

MASSIMO VINCENZINI*, SIMONA GUERRINI*

Lieviti nel processo di estrazione dell'olio extravergine d'oliva

I. INTRODUZIONE

Cosa sono i lieviti

I lieviti sono funghi microscopici unicellulari e pertanto invisibili a occhio nudo, sono ritenuti ubiquitari e tra i principali colonizzatori di substrati ricchi di nutrienti. I lieviti possono assumere una molteplicità di ruoli in natura: molte specie, infatti, sono capaci di adattarsi a differenti nicchie ecologiche che si formano anche grazie all'attività umana. Le tecnologie alimentari ne sono un esempio. *Saccharomyces cerevisiae*, il lievito maggiormente sfruttato dall'uomo, è infatti il principale responsabile della fermentazione alcolica dei vini, della birra e della lievitazione dei prodotti da forno (pane, panettone, pandoro, ecc.). Circa l'85% del DNA dei lieviti è organizzato in 16 coppie di cromosomi, mentre il restante 15% in plasmidi (5%) e in DNA mitocondriale (10%). I lieviti contano in media circa 6.000 geni capaci di controllare tutte le funzioni della cellula (metabolismo, produzione di energia, replicazione e ricombinazione, trascrizione, traduzione, trasporto, traffico intracellulare). Da un punto di vista metabolico, i lieviti sono eucarioti chemiorganotrofi capaci di utilizzare le fonti più disparate di carbonio presenti in natura. La degradazione degli zuccheri può dare origine, in funzione della disponibilità di ossigeno, alla respirazione (in aerobiosi) o alla fermentazione alcolica (in anaerobiosi), anche se molti lieviti hanno soltanto metabolismo respiratorio e possono ossidare, oltre agli zuccheri fermentescibili, anche gli alcoli, gli acidi

* *Università degli Studi di Firenze - Scuola di Agraria - Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF), sez. Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche*

organici e altri composti presenti nel mezzo di crescita. Al contrario, l'attività fermentativa è limitata agli zuccheri, soprattutto esosi (glucosio e fruttosio), mentre disaccaridi e polisaccaridi sono fermentati solo dalle specie di lievito che possiedono specifiche idrolasi. I lieviti sono in grado di rilasciare numerosi prodotti secondari del metabolismo come acidi grassi, esteri, alcoli superiori. Queste sostanze, rilasciate durante i processi fermentativi degli alimenti, possono influenzare, anche profondamente, le caratteristiche organolettiche dei prodotti finiti.

Molecole e difetti dell'olio extravergine d'oliva

Studi condotti nell'ambito di un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Toscana tra il 2006 e il 2010 (Caratterizzazione analitica degli attributi sensoriali degli oli vergini d'oliva - AROMOLIO) hanno consentito di associare alcune molecole con i principali difetti che possono essere riscontrati nell'olio:

1. Difetto di riscaldamento: butil-acetato, 1-butanolo, 2-eptanone;
2. Difetto di morchia: metil-propionato; etil-propionato, 1-propanolo, metil-butirrato, etil-pentanoato;
3. Difetto di muffa: guaiacolo, etil-guaiacolo, 1-ottene, isopentanololo;
4. Difetto di avvinato: etil-acetato;
5. Difetto di rancido: 2,4-eptadienale, 2,3-nonadienale, trans-2-ottenale, esanale.

Olio e microrganismi

Nell'esperienza comune, l'olio è una matrice priva di acqua e per questo motivo incapace di supportare lo sviluppo microbico. Non a caso l'uomo utilizza da tempo immemore l'olio per conservare alcuni alimenti, soprattutto vegetali, dall'aggressione dei microrganismi. Nonostante ciò, l'olio appena prodotto possiede un'apparenza opalescente dovuta alla presenza di particelle solide e microgocce di acqua di vegetazione che possono contenere microrganismi e precisamente lieviti, batteri e muffe. Ma da dove provengono? Sicuramente dalle olive che, nonostante i lavaggi che queste possono subire in entrata del frantoio, non sono sterili. La microflora delle olive è influenzata dallo stato fitosanitario di queste, dal modo con cui sono raccolte e stoccate e infine dalla temperatura ambientale. I lieviti presenti nell'olio appena prodotto possono

rimanere attivi durante il periodo di conservazione e possono migliorare o peggiorare la qualità dell'olio extra vergine d'oliva in base alle loro capacità metaboliche (Ciafardini et al., 2006a,b; Zullo e Ciafardini, 2008; Romo-Sanchez et al., 2010; Zullo et al., 2010). Studi recenti hanno dimostrato, infatti, come le qualità organolettiche e le proprietà antiossidanti dell'olio possano essere incrementate dall'attività esterasica e β -glucosidasi di alcuni lieviti (Ciafardini e Zullo, 2002). Allo stesso tempo però, altri studi hanno evidenziato come l'acidità dell'olio possa essere incrementata dall'attività lipasica di questi microrganismi attraverso la degradazione dei trigliceridi (Ciafardini et al., 2006b). Inoltre, la quasi totalità dei ceppi di lievito isolati da olio, presi in considerazione in uno studio condotto da Romo-Sanchez et al. (2010), ha dimostrato di possedere attività perossidasi, un'attività che può compromettere la qualità dell'olio attraverso la degradazione ossidativa di alcuni composti fenolici (Gomez-Rico et al., 2008).

Da quanto fin qui descritto risulta chiaro come tutti gli studi condotti sulla microbiologia dell'olio riguardano la presenza di microrganismi, soprattutto lieviti, durante la conservazione, mentre non è conosciuta l'ecologia microbica del processo di estrazione. Considerando la mancanza di informazioni su questo argomento, la partecipazione al progetto OLEOSALUS-STEM (misura 124 PSR Regione Toscana 2007-2013) ha fornito, tra le altre cose, l'opportunità di:

1. effettuare uno studio sulla presenza dei lieviti nelle varie fasi del processo di estrazione dell'olio extra vergine d'oliva;
2. avviare uno studio per comprendere il ruolo dei lieviti nella definizione delle caratteristiche aromatiche dell'olio finito.

2. LA SPERIMENTAZIONE

Il piano sperimentale

Sono stati presi in considerazione oltre trenta processi di produzione di olio extravergine d'oliva condotti nella stesso frantoio. Questi processi di produzione sono stati scelti in modo che fossero distribuiti in momenti diversi delle campagne olearie 2011 e 2012. Tutti gli oli prodotti erano monocultivar, cioè prodotti con una sola cultivar di olive: Frantoio o Moraiolo. I campioni per le analisi microbiologiche (prelevati in sterilità) per ciascun processo sono stati i seguenti: paste frante, paste gramolate, olio in uscita dal decanter, sanse. I prelievi delle paste sono stati eseguiti grazie all'inse-

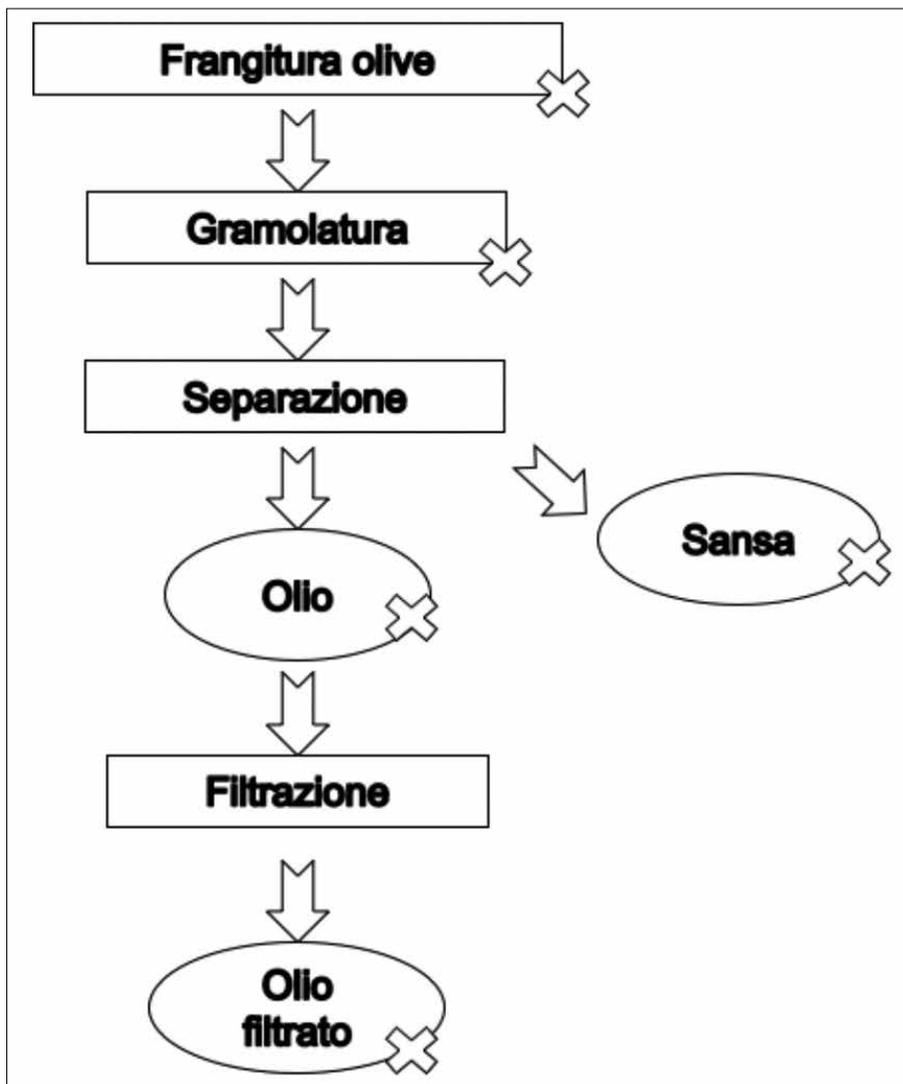


Fig. 1 Schema del processo dove sono indicati con "x" i punti di campionamento

rimento di rubinetti: uno situato prima della gramolatrice (paste frante) e l'altro prima dell'entrata in decanter (paste gramolate). Il rubinetto per il prelievo delle paste gramolate è stato inserito solo nella campagna olearia 2012. In figura 1 è riportato uno schema del processo dove sono indicati i punti di campionamento. Con lo scopo di minimizzare le incertezze delle determinazioni legate al campionamento, ciascun processo è stato campio-

nato due volte, prelevando i campioni delle diverse fasi a una distanza di circa 5 minuti tra l'uno e l'altro.

Numerosità dei lieviti in frantoio

A titolo di esempio, in figura 2 è riportato il contenuto dei lieviti nelle varie fasi dei processi di estrazione analizzati nel 2012, il 2011 è stato omesso in quanto aveva fornito risultati del tutto analoghi. I risultati ottenuti mostrano come durante il processo di estrazione dell'olio extravergine d'oliva si realizzi un arricchimento numerico dei lieviti (fig. 2). Infatti, le paste gramolate sono risultate significativamente più contaminate rispetto alle paste frante. Nonostante poi l'olio in uscita dal decanter corrispondesse in peso più o meno al 15% delle paste (e di conseguenza le sanse corrispondono all'85%), è possibile osservare come i lieviti fossero presenti nell'olio alle stesse concentrazioni di quelle riscontrate nelle paste gramolate e addirittura non significativamente diverse da quelle presenti nelle sanse. I risultati ottenuti lasciano supporre l'esistenza di un fenomeno di arricchimento numerico dei lieviti lungo il processo estrattivo dovuto a una progressiva colonizzazione della gramola e del decanter, visto che la durata di ciascuna fase (frangitura, gramolatura e centrifugazione) è sicuramente inferiore al tempo di generazione di una cellula di lievito (tempo necessario a una cellula per duplicarsi).

Biodiversità dei lieviti in frantoio

Un numero significativo di isolati di lievito, provenienti dalle diverse fasi di tutti i processi saggiati, sono stati purificati e identificati a livello di specie utilizzando metodiche molecolari (analisi dei profili di restrizione della regione spaziatrice dell'interno trascritto del rDNA e conferma mediante sequenziamento della regione D1/D2 del 26S rDNA). Nelle tabelle 1 e 2 sono riportate le specie riscontrate nelle diverse fasi delle due campagne olearie prese in considerazione (2011 e 2012 rispettivamente).

Durante la campagna olearia 2011 sono state riscontrate 6 specie diverse di lievito con frequenze di isolamento maggiori del 10%. *Candida molendinolei* è risultata presente in tutte le fasi con una frequenza di isolamento nelle paste e nelle sanse intorno al 50% e di circa il 30% nell'olio da decanter. Anche le specie *Candida wickerhamii*, *Candida diddensiae*, *Candida adriatica*, e *Saccharomyces cerevisiae* sono risultate presenti in

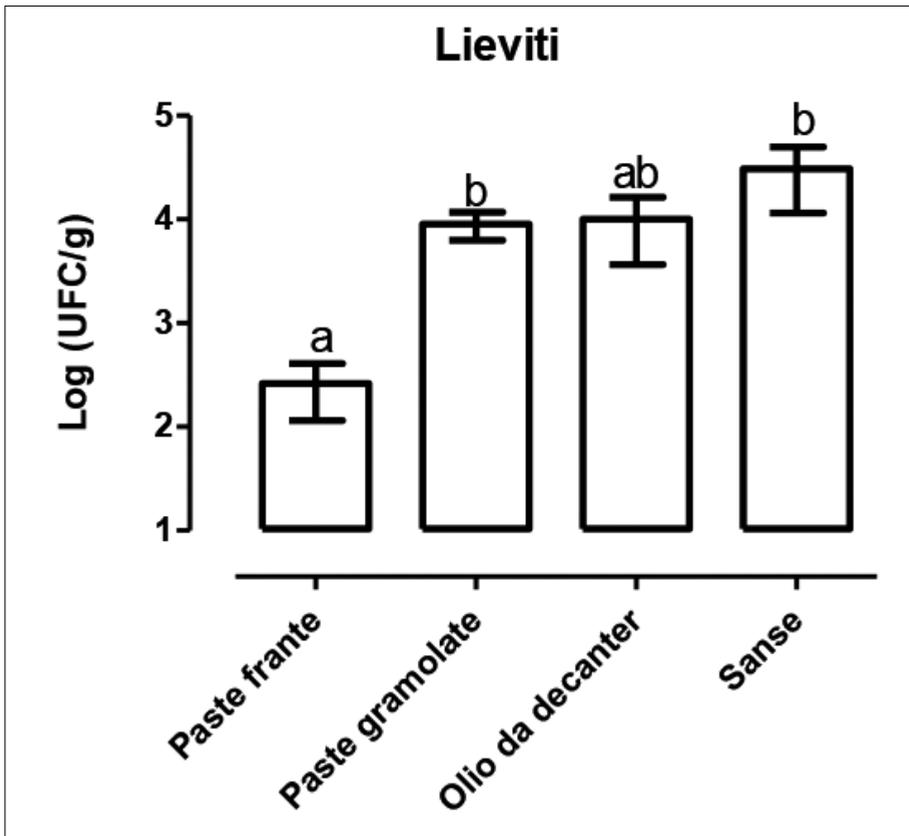


Fig. 2 Concentrazione dei lieviti nelle varie fasi; lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (ANOVA, $p < 0,05$)

%	2011		
	PASTE FRANTE	OLIO DA DECANTER	SANSE
<i>Candida adriatica</i>			13
<i>Candida molendinolei</i>	48	29	55
<i>Candida tenuis</i>		49	
<i>Candida wickerhamii</i>	10		10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10		
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	14		13
Altro*	18	22	9

* specie con frequenze di isolamento <10%

Tab. 1 Frequenze percentuali (percentuale di isolati appartenenti alla specie rispetto al totale degli isolati saggiati per ciascuna fase) delle varie specie di lievito riscontrate durante la campagna olearia 2011

	2012			
	PASTE FRANTE	PASTE GRAMOLATE	OLIO DA DECANter	SANSE
<i>Candida adriatica</i>			27	37
<i>Candida molendinolei</i>				12
<i>Candida norvegica</i>	30			
<i>Candida tenuis</i>			50	
<i>Candida wickerhamii</i>		13	11	10
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>		76		33
Altro*	70	11	12	8

* specie con frequenze di isolamento <10%

Tab. 2 Frequenze percentuali (percentuale di isolati appartenenti alla specie rispetto al totale degli isolati saggiati per ciascuna fase) delle varie specie di lievito riscontrate durante la campagna olearia 2012

tutte le fasi, ma a frequenze inferiori o uguali al 10%. *Zygosaccharomyces fermentati* era presente solo nelle paste e nelle sanse, mentre *Candida tenuis* solo nel decanter, a una frequenza del 50% rispetto al totale degli isolati.

Anche nel 2012 erano presenti 6 specie di lievito con frequenze di isolamento maggiori del 10%, anche se non erano esattamente le stesse di quelle riscontrate nel 2011. *C. molendinolei* era presente in tutte le fasi prese in esame con frequenze di isolamento sempre minori del 10%, a eccezione delle sanse dove raggiungeva il 12%. *Candida wickerhamii* era presente a concentrazioni superiori al 10% in tutte le fasi tranne che nelle paste frante, mentre le specie *Zygosaccharomyces mrakii*, sempre sotto il limite di rilevabilità nel 2011, è risultata presente nelle paste gramolate con una frequenza di isolamento del 76% e nelle sanse del 33%. *C. adriatica*, a differenza di quanto osservato nel 2011, è stata riscontrata solo nell'olio da decanter e nelle sanse con frequenze di isolamento del 27 e del 37% rispettivamente. Infine, *C. tenuis* è stata riscontrata nell'olio da decanter con circa la stessa frequenza di isolamento riscontrata nel 2011. Da quanto detto è possibile formulare le seguenti ipotesi:

1. la presenza di specie diverse sulle paste frante del 2011 rispetto a quelle del 2012 potrebbe essere una conseguenza dell'annata, nonostante ciò nell'olio da decanter e nelle sanse di entrambe le campagne si stabilizzano praticamente le stesse popolazioni di lievito lasciando supporre che questo sia una conseguenza della tipologia di impianto estrattivo e delle sue condizioni operative;
2. *C. wickerhamii*, *C. molendinolei* e *C. adriatica* sono presenti in entrambe le campagne olearie confermando quanto riportato in lettera-

tura riguardo la presenza di questi lieviti nell'olio in conservazione e suggerendo che questi lieviti siano in qualche modo adattati all'ambiente olio;

3. la gramolatura sembra aver arricchito selettivamente la pasta della campagna olearia 2012 con la specie *Z. mrakii*, sotto il limite di rilevabilità nelle paste frante, supportando così l'idea di un arricchimento speciologico di alcune specie di lievito a scapito di altre;
4. la centrifugazione sembra aver arricchito selettivamente l'olio di entrambe le campagne olearie con la specie *C. tenuis* sotto il limite di rilevabilità in tutte le altre fasi del processo, supportando ancora una volta l'idea di un arricchimento speciologico.

Pertanto, è possibile affermare che gramolatura e centrifugazione non sono soltanto in grado di arricchire quantitativamente il contenuto di lieviti, ma anche di selezionare alcune specie a discapito di altre.

Altre osservazioni possono essere fatte confrontando i processi condotti con cultivar di olive diverse (Frantoio e Moraiolo). Dai dati ottenuti è possibile concludere che non esiste nessuna relazione tra la tipologia di cultivar delle olive e le specie di lievito riscontrate sulle paste frante e tantomeno nelle restanti fasi (dati non mostrati), lasciando supporre il ruolo centrale del frantoio in questo fenomeno di arricchimento selettivo di alcune popolazioni di lievito a scapito di altre.

Proprietà enzimatiche dei lieviti isolati

Per valutare la possibilità che le specie di lievito individuate nelle paste gramolate, nell'olio da decanter e nelle sanse fossero potenzialmente in grado di modificare chimicamente l'olio, un numero significativo di isolati appartenenti a ciascuna delle specie riscontrate a percentuali superiori al 10% sono stati saggiati per le attività glucosidasi, lipasi e esterasi, utilizzando un kit miniaturizzato (APIZYM, Biomerieux). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3 e mostrano come il 50% delle specie possieda tutte le attività enzimatiche saggate. Da notare è soprattutto la specie *C. tenuis* la quale, oltre a essere stata riscontrata con una frequenza di isolamento nell'olio da decanter intorno al 50% in entrambi i processi, ha dimostrato di possedere tutte le attività enzimatiche prese in esame. Solo la specie *Z. mrakii*, riscontrata solo nel 2012 come specie dominante nelle paste gramolate e le sanse, si è dimostrata priva di tutte le attività enzimatiche prese in esame.

SPECIE	CAPACITÀ ENZIMATICA		
	ESTERASI	LIPASI	β -GLUCOSIDASI
<i>Candida adriatica</i>	+	+	+
<i>Candida molendinolei</i>	+	+	+
<i>Candida norvegica</i>	-	-	+
<i>Candida tenuis</i>	+	+	+
<i>Candida wickerhamii</i>	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	+	+	-
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>	-	-	-

Tab. 3 Capacità enzimatiche possedute dagli isolati saggiati appartenenti alle diverse specie (“+”: presenza della capacità; “-” assenza della capacità)

Lieviti e composizione aromatica dell'olio finito

Per valutare se la presenza dei lieviti lungo il processo di estrazione possa essere messa in relazione con composizione aromatica dell'olio finito, è stato condotto uno studio di correlazione tra il contenuto dei lieviti nell'olio da decanter e nelle sanses con i vari composti aromatici quantificati da Metropoli (Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze). Lo studio è stato condotto prendendo in esame entrambe le campagne olearie. Per il calcolo delle correlazioni sono stati utilizzati due coefficienti, quello di Pearson e quello di Sperman poiché il primo assume che i dati siano distribuiti secondo una Gaussiana, il secondo no. I risultati ottenuti hanno mostrato come, a fronte di 72 composti aromatici quantificati, 21 mostrassero una correlazione positiva e altri 18 una correlazione negativa (dati non mostrati). In sostanza, oltre il 50% delle componenti aromatiche è risultata correlata con la presenza di lieviti nell'olio da decanter e nella sansa. Chiaramente i risultati ottenuti non sono sufficienti a ipotizzare relazioni di causa e effetto tra numerosità dei lieviti e la formazione o la degradazione di certi composti aromatici, pertanto ulteriori studi saranno necessari e dovranno mirare a dimostrare l'effettiva attività metabolica di certe specie o ceppi di lievito a carico di precise componenti.

Infine, per valutare quanto le concentrazioni delle varie popolazioni microbiche (lieviti, batteri e muffe) riscontrate lungo il processo estrattivo impattino sulle caratteristiche aromatiche del prodotto finito, i dati riguardanti la componente aromatica dell'olio filtrato e quelli microbiologici (concentrazione di lieviti, batteri e muffe nell'olio da decanter e nella sansa) sono stati elaborati separatamente mediante analisi delle componenti principali (figg. 3 e 4 rispettivamente). I risultati ottenuti hanno messo in evidenza come i campioni di olio che avevano una contaminazione microbica simile tra loro

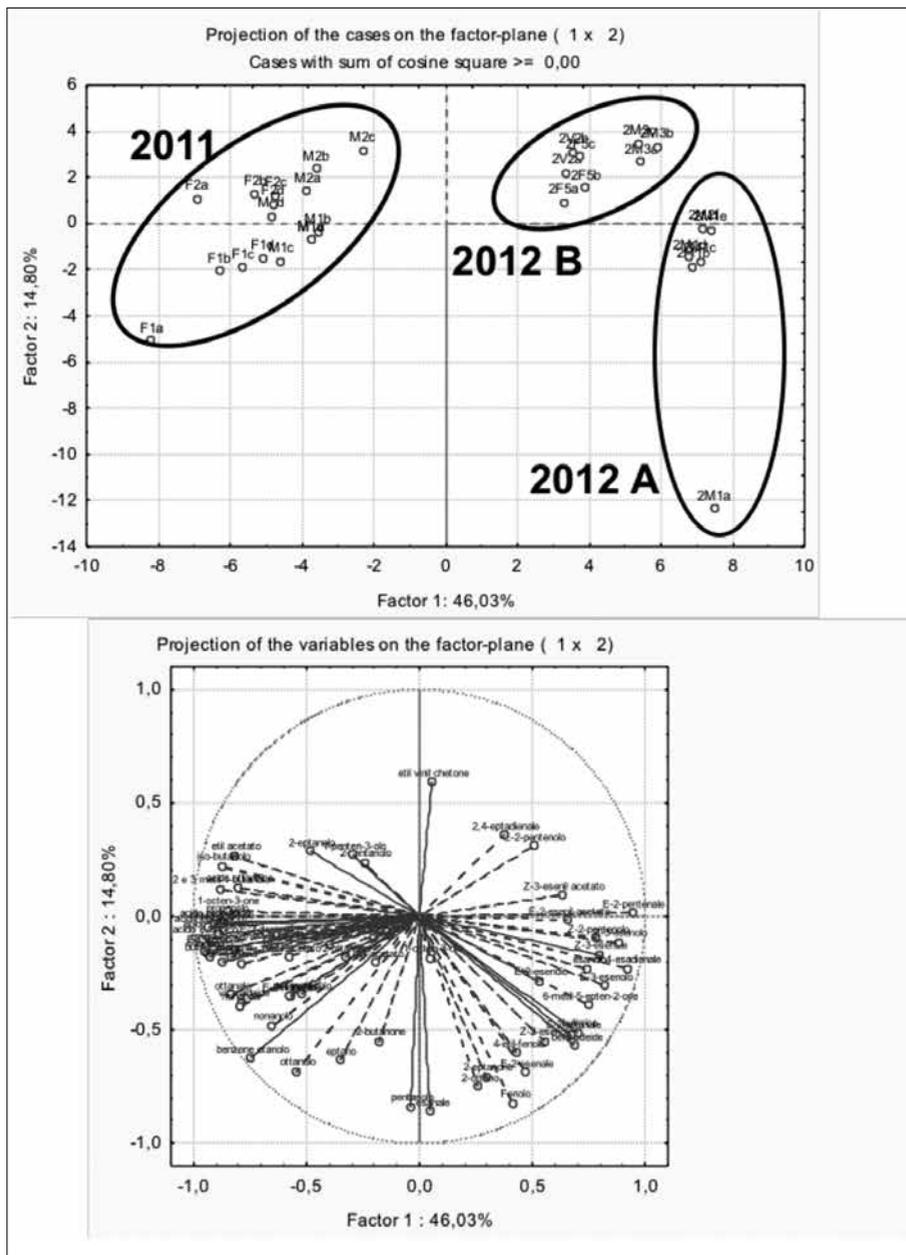


Fig. 3 *Analisi delle componenti principali dei composti aromatici presenti negli oli finiti prodotti nelle due campagne olearie prese in considerazione; In alto: proiezione dei campioni di olio ottenuti dai vari processi; In basso: proiezione delle varie componenti aromatiche*

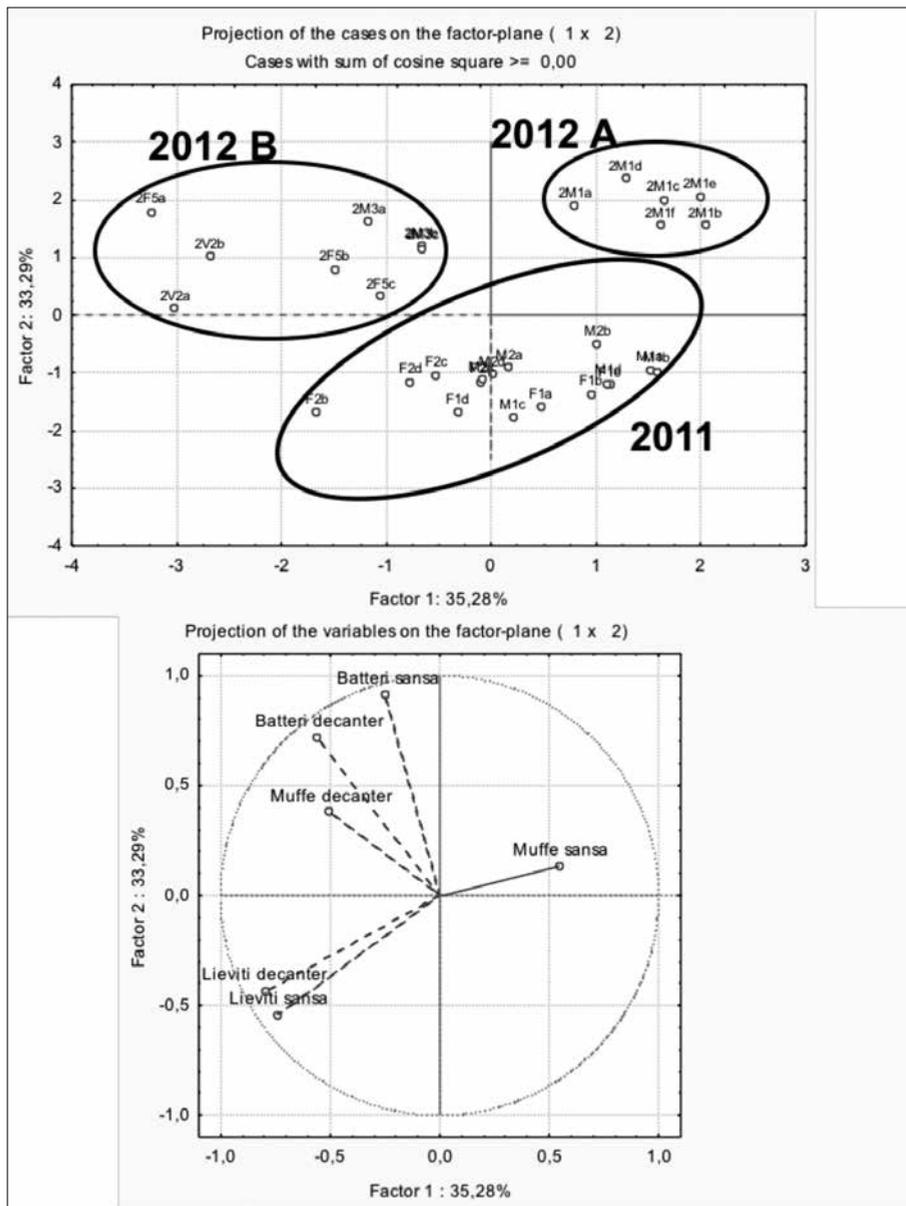


Fig. 4 *Analisi delle componenti principali della carica microbica complessiva presente nei processi estrattivi delle due campagne olearie prese in considerazione. In alto: proiezione dei vari processi; In basso: proiezione dei microrganismi (lieviti, batteri e muffe) presenti nell'olio da decanter e nella sansa*

avessero anche una composizione aromatica altrettanto simile, confermando in sostanza la possibilità che i microrganismi possano svolgere un ruolo nella definizione del profilo aromatico dell'olio extravergine d'oliva. Ulteriori studi saranno comunque necessari per verificare e approfondire questi risultati.

3. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati mostrati è possibile fare le seguenti affermazioni:

1. durante la campagna olearia, diverse popolazioni di lievito colonizzano il frantoio, specialmente la gramola e il decanter a numeri significativi (dell'ordine di 10^4 UFC/g);
2. le popolazioni dominanti le diverse fasi del processo estrattivo sono indipendenti dalla cultivar di olive utilizzate;
3. le popolazioni di lievito dominanti sono quasi tutte in possesso di capacità enzimatiche potenzialmente in grado di modificare la composizione chimica dell'olio;
4. oltre il 50% delle componenti aromatiche analizzate è risultata correlata con la concertazione dei lieviti nell'olio da decanter e nella sansa.

In conclusione, da quanto fin qui descritto, è possibile ipotizzare che ogni frantoio selezioni una propria popolazione microbica potenzialmente in grado di conferire note aromatiche tipiche oppure difetti al prodotto finito. Pertanto, la produzione di oli di qualità non dovrebbe prescindere dal conoscere, e soprattutto dal controllare, il microbiota presente in frantoio.

RIASSUNTO

L'olio appena prodotto possiede un'apparenza opalescente dovuta alla presenza di particelle solide e microgocce di acqua di vegetazione che contengono microrganismi (lieviti, muffe e batteri). Questi microrganismi derivano non solo dalla carposfera delle olive, ma anche, nel caso dei lieviti, da un fenomeno di arricchimento selettivo che si realizza durante il processo di estrazione. Infatti, studi condotti nell'ambito del progetto OLEO-SALUSITEM (misura 124 PSR Regione Toscana 2007-2013) hanno dimostrato come i lieviti presenti nelle paste al momento della frangitura non solo siano numericamente inferiori rispetto a quelli presenti nelle fasi successive, ma anche diversi da un punto di vista specilogico. Questo lascerebbe supporre che il processo estrattivo, con il passare delle ore, e soprattutto dei giorni di attività del frantoio, determini un arricchimento "selettivo" cioè un arricchimento di certe specie di lievito a scapito di altre. Tale arricchimento è risultato indipendente dalla tipologia di cultivar delle olive impiegate nel processo (Moraiolo e Frantoio) e soprattutto piuttosto diverso tra le due campagne olearie oggetto del progetto (2011 e 2012). Molte delle specie di lievito riscontrate hanno anche dimostrato

di possedere capacità enzimatiche potenzialmente in grado di modificare chimicamente l'olio (attività lipasica, esterasica, β -glucosidasica) ed effettivamente studi statistici hanno dimostrato l'esistenza di correlazioni positive o negative significative tra quantità di lieviti nelle fasi del processo in cui si realizza l'arricchimento selettivo e le concentrazioni di ben 39 componenti aromatiche nell'olio finito su un totale di 72 prese in esame.

ABSTRACT

Spontaneous microbiota of fresh olives comprises yeasts, bacteria and moulds. These microorganisms originate not only from the olive carposphere, but also, in the case of yeast, from a phenomenon of selective enrichment during the extraction process. Indeed, a study (OLEOSALUSISTEM - misura 124 PSR Regione Toscana 2007-2013), carried out on about 30 extractive processes of two different oil campaigns (2011 and 2012, in the same olive mill located in Tuscany) demonstrated that the yeasts occurring in crushed olives were not only lower in number than in the successive phases but also constituted by different dominant species. This finding would suggest that the process, under operating conditions, causes a progressive and selective enrichment of some yeast species. This selective enrichment of yeasts resulted unaffected by the olive cultivars (Moraiolo or Frantoio) used to produce the oils, but the yeast species dominating the process phases varied with the oil campaign. Most of this dominant yeast species demonstrated to possess enzymatic activities potentially able to affect the organoleptic quality of the olive oils (lipase, esterase, β -glucosidase). Finally, correlation studies showed significant positive or negative correlations between the yeast concentrations and the concentrations of 39 aromatic components (on a total of 72 determined) in the filtered oils.

BIBLIOGRAFIA

- CIAFARDINI G., ZULLO B.A. (2002): «Int. J. Food Microbiol.», 75, pp. 111-118.
 CIAFARDINI G., ZULLO B.A., IRIDE A. (2006a): «Food Microbiol.», 23, pp. 60-67.
 CIAFARDINI G., ZULLO B.A., CIOCCIA G., IRIDE A. (2006b): «Int. J. Food Microbiol.», 107, pp. 27-32.
 GOMEZ-RICO A., FREGATANE G., SALVADOR M.D. (2008): «Food Res. Int.», 41, pp. 433-440.
 ROMO-SANCHEZ S., ALVES-BAFFI M., AREVALO-VILLENA M., UBEDA-IRANZO J., BRIONES-PÉREZ A. (2010): «Food Microbiol.», 27, pp. 487-492.
 ZULLO B.A., CIAFARDINI G. (2008): «Food Microbiol.», 25, pp. 970-977.
 ZULLO B.A., CIOCCIA G., CIAFARDINI G. (2010): «Food Microbiol.», 27, pp. 1035-1042.