

PATÉ DA DECANter MULTIFASE DMF COME FONTE DI COMPOSTI BIOATTIVI E NUTRACEUTICI

Barbara Lanza

CREA-Centro Ingegneria e Trasformazioni Agroalimentari, Pescara



6/12/2022 - Convegno del PROGETTO INNOLITEC
INNOVAZIONI TECNOLOGICHE NELLA FILIERA DELL'OLIVA DA OLIO E DA MENSA
Risultati finali del progetto



Ministero dell'agricoltura,
della sovranità alimentare e delle foreste



WP5. VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DELL'INDUSTRIA OLEARIA

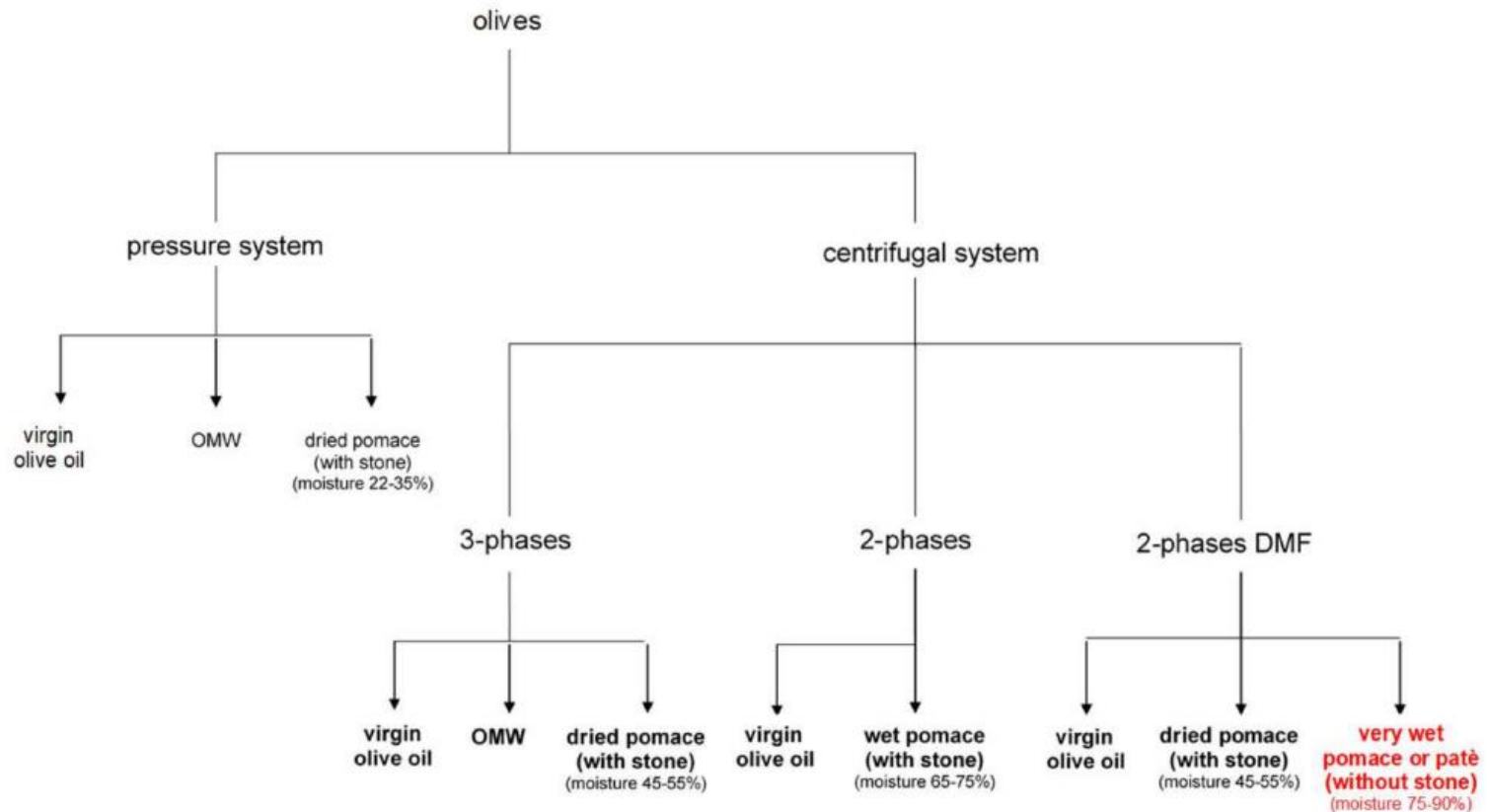
Task 5.4 Utilizzo del pat  da decanter multifase
DMF come alimento probiotico nell'alimentazione
umana (Task Leaders Lanza, Romeo)

In questi 4 anni di Progetto sono stati affrontati i seguenti argomenti:

- Censimento dei frantoi che utilizzano tecnologia Leopard DMF
- Recupero dei patè monovarietali
- Caratterizzazione nutraceutica del patè
- Prove di deamarizzazione fisica (metodo filtrazioni sequenziali)
- Prove di deamarizzazione biologica (fermentazione naturale)
- Selezione di microrganismi oleuropeinolitici e probiotici tolleranti il carico fenolico del patè
- Realizzazione di un terreno di coltura a base di patè (OJB – olive juice broth)
- Prove di deamarizzazione biologica con starter (fermentazione guidata)
- Caratterizzazione reologica del patè
- Prove di attività antibatterica verso microrganismi patogeni
- Prove su linee cellulari tumorali

Vantaggi del DMF:

- No acqua di processo
- Sansa disidratata (45% di U) simile a quella del 3-fasi
- Sansa molto umida (chiamata patè) senza nocciolino

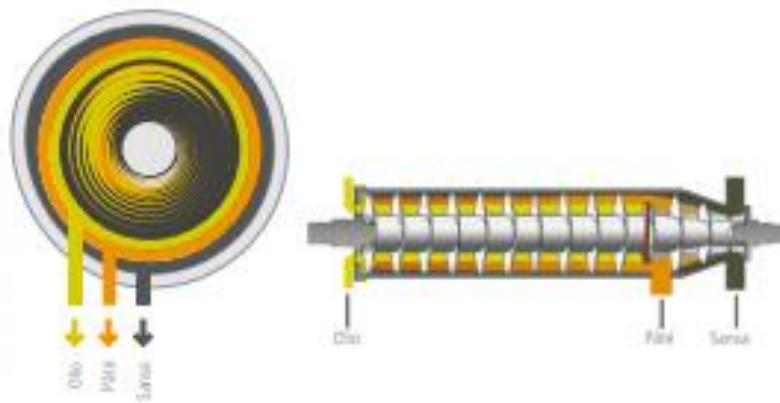




TECNOLOGIA MULTIFASE (DMF)

Nella lavorazione multifase l'estrattore centrifugo è predisposto per avere tre uscite: una per l'olio, una per la sansa e una intermedia per il pâté.

Questo tipo di estrazione garantisce la migliore qualità delle varie fasi prodotte con la versatilità di essere adatta sia alla lavorazione in continuo che a quella partitaria.



Recupero del paté



VARIETA' ANALIZZATE

Leccino



Tortiglione



Dritta



Carboncella





DOP Pretuziano delle Colline Teramane

(Reg. CE n. 1491 del 25.08.2003)

L'olio extravergine di oliva **DOP Pretuziano delle Colline Teramane** è ottenuto dai frutti dell'olivo delle varietà **Leccino**, **Frantoio** e **Dritta**, presenti congiuntamente negli oliveti fino al 75%. Possono concorrere altre varietà locali minori di olivo come **Tortiglione**, **Carboncella** e **Castiglione** per il restante 25%.



DOP Aprutino Pescara

(Reg. CE n. 1263 del 01.07.1996; Reg. UE n. 867 del 18.06.2020)

L'olio extravergine di oliva **DOP Aprutino Pescara** è ottenuto dai frutti dell'olivo delle varietà **Dritta**, **Leccino** e **Toccolana**, che devono essere presenti negli oliveti in misura non inferiore all'80%; altre varietà possono concorrere per il restante 20%.

Insieme ad altre 4 produzioni, è stata la prima DOP riconosciuta ufficialmente in Italia nel 1996, a riprova della sua qualità e della credibilità e serietà dei produttori.



DOP Colline Teatine

(Reg. CE n. 1065 del 12.06.97)

L'olio extravergine di oliva **DOP Colline Teatine** è ottenuto dai frutti dell'olivo delle varietà **Gentile di Chieti** (in misura non inferiore al 50%) e **Leccino** (in misura non superiore al 40%); altre varietà possono concorrere per il restante 10%.

Caratteristiche del patè DMF:

- un **elevato contenuto di sostanza organica** che lo rende ottimo per il compostaggio e l'utilizzo in campo
- un **buon contenuto in proteina grezza e in fibra** pregiata (composta da fibra neutro detersa e fibra acida detersa) che lo rende molto indicato come integratore nell'alimentazione zootecnica
- un **basso contenuto di lignina**, inferiore anche al quantitativo presente nella sansa denocciolata e paragonabile a quello di una sansa proveniente da olive denocciolate
- un **residuo grasso la cui composizione acidica è del tutto assimilabile a quella di un olio extravergine di oliva**, molto ricca, cioè, in acido oleico e con una buona percentuale in linoleico
- un **elevato contenuto in composti fenolici** che sono principalmente rappresentati da secoiridoidi e verbascoside

CARATTERIZZAZIONE NUTRACEUTICA DEL PATE'

Analisi HPLC della componente fenolica

Phenolic Compound (mg/kg)	Leccino	Dritta	Carboncella	Tortiglione
3,4 - DHPEA (Hydroxytyrosol)	243	73	977	720
p-HPEA (Tyrosol)	21	17	57	67
p-Hydroxybenzoic acid	30	41	197	188
Vanillic acid	29	29	87	93
Caffeic acid	0	25	15	97
Vanillin	22	1	40	20
p-Cumaric acid	0	21	149	13
Hydroxytyrosyl acetate	0	2	36	122
Ferulic acid	43	18	61	30
Verbascoside	42	95	788	995
o-Cumaric acid	0	58	12	59
3,4-DHPEA-EDA (Oleacein)	24	16	1050	1249
Oleuropein	0	15	391	472
3,4-DHPEA-EA (Oleuropein aglycone)	0	2	24	50
Tyrosyl acetate	15	4	32	43
p-HPEA-EDA (Oleocanthol)	39	68	130	31
Pinoresinol, 1-Acetoxypinoresinol	0	0	146	0
p-HPEA-EA (Ligstroside aglycone)	26	3	203	7
3,4-DHPEA,-EA,H	0	11	68	23

PROVE DI DEAMARIZZAZIONE E RECUPERO DI BIOFENOLI

- A. Deamarizzazione mediante filtrazioni sequenziali
- B. Deamarizzazione mediante fermentazione spontanea
- C. Deamarizzazione mediante fermentazione guidata

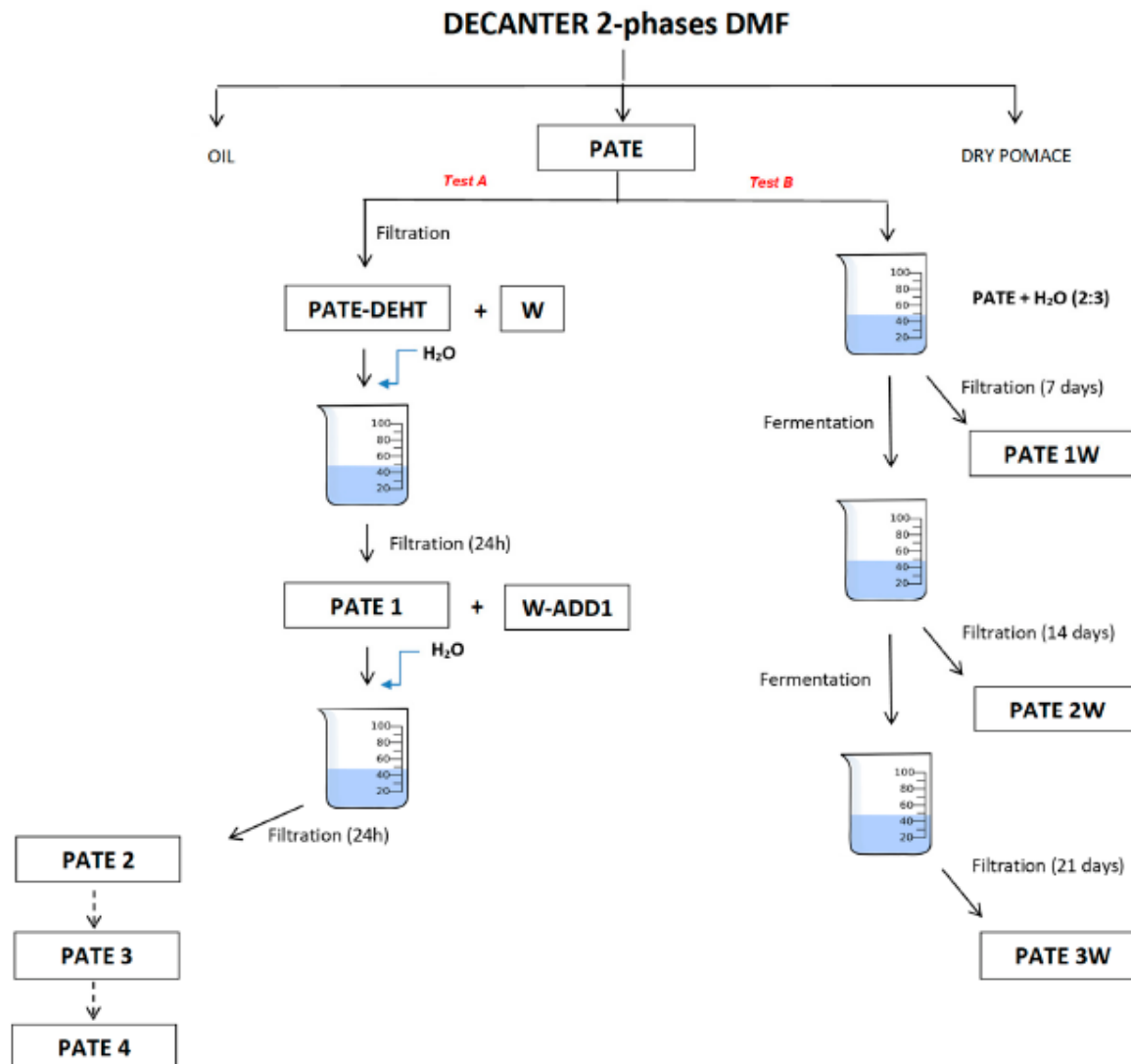
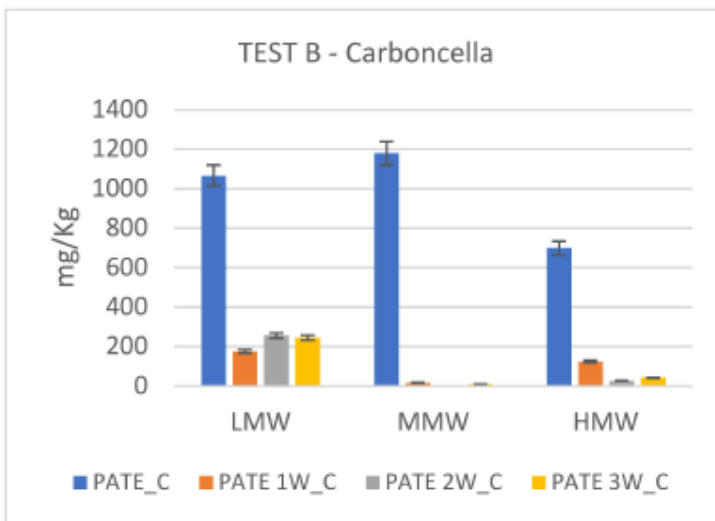
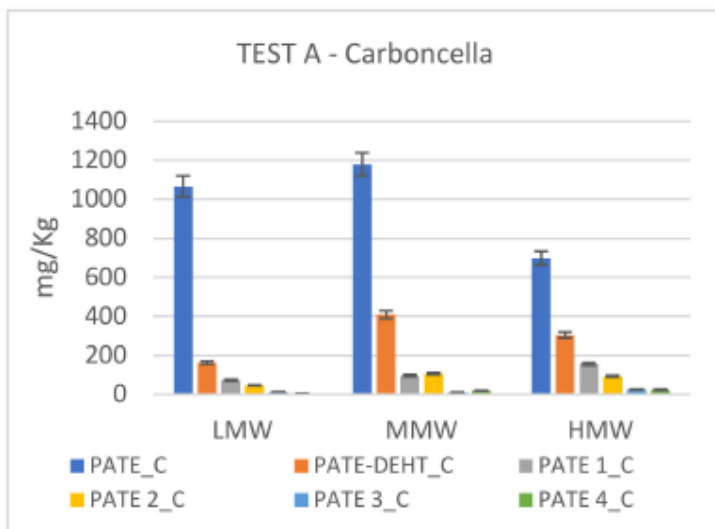


Figure 7. Experimental trial.

PROVE DI DEAMARIZZAZIONE E RECUPERO DI BIOFENOLI

- A. Deamarizzazione mediante filtrazioni sequenziali
- B. Deamarizzazione mediante fermentazione spontanea
- C. Deamarizzazione mediante fermentazione guidata

Degradazione dei secoiridoidi



Recupero nell'acqua di filtrazione

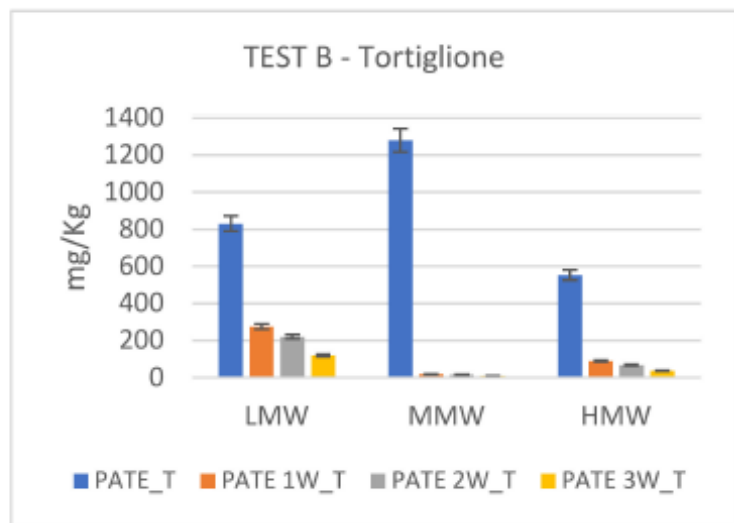
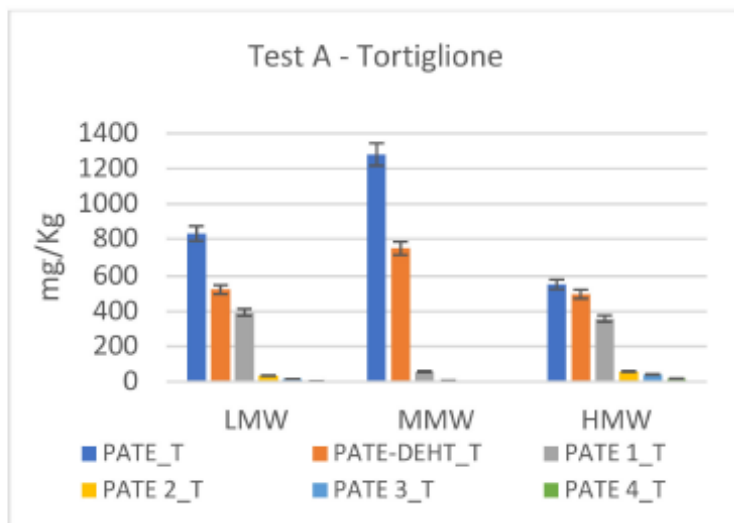
mg/L	W_C	W-ADD1_C
LMW	389 ± 19	302 ± 15
MMW	197 ± 10	167 ± 8
HMW	73 ± 4	104 ± 5

LMW: Hydroxytyrosol (HTY), tyrosol (TY) and tyrosyl acetate

MMW: 3,4-DHPEA-EDA (oleacein) and p-HPEA-EDA (oleocanthal)

HMW: oleuropein, 3,4-DHPEA-EA (oleuropein aglycone), 3,4-DHPEA-EA,H, p-HPEA-EA (ligstroside aglycone) and p-HPEA-EA,H

Degradazione dei secoiridoidi



Recupero nell'acqua di filtrazione

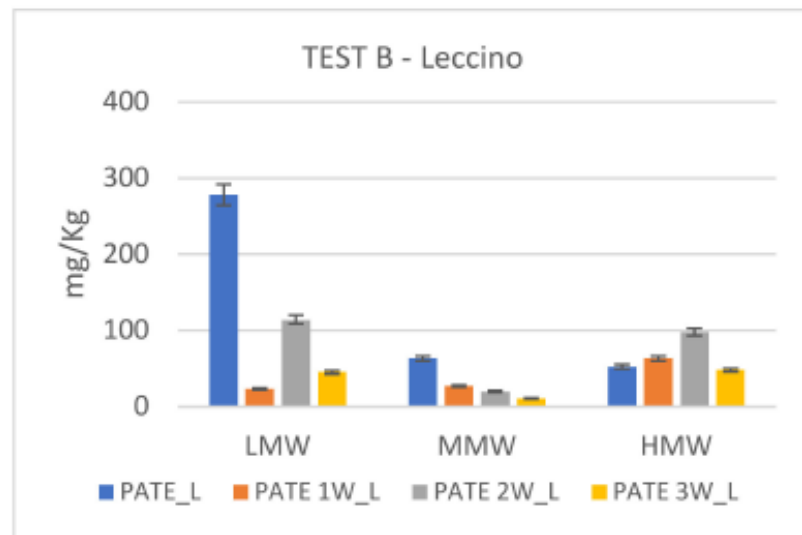
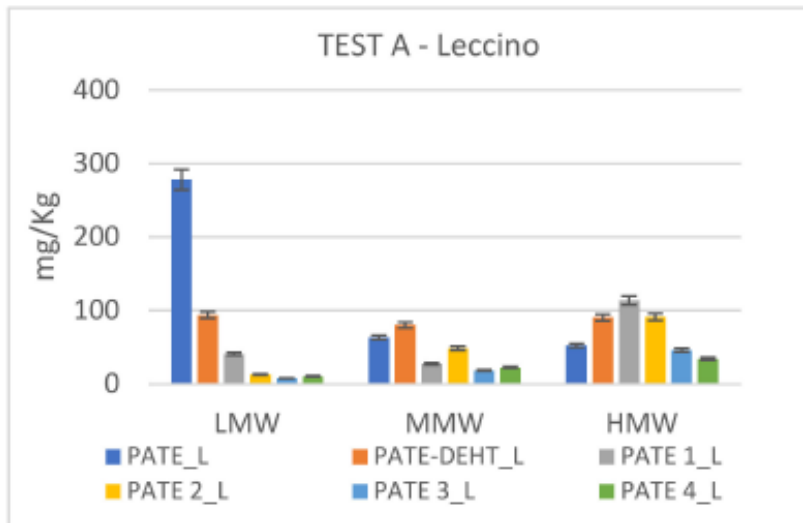
mg/L	W_T	W-ADD1_T
LMW	579 ± 29	241 ± 12
MMW	145 ± 7	6 ± 0
HMW	28 ± 1	30 ± 2

LMW: Hydroxytyrosol (HTY), tyrosol (TY) and tyrosyl acetate

MMW: 3,4-DHPEA-EDA (oleacein) and p-HPEA-EDA (oleocanthal)

HMW: oleuropein, 3,4-DHPEA-EA (oleuropein aglycone), 3,4-DHPEA-EA,H, p-HPEA-EA (ligstroside aglycone) and p-HPEA-EA,H

Degradazione dei secoiridoidi



Recupero nell'acqua di filtrazione

mg/L	W_L	W- ADD1_L
LMW	134 ± 7	55 ± 3
MMW	21 ± 1	0 ± 0
HMW	26 ± 1	5 ± 0

LMW: Hydroxytyrosol (HTY), tyrosol (TY) and tyrosyl acetate

MMW: 3,4-DHPEA-EDA (oleacein) and p-HPEA-EDA (oleocanthal)

HMW: oleuropein, 3,4-DHPEA-EA (oleuropein aglycone), 3,4-DHPEA-EA,H, p-HPEA-EA (ligstroside aglycone) and p-HPEA-EA,H

PROVE DI DEAMARIZZAZIONE E RECUPERO DI BIOFENOLI

- A. Deamarizzazione mediante filtrazioni sequenziali
- B. Deamarizzazione mediante fermentazione spontanea
- C. Deamarizzazione mediante fermentazione guidata

Degradazione microbiologica (fermentazione naturale)

	T0				T21			
	BATTERI		LIEVITI	MUFFE	BATTERI		LIEVITI	MUFFE
CULTIVAR	LATTOBACILLI	ENTEROBATTERI			LATTOBACILLI	ENTEROBATTERI		
LECCINO	$7,3 \times 10^4$ a	$4,9 \times 10^4$ a	0 a	$2,6 \times 10^3$ a	0 b	0 b	$5,6 \times 10^3$ b	$1,2 \times 10^3$ a
CARBONCELLA	$3,0 \times 10^4$ a	$1,3 \times 10^4$ a	$6,9 \times 10^4$ a	$1,2 \times 10^3$ a	0 b	0 b	$2,7 \times 10^4$ a	$1,8 \times 10^3$ a
TORTIGLIONE	$1,8 \times 10^5$ a	$2,5 \times 10^4$ a	$6,1 \times 10^3$ a	$1,1 \times 10^4$ a	$1,2 \times 10^4$ b	0 b	$8,5 \times 10^5$ b	$3,2 \times 10^4$ a



Confrontando quindi i due metodi di deamarizzazione...

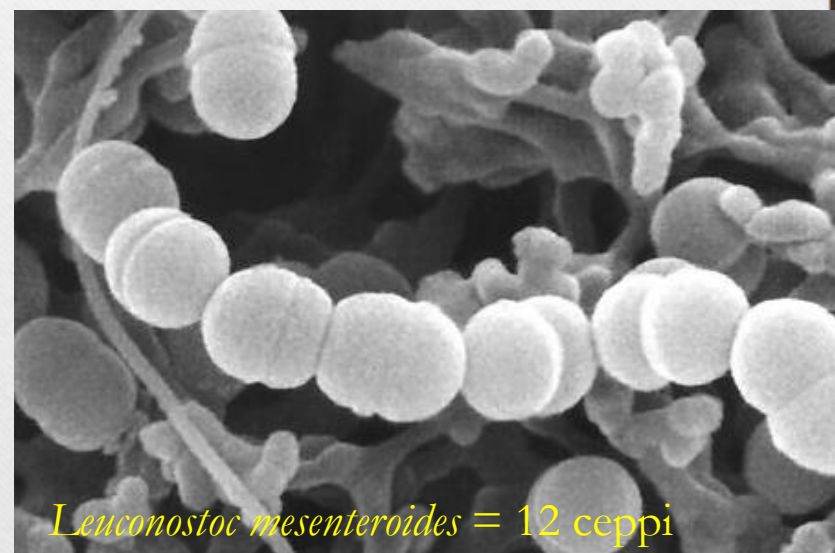
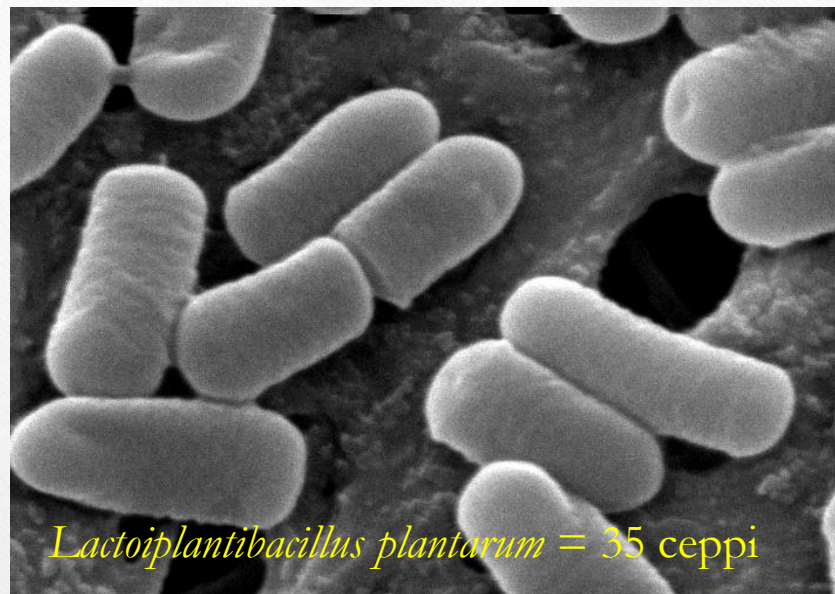
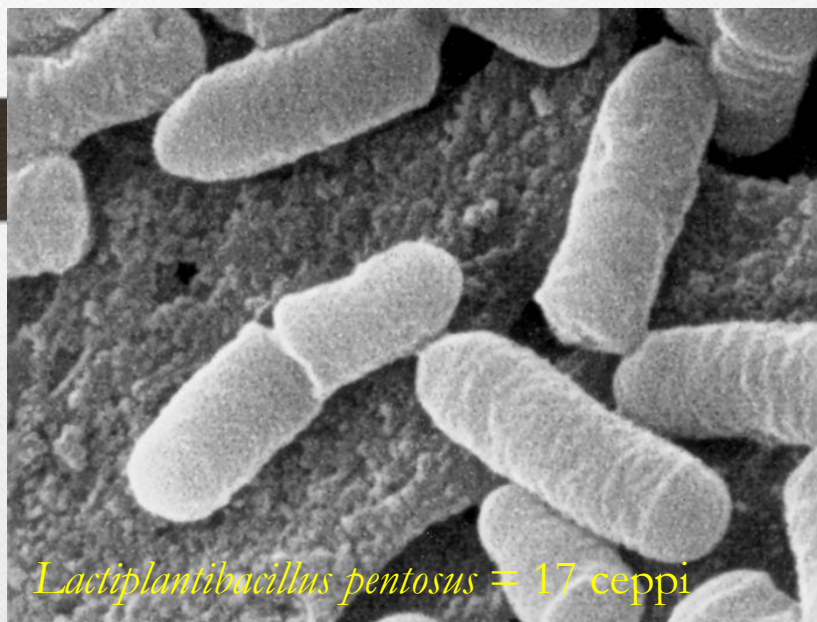
Table 3. Comparison of degradation rate of total phenolic compounds during test A and test B. Data are expressed as total biophenol content mg/kg of DMF pâté and, between parenthesis, the remaining percentage of total biophenols.

Test A				Test B			
Steps	Leccino	Carboncella	Tortiglione	Steps	Leccino	Carboncella	Tortiglione
PATE	948 (100%)	5899 (100%)	5543 (100%)	PATE	948 (100%)	5899 (100%)	5543 (100%)
PATE-DEHT	815 (86%)	2528 (43%)	4051 (73%)	PATE 1W	447 (45%)	1346 (23%)	3180 (57%)
PATE 1	662 (70%)	1021 (17%)	1110 (20%)	PATE 2W	446 (45%)	664 (11%)	1230 (22%)
PATE 2	553 (58%)	536 (9%)	252 (5%)	PATE 3W	417 (45%)	645 (11%)	580 (10%)
PATE 3	214 (23%)	140 (2%)	126 (2%)				
PATE 4	183 (19%)	140 (2%)	93 (2%)				

PROVE DI DEAMARIZZAZIONE E RECUPERO DI BIOFENOLI

- A. Deamarizzazione mediante filtrazioni sequenziali
- B. Deamarizzazione mediante fermentazione spontanea
- C. Deamarizzazione mediante fermentazione guidata

Microorganismi presenti nella Collezione CREA-IT.PE



Selezione in funzione di attività probiotiche

Convenzionali:

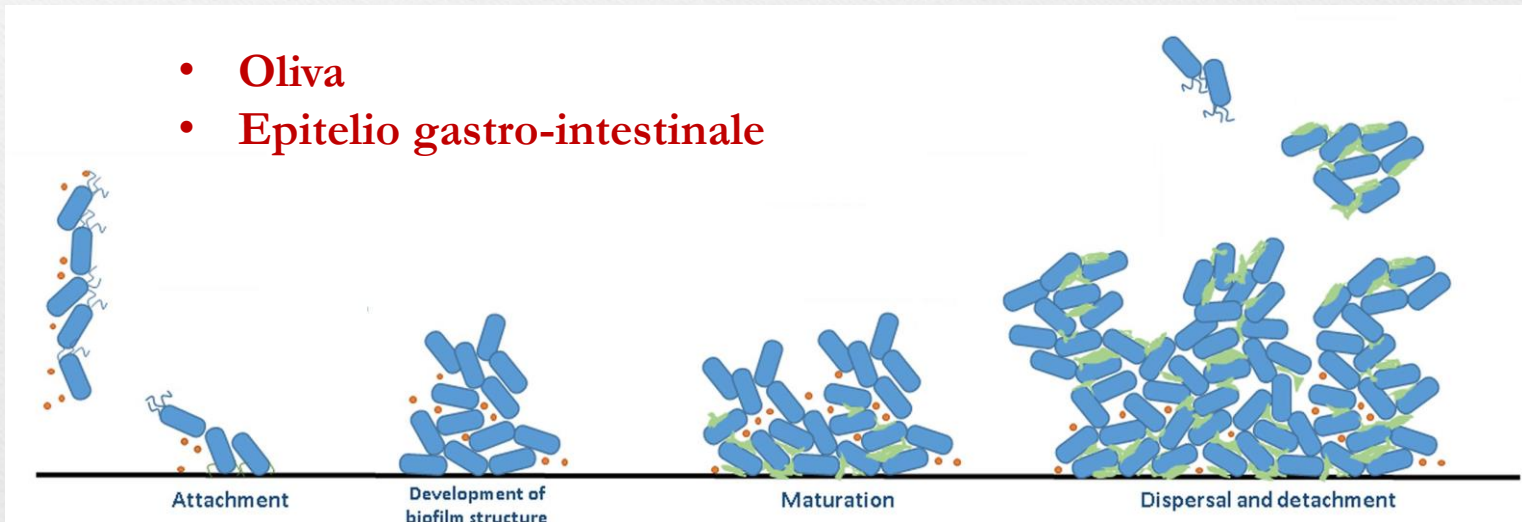
- Tolleranza a pH fortemente acidi
- Idrolisi dei sali biliari
- Tolleranza ad antibiotici
- Resistenza gastro-intestinale mediante «digestione simulata»

Non convenzionali:

- Capacità di formare biofilm
- Resistenza fagica
- Micro-incapsulamento dei LAB probiotici in microsfere di alginato
- Attività anti-pectinolitica

Capacità di formare biofilm

- A. Mucosità della colonia in MRS agar
- B. Viscosità in MRS broth
- C. Produzione di esopolisaccaridi (EPS) tramite microscopia elettronica a scansione (SEM)
- D. Adesione alle cere epicutcolari del frutto tramite microscopia elettronica a scansione (SEM)
- E. Autoaggregazione



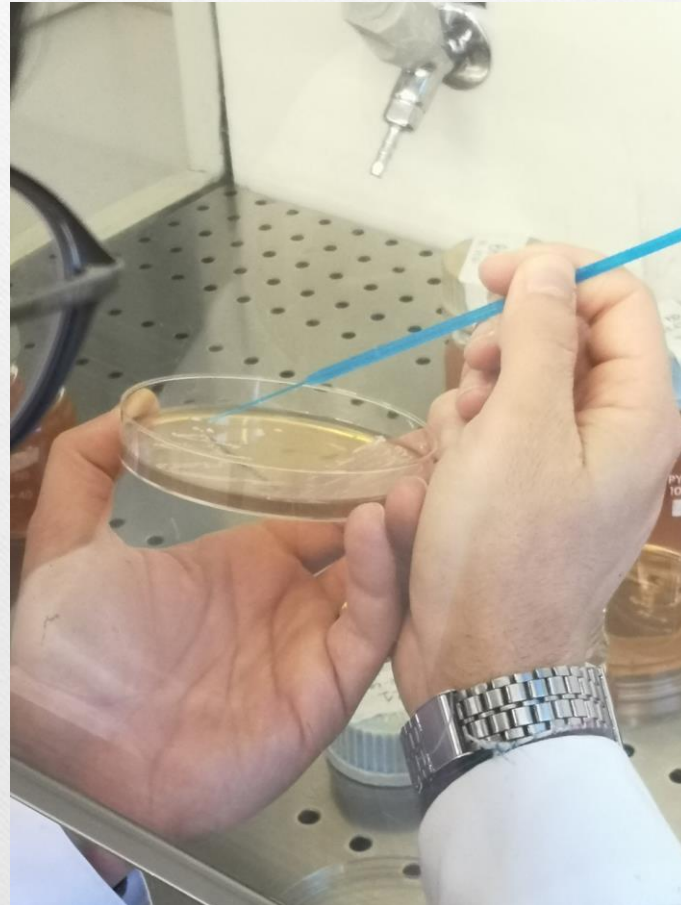
A. Valutazione della mucosità della colonia in MRS agar

Semina per striscio
in MRS agar



48 ore a 30 °C
in anaerobiosi

Valutazione della
mucosità della
colonia
mediante ansa
sterile



B. Valutazione della viscosità dei ceppi in MRS broth + saccarosio

Inoculo di 1ml di sospensione batterica in 100ml di MRS broth + saccarosio



24 ore 30 °C

Valutazione della viscosità apparente



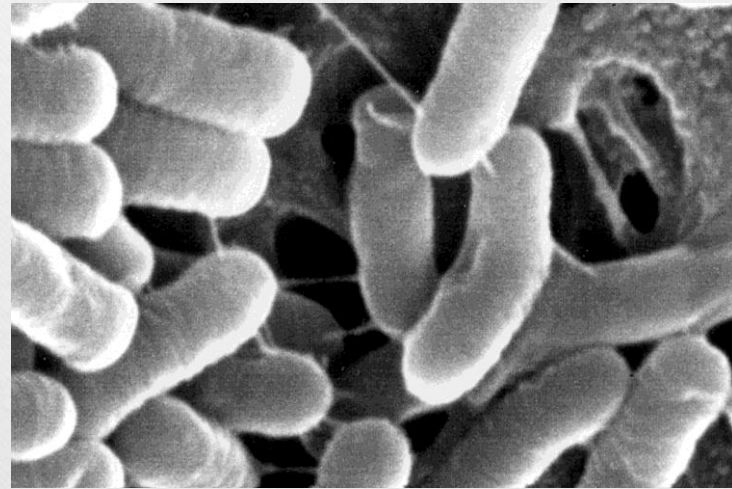
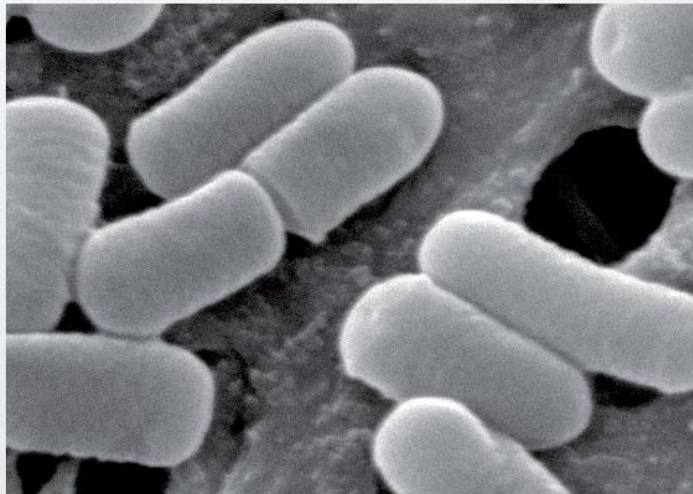
Valutazione della viscosità reale con viscosimetro



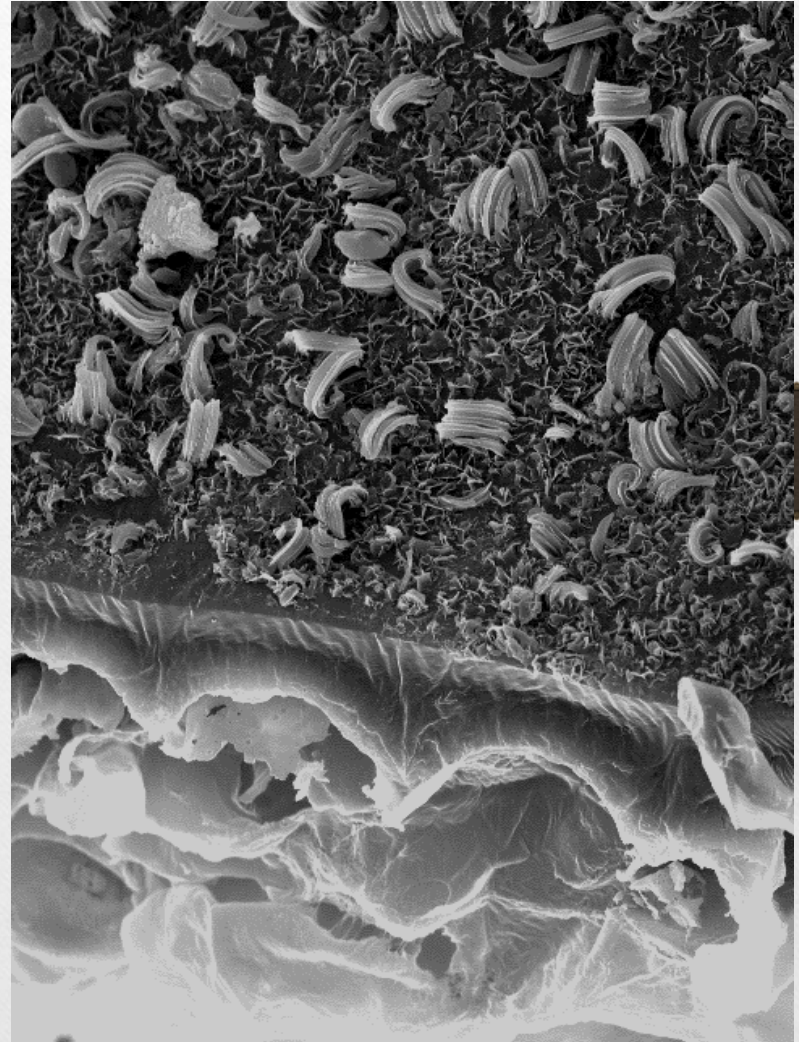
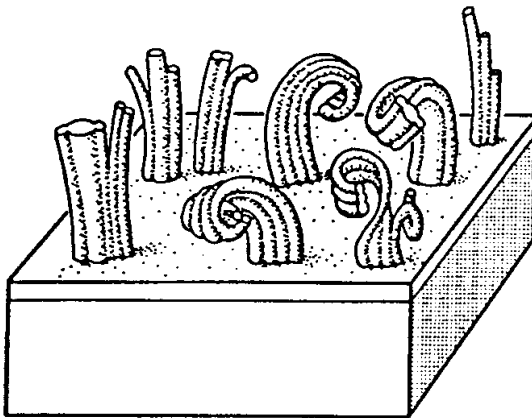
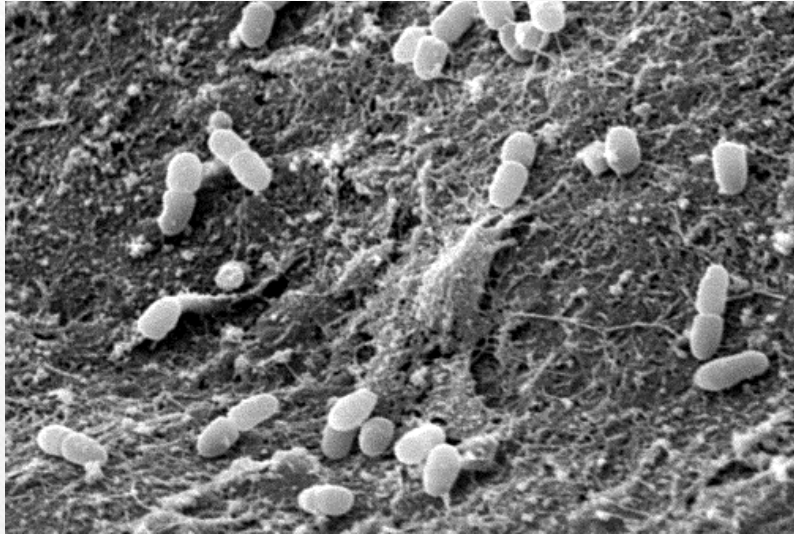
Ceppo	Viscosità a 30 RPM (mPa.s)
B28	1,40
B51	1,47
B124	1,32
B1	1,40
B2	1,32
B3	1,46
B7	1,22
B10	0,00
B13	1,40
B15	1,70
B17	1,20
B19	1,40
B27	1,34
B39	1,70
B44	1,50
B53	1,40
B126	1,20
B130	1,19
B136	1,35
B138	1,29
B142	1,30
B146	1,59
B165	1,28
B4	1,32
B8	1,45
B12	1,41
B14	1,36
B21	1,34
B23	1,27
B25	1,34
B31	1,61
B137	0,00
B158	1,22
B160	1,21
B162	1,80
L. bulgaricus270	1,34

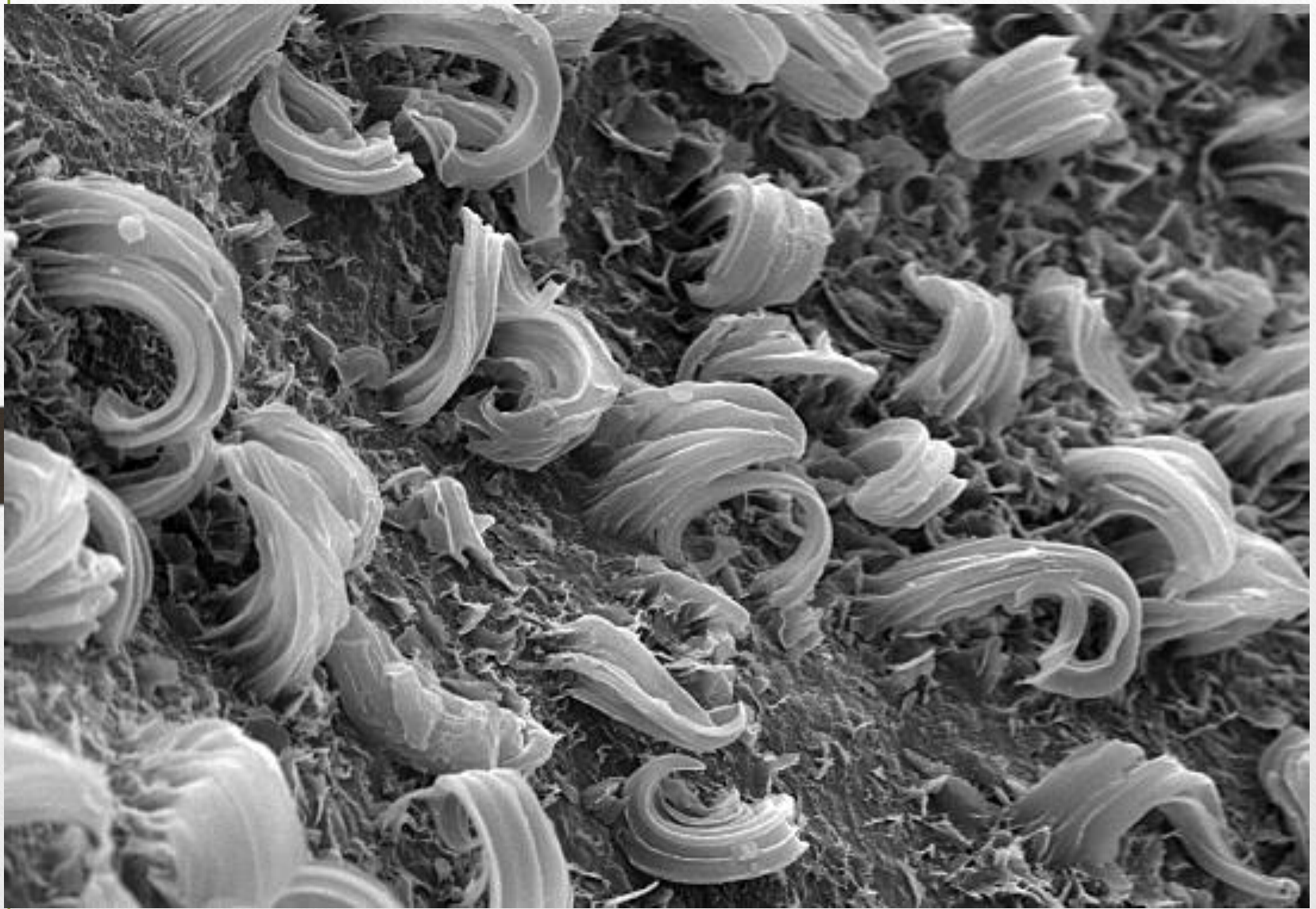
C. Produzione di esopolisaccaridi (EPS) mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)

Tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) è stata valutata la capacità da parte di *Lactiplantibacillus plantarum* di produrre esopolisaccaridi utili per formare biofilm, nonché la struttura cristallina dello strato ceroso epicuticolare della drupa, presupposti importanti per l'adesione dei microrganismi sulla superficie delle olive e per l'impiego di queste ultime come veicolo per ceppi probiotici.

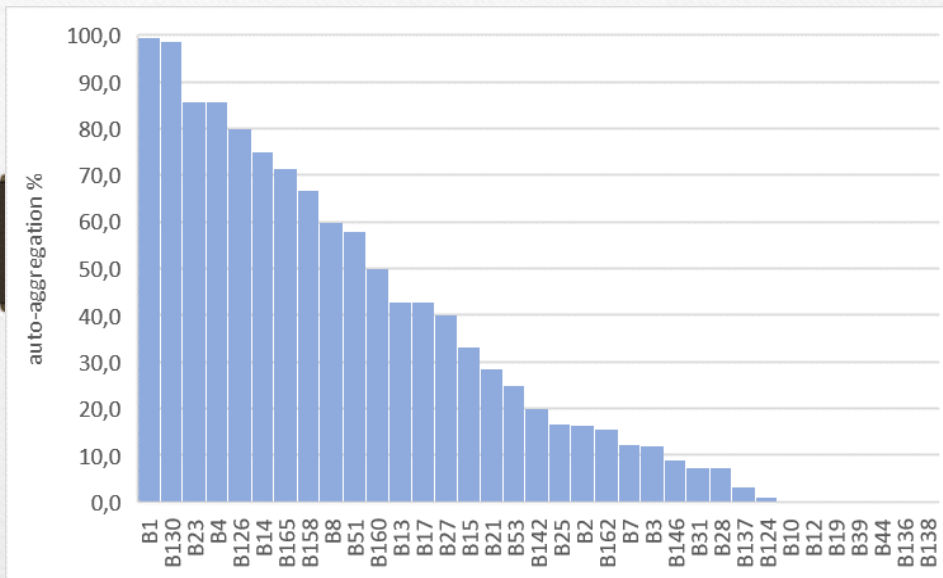


D. Adesione allo strato ceroso epi-cuticolare mediante microscopia elettronica a scansione (SEM)





Test di autoaggregazione



- Dieci ceppi hanno mostrato valori al di sopra del 50%, di cui due raggiungono quasi il 100% (B1 e B130)
- Dieci ceppi hanno mostrato valori inferiori al 20%
- Sette ceppi non hanno mostrato alcuna capacità di autoaggregazione

Resistenza gastro-intestinale mediante “digestione simulata”

I step

SSJ (Simulated Salivary Juice)

Succo salivare sintetico:

- tampone pH 6,9
- lisozima

Incubazione per 5 min a 37°C

II step

SGJ (Simulated Gastric Juice)

Succo gastrico sintetico:

- tampone pH 2,5
- pepsina

*Incubazione per 1h a 37°C in
agitatore orbitale per simulare i
movimenti peristaltici*

III step

SPJ (Simulated Pancreatic Juice)

Succo pancreatico sintetico:

- tampone pH 7,2
- bile
- pancreatina

*Incubazione per 3h a 37°C in
agitatore orbitale per simulare i
movimenti peristaltici*

Ceppo	T0	SSJ	SGJ	SPJ 3h	Capacità di sopravvivenza
<i>L. plantarum</i> B51	9,34 +/- 0,14	9,18 +/- 0,16	8,83 +/- 0,28	8,23 +/- 0,27	88%

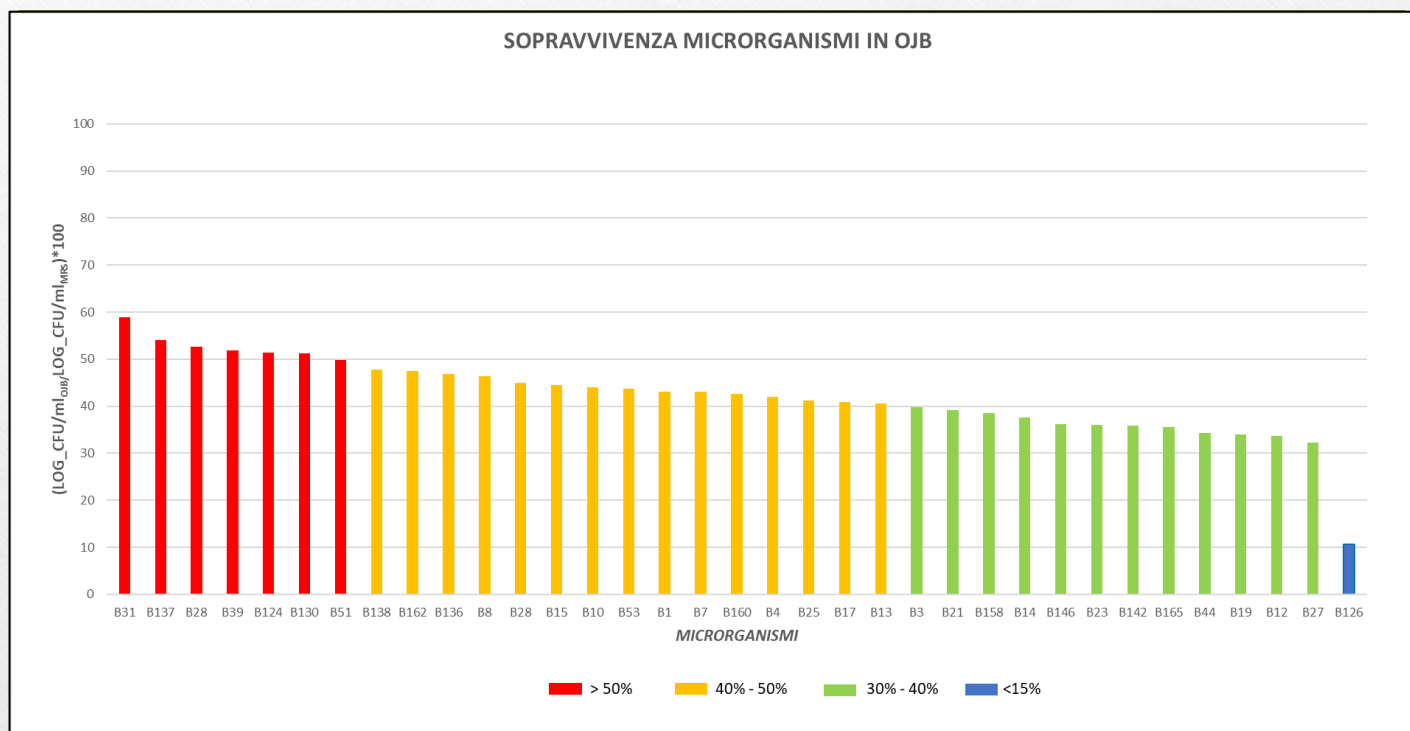
La capacità di sopravvivenza è espressa come percentuale di $1 - [(\log \text{CFU/mlT0} - \log \text{CFU/mlSPJ3h}) / \log \text{CFU/mlT0}]$

Prova in OLIVE JUICE BROTH

- Campioni di patè raccolti direttamente all'uscita del decanter, dopo trasporto refrigerato, sono stati filtrati con pompa da vuoto così da ottenere un succo, poi centrifugato per 2 volte (3756 g, 15 min, 4°C). Eliminata la parte oleosa in superficie, è stato recuperato il surnatante o "juice"
- Il juice è stato sterilizzato sotto UV per 1h, per poi aggiungervi, in rapporto 1:1, una soluzione sterile di acqua demineralizzata contenente glucosio 2% ed estratto di lievito 0,4%, ottenendo così un terreno di coltura arricchito (**OJB – Olive Juice Broth**) sul quale testare i ceppi oleuropeinolitici di *L. plantarum* della Collezione CREA-IT.PE
- Le provette contenenti OJB e microrganismo sono state incubate per 24 ore a 30°C contro prova di crescita in MRS broth.
- La % di sopravvivenza in OJB è stata valutata attraverso crescita in MRS agar
- Aliquote del juice, prima e dopo sterilizzazione in UV e di OJB degradato sono state processate in HPLC per la determinazione del contenuto fenolico iniziale e residuo

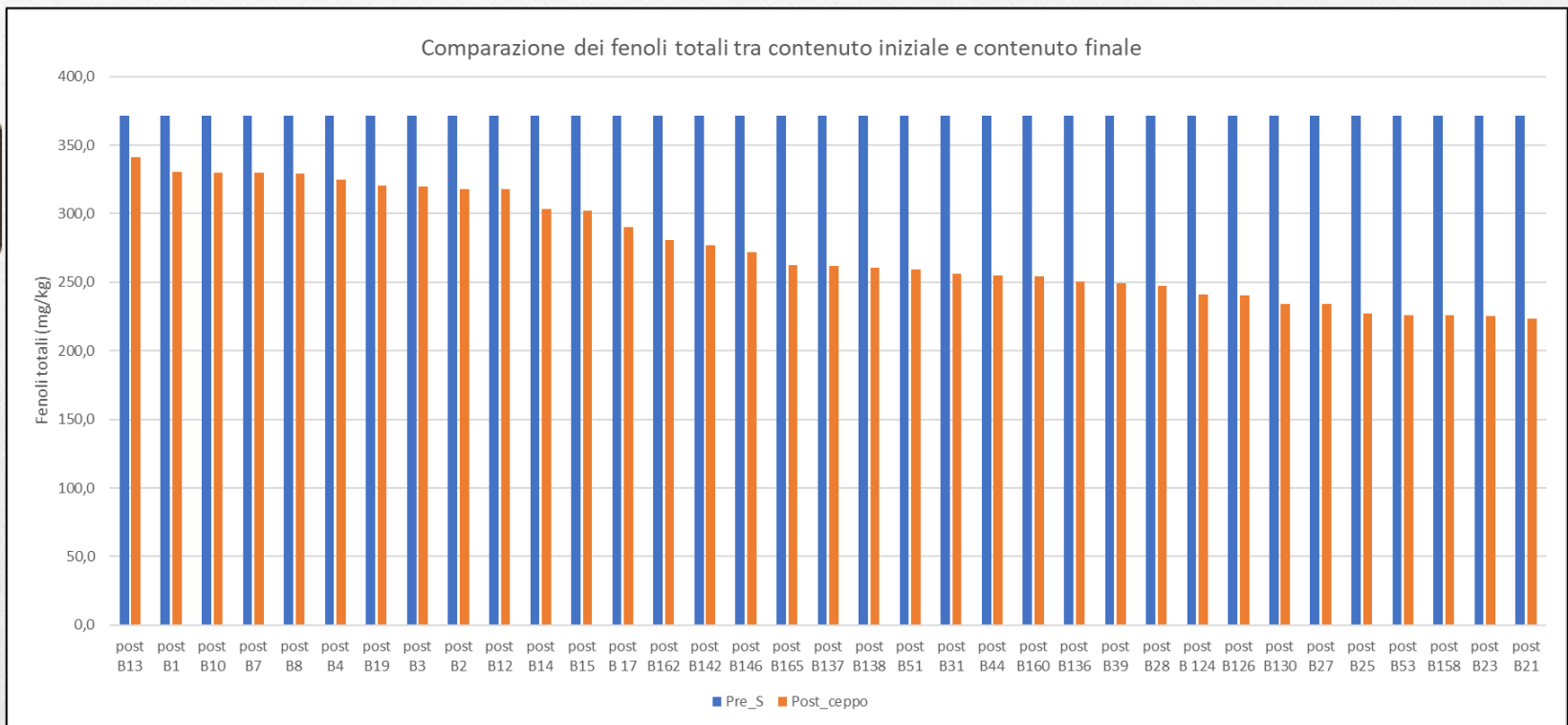
Test di sopravvivenza in OJB

Nella Figura sottostante è mostrata la distribuzione della sopravvivenza dei 35 ceppi di *L. plantarum* in OJB in relazione al controllo in MRS broth. I ceppi indicati in colore rosso hanno mostrato il più alto tasso di sopravvivenza.



Test di degradazione fenolica in OJB

Nella Figura sottostante, invece, è mostrato il contenuto fenolico totale dei campioni di OJB inoculati (arancio) rispetto al contenuto fenolico iniziale (azzurro). Tutti i 7 ceppi caratterizzati da una crescita $\geq 50\%$ in OJB (B31, B137, B28, B39, B124, B130, B51) hanno mostrato una degradazione del contenuto fenolico totale di OJB $\geq 30\%$.



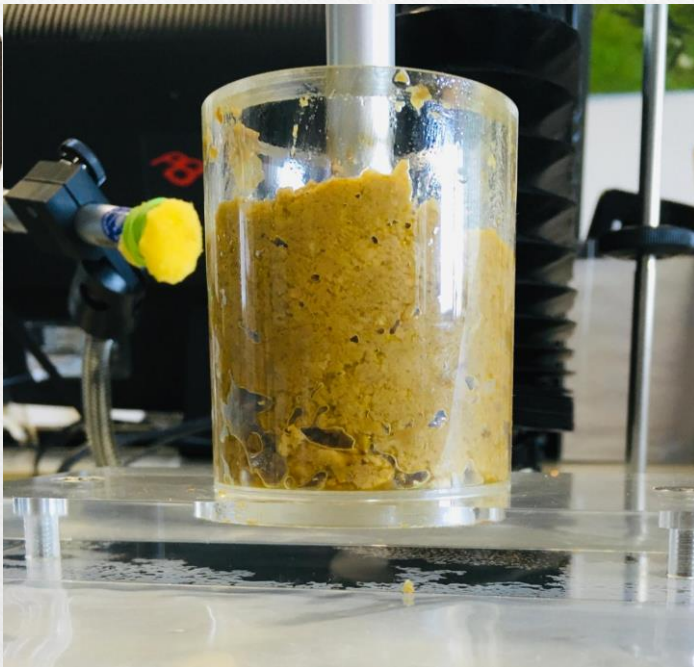
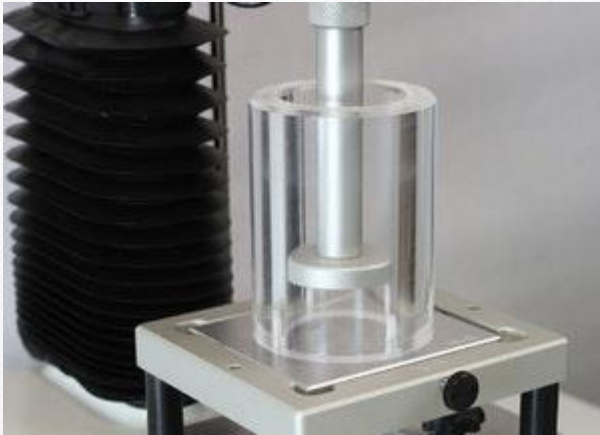
In collaborazione con l'Università degli Studi «G. d'Annunzio» di Chieti-Pescara

- Nessuno degli estratti fenolici di pat  ha mostrato attivit  antibatterica nei confronti dei microrganismi patogeni testati (*Pseudomonas aeruginosa* AC12a, *Staphylococcus aureus* Sa1, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* K2P),
- Gli estratti fenolici sono stati testati anche su due linee cellulari tumorali (Caco2 e HCT116), dimostrandosi efficaci nel ridurre l'espressione genica di molecole decisive nella progressione del tumore al colon e nell'attivit  mitocondriale. Il loro effetto non dipende dalla loro concentrazione ma dalla relativa composizione chimica.



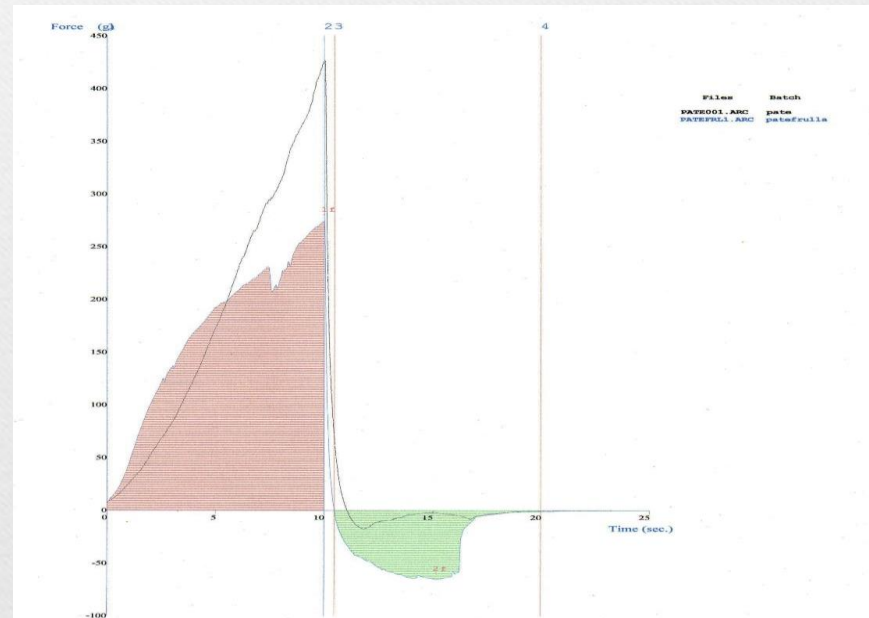
CARATTERIZZAZIONE REOLOGICA DEL PATE'

Con l'ausilio del **Texture
Analyzer TA.XTPlus**
(Stable Micro Systems Ltd,
Godalming, UK) +
Exponent Connect version
7.0.7.0 software



Texture analyzer accessorato con il Back Extrusion (BE) device

Il “back extrusion device” è un accessorio del Texture Analyzer costituito da un contenitore in plexiglass del diametro di 5 cm che viene posizionato centralmente al di sotto del “pistone a disco” del diametro 4 cm (P/40). Il pistone a disco esegue una prova di compressione che estrude il prodotto verso l'alto e intorno al bordo del disco. Questo test fornisce misure di “**consistenza**” e di “**coesività/pastosità**” del prodotto.





CONCLUSIONI

- In base agli esperimenti effettuati abbiamo focalizzato l'attenzione su una decina di ceppi promettenti sia in termini di probioticità che di degradazione fenolica. Il prodotto finale sarà quindi un paté commestibile, probiotico e ad alto contenuto di sostanze antiossidanti.
- Tale ricerca, condotta a livello esplorativo, apre la strada ad una futura trasformazione di un sottoprodotto del frantoio in alimento con alto valore aggiunto.

Pubblicazioni nell'ambito del Progetto:

-
- 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.** (2020) *Molecules*, 25 (24), art. no. 5967, DOI: 10.3390/molecules25245967
 - Di Marco S., Vecchiotti G., Di Loreto G., Bacceli M., Simone N., Lanza B. **DE-AMARIZZAZIONE MEDIANTE MICRORGANISMI SELEZIONATI DI PATÉ DI OLIVA OTTENUTO DA DECANter MULTIFASE.** V Convegno Nazionale sull'Olio e sull'Olio, Alghero 26-28/10/2022.
 - Di Marco S., Vecchiotti G., Di Loreto G., Bacceli M., Simone N., Lanza B. **BIOLOGICAL DE-BITTERING OF OLIVE MULTI-PHASE DECANter PÂTÉ BY LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM** In pubblicazione su: *Molecules-Special Issue "Biological Activity of Phenolics and Polyphenols in Nature Products"*, 2022.

Vi ringrazio per l'attenzione



«La raccolta delle olive» – Moc vincitrice Lego Contest settembre 2022