



crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura
e l'analisi dell'economia agraria

Centro di ricerca
olivicoltura, frutticoltura e agrumicoltura

SELEZIONE DI COLTURE STARTER DALLA CARPOSFERA DI DRUPE PER LA FERMENTAZIONE DELLE OLIVE DA TAVOLA WP4

*Lara Signorello, Nicolina Timpanaro, Solidea Mangiameli, Cinzia Benincasa,
Innocenzo Muzzalupo, Fabrizio Carbone, Flora V. Romeo*

Relatore: Dott.ssa Flora V. Romeo

Decreto Ministeriale finanziamento n. 37067, 28/12/2018



- **WP4** – Innovazioni nella filiera delle olive da mensa.
 - **Task:** trattamento delle olive con mix di microrganismi selezionati per il miglioramento della qualità delle olive da mensa



✦ Processo di fermentazione altamente influenzato dalla comunità microbica

✦ Le comunità microbiche dipendono dalle condizioni di pH, salinità e temperatura del processo di fermentazione

Batteri Lattici

Lieviti

Enterobacteriaceae

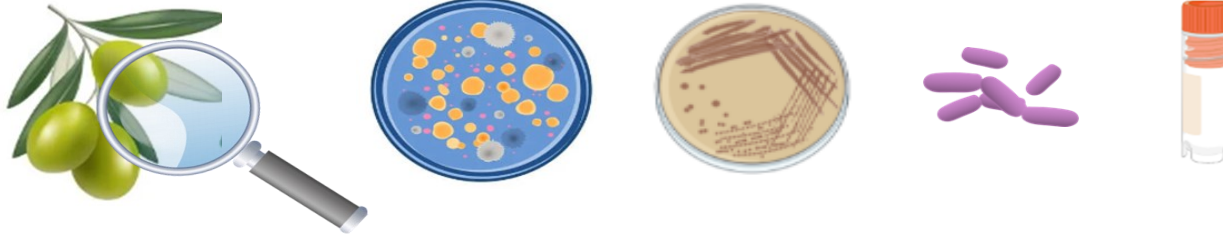
OBIETTIVO: Caratterizzazione del microbiota della carposfera di ulivo che favorisca il processo di fermentazione

STARTER CULTIVAR SPECIFICI

La principale innovazione biotecnologica per la fermentazione delle olive è l'uso di colture starter microbiche selezionate costituite da un unico ceppo o da una miscela di ceppi. I ceppi autoctoni, a differenza dei ceppi commerciali, essendo ben adattati alle condizioni delle drupe, possono facilmente guidare il **processo di fermentazione** dominando il microambiente delle olive.



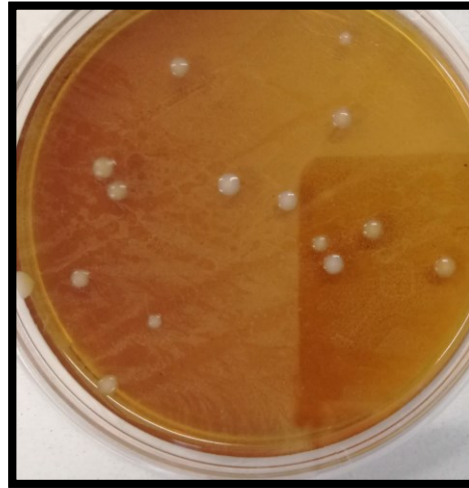
- Isolati dalla carposfera di olive cv **Carolea**



- I microrganismi, isolati su terreni selettivi per batteri lattici (LAB) e funghi, sono stati sottoposti ad indagini morfologiche, biochimiche (produzione di IAA, attività β -glucosidasi) e molecolari

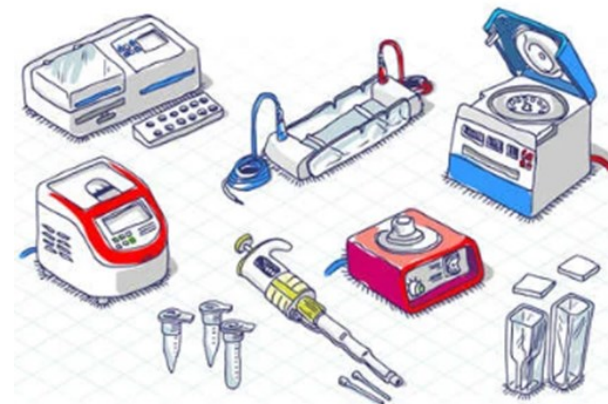


Funghi su PDA



LAB su MRS

Caratterizzazione molecolare del microbioma BATTERICO



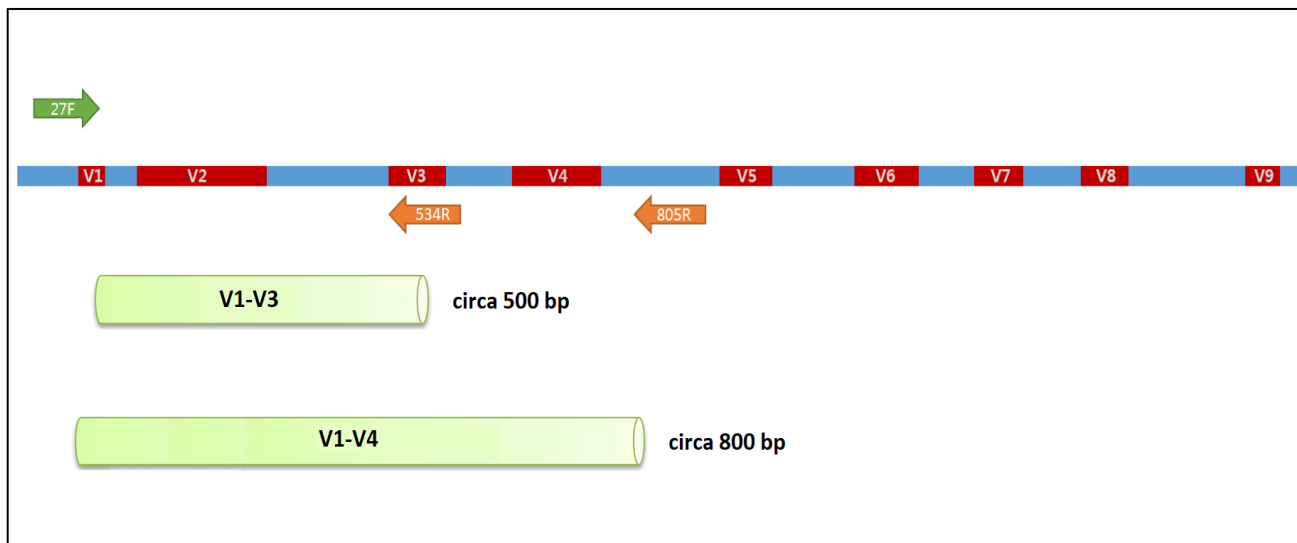
Estrazione DNA



Amplificazione



Sequenziamento dei frammenti
amplificati mediante metodo Sanger

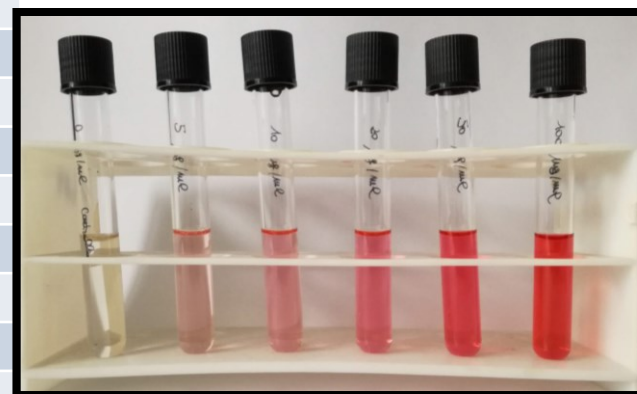


Schema del gene ribosomiale batterico 16S. In rosso sono mostrate le 9 regioni ipervariabili. Le frecce indicano i primers utilizzati.

Caratterizzazione biochimica del microbiota della carposfera

Test sulla produzione di Acido Indolacetico

Campione	Prod. IAA (scala 0-5)	Campione	Prod. IAA (scala 0-5)
A1	2,5	E1	2,0
A2	1,0	E2	2,0
A3	0,5	E3	2,0
A5	1,0	F4	1,5
B1	2,5	F5	2,0
B2	1,5	F6	1,5
B3	1,0	F7	1,0
C1	0,5	F8	0,5
C2	0,5	F9	2,5
C3	0,0	G1	2,5
C4	2,0	G2	1,0
D1	1,0	96% delle colonie produce IAA	
D2	1,0		
D3	1,5		
D4	1,0		
D5	2,5		



Standard di riferimento
da 0 a 5

Caratterizzazione molecolare del microbioma della carposfera

Ceppi identificati	N. colonie
<i>Pantoea agglomerans</i>	15
<i>Pantoea allii</i>	4
<i>Curtobacterium plantarum</i>	2
<i>Atlantibacter hermannii</i>	1
<i>Pantoea ananatis</i>	1
<i>Pantoea brenneri</i>	1
<i>Pantoea conspicua</i>	1
<i>Pantoea vagans</i>	1
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	1
Totale	27

Caratterizzazione molecolare del microbioma della carposfera

🌿 *Pantoea agglomerans*

Batterio della fillosfera

Controllo Biologico per
competizione su
Pseudomonas savastanoi Pv.
savastanoi



Rogna dell'olivo

Marchi, G., A. Sisto, A. Cimmino, A. Andolfi, M. G. Cipriani, A. Evidente, and G. Surico. 2006. Interaction between *Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Savastanoi* and *Pantoea Agglomerans* in Olive Knots. *Plant Pathology* 55 (5): 614–624. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01449.x.

Olive di Nocellara messinere pigmentata prodotte al naturale

Fasi di lavorazione:



Trattamenti preliminari

- Cernita
- Calibratura
- Lavaggio in acqua



Fermentazione in salamoia 7% NaCl e 1% di colture starter

- Fermentazione lattica
- Deamarizzazione biologica

Inoculo all'1% (v/v) di brodocolture di batteri lattici e lieviti secondo le seguenti tesi:

- A batteri lattici ***Lactiplantibacillus plantarum*** (DSM 20205)
- B lieviti ***Wickerhamomyces anomalus*** (DSM 6766)
- C n. 3 **isolati da drupa** (OC1LAB, OC2LAB, OC3LAB) di *L. plantarum*
- D **mix** con i microrganismi delle tesi A, B, C
- E **controllo** senza inoculo



Analisi
microbiologiche

In campioni di salamoia fino a 40 giorni con i seguenti **terreni selettivi**:

- MRS agar per i batteri lattici,
- SAB agar per lieviti e muffe,
- PCA per i batteri mesofili aerobi,
- MSA per gli stafilococchi coagulasi positivi,
- CCA per i coliformi totali.

Analisi
salamoie

- Misurazione del **pH**
deamarizzazione dei prodotti
- Componente fenolica tramite
HPLC

Analisi polpe

- Per la componente fenolica delle
polpe mediante **HPLC-UV**
- L'analisi degli zuccheri solubili
mediante **LC-MS/MS**

Profilo
sensoriale

- Valutazione del prodotto finito e
definizione del profilo sensoriale
(**panel** della sede del CREA di
Acireale)

Risultati delle analisi microbiologiche

Trattamento	Tempo (Giorni)	Stafilococchi (Log ₁₀ UFC/mL)	Coliformi totali (Log ₁₀ UFC/mL)
A) <i>L. plantarum</i>	5	4.54±0.51a	2.85±0.15abc
B) <i>W. anomalus</i>		3.31±0.27b	2.00±0.05c
C) Isolati da drupe		3.67±0.04ab	3.66±1.11ab
D) Mix di A, B, C		3.50±0.68b	2.59±0.13bc
E) Controllo		4.41±0.15a	4.04±0.78a
Sig.		**	**
A) <i>L. plantarum</i>	40	2.66±3.07b	4.08±2.05ab
B) <i>W. anomalus</i>		1.41±1.02b	3.78±2.00ab
C) Isolati da drupe		2.55±0.82b	1.28±0.48b
D) Mix di A, B, C		3.54±0.32ab	4.33±1.23ab
E) Controllo		6.66±0.34a	6.75±0.22a
Sig.		**	**

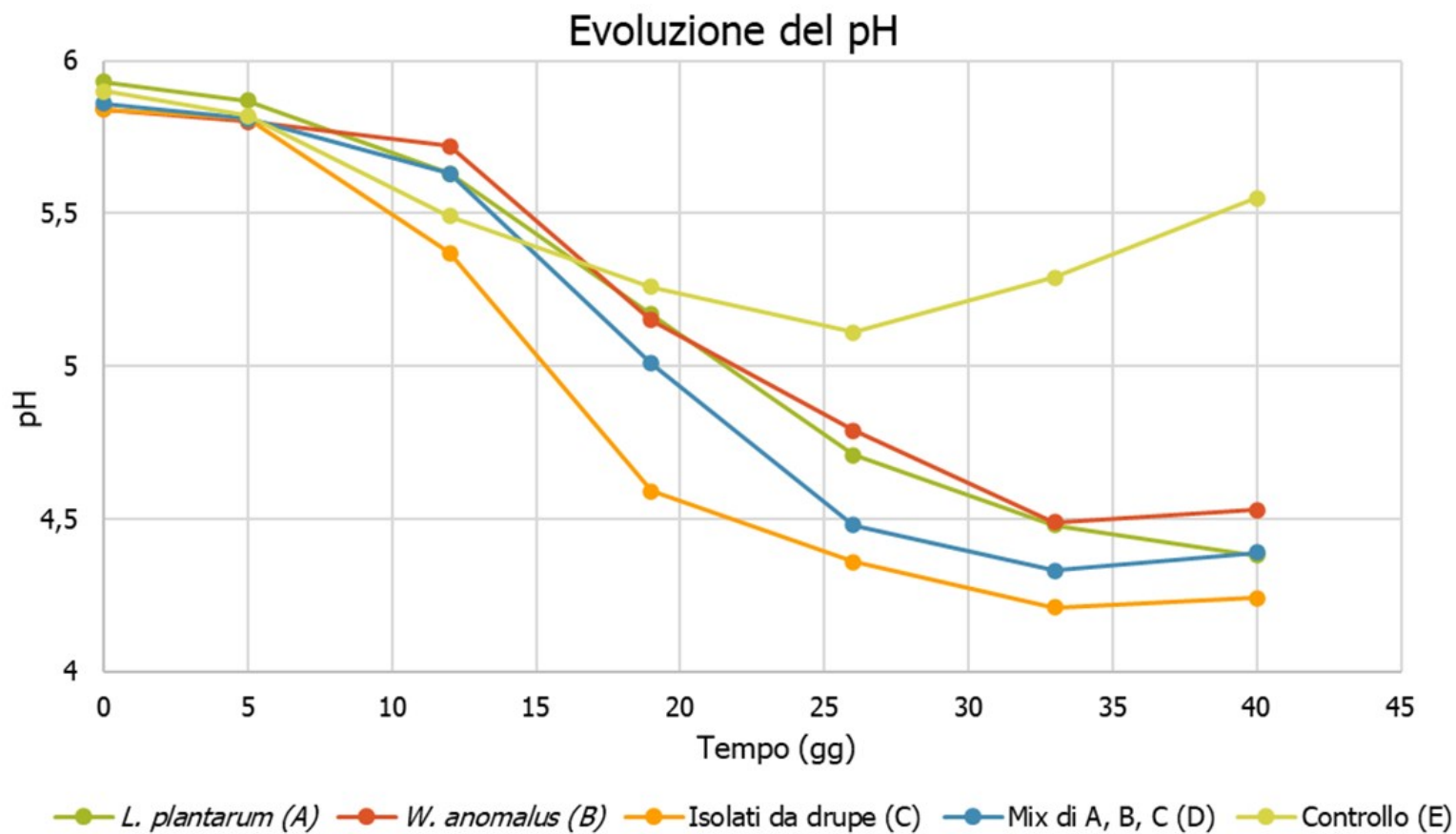
I dati sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse nella stessa colonna e per lo stesso tempo indicano differenze significative. **significativo per $p \leq 0.01$.

Risultati delle analisi microbiologiche

Trattamento	Tempo	Batteri lattici (Log ₁₀ UFC/mL)	Lieviti e muffe (Log ₁₀ UFC/mL)
A) <i>L. plantarum</i>	5	4.47±0.41	5.25±0.24
B) <i>W. anomalus</i>		4.60±0.28	4.66±0.25
C) Isolati da drupe		5.02±0.30	5.28±0.16
D) Mix di A, B, C		4.63±0.39	4.78±0.60
E) Controllo		4.89±0.34	5.01±0.49
Sig.		n.s.	n.s.
A) <i>L. plantarum</i>	40	5.45±0.27c	5.00±0.23ab
B) <i>W. anomalus</i>		6.04±0.68bc	5.82±0.86a
C) Isolati da drupe		7.29±0.22ab	4.20±0.56b
D) Mix di A, B, C		7.53±0.14a	6.12±0.54a
E) Controllo		3.03±1.20d	5.60±0.10a
Sig.		**	**

I dati sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse nella stessa colonna e per lo stesso tempo indicano differenze significative. **significativo per $p \leq 0.01$; n.s. non significativo.

Risultati analisi chimiche delle salamoie



Risultati analisi chimiche delle salamoie

I diversi inoculi hanno
influito in modo
rilevante sulle
**concentrazioni
fenoliche** delle
salamoie.

Trattamento	Tempo (Giorni)	Idrossitirosolo mg/L	Tirosolo mg/L	Verbascoside mg/L
A) <i>L. plantarum</i>	12	445.96±82.17ab	0.00±0.00	0.00±0.00
B) <i>W. anomalus</i>		335.55±4.87c	0.00±0.00	0.00±0.00
C) Isolati da drupe		490.28±50.01a	0.00±0.00	0.00±0.00
D) Mix A, B, C,		366.55±23.64bc	0.00±0.00	0.00±0.00
E) Controllo		345.88±20.45c	0.00±0.00	0.00±0.00
Sig.		***	n.s.	n.s.
A) <i>L. plantarum</i>	19	959.14±177.20ab	31.39±7.82ab	34.22±5.87a
B) <i>W. anomalus</i>		766.10±8.09c	25.85±1.08ab	23.56±1.51b
C) Isolati da drupe		1024.15±37.11a	37.53±4.40a	32.26±4.39a
D) Mix A, B, C,		830.30±39.73bc	23.72±2.73b	22.08±4.45b
E) Controllo		790.29±29.24bc	22.78±8.45b	0.00±0.00c
Sig.		**	*	***
A) <i>L. plantarum</i>	40	2003.59±272.18	88.46±16.24ab	97.57±14.55
B) <i>W. anomalus</i>		1977.98±25.71	77.23±6.96bc	95.61±13.84
C) Isolati da drupe		2055.24±27.18	105.45±0.80a	117.70±6.45
D) Mix A, B, C,		2123.09±350.88	94.23±17.24ab	91.78±20.04
E) Controllo		2110.71±28.66	60.21±6.49c	100.49±9.69
Sig.		n.s.	***	n.s.

I dati sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse nella stessa colonna e per lo stesso tempo indicano differenze significative. **significativo per $p \leq 0.01$; *significativo per $p \leq 0.05$; n.s. non significativo.

Risultati delle analisi alle polpe

A fine fermentazione il contenuto in **zuccheri e fenoli totali** è **diminuito** in tutte le tesi rispetto alla concentrazione iniziale.

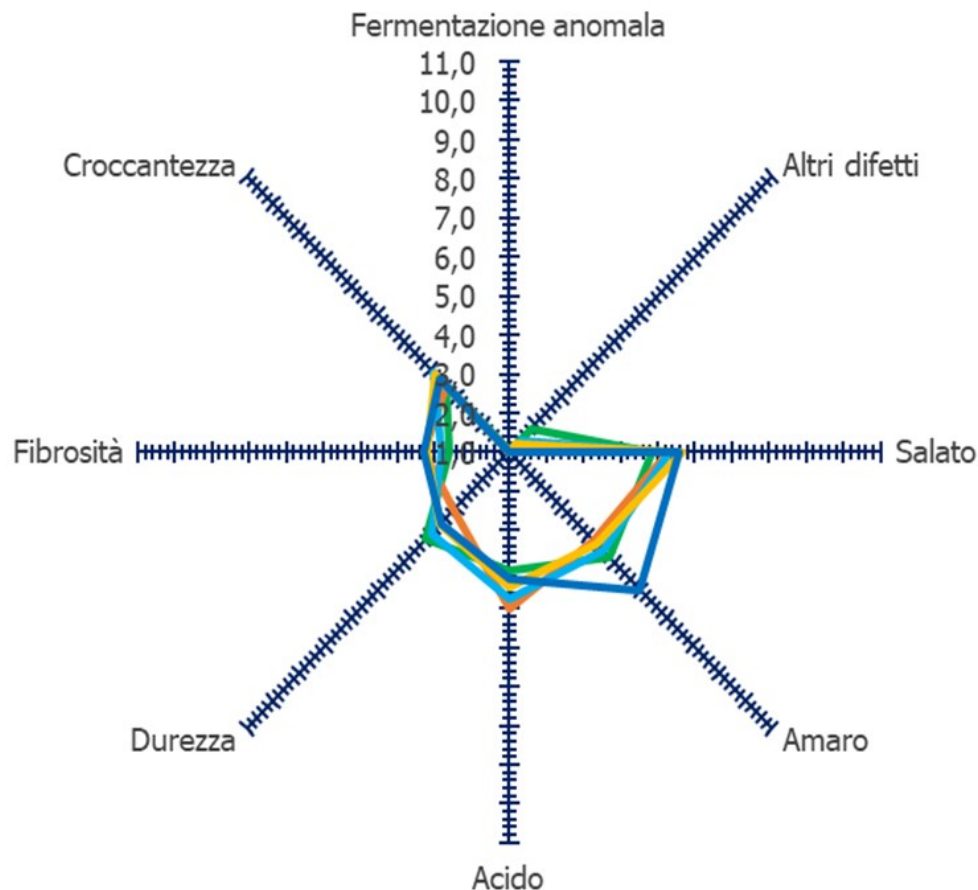


	TRATTAMENTO						
	Drupe	<i>L. plantarum</i> (A)	<i>W. anomalous</i> (B)	Isolati da drupe (C)	Mix di A, B, C (D)	Controllo (E)	
TEMPO	T0	T40					
FENOLI TOTALI mg/Kg	10603.21±580.48a	7181.52±308.78c	8337.04±369.20b	6139.91±288.91c	7116.40±406.57c	6196.27±448.02c	Sig. ***
ZUCCHERI TOTALI g/100g (PS)	11.25±0.11a	5.84±0.77bc	4.93±0.54cd	6.04±0.63bc	3.77±0.29c	6.88±0.34b	***

*I dati sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse nella stessa colonna e per lo stesso tempo indicano differenze significative. ***significativo per $p \leq 0.01$.*

Profilo sensoriale

— *L. plantarum* (A) — *W. anomalus* (B) — Isolati da drupe (C) — Mix di A, B, C (D) — Controllo (E)



L'analisi sensoriale dei campioni ha evidenziato che il descrittore **amaro** è stato percepito maggiormente nel controllo rispetto alle altre tesi, sottolineando come tutti gli inoculi hanno influenzato positivamente le cinetiche di deamarizzazione delle olive.

- I microorganismi isolati dalle drupe evidenziano la potenzialità di essere utilizzati per vari scopi: come biostimolanti, agenti di biocontrollo o colture starter;
- I dati evidenziano come la coltura starter costituita dai **ceppi isolati** da drupa si sia differenziata per il miglior abbattimento della carica patogena grazie ad una **spiccata acidificazione**.
- È importante quindi **identificare e caratterizzare colture starter autoctone** per ottimizzare le applicazioni biotecnologiche nel processo di fermentazione delle olive da tavola, ponendo attenzione non solo alla caratterizzazione tecnologica dei ceppi ma anche alla qualità sensoriale del prodotto finale per esaltarne la tipicità.



crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura
e l'analisi dell'economia agraria

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

**Centro di Ricerca Olivicoltura,
Frutticoltura e Agrumicoltura
(CREA-OFA)
Acireale (CT), Italy**

