarum* e *L. pentosus*. Inoltre, è stato possibile

rilevare una stretta correlazione tra i ceppi e la loro origine. Questo lascia presupporre la presenza di ceppi specifici in particolari nicchie di fermentazione.

Per la messa a punto di una coltura starter è necessaria non solo la caratterizzazione genetica dei ceppi selezionati, ma anche la valutazione delle potenzialità tecnologiche. Tofalo et al. (2014) hanno sottoposto a caratterizzazione tecnologica 75 ceppi diversi appartenenti al gruppo dei LAB, i quali sono risultati in grado di sviluppare in presenza di 6 e 8% di cloruro di sodio (NaCl). La resistenza a NaCl rappresenta una prerogativa fondamentale per lo sviluppo e la dominanza di ceppi in salamoia. Inoltre, il 90% dei ceppi è in grado di crescere in salamoia modificata, e il 27% presenta attività  $\beta$ -glucosidica, suggerendo un possibile ruolo di tali ceppi nell'idrolisi dell'oleuropeina (dati non mostrati).

Per verificare le caratteristiche dello starter individuato in laboratorio si è proceduto allestendo prove sperimentali di fermentazione delle cv. Itrana bianca e Itrana nera mediante inoculo con ceppi selezionati di *L. pentosus*, valutando il risultato rispetto a una fermentazione spontanea. Nel corso di quest'ultima i LAB si attestano su valori intorno a quelli iniziali (ca.  $10^2$  ufc/ml) nel corso degli 8 giorni, mentre i coliformi si caratterizzano per una lieve diminuzione da ca.  $10^5$  a ca.  $10^4$  ufc/ml. Nelle fermentazioni inoculate con lo starter, i coliformi sono nell'ordine di  $10^3$  ufc/ml già dopo 24 ore e dopo 8 giorni sono presenti a concentrazioni al di sotto di  $10^2$  ufc/ml di salamoia. I ceppi selezionati di *L. pentosus*, pertanto, non solo sono in grado di inibire completamente la crescita della popolazione contaminante di coliformi, ma anche di adattarsi alle condizioni stressanti della salamoia e dominare rapidamente il processo fermentativo (dati non mostrati).

In conclusione, l'approccio metodologico impiegato per la comprensione del sistema olive consente di avere un quadro rappresentativo della reale composizione microbica. La caratterizzazione genetica e tecnologica permette di individuare ceppi da impiegare come colture starter. Infatti, il loro impiego in scala pilota assicura un buon andamento del processo fermentativo dell'Itrana, tanto da poterne proporre l'impiego anche a livello aziendale per standardizzare un prodotto facilmente soggetto a fluttuazioni qualitative.

## RIASSUNTO

L'Itrana è una cultivar di olivo originaria e tipica della provincia di Latina, riconosciuta nel 2009 zona DOP "Colline Pontine". Tali olive, generalmente, vengono fermentate senza l'aggiunta di coltura starter; pertanto, il processo fermentativo non è standardizzato e fenomeni di deterioramento possono instaurarsi. Diversi studi hanno permesso di met-

tere a punto uno starter costituito da batteri lattici al fine di migliorare la fermentazione. Sei cultivar italiane di olive da mensa fermentate al naturale sono state caratterizzate da un punto di vista microbiologico e chimico-fisico. I batteri lattici isolati sono stati identificati e sottoposti a caratterizzazione tecnologica e genotipica. *Lactobacillus pentosus* è risultata la specie dominante. Inoltre, sono stati individuati alcuni ceppi con interessanti proprietà tecnologiche. Al fine di valutarne il potenziale come colture starter è stato studiato il loro comportamento in fermentazioni su scala di laboratorio. In particolare, l'aggiunta di ceppi selezionati di *L. pentosus* alla fermentazione è in grado di esercitare un forte controllo dei microrganismi spontanei, suggerendone un possibile uso anche a livello aziendale per standardizzare un prodotto facilmente soggetto a fluttuazioni qualitative.

#### ABSTRACT

Itrana is a typical cultivar of Latina province which was recognized in 2009 as PDO area "Colline Pontine". Generally, these olives are naturally fermented so, the fermentation process is not standardized and deterioration phenomena can arise. Different studies are in progress to develop a starter culture consisting of lactic acid bacteria in order to improve the fermentation process. Six cultivars of naturally fermented table olives were analyzed by a combined approach consisting of physico-chemical, microbiological and molecular analyses. Afterwards lactic acid bacteria previously isolated from olives and brines were technologically and genotypically characterized. *Lactobacillus pentosus* was the dominant species in all the cultivars. In addition, some strains showed interesting technological properties and, in order to assess their possible use as starter cultures, laboratory-scale fermentations were conducted. In particular, the addition of selected strains of *L. pentosus* allowed to control spontaneous microbiota suggesting a possible use of starter strains also at industrial scale to standardize the fermentation process of Itrana cultivar.

#### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ARROYO LÓPEZ F.N., QUEROL A., BAUTISTA-GALLEGO J., GARRIDO-FERNÁNDEZ A. (2008): *Role of yeast in table olive production*, «International Journal of Food Microbiology», 128, pp. 189-196.
- CORSETTI A., PERPETUINI G., SCHIRONE M., TOFALO R., SUZZI G. (2012): *Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies*, «Frontiers in Microbiology», 3, pp. 1-6.
- ERCOLINI D. (2004): *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*, «Journal of Microbiological Methods», 56, pp. 297-314.
- GARRIDO FERNÁNDEZ A., FERNÁNDEZ DÍEZ M.J., ADAMS M.R. (1997): *Table Olives: Production and Processing*, Chapman and Hall, Londra, pp. 67-109.
- GIRAFFA G., NEVIANI E. (2001): *DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems*, «International Journal of Food Microbiology», 67, pp. 19-34.
- HURTADO A., REGUANT C., BORDONS A., ROZÈS N. (2012): *Lactic acid bacteria from fermented table olives*, «Food Microbiology», 31, pp. 1-8.

- HURTADO A., REGUANT C., ESTEVE-ZARZOSO B., BORDONS A., ROZÈS N. (2008): *Microbial population dynamics during the processing of Aberquina table olives*, «Food Research International», 41, pp. 738-744.
- LANZA B., CORSETTI A. (2009): *Olive da mensa*, in *L'ulivo e l'olio*, Bayer CropScience, pp. 635-653.
- REJANO NAVARRO L., GONZÁLES CANCHO F., DE LA RODRÍGUEZ J.M. (1978): *Formation of propionic acid during the storage of green table olives*, «Grasas y Aceites», 29, pp. 203-210.
- SERVILI M., SETTANNI L., VENEZIANI G., ESPOSITO S., MASSITTI O., TATICCHI A., URBANI S., MONTEODORO G.F., CORSETTI A. (2006): *The use of Lactobacillus pentosus 1MO to shorten the debittering process time of black table olives (cv. Itrana and Leccino): A pilot-scale application*, «Journal of Agriculture and Food Chemistry», 54, pp. 3869-3875.
- TOFALO R., PERPETUINI G., SCHIRONE M., SUZZI G., CORSETTI A. (2013): *Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars*, «International Journal of Food Microbiology», 161, pp. 203-208.
- TOFALO R., PERPETUINI G., SCHIRONE M., CIARROCCHI A., FASOLI G., SUZZI G., CORSETTI A. (2014): *Lactobacillus pentosus dominates spontaneous fermentation of Italian table olives*, «LWT-Food Science and Technology», in press (doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.035).
- TOFALO R., SCHIRONE M., PERPETUINI G., ANGELOZZI G., SUZZI G., CORSETTI A. (2012): *Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars*, «Antonie Van Leeuwenhoek» 102, pp. 121-131.
- UNAPROL (2011): *Lo scenario economico di settore "Olivicoltura da olio"*.

