

UNIVERSITA' DEGLI STUDI "G. D'ANNUNZIO"

Chieti-Pescara

SCUOLA SUPERIORE DI DOTTORATO

Dottorato di ricerca in Scienze Biomolecolari e Farmaceutiche

Ciclo XXXVIII

**SVILUPPO DI UN ALIMENTO INNOVATIVO
(SNACK DI SOCCORSO) IN FORMATO CHIPS
A BASE DI PATE' DI OLIVE AD ELEVATO
POTENZIALE NUTRACEUTICO E
PROBIOTICO**

Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche

Settore scientifico/disciplinare CHIM07/a

Dottoranda

Dott.ssa Martina Bacceli



Coordinatrice

Prof.ssa Assunta Pandolfi

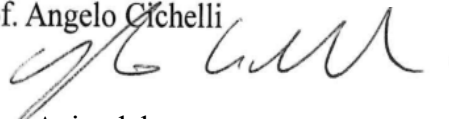


Tutor Accademico

Prof. Adriano Mollica



Prof. Angelo Cicchelli



Tutor Aziendale

Dott.ssa Barbara Lanza



Anni accademici 2022/23 – 2025/26

INDICE

Abstract	p. 1
Introduzione	p. 3
Capitolo 1 – Stato dell’arte: olive e pat�	p. 8
1.1 L’olivo come protagonista della Dieta Mediterranea e i suoi prodotti	p. 9
1.2 La deamarizzazione delle olive da tavola	p. 14
1.3 Il pat� di olive	p. 16
1.4 Il pat� DMF	p. 17
Bibliografia - Capitolo 1	p. 20
Capitolo 2 – Test di fermentazione spontanea e controllata nella produzione industriale di olive da tavola	p. 23
2.1 Introduzione	p. 24
2.2 Materiali e metodi	p. 25
2.2.1 Prova sperimentale	p. 25
2.2.2 Determinazioni analitiche	p. 28
2.2.3 Analisi statistiche	p. 29
2.3 Risultati	p. 30
2.3.1 Parametri chimico-fisici	p. 30
2.3.2 Analisi microbiologica	p. 36
2.3.3 Contenuto fenolico	p. 38
2.4 Discussione e conclusioni	p. 41
Bibliografia - Capitolo 2	p. 50
Capitolo 3 – Nuovo terreno di coltura ottenuto da pat� DMF	p. 53
3.1 Introduzione	p. 54
3.2 Materiali e metodi	p. 56
3.2.1 Campionamento del pat� di olive	p. 56
3.2.2 Caratterizzazione del pat� fresco DMF	p. 57
3.3 Risultati	p. 65
3.4 Discussione	p. 73
3.5 Conclusioni	p. 76
Bibliografia - Capitolo 3	p. 78
Capitolo 4 – Caratterizzazione del pat� di olive	p. 83
4.1 Introduzione	p. 84
4.2 Materiali e metodi	p. 85
4.2.1 Sviluppo del lessico sensoriale	p. 85

4.2.2 Panel di assaggiatori	p. 86
4.2.3 Selezione dei campioni	p. 86
4.2.4 Processo di valutazione	p. 86
4.2.5 Selezione e convalida dei descrittori	p. 87
4.2.6 Creazione di una scheda di profilo specifica	p. 92
4.2.7 Formazione dei membri del panel	p. 92
4.3 Studio sperimentale	p. 93
4.3.1 Campionamento	p. 93
4.3.2 Analisi sensoriale	p. 93
4.3.3 Analisi della texture	p. 97
4.3.4 Analisi statistica dei dati	p. 100
4.4 Risultati	p. 100
4.5 Discussione	p. 106
4.6 Conclusioni sulla scheda di profilo	p. 110
4.7 Prova di applicazione del nuovo foglio di profilo	p. 110
Bibliografia - Capitolo 4	p. 114
Capitolo 5 – Realizzazione del prodotto innovativo (snack di soccorso)	p. 118
5.1 Introduzione	p. 119
5.2 Materiali e metodi	p. 121
5.2.1 Biofenoli del pat� di olive	p. 121
5.2.2 Scelta dello snack	p. 123
5.2.3 Screening delle formulazioni	p. 125
5.2.4 Realizzazione del foglio di profilo sensoriale	p. 128
5.2.5 Analisi texturale	p. 129
5.2.6 Scelta dei pat�	p. 130
5.2.7 Analisi nutrizionale	p. 130
5.2.8 Analisi statistica	p. 130
5.3 Risultati	p. 131
5.3.1 Caratteristiche nutrizionali del pat� e delle pizzelle	p. 131
5.3.2 Foglio di profilo sensoriale	p. 136
5.3.3 Analisi sensoriale	p. 140
5.3.4 Analisi texturale	p. 143
5.4 Discussione e conclusioni	p. 148
Bibliografia- Capitolo 5	p. 155
Capitolo 6 - Conclusioni generali	p. 160

*A mamma e papà,
inesauribili radici di nutrimento*

Abstract

La tesi affronta la valorizzazione delle olive da tavola e dei sottoprodotti da esse ottenuti attraverso un percorso di ricerca che integra aspetti tecnologici, microbiologici, nutraceutici e sensoriali. L'obiettivo finale è sviluppare un alimento innovativo ad elevato valore funzionale utilizzando paté di olive deamarizzato come ingrediente principale.

Dopo una revisione dello stato dell'arte sulle olive da tavola, sui processi di deamarizzazione e sui sottoprodotti dell'industria olearia, la prima fase è stata lo studio di fermentazioni spontanee e guidate di olive da tavola in condizioni industriali mediante l'impiego di starter selezionati di *Lactiplantibacillus plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*. I risultati hanno evidenziato la possibilità di controllare il processo fermentativo, migliorando la qualità del prodotto e riducendo i rischi tecnologici.

La seconda fase ha interessato i sottoprodotti dell'industria olearia in particolare il paté di olive (paté DMF) costituito principalmente da polpa e acqua di vegetazione, da cui è stato sviluppato un nuovo terreno di coltura (Olive Juice Broth) utilizzato per selezionare ceppi batterici capaci di tollerare e degradare i composti fenolici responsabili dell'amaro. Questa fase ha consentito di identificare ceppi batterici promettenti per applicazioni nella produzione di olive da tavola.

Il paté di oliva è stato caratterizzato inoltre da un punto di vista chimico-fisico e sensoriale. A tal proposito sono stati sviluppati e validati sia un lessico sensoriale che una scheda di profilo specifici per l'analisi. I risultati sono stati supportati da valutazioni fisiche e nutrizionali del prodotto.

La fase finale del progetto ha previsto lo sviluppo dell'alimento funzionale innovativo a base di paté di olive supportato dai risultati ottenuti precedentemente e caratterizzato da un buon profilo sensoriale ed ottimo valore nutrizionale e nutraceutico con potenziali effetti benefici per la salute.

La tesi e i risultati ottenuti dimostrano il potenziale dei sottoprodotti dell'industria olearia per lo sviluppo e selezione di starter batterici funzionali e per la produzione di alimenti funzionali in ottica di economia circolare.

This doctoral thesis focuses on the valorization of table olives and their by-products through a research pathway integrating technological, microbiological, nutraceutical, and sensory aspects. The ultimate objective was to develop an innovative functional food using debittered olive pâté as the main ingredient.

Following a comprehensive review of the current state of the art on table olives, debittering processes, and olive oil industry by-products, the first phase of the research investigated spontaneous and controlled fermentations of table olives under industrial conditions using selected starter cultures of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. The results demonstrated that the fermentation process can be effectively controlled, leading to improved product quality while reducing technological risks.

The second phase focused on olive oil industry by-products, particularly olive pâté (DMF pâté), consisting mainly of olive pulp and vegetation water. From this substrate, a novel culture medium, named Olive Juice Broth (OJB), was developed and used to select bacterial strains capable of tolerating and degrading the phenolic compounds responsible for bitterness. This approach enabled the identification of promising bacterial strains with potential applications in table olive production.

The olive pâté was also characterized from both physicochemical and sensory perspectives. For this purpose, a specific sensory lexicon and a dedicated sensory profile sheet were developed and validated. The sensory findings were supported by physicochemical and nutritional analyses of the product.

The final stage of the project involved the development of an innovative functional food based on olive pâté, building on the results obtained in the previous phases. The final formulation exhibited a favorable sensory profile together with excellent nutritional and nutraceutical properties, suggesting potential health-promoting effects.

Overall, the findings of this thesis demonstrate the considerable potential of olive oil industry by-products both for the development and selection of functional bacterial starter cultures and for the production of innovative functional foods, in accordance with the principles of the circular economy.

INTRODUZIONE

Introduzione

Questo progetto di Dottorato nasce da una collaborazione dell'Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti- Pescara (coordinatori i Proff.ri Adriano Mollica e Angelo Cichelli) con l'ente CREA (Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria), che ha finanziato la borsa. La mia attività di ricerca si è svolta presso la sede del CREA-IT (centro di Ingegneria e Trasformazioni agro-alimentari) di Pescara, sotto la supervisione e la guida del Primo Ricercatore, la dott.ssa Barbara Lanza, che ricopre l'incarico di esperto MASAF (Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle Foreste) e del COI (Consiglio Oleicolo Internazionale) in materia di analisi organolettica, composizione nutrizionale e norme sulle olive da tavola.

Questo progetto di Dottorato è nato, oltre che da valutazioni tecnico-scientifiche, anche da considerazioni di carattere sociale sollecitate da eventi di stringente attualità.

Tali eventi hanno tutti come effetto l'aumento inusitato dei flussi migratori: i conflitti bellici che si sono accesi in questi ultimi anni generano ondate di profughi sempre più massicce; il cambiamento climatico si rende sempre più evidente e aumenta la pressione demografica verso i paesi sviluppati; il carico demografico del pianeta, che ha raggiunto gli 8 miliardi di esseri umani, provoca una pressione sulle risorse alimentari che spinge intere popolazioni a cercare nuove opportunità di sopravvivenza in luoghi lontani da quelli nativi. Sembra quindi ritornare in auge quella "trappola malthusiana" che la rivoluzione industriale aveva superato.

Com'è noto, Malthus aveva teorizzato l'impossibilità di un miglioramento persistente delle condizioni di vita del genere umano a causa del diverso ritmo di accrescimento della popolazione e delle risorse alimentari. Mentre la popolazione, infatti, secondo Malthus, cresce secondo una progressione geometrica, le risorse alimentari seguono una traiettoria dettata dalla progressione aritmetica. Di conseguenza, il divario progressivo che si genera tra i due fenomeni impedisce il superamento della scarsità delle risorse che rende la vita dell'umanità circoscritta alla mera sopravvivenza. La rivoluzione industriale, come detto, ha dato l'impressione che la "trappola malthusiana" fosse stata superata per sempre ma gli avvenimenti a cui abbiamo fatto riferimento, dall'inizio del nuovo millen-

nio, sembrano aver riproposto la triste previsione dell'economista inglese.

Tale tesi di dottorato si inserisce in questa problematica sociale: la messa a punto di nuovi formulati alimentari, specialmente quelli derivanti da nuove fonti, rappresenta una priorità del XXI secolo per il genere umano. Solo individuando nuove utilizzazioni delle risorse alimentari sarà possibile fare fronte all'enorme crescita della popolazione mondiale che, insieme alle altre cause sopra menzionate, è all'origine dei consistenti e crescenti flussi migratori che generano tensioni nelle comunità locali, sia di arrivo sia di partenza.

Nel caso specifico, lavorando da anni nel campo delle olive da tavola e dei suoi derivati, è stato sviluppato il prototipo di un alimento innovativo, con un alto contenuto di paté di olive debitamente deamarizzato. Il paté da utilizzare può essere rappresentato sia da paté prodotto da olive già deamarizzate, come commercialmente inteso, sia da un sottoprodotto dell'industria olearia che viene denominato "paté DMF", derivante da una moderna tecnologia (Decanter MultiFase, Leopard, Pieralisi) che ricorre all'estrazione in due fasi riducendo i consumi di acqua. Tale "paté" in realtà consiste di una miscela di pasta fresca di olive finemente macinata assieme ad acqua di vegetazione praticamente priva di residui di nocciolino e con altissimo contenuto fenolico (nell'ordine del 70%).

Al fine di scegliere la materia prima maggiormente performante dal punto di vista organolettico, della consistenza e del potere nutraceutico e probiotico, è stato necessario conoscere la matrice di partenza (paté di olive e paté dmf) a più livelli.

Inizialmente sono state condotte prove sperimentali sulle olive da tavola allo scopo di approfondire i processi di deamarizzazione che si verificano in ambito industriale, invece che su scala di laboratorio, di cui esiste ampia documentazione in letteratura. Sono stati, quindi, seguiti i processi di fermentazione in lotti all'interno di un impianto industriale, testando sia i processi spontanei che quelli guidati. Lo starter selezionato era in rapporto di 1:1 tra il ceppo *Lactiplantibacillus plantarum* B1 e il ceppo *Saccharomyces cerevisiae* SC24 (10^8 CFU/mL). Sono stati analizzati i parametri chimico-fisici, microbiologici e fenolici di cinque diversi fusti, con un campionamento periodico (sette campionamenti). I risultati ottenuti hanno confermato correlazioni logiche tra i parametri chimico-fisici e hanno mostrato una buona discriminazione tra i campioni, specialmente per quanto riguarda il profilo fenolico dei diversi fusti. L'analisi microbiologica ha mostrato l'evoluzione dei microrganismi nei fusti, ma i risultati presentano un'interpretazione poco chiara. Non sono stati rilevati *Enterobacter*, pertanto è stato possibile

confermare la sicurezza sia del processo che del prodotto. La sperimentazione ha quindi dimostrato che ogni fusto è un ecosistema a sé stante e che è possibile “guidare” la fermentazione delle olive da tavola, ma ciò richiede molta esperienza e un monitoraggio costante di numerosi parametri. Questo comporta l’applicazione immediata di eventuali misure correttive in caso di alterazione dei parametri. I risultati evidenziano alcune criticità dei processi industriali e rappresentano dati utili per i tecnici e le strutture produttive al fine di migliorare la qualità del prodotto e ridurre al minimo le perdite.

È stato poi analizzato il paté DMF e caratterizzato a livello chimico-fisico, della sua composizione in acidi grassi e fenolica.

Successivamente, da questo paté si è ottenuto un nuovo terreno di coltura, l’Olive Juice Broth (OJB), che può essere impiegato per selezionare ceppi batterici in grado di sopravvivere e degradare le sostanze amare normalmente presenti nel frutto dell’olivo. Sono stati testati trentacinque diversi ceppi batterici di *Lactiplantibacillus plantarum* provenienti dalla Collezione di Microrganismi CREA-IT di Pescara. Sette ceppi caratterizzati da una crescita $\geq 50\%$ nell'OJB (B31, B137, B28, B39, B124, B130 e B51) hanno mostrato una degradazione del contenuto fenolico totale dell'OJB $\geq 30\%$. Da questo insieme, il ceppo *L. plantarum* B51 è stato selezionato come starter migliore per la produzione di olive da tavola rispetto alla fermentazione spontanea. L'inoculante selezionato ha ridotto efficacemente il tempo di deamarizzazione rispetto alla fermentazione spontanea. L'idrossitirosolo, derivato dalla degradazione dell'oleuropeina e del verbascoside, e il tirosolo, derivato dalla degradazione del ligstroside, sono stati prodotti più rapidamente rispetto alla fermentazione spontanea. Il mezzo OJB si è confermato utile nella selezione di ceppi batterici resistenti al complesso ambiente fenolico del frutto dell'olivo.

A questo punto, è stato caratterizzato il paté di olive, quale prodotto classicamente inteso in ambito commerciale, ottenuto da olive già deamarizzate, al fine di sviluppare e testare un lessico specifico e un innovativo foglio di profilo per l’analisi sensoriale del paté di olive, così da colmare la lacuna esistente. L'elenco dei descrittori è stato definito in termini di sensazioni negative, sensazioni olfattive/gustative e attributi cinestetici.

Il CREA-IT di Pescara è pioniere nell’analisi sensoriale delle olive da tavola e ospita un Comitato di assaggio di olive da tavola riconosciuto dal 2006 dal COI (Consiglio Oleicolo Internazionale) e dal MASAF (Ministero dell’Agricoltura, della Sovranità alimentare e delle Foreste), oltre ad un Panel di riferimento per oli di oliva vergini. L’ex-

pertise maturata nel settore ha fatto sì che si elaborasse un metodo valido per l'analisi sensoriale anche di un sottoprodotto delle olive e degli oli di oliva, quale il paté di olive, come commercialmente inteso. Gli assaggiatori esperti sono stati prima formati e poi hanno utilizzato la scheda di profilo per caratterizzare 40 campioni commerciali di paté di olive provenienti da cinque diverse cultivar di *Olea europaea* L.

Per supportare e verificare i descrittori cinestetici, è stata eseguita un'analisi texturale mediante strumento Texture Analyser. I risultati ottenuti hanno dimostrato la validità della scheda di profilo per valutare correttamente i diversi prodotti.

È stata poi testata mediante HPLC anche la componente fenolica dei paté di olive, al fine di proporre un possibile utilizzo anche per i paté di olive della stessa indicazione salutistica prevista per l'olio EVO, ovvero "I polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo".

Il valore soglia da eguagliare e/o superare (5 mg di idrossitiroso e prodotti correlati) è riferito a 20 g di olio EVO (Reg. UE 432/2012 e successive modifiche in materia di "health claims"). Dai risultati ottenuti è emerso che effettivamente tutti i paté testati potrebbero avvalersi dello stesso claim salutistico dell'olio EVO.

Infine, sono state condotte diverse prove sperimentali necessarie al raggiungimento dello scopo finale, ovvero la realizzazione di un prototipo di alimento innovativo in formato di snack, con un alto contenuto di paté di olive debitamente deamarizzato.

Dalle analisi condotte e per la difficoltà di reperire campioni di DMF, non molto diffuso come tecnologia di estrazione, le attività di ricerca si sono concentrate sui paté del commercio, trattandosi di una materia prima maggiormente performante dal punto di vista organolettico, della consistenza e del potere nutraceutico. Pertanto, sono state condotte prove di realizzazione del prodotto finito, rivolgendo le attenzioni ad un alimento tipico della tradizione abruzzese (*pizzella* o *ferratella*), seppur in versione dolce, modificandolo in versione salata con paté di olive al suo interno.

Da tale prova è emerso un nuovo alimento, estremamente valido sul piano nutrizionale e con grande potenziale nutraceutico.

Il seguente lavoro si compone, quindi, di cinque capitoli.

Nel primo viene descritto lo stato dell'arte in ambito di olive da tavola e paté di olive, sia del commercio sia ottenuti da decanter DMF.

Nel secondo viene descritta una prova di deamarizzazione di olive da tavola all'in-

terno di fusti in un contesto industriale, in modo da confrontare l'andamento dell'intero processo tra l'impiego di starters microbici e no.

Nel terzo capitolo viene riportata la prova effettuata sul paté DMF, inizialmente caratterizzato a livello chimico-fisico, della componente fenolica e degli acidi grassi; questo è stato poi impiegato per creare un nuovo terreno di coltura ricco di fenoli e utilizzato per lo screening di ceppi di batteri lattici in grado di degradare le sostanze amare da impiegare nella produzione di olive da tavola.

Nel quarto capitolo è stato invece studiato il paté del commercio, ottenuto da olive già deamarizzate, al fine di sviluppare un lessico specifico per descriverne le caratteristiche sensoriali e texturali. Dopo aver elaborato e validato la scheda di profilo sensoriale, è stato caratterizzato il prodotto sul piano del profilo fenolico.

Nel quinto capitolo viene illustrata la prova di realizzazione del prodotto innovativo vero e proprio, a base di paté di olive.

I cinque capitoli non rappresentano studi indipendenti, ma costituiscono le fasi successive di un unico percorso sperimentale finalizzato alla progettazione di un alimento innovativo a base di paté di olive. Ciascuna attività è stata concepita per rispondere a una specifica esigenza scientifica e tecnologica che ha orientato la fase successiva della ricerca. In particolare, lo studio dei processi di deamarizzazione ha consentito di comprendere i meccanismi che influenzano la qualità della materia prima; la caratterizzazione del paté DMF e lo sviluppo del terreno Olive Juice Broth hanno permesso di selezionare ceppi microbici utili al miglioramento del processo produttivo; la definizione di un metodo di caratterizzazione sensoriale e nutraceutica del paté ha fornito gli strumenti necessari per la scelta della materia prima più idonea; infine, tutte le conoscenze acquisite sono confluite nella realizzazione dello snack di soccorso, sintesi applicativa dell'intero progetto di ricerca.

CAPITOLO 1

Stato dell'arte: olive e paté

1. Stato dell'arte: olive e pat 

1.1. L'olivo come protagonista della Dieta Mediterranea e i suoi prodotti

L'olivo   una pianta funzionale nel sistema agricolo di molti paesi e ha acquisito nei secoli un'ampia importanza socioeconomica. Grazie alle sue caratteristiche di adattabilit  e longevit , esso riveste un ruolo preponderante come elemento distintivo del territorio e come coltivazione in grado di crescere anche su suoli aridi e in condizioni climatiche difficili.

L'olivo rappresenta una risorsa sociale ed economica per qualsiasi ambiente; infatti, protegge il paesaggio e aiuta a prevenire l'esodo dalle campagne, oltre ad essere una preziosa fonte di cibi salutari quali l'olio d'oliva e le olive da tavola. La rilevanza dell'olivo  , quindi, il risultato di una combinazione di fattori che gli ha garantito la diffusione in tutto il mondo [1].

L'olivo entra cos  a pieno titolo nella dieta mediterranea, con tutti i suoi prodotti e sottoprodotti. Esso   infatti il protagonista indiscusso della definizione del concetto di "dieta mediterranea", termine generico che si riferisce in particolare ai modelli dietetici riscontrabili nelle aree del Mediterraneo in cui cresce l'olivo [2].

L'ormai noto modello alimentare della dieta mediterranea   stato proposto per primo dall'epidemiologo e fisiologo statunitense Ancel Keys negli anni '60 del Novecento dopo un attento studio dello stile di vita e delle abitudini alimentari delle popolazioni del bacino del Mediterraneo; tale pattern   conosciuto in tutto il mondo per le sue capacit  preventive nei confronti delle patologie croniche, come l'ipertensione, il diabete, l'aterosclerosi, il cancro, oltre che verso sovrappeso e obesit . Un recente campo di ricerca ha, inoltre, mostrato che una pi  alta aderenza alla dieta mediterranea   associata ad un pi  basso rischio di disordini mentali, compresi il declino cognitivo e la depressione [3].

La ricerca di Ancel Keys si bas  su tre evidenze fondamentali:

- l'aspettativa di vita adulta per le popolazioni di queste aree era tra le pi  elevate del mondo e le percentuali di malattie cardio-vascolari, di alcuni tipi di cancro e di alcune malattie croniche correlate alla dieta erano tra le pi  basse nel mondo all'inizio degli anni '60, nonostante i limitati servizi medici a disposizione;

- i dati sulla disponibilità di cibo e sull'assunzione alimentare nella regione del Mediterraneo descrivevano modelli dietetici aventi caratteristiche comuni tra loro;
- i modelli dietetici, condividendo molte di queste caratteristiche comuni, sono stati associati a bassi tassi di malattie croniche ed elevata aspettativa di vita adulta in molti studi epidemiologici condotti in tutto il mondo.

Dall'osservazione degli introiti alimentari e delle frequenze di assunzione, è nata la “piramide della dieta mediterranea” per comunicare il senso generale delle relative proporzioni e della frequenza di consumo dei cibi e dei gruppi alimentari che contribuiscono a questo modello dietetico nel suo complesso. La piramide è destinata a fornire un'impressione generale delle scelte alimentari salutari piuttosto che a definire pesi e misure raccomandati per determinati alimenti o quantità di energia ottenibile da questi. Nella piramide vengono indicate le relative frequenze, che sono intenzionalmente non specifiche perché uno stato di buona salute è stato associato ad una considerevole variabilità all'interno del modello generale. La piramide è stata disegnata come una guida dietetica per la popolazione adulta e può essere necessario apportare modifiche per bambini, donne gravide e altri gruppi speciali della popolazione [2].

La tradizionale dieta mediterranea si caratterizza per un abbondante consumo di cibi vegetali, come pane, pasta, riso, verdura, frutta e semi; la fonte principale di grassi è rappresentata dall'olio di oliva e l'assunzione di pesce, pollame, uova e prodotti lattiero-caseari è moderata. Molti di questi alimenti sono componenti funzionali aventi aspetti positivi sulla salute e sul benessere, responsabili dei vantaggi associati alla dieta [4].

Dall'immagine in fig. 1.1 si può notare la presenza centrale dell'olio di oliva, guadagnata meritatamente grazie al suo elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi, al bassissimo contenuto di grassi saturi e alla presenza di antiossidanti come la vitamina E, elementi che lo rendono preferibile rispetto agli altri grassi.



Fig. 1.1. - Piramide della dieta mediterranea: un modello culturale per una sana alimentazione [2- Immagine tratta dal sito dell'Istituto Superiore di Sanità].

I molteplici effetti benefici dell'olio di oliva e, di conseguenza, anche delle olive da tavola sono riportati in figura 1.2. Come si può osservare, questi spaziano dalle proprietà antitumorali alla capacità di ridurre la pressione arteriosa, dalla prevenzione e dal trattamento del diabete agli effetti favorevoli sull'osteoporosi, dalle proprietà antiinfiammatorie a quelle antimicrobiche, dalla modulazione del metabolismo lipidico alla prevenzione dello stress ossidativo [5].



Fig. 1.2. - Schema degli effetti benefici e salutari dell'olio di oliva all'interno della dieta mediterranea [immagine tradotta in italiano, tratta da 5]

I composti fenolici, normalmente conosciuti come polifenoli, sono tra i principali responsabili dei benefici offerti dall'adesione alla dieta mediterranea. Come è noto, i composti fenolici giocano un ruolo importante nell'attività antiossidante e sono direttamente collegati sia al valore nutrizionale che al caratteristico gusto dell'olio [6]. Un'assunzione continua e prolungata di polifenoli si correla, infatti, con una riduzione della pressione sanguigna e dell'adiposità, con il miglioramento del profilo lipidico e con effetti antiinfiammatori, tutti aspetti che contribuiscono alla prevenzione delle malattie cardio-vascolari.

L'elevato contenuto polifenolico delle olive e dell'olio di oliva rende tali alimenti basilari nel modello dietetico mediterraneo.

Il contenuto in fenoli delle olive è molto maggiore rispetto a quello presente nell'olio extravergine di oliva; ciò è dovuto al fatto che la maggior parte dei fenoli, essendo di natura idrofila, viene eliminata durante la fase di separazione delle acque di vegetazione.

Al contrario, le olive da tavola ne conservano un notevole quantitativo anche dopo il processo di deamarizzazione; tale peculiarità permette al consumatore di beneficiare maggiormente della loro attività antiossidante.

Le olive da tavola, così, assumono il ruolo di “alimenti funzionali”. Considerando la definizione di “alimenti funzionali”, ovvero tutti i cibi che posseggano un determinato quantitativo di sostanze ad alto valore nutrizionale/nutraceutico, appare chiaro come le olive da tavola possano, a ragione, essere definite in tal modo. A tal proposito, vanno dapprima considerate la varietà di biofenoli (oltre 30 composti differenti) e il loro elevato contenuto all'interno delle olive, in quanto questi sono dotati di attività antiossidante e di capacità di “radical scavenging” e sono presenti in quantitativi compresi tra i 100 e i 350 mg/100g di parte edibile.

A questo contenuto già di per sé così importante vanno aggiunte altre caratteristiche peculiari, quali i diversi rapporti tra acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e saturi (SFA) che oscillano in un range compreso tra 3.3 e 6.8, così come il rapporto tra omega-6 e omega-3, in rapporto variabile tra 6.7 e 23.5. Questi parametri sono utilizzati per determinare la qualità nutrizionale della frazione lipidica in quegli alimenti che forniscono un'influenza di tipo regolatorio su certi markers trombogenici e/o fibrinolitici durante lo stato post-prandiale di soggetti sani; pertanto, le olive da tavola hanno tutti i requisiti per poter essere annoverate tra questi. Tali parametri sono insiti nella “natura” del frutto e i processi di lavorazione incidono solo marginalmente sul loro contenuto e sul valore nutraceutico.

Tuttavia, altre caratteristiche interessanti dal punto di vista nutrizionale vengono aggiunte dai metodi di lavorazione, come ad esempio un arricchimento in microelementi quali Fe, Mn, Cu, Zn [7].

Inoltre, dal punto di vista microbiologico, con il consumo di olive da tavola vengono naturalmente assunti anche una parte dei microorganismi impiegati per i processi di deamarizzazione, alcuni dei quali hanno dimostrato potenziali attività benefiche, di tipo probiotico: in particolare, ci si riferisce ad alcuni ceppi di *Lactiplantibacillus* spp. (ex *Lactobacillus plantarum* spp.).

1.2. La deamarizzazione delle olive da tavola

Il trattamento di deamarizzazione cui devono essere sottoposte le olive appena raccolte prima di essere consumate permette di eliminare o ridurre la presenza di polifenoli, in particolare dell'oleuropeina, responsabili del gusto amaro della drupa.

L'oleuropeina è un glucoside formato da un estere dell'acido elenolico e dell'idrossitirosolo; può essere idrolizzata in condizioni alcaline (deamarizzazione chimica) o da enzimi come la β -glucosidasi (metodo biologico).

La deamarizzazione chimica viene impiegata per la lavorazione delle olive secondo il metodo "sivigliano" (o spagnolo) e consiste nell'utilizzo di idrossido di sodio, che permette l'eliminazione della maggior parte dei glucosidi oleuropeinolitici. In base al risultato finale desiderato variano durata e intensità del processo.

L'idrolisi dell'oleuropeina causata dall'idrossido di sodio determina la produzione di un residuo zuccherino quale il glucosio e l'aglicone corrispondente costituito da idrossitirosolo e acido elenoico (Fig. 1.3).

Nel metodo "sivigliano" si lascia penetrare la soluzione alcalina (alla concentrazione di 1.2-2.5/2.8% peso/volume) a una profondità di $\frac{2}{3}$ o $\frac{3}{4}$ di oliva, in modo che non raggiunga il nocciolo. Si può usare la soda anche a concentrazioni maggiori, fino al 3.5%, dipendentemente dalla temperatura e dalle dimensioni della drupa. Tale passaggio richiede un tempo variabile tra le 5 e 7 ore in base alla grandezza delle olive, ma in alcuni casi può anche superare le 10 ore; per trattamenti prolungati è bene ricorrere a soluzioni alcaline più diluite per non alterare la struttura della polpa, che comporterebbe una riduzione anche del materiale fermentescibile. Pertanto, si mostra necessario sottoporre le olive a preventiva calibratura; talvolta, prima della deamarizzazione chimica, le olive devono anche essere lasciate ferme per 1-2 giorni, in modo che si eviti il difetto di "peeling" ("pelatura"), caratterizzato dal distacco dell'epidermide della drupa. Tale difetto può essere prevenuto anche tramite il mantenimento di una temperatura controllata di 18-20 °C, che non è semplice ottenere nelle zone tipiche di produzione; perciò, si ricorre all'impiego di vasche interrate.

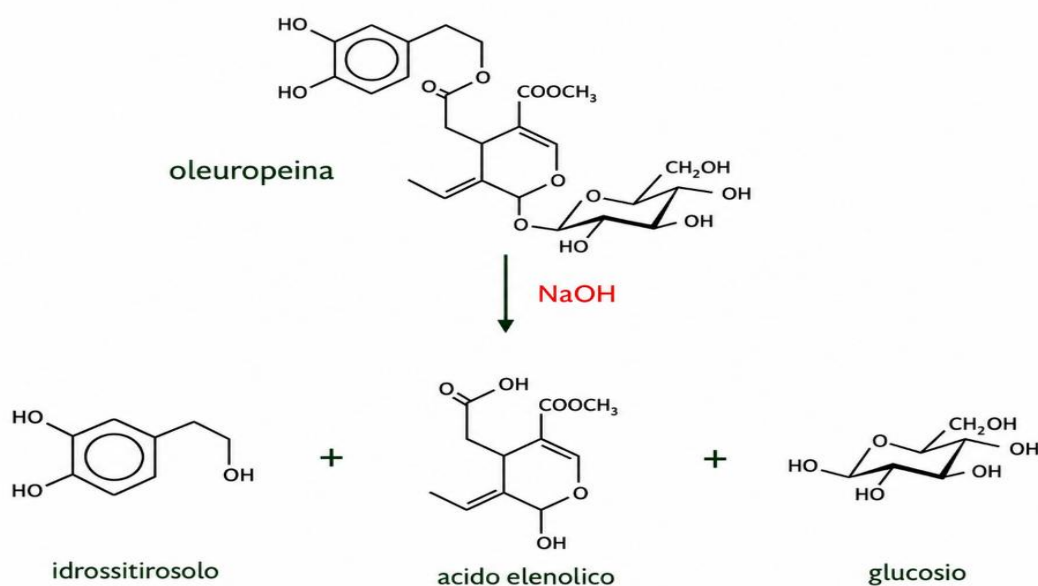


Fig. 1.3. Schema del procedimento della deamarizzazione chimica.

La deamarizzazione biologica, invece, consiste in una riduzione delle sostanze polifenoliche ottenuta grazie a un processo di diffusione di tali sostanze dall'oliva alla salamoia nella quale vengono poste.

Si tratta ovviamente di un processo molto più lungo, che termina quando si raggiunge un equilibrio tra la fase liquida (salamoia) e la fase solida (le olive). Questo ha dunque una durata di diversi mesi, variabile in base alle caratteristiche della cultivar trattata, quali la permeabilità della cuticola, la consistenza della polpa e le dimensioni dell'oliva, la forza della salamoia, la temperatura, il rapporto massa di olive/volume di salamoia.

Il risultato finale non è mai paragonabile a quello ottenuto dalla deamarizzazione chimica, dal momento che un certo sapore amaro ("bitter") permane nel prodotto finito ed è spesso molto apprezzato dal consumatore.

All'interno della salamoia l'oleuropeina subisce idrolisi dovuta all'azione combinata dell'acidità derivante dalla fermentazione lattica unitamente a quella della β -glucosidasi, enzima prodotto da microorganismi, tra i quali, in particolare, il *Lactiplantibacillus plantarum*. Tale enzima è in grado di scindere l'oleuropeina in glucosio, utilizzato dal batterio per la propria attività, e aglicone avente azione inibente sugli stessi batteri lattici; l'aglicone viene poi attaccato dall'esterasi, che lo scinde in acido elenolico e idrossitiro-

solo (fig. 1.4).

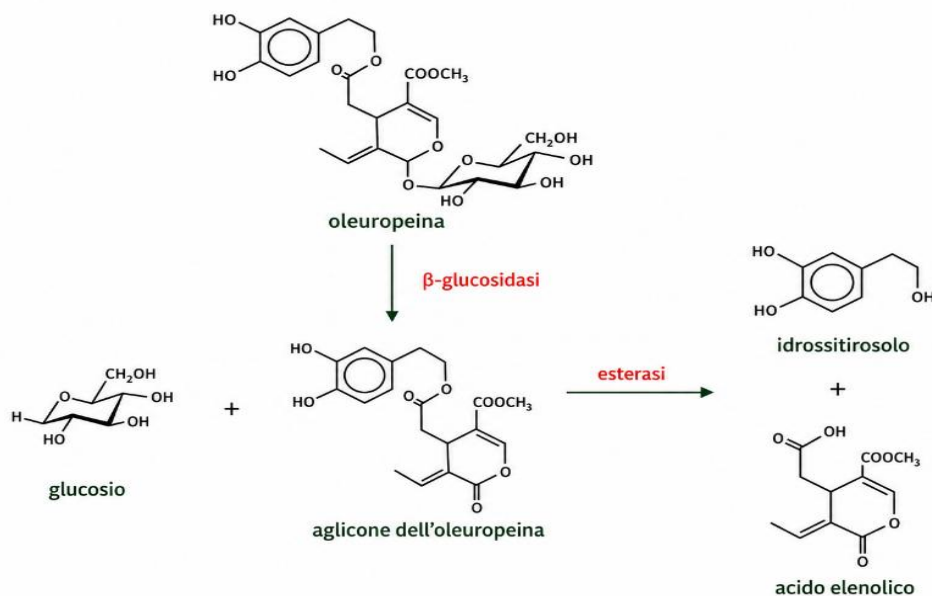


Fig. 1.4. – Schema del procedimento di deamarizzazione biologica

Utilizzando alcuni ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* come starter di fermentazione, mediante l'applicazione di corrette pratiche di processo, si possono migliorare i tempi di trasformazione e le caratteristiche del prodotto finale.

Recenti studi evidenziano come sia possibile migliorare la qualità delle olive e ridurre i tempi di deamarizzazione pilotando la fermentazione con l'inoculo di colture selezionate di microrganismi nella salamoia. Infatti, la degradazione dei glucosidi secoiridoidi è risultata essere, in lab-scale, molto più rapida nelle giare inoculate rispetto alla giara in cui è avvenuta la fermentazione spontanea [7].

1.3. Il paté di olive

Il paté di olive rappresenta un prodotto gastronomico di crescente interesse per i consumatori data la sua grande versatilità in cucina, seppure ancora non largamente diffuso in paesi al di fuori dell'area mediterranea. 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.

Si tratta di prodotti commerciali ottenuti da olive precedentemente deamarizzate, che vengono denocciolate e tritate a bassa temperatura, in alcuni casi addizionate di

spezie per poi aggiungere olio EVO in quantità variabili (10-20%).

Essendo le olive alimenti con elevato potere nutraceutico e antiossidante [8], anche i paté che ne derivano ne assumono verosimilmente gli stessi effetti benefici per la salute umana. Recenti studi ne hanno valutato il suo potenziale nutraceutico anche in formulazione rinforzata, mediante aggiunta di acqua di vegetazione [9].

Inoltre, non richiedendo l'impiego di particolari tecnologie di produzione, realizzarli è semplice e perciò sono sempre più diffusi in commercio. Ciò rende necessario conoscerne le preferenze dei consumatori sulle caratteristiche reologiche e cinestetiche, essendo alimenti con composizione estremamente variabile per cultivar, stadio di maturazione delle olive alla raccolta e metodo di lavorazione dei frutti che lo compongono.

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 [10]. Le proprietà texturali rappresentano, quindi, veri e propri fattori critici nel determinare la percezione della qualità di un alimento.

1.4. Il paté DMF

La sansa è il sottoprodotto solido ottenuto dall'estrazione meccanica dell'olio d'oliva vergine. Attualmente in Italia, la sansa ottenuta dal sistema a pressione è utilizzata quasi esclusivamente per il recupero del residuo di olio, mentre non ci sono grandi richieste dai sansifici di sansa ottenuta dal sistema continuo di centrifugazione e, in particolare, da quello derivante dal decanter a 2 fasi [11].

La composizione della sansa è variabile e dipende principalmente dal sistema di estrazione adottato, oltre che dalla varietà e dal grado di maturazione del frutto. Attualmente rappresenta più un problema che una risorsa per il frantoio a causa della presenza di grandi quantità di polifenoli e nocciolo (o seme) e, quindi, lignina.

Per ottenere una sansa senza nocciolo, esistono fondamentalmente tre alternative ai processi classici: (a) separazione del nocciolo a monte dell'impianto; (b) separazione del nocciolo a valle dell'impianto; e (c) separazione del nocciolo con de-

canter multifase.

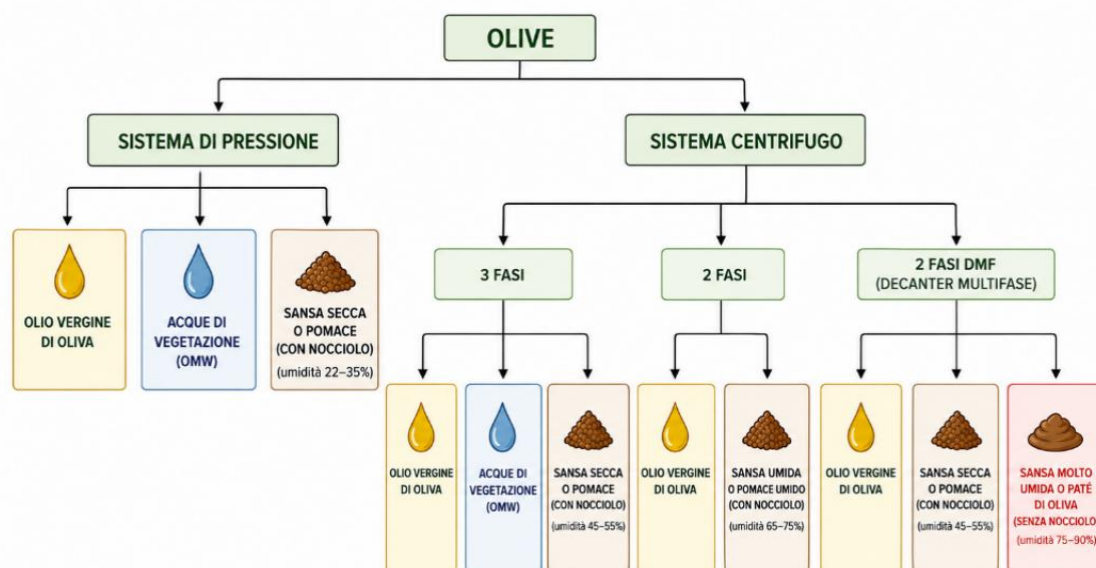


Fig. 1.5. Schema della produzione di sansa di oliva. OMW = acque reflue del frantoio [rielaborazione tratta da pubblicazione di cui sono co-autore: “Olive Pâté by Multi-Phase Decanter as Potential Source of Bioactive Compounds of Both Nutraceutical and Anticancer Effects”. *Molecules* 2020, Volume 25, Issue 24, 5967].

Il denocciolatore da utilizzare a monte dell’impianto ha la funzione di denocciolare continuamente le olive ottenendo il nocciolo intero come sottoprodotto e la sola polpa da cui estrarre l’olio (olio denocciolato e sansa senza nocciolo).

La tecnica di denocciolatura produce oli con un numero inferiore di perossidi e una maggiore resistenza forzata all’ossidazione, rispetto agli oli ottenuti da pasta integrale; l’assenza di frammenti e di nocciolino porta a una riduzione dei fenomeni lipolitici e ossidativi con un miglioramento consistente della shelf life del prodotto finito.

Alcuni frantoi hanno provato a separare a valle la sansa umida nelle sue due frazioni (nocciolo e fibra) con una macchina separatrice di noccioli, al fine di utilizzare il nocciolo come combustibile. In particolare, il maggior rendimento si ottiene quando le olive vengono lavorate con un decanter a 2 fasi perché si produce una sansa molto umida (umidità > 60%) che favorisce una maggiore efficienza della macchina separatrice e un conseguente maggiore recupero di nocciolo.

Le macchine in commercio possono lavorare circa 80–200 quintali/ora in due o

tre fasi. La differenza sostanziale tra questi due metodi potrebbe essere dovuta all'umidità della sansa (con nocciolo): nel caso della lavorazione a due fasi, infatti, l'umidità può variare dal 65% al 75%, mentre nel caso della lavorazione a tre fasi, invece, la sansa è più secca con un'umidità stimata intorno al 45–55% (sansa essiccata).

Una novità nel sistema di estrazione a due fasi è rappresentata dai decanter multi-fase (DMF) che lavorano senza aggiunta di acqua di processo e con il vantaggio di recuperare una sansa essiccata simile a quella proveniente dalle tre fasi (45–55% di umidità) da utilizzare come combustibile per stufe e caldaie e un sottoprodotto, chiamato “patè”, costituito dalla polpa e dalla sua acqua di vegetazione, senza tracce di nocciolino [12].

Tale patè ha un alto contenuto di sostanza organica, un buon contenuto di fibra e proteina grezza e un basso contenuto di lignina, paragonabile alla sansa ottenuta da olive denocciolate.

Ha, inoltre, un elevato contenuto di composti fenolici rappresentati principalmente da secoiridoidi a basso, medio e alto peso molecolare [12, 13, 14], e un residuo di grasso (3–6%) la cui composizione acidica è simile a quella di un olio extra vergine di oliva [14,15]. Inoltre, presenta un'elevata umidità, in media tra il 75 e il 90%.

Si dimostra quindi un prodotto ad alto valore aggiunto per il frantoio, potendo essere riutilizzato in modo competitivo in diversi settori: agronomico (come fertilizzante del suolo), zootecnico (come integratore nell'alimentazione di bovini e ovini, arricchisce latte e derivati di acidi grassi polinsaturi e antiossidanti polifenoli), energia (come biomassa per impianti a biogas).

Le sue principali proprietà sono state riportate in molti studi che hanno evidenziato le sue attività biologiche. In particolare, i loro effetti sulla salute umana sono antinfiammatori, anti-iperglicemici, epatoprotettivi, cardioprotettivi, antimicrobici e anticancro [16, 17,18]. Studi recenti [19] suggeriscono che i principali biofenoli presenti nei prodotti e sottoprodotti dell'olivo possano essere utilizzati come potenziale fonte sia di effetti antiossidanti che anticancro, e in particolare, nel cancro ovarico che è caratterizzato da un alto tasso di mortalità tra le neoplasie ginecologiche a livello mondiale.

Questo nuovo sottoprodotto del frantoio è anche potenzialmente adatto al consumo umano, ma, a causa del suo contenuto fenolico che gli conferisce un sapore amaro, senza alcun trattamento non è commestibile; quindi, questa pasta di olive necessita di trasformazione [13].

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1

- 1- Cimato A. e Attilio C. Worldwide diffusion and relevance of olive culture. In book: Olive Diseases and Disorders. Transworld Research NetWork. 2011. Schena L, Agosteo G.E., Cacciola S.O. Chapter 1.
- 2- Istituto Superiore di Sanità: <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/p/piramide-alimentare#la-piramide-alimentare-italiana>
- 3- Martini D. 2019. Health Benefits of Mediterranean Diet. *Nutrients*. 11, 1802.
- 4- Ortega R.M. 2006. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*. 9(8A), 1136–1140.
- 5- Jimenez-Lopez C., Carpena M., Lourenço-Lopes C., Gallardo-Gomez M., Lorenzo J.M., Barba F.J., Prieto M.A. and Simal-Gandara J. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil .2020. *Foods*. MDPI. 9, 1014.
- 6- Liberatore L., Procida G., D’Alessandro N., Cichelli A. 2001. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chemistry*. Vol. 73, 1: 119-124.
- 7- Lanza B., Di Marco S., Simone N., Di Marco C. and Gabriele F. 2020. Table Olives Fermented in Iodized Sea Salt Brines: Nutraceutical/Sensory Properties and Microbial Biodiversity. *Foods*. MDPI. 9, 301.
- 8- Rocha, J.; Borges, N.; Pinho, O. Table olives and health: a review, in: *Journal of Nutritional Science* 2020, 9, e57.
- 9- 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.
- 10- 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.

- 11- Di Serio, M.G.; Lanza, B.; Iannucci, E.; Russi, F.; Di Giovacchino, L. Valorization of wet olive pomace produced by 2 and 3-phases centrifugal decanter. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 2011, 88, 111–117.
- 12- Lozano-Sánchez, J.; Bendini, A.; Di Lecce, G.; Valli, E.; Toschi, T.; Segura-Carretero, A. Macro-and micro functional components of a spreadable olive by-product (pâté) generated by new concept of two-phase decanter. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017, 119, 1600096
- 13- Cecchi, L.; Bellumori, M.; Cipriani, C.; Mocali, A.; Innocenti, M.; Mulinacci, N.; Giovannelli, L. A two-phase olive mill by-product (pâté) as a convenient source of phenolic compound: Content, stability, and antiaging properties in cultured human fibroblast. *J. Funct. Foods* 2018, 40, 751–759, doi: 10.1016/j.jff.2017.12.018. 4.
- 14- Tufariello, M.; Durante, M.; Veneziani, G.; Taticchi, A.; Servili, M.; Bleve, G.; Mita, G. Pâté è olive cake: Possible exploitation of a by-product for food applications. *Front. Nutr.* 2019, 6, 3, doi:10.33.89/fnut2019.00003. 5.
- 15- Velasco, J.; Holgado, F.; Marquez-Ruiz, G.; Ruiz-Mendez, M.V. Concentrates of triterpenic acids obtained from crude olive pomace oils: Characterization and evaluation of their potential antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 2018, 98, 4837–4844, doi: 10.1002/jsfa.9012.
- 16- Rufino-Palomares, E.E.; Perez-Jimenez, A.; Reyez-Zurita, F.J.; Garcia-Salguero, L.; Mokhtari, K.; HerreraMerchan, A.; Medina, P.P.; Peragón, J.; Lupiáñez, J.A. Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic triterpenoids and some of their chemical derivatives. *Curr. Org. Chem.* 2015, 19, 919– 947, doi: 10.2174/1385272819666150119225952.
- 17- Mahmoud, A.E.; Fathy, S.A.; Ali, M.M.; Ezz, M.K.; Mohammed, A.T. Antioxidant and anticancer efficacy of therapeutic bioactive compounds from fermented olive waste. *Grasas Aceites* 2018, 69, e266. ISSN-L: 0017- 3495. <https://doi.org/10.3989/gya.0230181>.
- 18- Nunes, M.A.; Costa, A.S.G.; Bessada, S.; Santos, J.; Puga, H.; Alves, R.C.; Freitas, V.; Oliveira, M.B.P.P. Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Sci. Total Environ.* 2018, 644, 229–236, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.350.

- 19- Moscatello, C.; D'Amico, E.; Toniato, E.; Lanza, B.; Aceto, G.M. Effect of bio-compatible extracts of *Olea europaea* L. on ovarian cancer cells model. *J Biol Regul Homeost Agents* 2018, 32, 118.

CAPITOLO 2

**Test di fermentazione spontanea e controllata
nella produzione industriale di olive da tavola**

2. Test di fermentazione spontanea e controllata nella produzione industriale di olive da tavola¹

2.1. Introduzione

La prova descritta in questo capitolo è frutto dell'elaborazione dei dati del progetto DEAOLIVA (D.M. 93882/2017 and D.M. 35902/2019), finanziato dal MASAF (ex MiPAAF), di cui mi sono occupata nei primi 6 mesi del mio Dottorato.

Le olive, frutti dell'albero di *Olea europaea* L., hanno un alto contenuto di sostanze fenoliche. Queste sostanze le rendono non commestibili a causa del forte sapore amaro. Tuttavia, diventano pronte per il consumo dopo un adeguato processo di trasformazione. Una volta lavorate, le olive da tavola sono ampiamente utilizzate come stuzzichini o come ingredienti per ricette culinarie. Le olive da tavola sono l'alimento fermentato più conosciuto nell'area mediterranea e il loro consumo è in aumento di anno in anno in tutto il mondo, anche grazie alla popolarità della “dieta mediterranea”. Tuttavia, nonostante la loro diffusione, la produzione in alcuni casi è ancora artigianale [1, 2, 3].

I processi di deamarizzazione applicati alle olive da tavola sono numerosi e diversi, e ciascuno presenta caratteristiche specifiche volte a ottenere un prodotto altamente appetibile e apprezzato. I metodi più comuni di deamarizzazione sono quelli “al Castelvetro” e “al savigliano”, che utilizzano NaOH per l'idrolisi totale o parziale delle sostanze fenoliche, e quello “greco/naturale”, che sfrutta la microflora presente sull'epicarpo per l'idrolisi dei fenoli [1,4]. Tra i diversi metodi di deamarizzazione, quello che attira maggiormente l'attenzione della ricerca è il metodo “naturale”, poiché arricchisce le caratteristiche sensoriali del frutto originale.

Questo metodo, come spiegato nel capitolo 1, prevede l'immersione in sala-

¹ Capitolo ottenuto da rielaborazione di articolo di cui sono co-autore: Simone, N.; Di Loreto, G.; Bacceli, M.; Di Marco, S.; Cellini, M.; Vecchiotti, G.; Lanza, B. Spontaneous and Controlled Fermentation Tests in Industrial Table Olives Production. *Appl. Sci.* 2023, 13, 9455. <https://doi.org/10.3390/app13169455>

moia di NaCl dopo la raccolta, durante la quale le olive iniziano una fermentazione grazie alla microflora spontanea residente nell'epicarpo. La fermentazione dura solitamente diversi mesi (circa 7-8, o anche di più) [1,5,6]. Questi microrganismi eliminano l'amaro dalle olive idrolizzando i complessi glucosidici fenolici responsabili del sapore amaro (principalmente oleuropeina e ligstroside) in fenoli semplici (principalmente idrossitirosolo e tirosolo). In questo modo, arricchiscono il prodotto di sostanze aromatiche [7,8]. Questo processo di fermentazione è influenzato anche dalla concentrazione di NaCl nella salamoia, dal pH, dalla concentrazione acida, dalla temperatura e da altri fattori che possono influire positivamente o negativamente sul processo [9]. Inoltre, la diversità delle specie microbiche e fungine presenti sull'epicarpo fa sì che le fermentazioni “naturali” non siano mai identiche e, pertanto, questo metodo di preparazione rappresenta ancora una fonte di incertezza riguardo alle caratteristiche del prodotto finito [3].

Nel corso degli anni, sono stati condotti con successo diversi test sperimentali “su scala di laboratorio” con colture starter di microrganismi selezionati [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Tuttavia, dopo aver esaminato la letteratura, vi sono poche prove di dati ottenuti a livello industriale. Pertanto, è stato eseguito un test, di seguito riportato, su grandi quantità e nelle stesse condizioni operative dei processi commerciali/industriali al fine di monitorare l'andamento della fermentazione spontanea da un punto di vista chimico-fisico e microbiologico all'interno di un impianto industriale e di verificare l'efficacia di alcuni starters in una fermentazione guidata.

La scelta di effettuare prove “sul campo” è stata dettata dalla necessità di comprendere i processi comunemente adottati dai produttori commerciali e di monitorare l'andamento dei vari parametri che caratterizzano l'evoluzione del prodotto. Tale approccio mira ad aiutare le aziende ad ottenere un prodotto con caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali costanti e riproducibili e a prevenire l'insorgere di fermentazioni anomale.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1. Prova sperimentale

Le olive della varietà Leccino (calibro 17+) sono state fornite dalla ditta Ficacci Olive Co. (Castel Madama RM, Italia) come parte di un lotto destinato a diverse centinaia di fusti. L'azienda ha messo a disposizione di questa prova cinque fusti, ciascuno contenente circa 140 kg di olive e 80 kg di salamoia. I fusti sono stati selezionati in modo casuale dall'intero lotto. La salamoia iniziale all'interno dei fusti era composta dal 13% di NaCl in acqua potabile non sterilizzata. Questi fusti sono stati denominati N1, N2, G1, G2 e FUO, come elencato nella Tabella 2.1. N1, N2, G1 e G2 sono stati collocati all'interno di un capannone dell'azienda, mentre il fusto denominato FUO ha seguito tutti gli altri fusti del lotto di produzione ed è stato conservato all'aperto in un cortile esposto alle intemperie e a sbalzi di temperatura (Figura 2.1).

Tab. 2.1 Elenco dei codici dei fusti

Codice	Descrizione
N1	Fermentazione spontanea (replica 1)
N2	Fermentazione spontanea (replica 2)
G1	Fermentazione guidata (replica 1)
G2	Fermentazione guidata (replica 2)
FUO	Fermentazione spontanea (fusto sigillato)

I fusti N1 e N2 sono stati lasciati alla fermentazione spontanea grazie alla microflora epifitica naturale, mentre i fusti G1 e G2 sono stati inoculati con una miscela di *Lactiplantibacillus plantarum* (LAB) ceppo B1 derivato dalla collezione di microrganismi del CREA-IT di Pescara e *Saccharomyces cerevisiae*. L'inoculo era pari a 1×10^8 CFU/mL. La scelta del ceppo B1 come batterio lattico è stata effettuata dopo un'approfondita selezione dei vari ceppi presenti nella collezione [11]. La decisione di aggiungere un lievito all'inoculo, e in particolare *S. cerevisiae* SC24, è stata motivata dal noto ruolo potenziale di questo lievito nel proteggere la fermentazione dal deterioramento grazie alla sua attività killer [14,17,18]. Il fusto FUO è stato scelto a caso tra centinaia di fusti ed era identico a N1 e N2, tranne che per due differenze:

1. è stato tenuto sigillato fino alla fine del processo di fermentazione;
2. è rimasto collocato in uno spazio aperto insieme a tutti gli altri fusti.



Figura 2.1. Fusti di prova. Da sinistra: N1, N2, G1 e G2 situate all'interno di un capannone; a destra: il fusto FUO situato in un'area esterna.

I fusti N1, N2, G1 e G2 sono stati aperti periodicamente per prelevare campioni di olive e salamoia da analizzare per i parametri chimici e microbiologici, secondo il metodo suggerito da Bleve et al. [19]. Il fusto FUO è stato tenuto sigillato fino alla fine del processo di fermentazione (210 giorni).

Una volta verificato il corretto riempimento dei 4 fusti, è stata inserita una speciale grata interna in materiale polimerico per uso alimentare proprio sotto il coperchio, al fine di impedire alle olive di risalire fuori dalla salamoia, evitando così la formazione di una pellicola di lievito [20]. Infine, i fusti sono stati chiusi con l'apposito coperchio a vite. Dopo un periodo di condizionamento, fissato a 23 giorni, sono state effettuate le inoculazioni sui fusti G1 e G2 con un rapporto 1:1 di brodo YPD (Yeast-extract Peptone Dextrose).

Sono state effettuate visite periodiche allo stabilimento per prelevare campioni di salamoia e olive, avendo sempre cura di sostituire il contenuto prelevato con salamoia fresca, al fine di non lasciare eccessivi spazi vuoti nel fusto ed evitare l'azione ossidante dell'aria. Complessivamente, sono stati effettuati 7 campionamenti.

Il periodo di campionamento è stato scelto al fine di monitorare l'intero processo di fermentazione sia dal punto di vista microbiologico che chimico-fisico. La tempistica è stata scelta sulla base di altri studi [11,19], con alcune variazioni dovute a condizioni climatiche avverse e alla distanza di 200 km tra l'impianto e il laboratorio di ricerca.

Una frequenza di campionamento più elevata avrebbe potuto compromettere

il processo di fermentazione a causa dell'eccessiva manipolazione del contenuto dei fusti, mentre una frequenza di campionamento più bassa avrebbe potuto far perdere alcune variazioni importanti in uno o più parametri.

Per quanto riguarda le procedure operative utilizzate per prelevare le aliquote di olive e salamoia dei fusti oggetto dello studio, i ricercatori hanno seguito corrette pratiche igieniche (utilizzando guanti monouso, mascherine FFP2 e utensili puliti e disinfettati), come richiesto dalle norme e dalle linee guida HACCP.

È stata determinata la fine della fermentazione al 5° campionamento, sulla base dei parametri chimico-fisici analizzati.

Sono stati prelevati campioni anche dal fusto di olive lasciata sigillata e conservata all'aperto insieme al resto del lotto di produzione (FUO), al fine di valutare come si sarebbero normalmente svolti i processi di trasformazione (teoricamente come in N1 e N2), ma senza alcuna interferenza dovuta alle operazioni di campionamento. La stessa procedura è stata applicata anche in due campionamenti successivi durante la durata di conservazione, 3 e 6 mesi dopo la fine del processo di fermentazione. L'analisi dei parametri chimico-fisici e microbiologici delle olive in salamoia ben oltre il periodo "standard" di fermentazione ci ha permesso di valutare eventuali cambiamenti nella composizione chimica, nello sviluppo e nella crescita delle varie specie microbiche e nelle caratteristiche del prodotto finale.

2.2.2. Determinazioni analitiche

L'insieme completo delle analisi effettuate è riportato nella Tabella 2.2. Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato seguendo la metodologia descritta in [11,12].

Tabella 2.2. Determinazioni effettuate sulle olive e sulle salamoie di fermentazione.

	Olive fre- sche	Durante il processo	Fine del pro- cesso (FP)	Shelf life 3 mesi (S3)	Shelf life 5 mesi (S5)
Analisi microbiologica	X	X	X	X	X
Contenuto fenolico (polpa)	X	X	X	X	X
Contenuto fenolico (sala- moia)		X	X	X	X
Colore	X		X	X	X
Umidità	X		X		
Ceneri	X		X		
Contenuto in olio	X		X		
Rapporto polpa/nocciolo (P/N)	X		X	X	X
Contenuto di sale (polpa)	X				
Contenuto di sale (salamoia)		X	X	X	X
Acidità libera (polpa)	X				
Acidità libera (salamoia)		X	X	X	X
Analisi texturale *	X	X	X	X	X
Analisi sensoriale*			X	X	

*dati non mostrati

2.2.3. Analisi statistiche

Il software utilizzato per i test di normalità, ANOVA, e Correlazione di Pearson è stato PAST v. 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/>). La PCA (Analisi delle Componenti Principali) e l'AHC (Classificazione Gerarchica Ascendente) è stata fatta con XLStat Premium ver. 25.2.1411.0 di Addinsoft (Lumivvero (2023)). XLSTAT soluzione per l'analisi statistica e dei dati (Parigi, Francia. <https://www.xlstat.com>).

2.3. Risultati

2.3.1. Parametri chimico-fisici

Da queste determinazioni sono stati raccolti numerosi dati relativi ai singoli parametri oggetto di indagine. Per quanto riguarda il contenuto di sale delle varie salamoie, le misurazioni iniziali dei quattro fusti (N1, N2, G1 e G2) hanno fornito valori globalmente crescenti da circa l'8% di salinità fino a quasi il 10% (g/100 g). Il fusto di controllo (FUO) ha presentato valori fluttuanti nelle tre misurazioni effettuate (rispettivamente 10.11%, 11.30% e 9.49%). Al quarto campionamento è stato ottenuto un valore del 9.49%, in linea con gli altri fusti testati. I risultati complessivi sono riportati nella Figura 2.2.

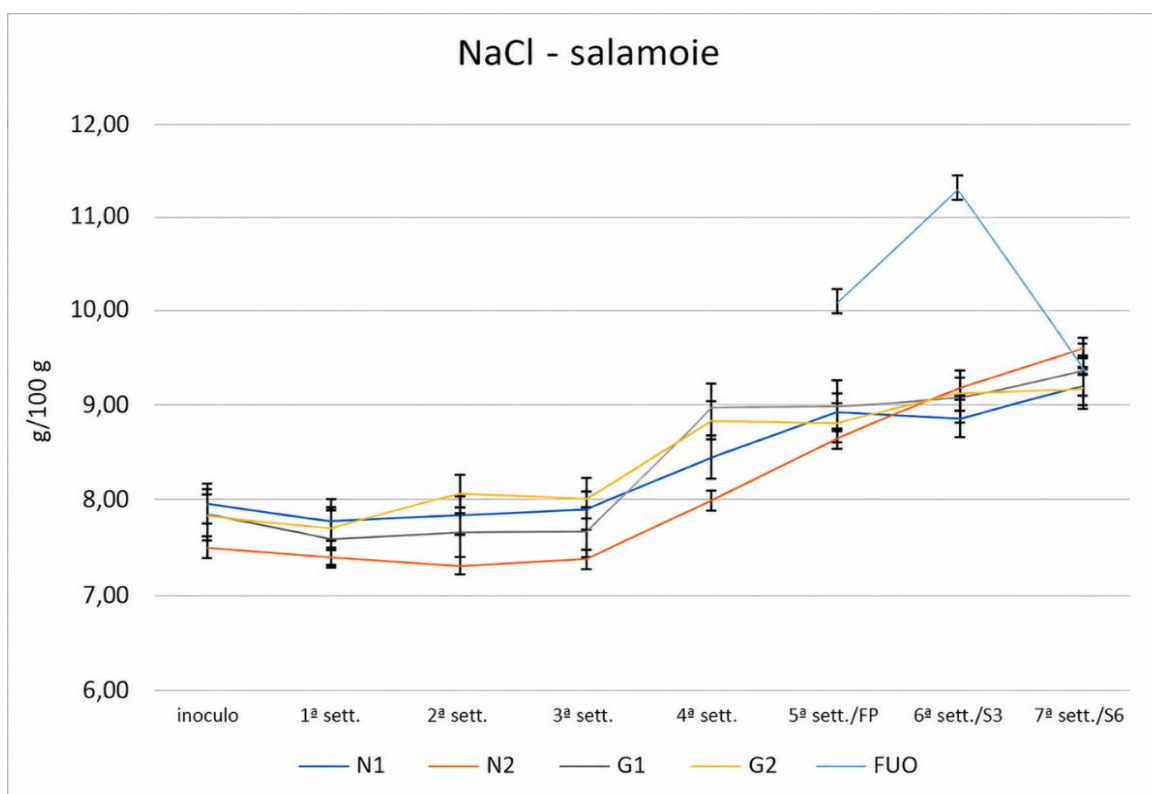


Figura 2.2. Andamento del contenuto di NaCl nelle salamoie.

I risultati relativi all'acidità libera totale sono riportati nella Figura 2.3. L'acidità libera totale è data da un insieme di acidi organici a catena corta che vengono

rilasciati nella salamoia durante i vari processi di fermentazione dalle diverse specie della microflora fermentante; alcuni di questi, come l'acido acetico, influenzano il parametro del pH in misura maggiore rispetto ad altri. Il metodo analitico prevede una titolazione con una soluzione standardizzata di idrossido di sodio (NaOH) e i risultati sono convenzionalmente espressi come grammi di acido lattico (o acido citrico) per 100 g di campione. Poiché le olive contengono miscele di acidi organici differenti, si sceglie un acido di riferimento rappresentativo della matrice alimentare. Il metodo quantifica l'acidità totale, pertanto non consente di distinguere i singoli acidi organici presenti, responsabili dell'acidità stessa. Per questo motivo, non è possibile tentare una correlazione tra pH e acidità libera totale. Al termine del periodo di fermentazione, tutti i fusti oggetto di studio hanno mostrato valori di acidità libera totale inferiori rispetto al fusto di controllo FUO. Ciononostante, durante il periodo di conservazione (tre mesi e sei mesi dopo la fine della fermentazione), l'acidità libera totale è aumentata in tutte i fusti fino a raggiungere i valori ottenuti dal fusto FUO.

Nella Figura 2.4 è possibile osservare l'andamento del pH nei fusti durante le varie fasi del processo di fermentazione.

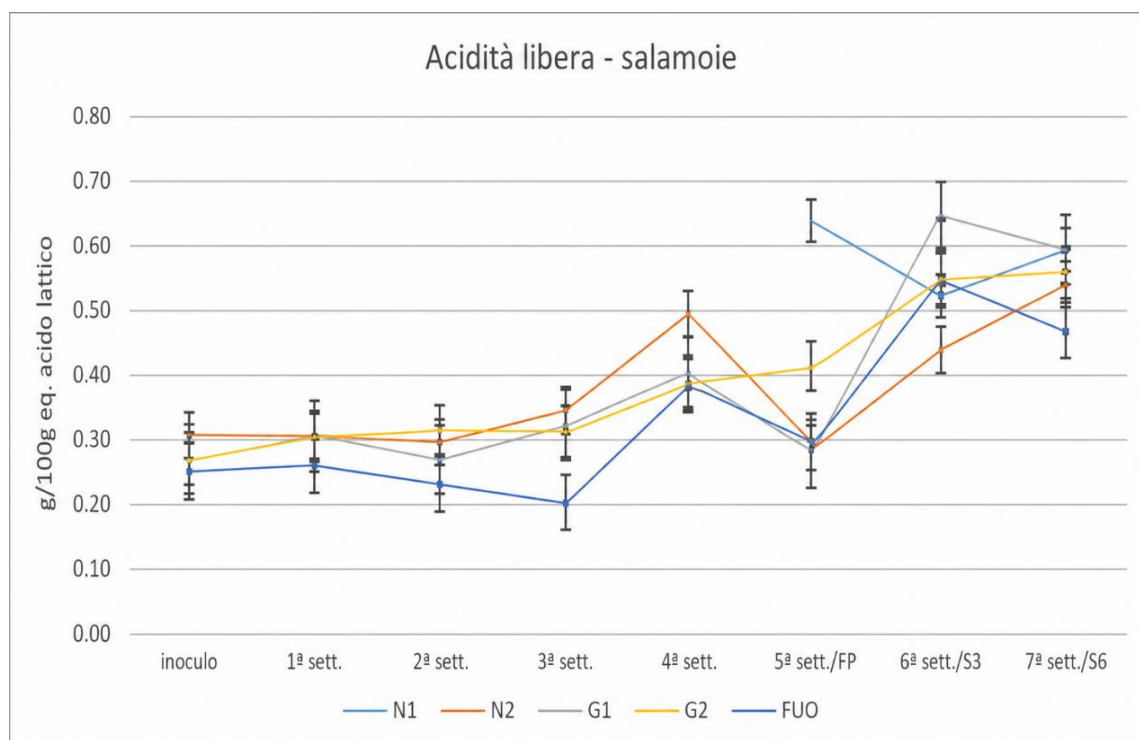


Figura 2.3. Andamento dell'acidità libera totale delle diverse salamoie.

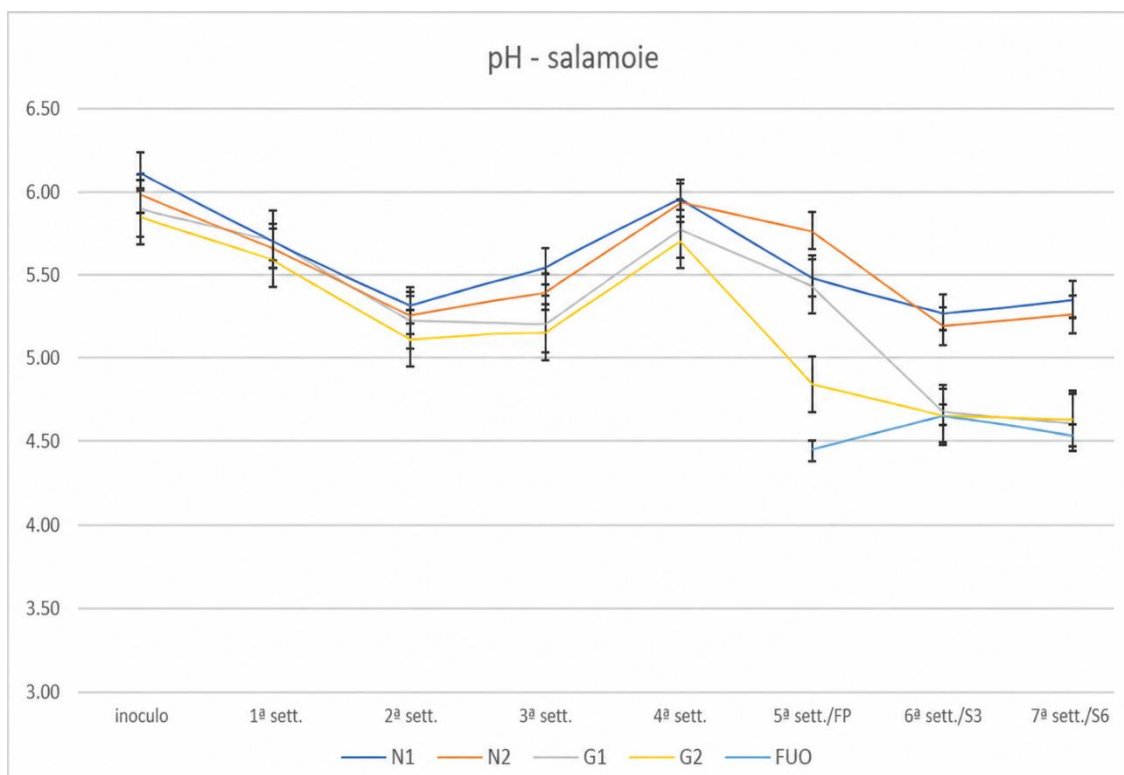


Figura 2.4. Andamento del pH delle diverse salamoie.

In questo caso, si può osservare che, partendo da valori di pH compresi tra 5.85 e 6.12 nella fase di inoculazione, si è verificata una prima diminuzione del pH nelle prime fasi della fermentazione fino a raggiungere un minimo al secondo campionamento (5.15–5.55). Successivamente, si è osservato un modesto aumento, che ha raggiunto il suo picco al 4° campionamento (5.72–5.97). Infine, si è verificata una significativa diminuzione tra il quinto campionamento (fine della fermentazione) e il settimo campionamento (durata di conservazione di sei mesi), con valori minimi per le fusti inoculate (G1 e G2) al settimo campionamento (4.63–5.27). Tra i tre campionamenti presi in considerazione, il fusto di controllo esterno (FUO) ha assunto valori di pH complessivamente inferiori rispetto alle fusti in prova, con valori al quinto, sesto e settimo campionamento 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 riportati nelle Tabelle 2.3 e 2.4.

Tab.2.3 Parametri chimico-fisici delle olive all'inizio dell'esperimento (preparazione dei fusti). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard.

Parametri	Frutto fresco
Acidità libera ⁽¹⁾	0,44 $\pm$ 0,01
Umidità ⁽²⁾	69,53 $\pm$ 0,08
Ceneri ⁽³⁾	2,20 $\pm$ 0,36
Sale ⁽⁴⁾	0,60 $\pm$ 0,01
P/S ⁽⁵⁾	4,42
Contenuto di olio ⁽⁶⁾	9,54 $\pm$ 0,03
⁽¹⁾ g eq. acido lattico/100 g di polpa di oliva; ⁽²⁾ g H ₂ O/100 g di polpa di oliva; ⁽³⁾ g di ceneri/100 g di polpa di oliva; ⁽⁴⁾ g di NaCl/100 g di polpa di oliva; ⁽⁵⁾ P/S = rapporto polpa/nocciolo; ⁽⁶⁾ g di olio/100 g di polpa di oliva	

Tab.2.4. Parametri chimico-fisici delle olive al termine del processo di fermentazione (5° prelievo). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard

Parametri	N1	N2	G1	G2	FUO
Acidità libera ⁽¹⁾	0,30 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01
Umidità ⁽²⁾	62,19 $\pm$ 0,01	63,93 $\pm$ 0,35	61,48 $\pm$ 0,56	62,66 $\pm$ 0,04	61,63 $\pm$ 0,08
Ceneri ⁽³⁾	6,86 $\pm$ 1,39	6,71 $\pm$ 1,18	6,73 $\pm$ 1,36	5,77 $\pm$ 0,16	7,84 $\pm$ 0,01
Sale ⁽⁴⁾	8,97 $\pm$ 0,05	8,69 $\pm$ 0,07	9,03 $\pm$ 0,02	8,86 $\pm$ 0,09	10,11 $\pm$ 0,09
Contenuto di olio ⁽⁵⁾	10,74 $\pm$ 0,24	11,03 $\pm$ 0,50	12,13 $\pm$ 0,30	11,70 $\pm$ 0,30	10,67 $\pm$ 0,00
P/S ⁽⁶⁾	3,83	3,63	3,81	3,63	3,42
⁽¹⁾ g equivalenti di acido lattico/100 g di polpa di oliva; ⁽²⁾ g H ₂ O/100 g di polpa di oliva; ⁽³⁾ g di ceneri/100 g di polpa di oliva; ⁽⁴⁾ g di NaCl/100 g di polpa di oliva; ⁽⁵⁾ g di olio/100 g di polpa di oliva; ⁽⁶⁾ P/S = rapporto polpa/nocciolo.					

Come si può vedere nella Figura 2.5, esistono correlazioni significative (di Pearson) tra alcuni di questi parametri. I cerchi rossi indicano correlazioni negative, mentre quelli blu indicano correlazioni positive. I parametri riportati nei riquadri grigi presentano valori di $p < 0,05$.

Non è stato possibile includere i dati microbiologici nella matrice di correlazione di Pearson poiché non hanno superato i test di normalità.

I dati ottenuti sono stati successivamente trattati mediante PCA (Analisi delle Componenti Principali) e AHC (Classificazione Gerarchica Ascendente), considerando i valori ottenuti sulla polpa del prodotto fresco e sulla polpa dei prodotti delle cinque fusti al termine della fermentazione (quinto campionamento).

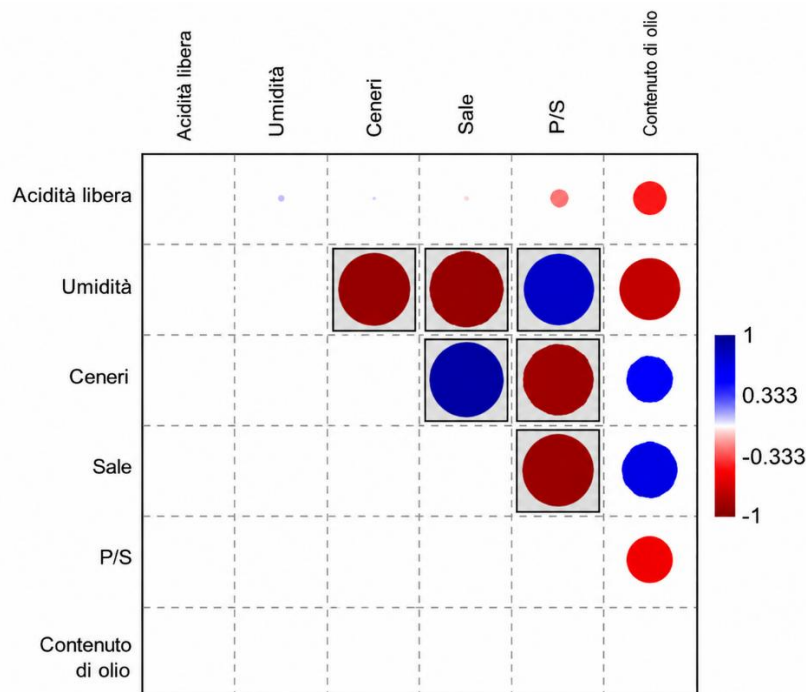


Figura 2.5. Grafico di correlazione (Pearson) tra i parametri chimico-fisici.

La figura 2.6 mostra la variabilità cumulativa tra i parametri della matrice. Si è deciso di procedere con l'analisi di F1 e F2, poiché la somma dei due fattori rappresenta il 93.40% della variabilità totale. I dati generali relativi ai parametri chimico- fisici e ai fenoli sono riportati alla fine del capitolo.

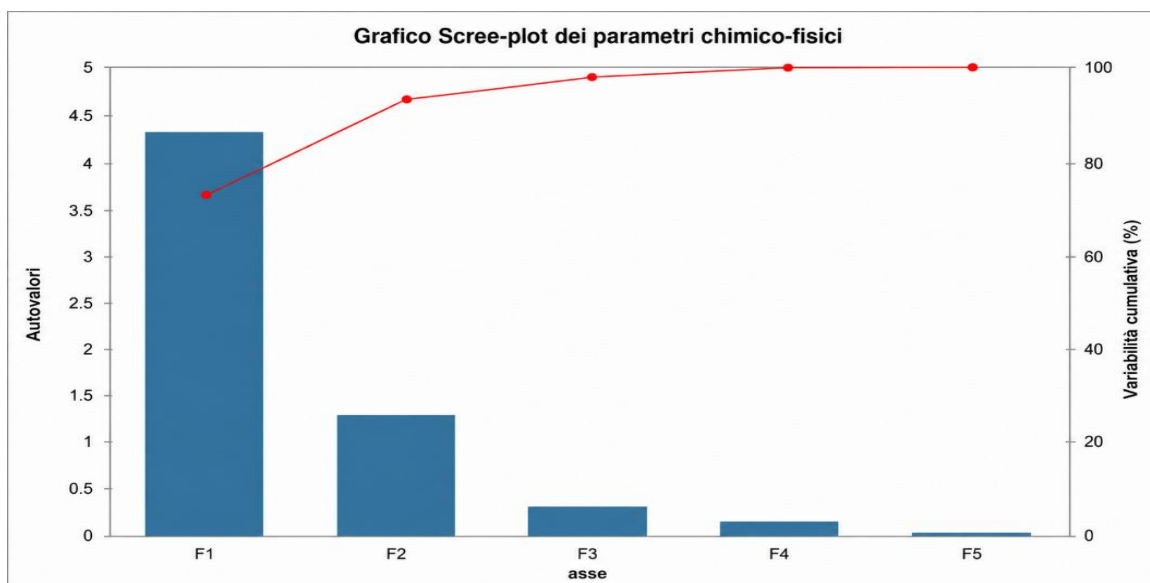


Figura 2.6. Grafico Scree-plot: variabilità cumulativa.

Come si può osservare nella Figura 2.7, dai dati elaborati mediante PCA emerge una netta separazione tra il prodotto fresco (LCF) nel quadrante in alto a sinistra, il fusto esterno (FUO) nel quadrante in alto a destra e tutti gli altri prodotti (N1, N2, G1, G2) a fine processo di fermentazione (FP) nel quadrante in basso a destra. Si nota inoltre una sovrapposizione quasi perfetta dei campioni N1 e N2.

La stessa matrice è stata sottoposta all'AHC utilizzando il criterio della dissomiglianza basato sulla distanza euclidea. È stato scelto il metodo di agglomerazione di Ward poiché tende a creare gruppi di dimensioni uguali, con una soglia stabilita in base all'indice di Hartigan (valori predefiniti del software: da 2 a 5). I risultati forniti dall'analisi sono molto interessanti (Figura 2.8).

Si possono osservare tre cluster: uno per il prodotto fresco (C1), uno per il fusto esterno (C3, in quanto punto singolo all'interno del cluster C1) e uno per i fusti analizzati (C2). I campioni N1-N2 e G1-G2 sono raggruppati in coppie con un coefficiente di dissomiglianza molto basso, affiancati dal campione conservato all'esterno (FUO) e, con un coefficiente di dissomiglianza più elevato, dal campione fresco di LCF sulla sinistra.

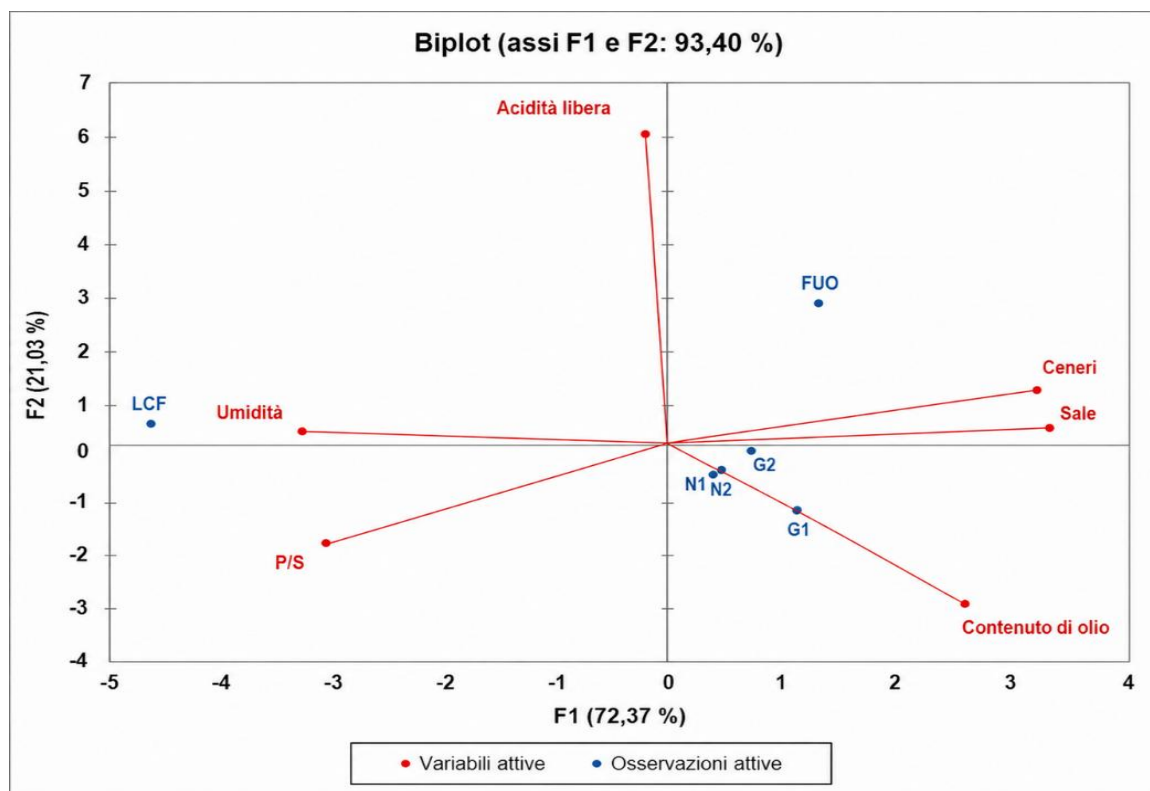


Figura 2.7. Biplot PCA dei parametri chimico-fisici.

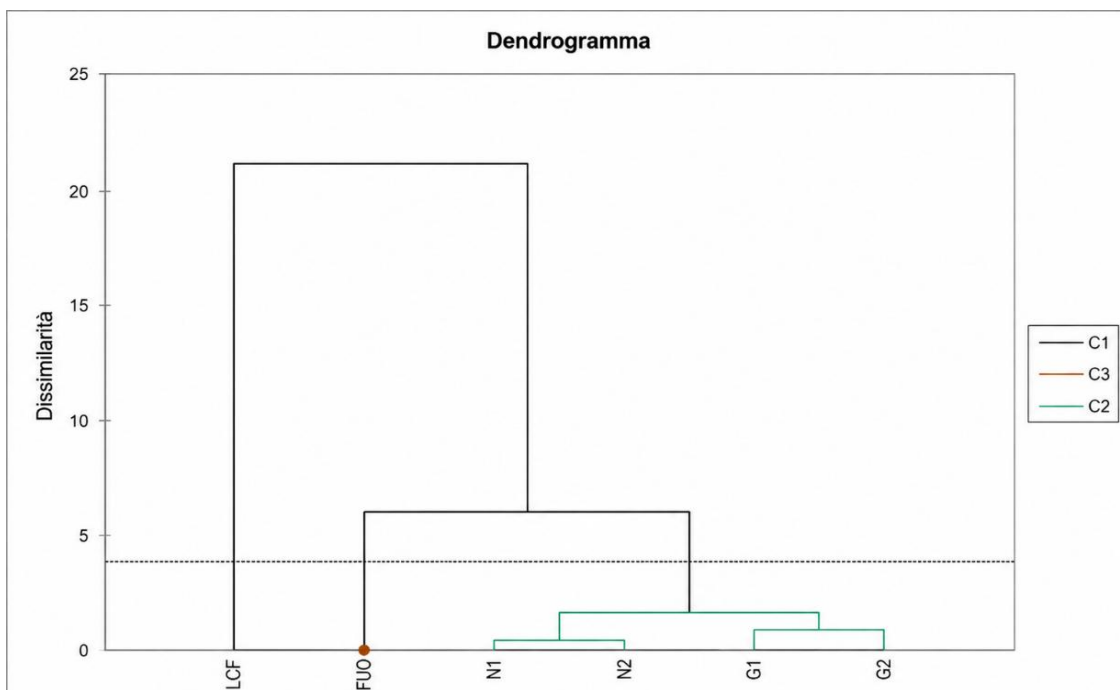


Figura 2.8. AHC dei parametri fisico-chimici. Il cluster 3 è rappresentato da un unico punto del campione FUO.

2.3.2. Analisi microbiologica

Dal punto di vista microbiologico, sono state prese in considerazione le analisi relative a LAB totali, lieviti, enterobatteri e muffe.

La presenza di enterobatteri non è mai stata rilevata in nessuno dei campioni prelevati. Per quanto riguarda il contenuto di muffe, queste sono state rilevate in quantità trascurabili (0 –1 CFU) e solo in pochi campioni; pertanto, non sono riportate.

Esaminando l'andamento dei batteri lattici (Figura 2.9), si osserva che essi sono assenti al primo campionamento, nonostante fossero stati inoculati intenzionalmente con il nostro starter anche nei fusti G1 e G2. Successivamente, si sono sviluppati solo nel fusto G2, a partire dal quinto campionamento, e in seguito anche negli altri fusti (compresi N1 e N2) durante il periodo di conservazione. Nel fusto FUO, sono sempre stati assenti.

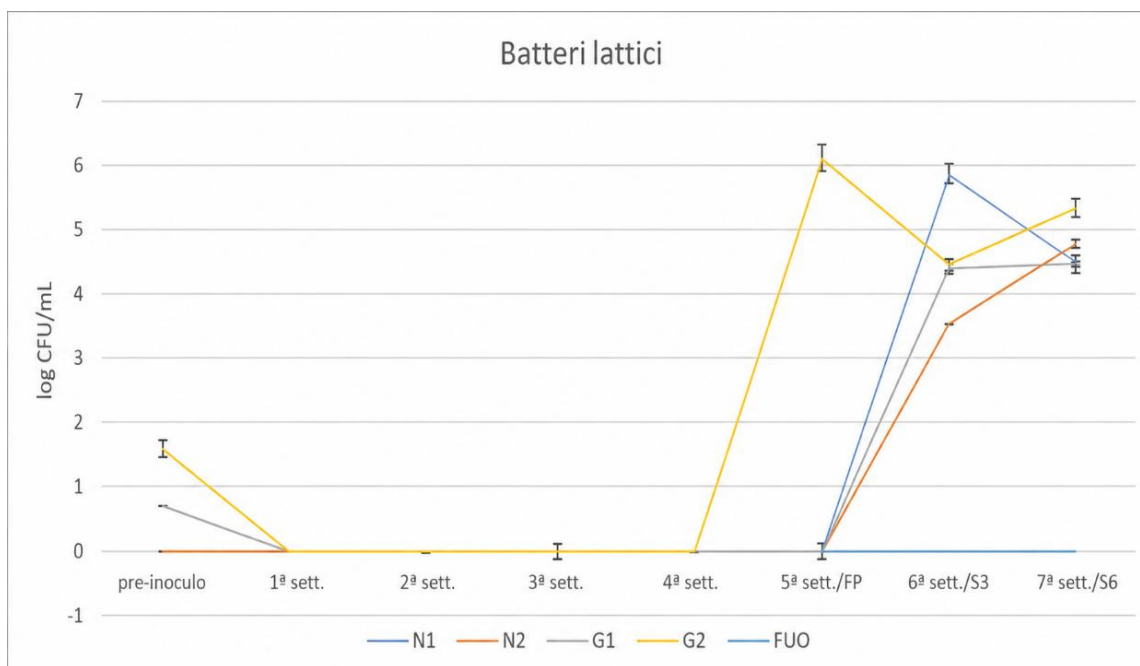


Figura 2.9. Andamento della presenza di batteri lattici nei fusti oggetto di studio.

Per quanto riguarda la presenza di lieviti (Figure 2.10 e 2.11), i diversi fusti hanno seguito andamenti diversi. Al primo campionamento, N1 non mostrava ancora tracce di lieviti in fase di sviluppo, mentre questi compaiono al secondo campionamento e aumentano fino a raggiungere un picco al terzo campionamento; successivamente sono rimasti stabili nei campionamenti successivi. In N2, in cui erano già stati introdotti alcuni lieviti nella fase di pre-inoculazione, si è registrato un aumento costante del contenuto fino a raggiungere un picco al quarto campionamento. Successivamente sono scomparsi al quinto campionamento, per poi riapparire in quantità modeste al sesto campionamento (tre mesi di conservazione). Per quanto riguarda i fusti G1 e G2, si è registrata una modesta presenza di lieviti pre-inoculo e, successivamente, dopo l'inoculazione, la crescita è aumentata come previsto e ha mostrato una certa stabilità fino al quarto campionamento; entrambe sono poi scese a 2.65 ± 0.014 log CFU/mL per il gruppo G1 e 2.95 ± 0.15 log CFU/mL per il gruppo G2. Successivamente, hanno ripreso a proliferare nei campioni rimanenti, aggiungendo valori simili a quelli riscontrati nel fusto FUO.

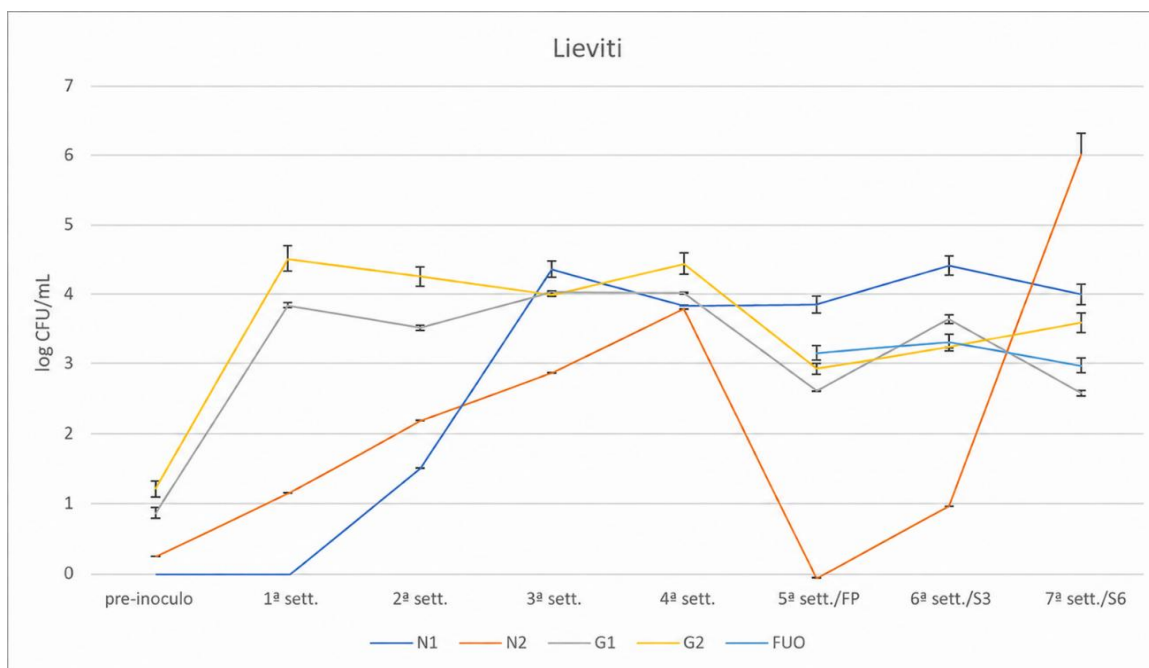


Figura 2.10. Andamento della presenza di lieviti nei fusti oggetto di studio.

2.3.3. *Contenuto fenolico*

Ad ogni campionamento, sono state prelevate aliquote di olive e salamoia da destinare all'analisi del contenuto fenolico relativo. I dati sono stati successivamente elaborati mediante PCA e AHC, considerando i valori ottenuti sulla polpa del prodotto fresco, sulla polpa dei prodotti dei cinque fusti alla fine della fermentazione (quinto campionamento) e sulle polpe dei prodotti dopo tre mesi (sesto campionamento) e sei mesi (settimo campionamento) di conservazione.



Figura 2.11. Fusto G2. A sinistra: fase pre-inoculo; a destra: condizioni al momento del primo campionamento.

Il grafico Scree-plot in Figura 2.12 mostra l'andamento della variabilità cumulativa. Sono state selezionate le variabili F1 e F2; esse esprimono il 61,93% della variabilità sui due assi (43,14% F1, 18,79% F2).

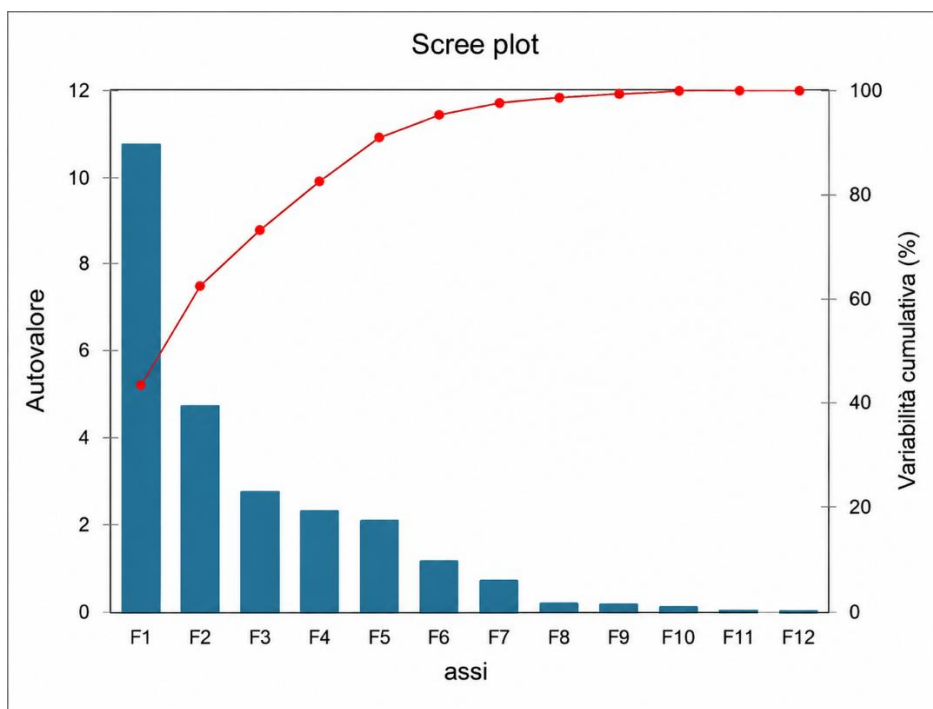


Figura 2.12. Grafico Scree-plot della variabilità cumulativa.

Dai dati esaminati emerge una netta separazione nell'analisi PCA (Figura 2.13) tra il prodotto fresco (LCF) e tutti gli altri prodotti trasformati. I prodotti a fine processo di fermentazione (FP) sono invece concentrati nei due quadranti di destra, mentre i prodotti analizzati a fine dei due periodi di conservazione sono concentrati nel quadrante in basso a sinistra. Fa eccezione il risultato ottenuto nel periodo di conservazione del fusto FUI, che si posiziona nel quadrante in alto a sinistra, ma risulta comunque distinto dal campione fresco LCF.

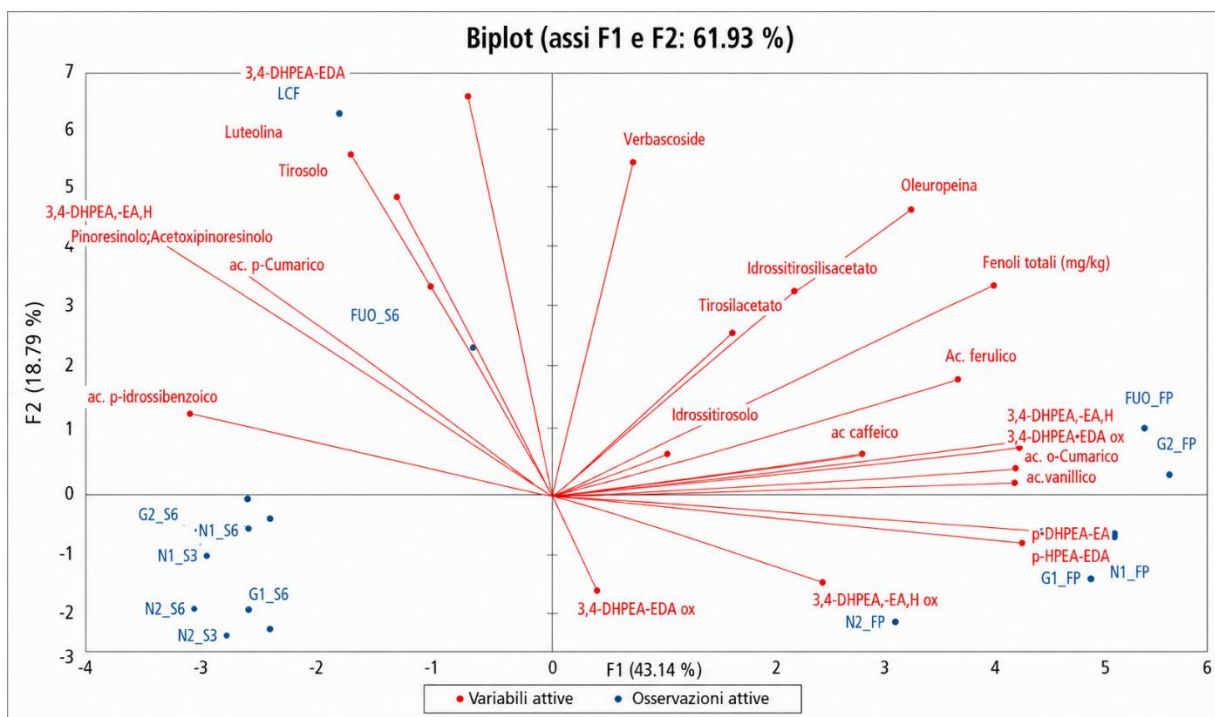


Figura 2.13. Sostanze fenoliche sottoposte ad analisi PCA. Biplot con osservazioni e variabili.

La stessa matrice di dati, sottoposta all'AHC, ha permesso di raggruppare efficacemente i diversi gruppi, come mostrato nella Figura 2.14. Possiamo quindi osservare come tutti i prodotti analizzati, al termine della fermentazione (FP), siano correttamente raggruppati in C2, con il campione FUI raggruppato separatamente sulla sinistra e con un certo valore di dissomiglianza rispetto agli altri campioni. I prodotti analizzati dopo i due periodi di conservazione (indicati con il suffisso S3 e S6) sono tutti raggruppati in C1. All'interno di questo gruppo, si riscontra che la dissimilarità tra FUI_S3 e FUI_S6 è inesistente, ma questi due campioni sono raggruppati insieme al prodotto LCF fresco. Anche i campioni N1,

N2, G1 e G2 non mostrano alcuna dissimilarità tra loro nei due diversi campionamenti, ma il campione G2 forma un sottogruppo con una certa dissimilarità rispetto agli altri campioni del gruppo.

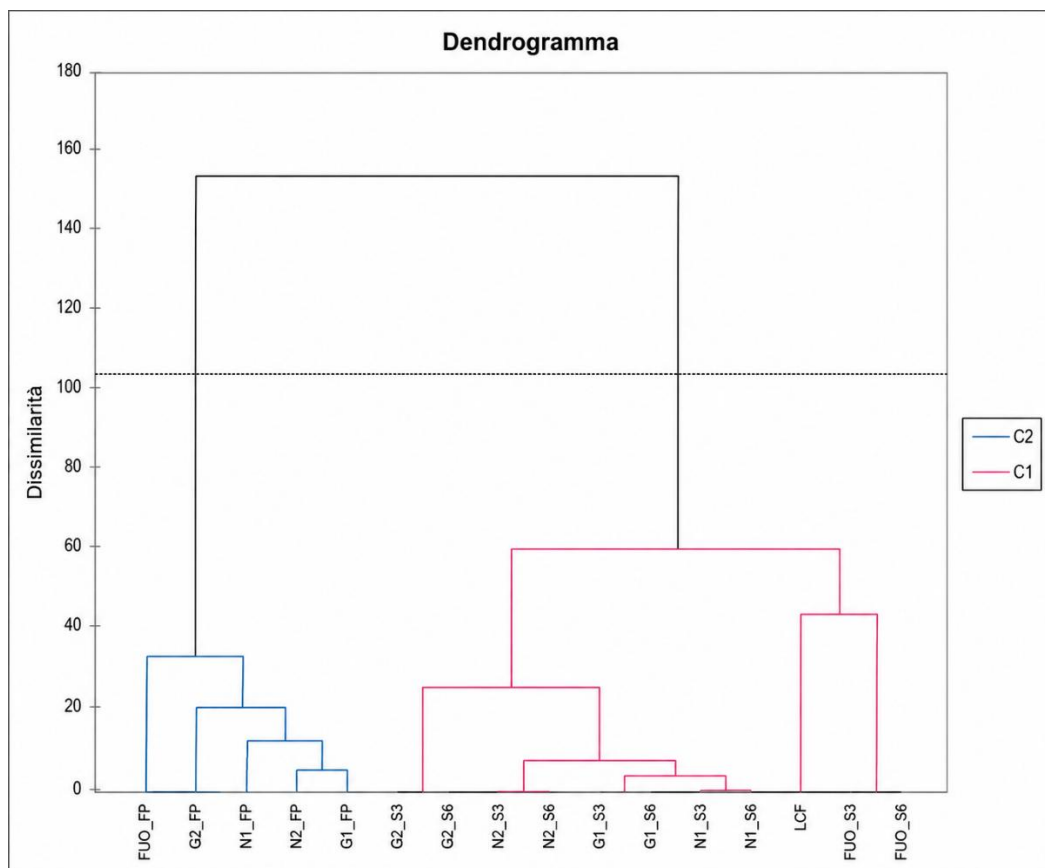


Figura 2.14. AHC di sostanze fenoliche della polpa.

Le analisi relative alla consistenza, alle caratteristiche sensoriali e al colore del prodotto, sia al termine della lavorazione sia dopo un periodo di conservazione compreso tra i tre e i sei mesi, non sono state trattate in questa sede.

2.4. Discussione e conclusioni

I dati ottenuti dalla determinazione del contenuto di sale nei fusti N1, N2, G1 e G2 sono spiegabili in quanto ai campioni sono state aggiunte aliquote di salamoia fresca; queste presentavano valori vicini al 12%, mentre il diverso contenuto di sale nel fusto FUO è spiegabile con il fatto che il fusto è stato tenuto sigillato

durante l'intero processo fino al quinto campionamento. L'aumento della salinità al campionamento successivo è stato quasi certamente dovuto all'eccessiva evaporazione della salamoia. Ciò si spiega ragionevolmente con il fatto che il fusto si trovava al centro del piazzale di stoccaggio ed era quindi completamente esposto al sole estivo e ai suoi effetti termici. Infatti, dopo il primo prelievo e il successivo rabbocco con salamoia fresca, il livello della salamoia rilevato alla riapertura diminuiva drasticamente.

L'acidità totale libera è da considerarsi accettabile, anche se non si è riuscito a distinguere tra le diverse specie acide, come suggerito da Panagou et al. nel loro lavoro [21]. I valori di pH hanno rivelato dati che, secondo Lombardi et al., sono nella norma per le olive fermentate naturalmente [22], specialmente per quanto riguarda il fusto FUO.

Per quanto riguarda le correlazioni di Pearson, si osserva, come è logico aspettarsi, una correlazione inversa tra ceneri e umidità, dato che l'aumento di quest'ultima sul peso fresco comporta una diminuzione delle ceneri dopo la calcinazione.

Un'altra correlazione inversa logica e confermata è quella tra sale e umidità, poiché all'aumentare del sale nella salamoia si avrà un aumento della pressione osmotica che porterà alla disidratazione delle olive.

La correlazione tra ceneri e rapporto polpa/nocciolo (P/S), sebbene evidente e significativa, non è chiaramente interpretabile poiché, per la determinazione delle ceneri, si parte da quantità di polpa denocciolata di pari peso.

Lo stesso vale per la correlazione tra sale e rapporto P/S; presumibilmente, si può ritenere che, nelle olive con un rapporto P/S più elevato, il sale penetri nei tessuti più lentamente e quindi le olive con un rapporto P/S più basso abbiano uno spessore della polpa minore, offrendo così meno resistenza al passaggio del sale nei tessuti.

Allo stesso modo, è chiara anche la forte correlazione positiva tra il contenuto di sale e quello di ceneri, poiché il primo si trova insieme alle ceneri, e lo stesso vale per la correlazione tra il rapporto P/S e l'umidità. Al contrario, il contenuto di olio dei vari campioni, pur mostrando alcune correlazioni interessanti, non riporta valori di $p < 0,05$. È interessante la forte correlazione positiva tra questo

parametro e il contenuto di sale (che potrebbe essere un indice di lisi cellulare); è logico osservare una correlazione negativa tra il contenuto di olio e l'umidità, dato il metodo analitico utilizzato.

Questa indagine, condotta in condizioni operative industriali, ha messo in luce alcuni aspetti della produzione di olive da tavola fermentate naturalmente che non erano emersi dalla bibliografia consultata.

1. In primo luogo, l'insieme delle determinazioni analitiche ha chiaramente dimostrato che, sebbene la situazione di partenza fosse la stessa, i prodotti finiti presentavano lievi differenze. Ciò può essere dovuto a diversi fattori, tra cui la popolazione della microflora residente (qualitativa e quantitativa), la competizione tra i microrganismi starter, la presenza di eventuali batteriofagi [23], le condizioni climatiche, l'ubicazione dei fusti e le condizioni operative.
2. In secondo luogo, l'evoluzione del profilo fenolico distingue chiaramente il prodotto fresco da quello finito, ma caratterizza ulteriormente i diversi prodotti finiti, dimostrando che esistono diversi tipi di eliminazione dell'amaro a seconda del tipo di microflora prevalente nella salamoia. Inoltre, abbiamo notato che la permanenza del prodotto nei fusti per un periodo compreso tra i tre e i sei mesi dopo la fine della fermentazione (prelievi S3 e S6) influenza chiaramente il profilo fenolico, come si può vedere dall'analisi AHC in Figura 2.14.
3. È emerso che il fusto esterno, contrassegnato con la sigla FUO, essendo rimasto esposto alle variazioni climatiche, abbia mostrato un comportamento diverso rispetto agli altri fusti testati, sia per quanto riguarda i parametri chimico-fisici che il contenuto fenolico. Gli stessi risultati si sono riscontrati anche nel profilo microbiologico, con la totale assenza di batteri lattici nel fusto FUO in tutti e tre i campionamenti (EP, S3 e S6).

I risultati ottenuti confermano quanto riportato in letteratura circa la possibilità di migliorare il controllo della fermentazione delle olive da tavola mediante l'impiego di colture starter selezionate di *Lactiplantibacillus plantarum*. Diversi studi hanno infatti evidenziato come l'inoculo di ceppi selezionati permetta di accelerare i processi di dea-

marizzazione biologica, ridurre la variabilità microbiologica e migliorare la sicurezza del prodotto finale [24, 25, 26]. Tuttavia, il presente studio amplia tali evidenze poiché è stato condotto direttamente in condizioni industriali, nelle quali la variabilità dei parametri di processo risulta notevolmente superiore rispetto alle prove di laboratorio generalmente riportate in letteratura. L'elevata eterogeneità osservata tra i diversi fusti conferma che ciascun sistema fermentativo rappresenta un ecosistema microbiologico dinamico, influenzato da numerosi fattori tecnologici ed ambientali. Tale osservazione sottolinea la necessità di integrare l'impiego degli starter con un monitoraggio continuo dei principali parametri chimico-fisici e microbiologici durante la produzione industriale.

I risultati ottenuti dai ceppi inoculati con colture starter selezionate hanno invece messo in luce alcuni aspetti critici importanti nella produzione industriale delle olive da tavola: la scelta dell'inoculo è fondamentale. In questo esperimento, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* si è dimostrato più efficace e ha immediatamente prevalso sul batterio *Lactiplantibacillus plantarum*. Ciò è in parte in linea con i risultati ottenuti da Chityri et al. [27] nella fermentazione controllata delle olive Kalamata, dove i LAB sono scomparsi al sesto giorno di fermentazione nonostante l'aggiunta di un lievito. Nella nostra prova abbiamo aggiunto il ceppo *L. plantarum* al posto di *L. pentosus*, come suggerito da Paba et al. [28], in virtù dei risultati positivi ottenuti in precedenti esperimenti su scala di laboratorio [11].

È difficile stabilire con esattezza a cosa sia dovuta questa prevalenza, ma possiamo avanzare alcune ipotesi: (a) l'uso di salamoie ad alta concentrazione di NaCl (10–12%) che, se da un lato garantisce alle olive un certo grado di protezione contro l'insorgenza di microrganismi patogeni, dall'altro potrebbe probabilmente inibire la crescita dei 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) sbalzi di temperatura; (d) competizione microbica per micro e macronutrienti.

La sperimentazione ha quindi dimostrato che ogni fusto è un ecosistema a sé stante e che è possibile “guidare” la fermentazione delle olive da tavola, ma ciò richiede molta esperienza e un monitoraggio costante di numerosi parametri. Ciò comporta l'applicazione immediata di eventuali misure correttive in caso di alterazione dei parametri.

Tale lavoro può rappresentare un interessante punto di partenza per future ricerche sulla fermentazione naturale delle olive da tavola al di fuori dei laboratori e costituisce un valido ausilio per le aziende e i tecnici addetti alla produzione e al controllo qualità.

I risultati ottenuti costituiscono la base microbiologica e tecnologica del progetto di ricerca, poiché consentono di comprendere le dinamiche della deamarizzazione biologica e di individuare strategie per il controllo del processo fermentativo. Tali conoscenze rappresentano il presupposto per la successiva valorizzazione del paté di olive come ingrediente funzionale.

Tab. A2.1 – Dati PCA: parametri chimico-fisici.

AUTOVETTORI					
	F1	F2	F3	F4	F5
Acidità libera	-0,023	0,863	0,44	0,191	0,087
Umidità	-0,47	0,018	-0,017	-0,615	0,403
Ceneri	0,46	0,112	-0,431	0,18	0,746
Sale	0,477	0,029	-0,159	-0,034	-0,417
P/S	-0,444	-0,267	0,033	0,741	0,135
Contenuto in olio	0,377	-0,413	0,771	-0,061	0,285
CARICHI FATTORIALI					
	F1	F2	F3	F4	F5
Acidità libera	-0,048	0,969	0,233	0,06	0,011
Umidità	-0,979	0,02	-0,009	-0,195	0,05
Ceneri	0,959	0,125	-0,228	0,057	0,092
Sale	0,995	0,033	-0,084	-0,011	-0,052
P/S	-0,924	-0,3	0,017	0,234	0,017
Contenuto in olio	0,785	-0,463	0,408	-0,019	0,035
CORRELAZIONI TRA VARIABILI E FATTORI					
	F1	F2	F3	F4	F5
Acidità libera	-0,048	0,969	0,233	0,06	0,011
Umidità	-0,979	0,02	-0,009	-0,195	0,05
Ceneri	0,959	0,125	-0,228	0,057	0,092
Sale	0,995	0,033	-0,084	-0,011	-0,052
P/S	-0,924	-0,3	0,017	0,234	0,017
Contenuto in olio	0,785	-0,463	0,408	-0,019	0,035

Tab. A2.2- Dati PCA: Contenuto di fenoli nella polpa.

Auto-vettori												
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Idrossitirosolo	0,066	0,045	0,473	0,079	0,377	-0,042	0,096	0,141	-0,017	-0,211	-0,347	-0,223
Tirosolo	-0,087	0,318	0,06	0,293	0,31	-0,133	0,067	0,159	0,175	-0,046	0,076	0,397
Acido p-idrossibenzoico	-0,206	0,083	-0,169	0,288	0,316	0,132	-0,043	0,174	0,107	-0,015	-0,225	-0,227
Acido vanillico	0,273	0,014	-0,156	-0,021	0,115	0,078	-0,282	0,052	-0,388	-0,266	-0,041	0,169
Acido caffeico	0,176	0,046	-0,14	-0,164	0,046	0,649	-0,196	0,205	0,244	-0,038	-0,216	-0,107
Vanillina	0,178	0,044	0,111	0,425	-0,283	0,005	0,17	0,041	-0,086	-0,265	0,098	-0,209
Acido p-cumarico	-0,067	0,219	0,367	-0,236	0,067	0,356	-0,244	-0,375	0,026	0,103	0,123	0,146
Idrossitirosilacetato	0,137	0,2	-0,08	0,356	-0,314	0,207	-0,042	-0,131	0,46	-0,111	-0,146	0,283
Acido ferulico	0,234	0,118	0,239	-0,188	-0,027	-0,233	0,134	-0,304	0,175	0,131	-0,331	0,047
Verbascoside	0,047	0,359	-0,319	0,164	-0,098	-0,037	-0,023	-0,15	-0,101	0,152	-0,09	-0,315
Acido o-cumarico	0,292	0,03	-0,107	0,023	0,115	-0,042	0,001	-0,236	-0,015	-0,164	0,077	0,021
3,4-DHPEA-EDA ox	0,028	-0,102	0,102	0,43	0,419	0,247	-0,072	-0,364	-0,228	0,274	0,249	-0,024
3,4-DHPEA-EDA	-0,047	0,435	-0,114	-0,112	-0,085	0,026	-0,017	-0,001	-0,176	0,157	-0,017	-0,274
Oleuropeina	0,205	0,301	-0,172	-0,101	0,012	0,015	0,066	0,002	-0,227	-0,056	0,187	0,171
3,4-DHPEA-EA	0,273	0,05	-0,09	-0,042	0,184	-0,006	0,131	0,455	-0,092	0,495	-0,137	0,235
Tirosilacetato	0,105	0,161	0,361	0,172	-0,363	0,141	0,087	0,182	-0,349	0,209	-0,064	0,221
p-HPEA-EDA ox	0,289	0,014	0,09	-0,151	0,033	-0,063	-0,053	-0,027	0,137	0,266	0,02	-0,293
p-HPEA-EDA	0,278	-0,052	-0,072	-0,156	0,164	-0,085	-0,114	-0,02	-0,028	-0,319	-0,078	0,227
Pinoresinolo, 1-Acetossipinoresinolo	-0,185	0,248	-0,295	-0,06	0,141	-0,168	0,052	-0,264	-0,094	0,002	-0,249	0,127
p-HPEA-EA	0,288	-0,037	-0,033	0,101	0,04	-0,167	-0,223	0,03	-0,036	-0,093	0,056	-0,132
3,4-DHPEA,-EA,H ox	0,157	-0,091	-0,156	-0,128	0,131	0,314	0,789	-0,122	0,029	-0,085	0,152	-0,016
Luteolina	-0,112	0,367	0,19	-0,202	0,034	0,087	0,026	0,239	-0,067	-0,321	0,313	-0,179
3,4-DHPEA,-EA,H	-0,229	0,276	0,047	-0,102	0,108	-0,097	0,067	0,065	0,179	-0,04	0,16	0,111
p-HPEA,-EA,H	0,285	0,06	-0,017	0,032	0,083	-0,185	-0,128	0,123	0,391	0,169	0,492	-0,097
Fenoli totali (mg/kg)	0,251	0,218	0,144	0,049	0,065	-0,103	0,101	-0,118	0,034	-0,083	-0,154	-0,142

Tab. A2.2- Continua.

Carichi fattoriali												
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Idrossitirosolo	0,216	0,098	0,782	0,121	0,545	-0,045	0,08	0,065	-0,007	-0,071	-0,064	-0,01
Tirosolo	-0,285	0,69	0,099	0,445	0,448	-0,143	0,056	0,073	0,072	-0,016	0,014	0,018
Acido p-idrossibenzoico	-0,677	0,179	-0,279	0,438	0,456	0,143	-0,036	0,08	0,044	-0,005	-0,042	-0,01
Acido vanillico	0,898	0,031	-0,258	-0,032	0,167	0,084	-0,236	0,024	-0,16	-0,09	-0,008	0,008
Acido caffeico	0,577	0,1	-0,231	-0,249	0,066	0,7	-0,164	0,094	0,1	-0,013	-0,04	-0,005
Vanillina	0,585	0,096	0,184	0,646	-0,408	0,006	0,142	0,019	-0,035	-0,089	0,018	-0,009
Acido p-cumarico	-0,219	0,474	0,607	-0,359	0,097	0,384	-0,204	-0,172	0,011	0,035	0,023	0,007
Idrossitirosilacetato	0,451	0,434	-0,132	0,54	-0,454	0,223	-0,035	-0,06	0,189	-0,037	-0,027	0,013
Acido ferulico	0,767	0,257	0,396	-0,286	-0,038	-0,251	0,112	-0,139	0,072	0,044	-0,061	0,002
Verbascoside	0,153	0,777	-0,528	0,249	-0,142	-0,04	-0,019	-0,069	-0,041	0,051	-0,017	-0,014
Acido o-cumarico	0,958	0,064	-0,177	0,035	0,166	-0,045	0,001	-0,108	-0,006	-0,055	0,014	0,001
3,4-DHPEA-EDA ox	0,091	-0,22	0,168	0,653	0,605	0,266	-0,06	-0,167	-0,094	0,092	0,046	-0,001
3,4-DHPEA-EDA	-0,155	0,942	-0,188	-0,17	-0,123	0,028	-0,014	0	-0,072	0,053	-0,003	-0,012
Oleuropeina	0,675	0,653	-0,284	-0,154	0,018	0,017	0,055	0,001	-0,093	-0,019	0,035	0,008
3,4-DHPEA-EA	0,898	0,109	-0,148	-0,064	0,266	-0,007	0,109	0,209	-0,038	0,167	-0,025	0,01
Tirosilacetato	0,345	0,348	0,597	0,261	-0,524	0,152	0,073	0,083	-0,143	0,07	-0,012	0,01
p-HPEA-EDA ox	0,951	0,031	0,149	-0,229	0,048	-0,068	-0,044	-0,013	0,056	0,09	0,004	-0,013
p-HPEA-EDA	0,912	-0,113	-0,118	-0,237	0,237	-0,092	-0,095	-0,009	-0,011	-0,107	-0,014	0,01
Pinoresinolo, 1-Acetossi-pinoresinolo	-0,608	0,537	-0,488	-0,092	0,203	-0,181	0,044	-0,121	-0,038	0,001	-0,046	0,006
p-HPEA-EA	0,946	-0,08	-0,054	0,153	0,057	-0,18	-0,187	0,014	-0,015	-0,031	0,01	-0,006
3,4-DHPEA,-EA,H ox	0,515	-0,196	-0,258	-0,195	0,189	0,339	0,66	-0,056	0,012	-0,029	0,028	-0,001
Luteolina	-0,369	0,795	0,314	-0,307	0,049	0,094	0,022	0,11	-0,028	-0,108	0,058	-0,008
3,4-DHPEA,-EA,H	-0,753	0,598	0,078	-0,155	0,156	-0,104	0,056	0,03	0,074	-0,013	0,03	0,005
p-HPEA,-EA,H	0,935	0,129	-0,028	0,049	0,119	-0,2	-0,107	0,056	0,161	0,057	0,091	-0,004
Fenoli totali (mg/kg)	0,825	0,473	0,239	0,074	0,094	-0,111	0,084	-0,054	0,014	-0,028	-0,029	-0,006

Tab. A2.2- Continua.

Correlazioni tra variabili e fattori												
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Idrossitirosolo	0,216	0,098	0,782	0,121	0,545	-0,045	0,08	0,065	-0,007	-0,071	-0,064	-0,01
Tirosolo	-0,285	0,69	0,099	0,445	0,448	-0,143	0,056	0,073	0,072	-0,016	0,014	0,018
Acido p-idrossibenzoico	-0,677	0,179	-0,279	0,438	0,456	0,143	-0,036	0,08	0,044	-0,005	-0,042	-0,01
Acido vanillico	0,898	0,031	-0,258	-0,032	0,167	0,084	-0,236	0,024	-0,16	-0,09	-0,008	0,008
Acido caffeico	0,577	0,1	-0,231	-0,249	0,066	0,7	-0,164	0,094	0,1	-0,013	-0,04	-0,005
Vanillina	0,585	0,096	0,184	0,646	-0,408	0,006	0,142	0,019	-0,035	-0,089	0,018	-0,009
Acido p-cumarico	-0,219	0,474	0,607	-0,359	0,097	0,384	-0,204	-0,172	0,011	0,035	0,023	0,007
Idrossitirosilacetato	0,451	0,434	-0,132	0,54	-0,454	0,223	-0,035	-0,06	0,189	-0,037	-0,027	0,013
Acido ferulico	0,767	0,257	0,396	-0,286	-0,038	-0,251	0,112	-0,139	0,072	0,044	-0,061	0,002
Verbascoside	0,153	0,777	-0,528	0,249	-0,142	-0,04	-0,019	-0,069	-0,041	0,051	-0,017	-0,014
Acido o-cumarico	0,958	0,064	-0,177	0,035	0,166	-0,045	0,001	-0,108	-0,006	-0,055	0,014	0,001
3,4-DHPEA-EDA ox	0,091	-0,22	0,168	0,653	0,605	0,266	-0,06	-0,167	-0,094	0,092	0,046	-0,001
3,4-DHPEA-EDA	-0,155	0,942	-0,188	-0,17	-0,123	0,028	-0,014	0	-0,072	0,053	-0,003	-0,012
Oleuropeina	0,675	0,653	-0,284	-0,154	0,018	0,017	0,055	0,001	-0,093	-0,019	0,035	0,008
3,4-DHPEA-EA	0,898	0,109	-0,148	-0,064	0,266	-0,007	0,109	0,209	-0,038	0,167	-0,025	0,01
Tirosilacetato	0,345	0,348	0,597	0,261	-0,524	0,152	0,073	0,083	-0,143	0,07	-0,012	0,01
p-HPEA-EDA ox	0,951	0,031	0,149	-0,229	0,048	-0,068	-0,044	-0,013	0,056	0,09	0,004	-0,013
p-HPEA-EDA	0,912	-0,113	-0,118	-0,237	0,237	-0,092	-0,095	-0,009	-0,011	-0,107	-0,014	0,01
Pinoresinolo, 1-Acetossipinoresinolo	-0,608	0,537	-0,488	-0,092	0,203	-0,181	0,044	-0,121	-0,038	0,001	-0,046	0,006
p-HPEA-EA	0,946	-0,08	-0,054	0,153	0,057	-0,18	-0,187	0,014	-0,015	-0,031	0,01	-0,006
3,4-DHPEA-EA,H ox	0,515	-0,196	-0,258	-0,195	0,189	0,339	0,66	-0,056	0,012	-0,029	0,028	-0,001
Luteolina	-0,369	0,795	0,314	-0,307	0,049	0,094	0,022	0,11	-0,028	-0,108	0,058	-0,008
3,4-DHPEA-EA,H	-0,753	0,598	0,078	-0,155	0,156	-0,104	0,056	0,03	0,074	-0,013	0,03	0,005
p-HPEA-EA,H	0,935	0,129	-0,028	0,049	0,119	-0,2	-0,107	0,056	0,161	0,057	0,091	-0,004
Fenoli totali (mg/kg)	0,825	0,473	0,239	0,074	0,094	-0,111	0,084	-0,054	0,014	-0,028	-0,029	-0,006

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 2

- 1- Conte, P.; Fadda, C.; Del Caro, A.; Urgeghe, P.P.; Piga, A. Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods* 2020, 9, 514.
- 2- Perpetuini, G.; Prete, R.; Garcia-Gonzalez, N.; Khairul Alam, M.; Corsetti, A. Table Olives More than a Fermented Food. *Foods* 2020, 9, 178.
- 3- Anagnostopoulos, D.A.; Kamilari, E.; Tsaltas, D. Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 1128.
- 4- Cocolin, L.; Alessandria, V.; Botta, C.; Gorra, R.; De Filippis, F.; Ercolini, D.; Rantsiou, K. NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLoS ONE* 2013, 8, e69074.
- 5- Ramírez, E.; Medina, E.; García, P.; Brenes, M.; Romero, C. Optimization of the Natural Debittering of Table Olives. *LWT—Food Sci. Technol.* 2017, 77, 308–313.
- 6- Anagnostopoulos, D.A.; Tsaltas, D. Current Status, Recent Advances, and Main Challenges on Table Olive Fermentation: The Present Meets the Future. *Front. Microbiol.* 2022, 12, 797295.
- 7- Servili, M.; Settanni, L.; Veneziani, G.; Esposto, S.; Massitti, O.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Montedoro, G.F.; Corsetti, A. The use of *Lactobacillus pentosus* IMO to shorten the debittering process time of black table olives (Cv. Itrana and Leccino): A pilot-scale application. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 3869–3875.
- 8- Gökçen, İ. Phenolic compounds change in Table Olives. *Nutr. Food Sci. Int. J.* 2017, 3, 555621.
- 9- Ramírez, E.; Medina, E.; Brenes, M.; Romero, C. Endogenous Enzymes Involved in the Transformation of Oleuropein in Spanish Table Olive Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 9569–9575.

- 10- Bonatsou, S.; Tassou, C.C.; Panagou, E.Z.; Nychas, G.E. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms* 2017, 5, 30.
- 11- 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, 126.
- 12- 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, 239.
- 13- Arroyo-López, F.N.; Querol, A.; Bautista-Gallego, J.; Garrido-Fernández, A. Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* 2008, 128, 189–196.
- 14- Arroyo-López, F.N.; Romero-Gil, V.; Bautista-Gallego, J.; Rodríguez-Gómez, F.; Jiménez-Díaz, R.; García-García, P.; Querol, A.; Garrido-Fernández, A. Yeasts in Table Olive Processing: Desirable or Spoilage Microorganisms? *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 160, 42–49.
- 15- Campus, M.; Cauli, E.; Scano, E.; Piras, F.; Comunian, R.; Paba, A.; Daga, E.; Di Salvo, R.; Sedda, P.; Angioni, A.; et al. Towards Controlled Fermentation of Table Olives: LAB Starter Driven Process in an Automatic Pilot Processing Plant. *Food Bioprocess Technol.* 2017, 10, 1063–1073.
- 16- Corsetti, A.; Perpetuini, G.; Schirone, M.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Application of starter cultures to table olive fermentation: An overview on the experimental studies. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 248.
- 17- Psani, M.; Kotzekidou, P. Technological Characteristics of Yeast Strains and Their Potential as Starter Adjuncts in Greek-Style Black Olive Fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 22, 1329–1336.
- 18- Marquina, D.; Toufani, S.; Llorente, P.; Santos, A.; Peinado, J.M. Killer Activity in Yeast Isolates from Olive Brines. *Adv. Food Sci.* 1997, 19, 41–46.

- 19- Bleve, G.; Tufariello, M.; Durante, M.; Perbellini, E.; Ramires, F.A.; Grieco, F.; Cappello, M.S.; De Domenico, S.; Mita, G.; Tasioula-Margari, M.; et al. Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives. *Front. Microbiol.* 2014, 5, 570.
- 20- Ciafardini, G.; Zullo, B.A. Use of Air-Protected Headspace to Prevent Yeast Film Formation on the Brine of Leccino and Taggiasca Black Table Olives Processed in Industrial-Scale Plastic Barrels. *Foods* 2020, 9, 941.
- 21- Panagou, E.Z.; Tassou, C.C.; Katsaboxakis, C.Z. Induced Lactic Acid Fermentation of Untreated Green Olives of the Conservolea Cultivar by *Lactobacillus Pentosus*. *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 667–674.
- 22- Lombardi, S.J.; Macciola, V.; Iorizzo, M.; De Leonardis, A. Effect of different storage conditions on the shelf-life of natural green table olives. *Ital. J. Food Sci.* 2018, 30, 414–427.
- 23- Lanza, B.; Zago, M.; Carminati, D.; Rossetti, L.; Meucci, A.; Marfisi, P.; Russi, F.; Iannucci, E.; Di Serio, M.G.; Giraffa, G. Isolation and preliminary characterization of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages from table olive fermentation. *Ann. Microbiol.* 2012, 62, 1467–1472.
- 24- Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 2012 Aug;31(1):1-8.
- 25- Bevilacqua A, Corbo MR and Sinigaglia M. Selection of Yeasts as Starter Cultures for Table Olives: A Step-by-Step Procedure. *Front. Microbio.* 2012. 3:194.
- 26- Anagnostopoulos DA, Tsaltas D. Current Status, Recent Advances, and Main Challenges on Table Olive Fermentation: The Present Meets the Future. *Front Microbiol.* 2022 Jan 13;12:797295.
- 27- Chytiri, A.; Tasioula-Margari, M.; Bleve, G.; Kontogianni, V.G.; Kallimanis, A.; Kontominas, M.G. 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.* 2020, 100, 926–935.
- 28- Paba, A.; Chessa, L.; Daga, E.; Campus, M.; Bulla, M.; Angioni, A.; Sedda, P.; Comunian, R. Do Best-Selected Strains Perform Table Olive Fermentation Better than Undefined Biodiverse Starters? A Comparative Study. *Foods* 2020, 9, 135.

CAPITOLO 3

**Nuovo terreno di coltura ottenuto da
paté DMF**

3. Nuovo terreno di coltura ottenuto da pat  DMF²

3.1. Introduzione

Una novit  nel sistema di estrazione dei frantoi   rappresentata dai decanter multifase della serie Leopard DMF (Pieralisi Group S.p.A, Jesi, AN, Italia) (Figura 3.1), che funzionano senza l'aggiunta di acqua di lavorazione e con il vantaggio di recuperare due sottoprodotti: un residuo solido disidratato, costituito prevalentemente da frammenti di nocciolo e parte della frazione fibrosa, che pu  essere utilizzato come combustibile per stufe e caldaie, e un "p t ", costituito da polpa e acque di lavorazione delle olive, senza tracce di nocciolino [1].



Figura 3.1. Decanter multifase della serie Leopard DMF.

Il pat  DMF, come descritto nel capitolo 1, rappresenta un prodotto ad alto valore aggiunto per il frantoio, potendo essere riutilizzato per diversi scopi in di-

² Capitolo ottenuto da rielaborazione di articolo di cui sono co-autore: Lanza, B.; Bacceli, M.; Di Marco, S.; Simone, N.; Di Loreto, G.; Flamminii, F.; Mollica, A.; Cichelli, A. A New Culture Medium Rich in Phenols Used for Screening Bitter Degrading Strains of Lactic Acid Bacteria to Employ in Table Olive Production. *Molecules* 2024, 29, 2236. <https://doi.org/10.3390/molecules29102236>

versi campi, tra cui quello agronomico (come fertilizzante del suolo) [2], zootecnico (come integratore nell'alimentazione di bovini e ovini, poiché arricchisce il latte e i derivati di acidi grassi polinsaturi e polifenoli antiossidanti) [3] e nella produzione di energia (come biomassa per impianti di biogas) [4].

Il paté presenta un elevato contenuto di composti fenolici derivati dalla via di degradazione dell'oleuropeina e del ligstroside, con una prevalenza di secoiridoidi a basso e medio peso molecolare, quali idrossitirosolo, tirosolo, oleaceina, oleocantale e verbascoside [1, 5, 6, 7, 8].

Molti studi hanno riportato le principali proprietà dei fenoli dell'olivo, evidenziandone le attività biologiche. Nello specifico, i loro effetti sulla salute umana sono antinfiammatori, antitrombotici, anti-iperglicemici, epatoprotettivi, cardioprotettivi, antimicrobici e antitumorali [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,16].

È noto che le sostanze fenoliche sono ritenute responsabili del sapore amaro e piccante dell'olio extravergine di oliva. La relazione tra i polifenoli e l'amarrezza e la piccantezza dell'olio d'oliva è complessa, ed è difficile determinare le soglie dei polifenoli associate alle rispettive sensazioni. Alcuni autori hanno cercato di associare l'intensità delle sensazioni di amaro e piccante descritte dai degustatori di una commissione alle concentrazioni delle rispettive sostanze, ma è difficile stabilire un valore soglia [17,18].

I microrganismi, come *il Lactiplantibacillus plantarum*, possono accelerare il processo di eliminazione dell'amaro idrolizzando i composti responsabili del sapore amaro delle olive [19, 20, 21]. Il processo di lisi dell'oleuropeina e del ligstroside avviene in due fasi:

1. l'idrolisi del legame glicosidico da parte della β -glucosidasi, che porta alla formazione di agliconi di oleuropeina o ligstroside-agliconi e
2. l'idrolisi degli agliconi da parte dell'esterasi, con la formazione di acido elenolico e idrossitirosolo (dall'oleuropeina-aglicone) o tirosolo (dal ligstroside-aglicone) [22,23]. Questi ultimi fenoli, aventi un sapore non amaro [17, 24] e conservando i loro effetti nutraceutici anche dopo le fasi di lavorazione, possono contribuire a un prodotto a base di olive da tavola piacevole e salutare.

Secondo Paramithiotis et al. [25], la fermentazione lattica può aumentare il contenuto fenolico totale (TPC) sia attraverso la lisi della parete cellulare delle cellule vegetali e il loro rilascio dal vacuolo, sia attraverso l'attività β -glucosidasi esercitata da diversi ceppi di batteri lattici.

Sulla base di queste evidenze scientifiche, l'obiettivo della presente ricerca è stato quello di sviluppare un terreno di coltura a partire da scarti dell'olio d'oliva sotto forma di pat  DMF e di testarlo per la selezione di ceppi di *L. plantarum* con elevata attivit  oleuropeinolitica. I ceppi batterici saranno poi classificati in base alla loro capacit  di sopravvivere e degradare le sostanze amare normalmente presenti nel frutto dell'olivo, e potrebbero successivamente essere utilizzati per ottenere una denaturazione pi  rapida e/o pi  efficiente delle olive destinate alla produzione di olive da tavola. Infine, questo terreno di coltura potrebbe essere standardizzato e diventare un punto di riferimento come terreno selettivo per microrganismi resistenti ai fenoli e/o in grado di degradare sostanze fenoliche complesse.

3.2. Materiali e metodi

3.2.1 Campionamento del pat  di olive

Le olive della variet  *Olea europaea* L. "Dritta" (Figura 3.2) sono state raccolte nella zona centrale dell'Italia (Regione Abruzzo) e lavorate in un moderno impianto centrifugo multifase (Leopard DMF 6 Series, Pieralisi Group S.p.A., Jesi, AN, Italia) situato nel frantoio SCAL (Loreto Aprutino, PE, Italia). I campioni di sansa molto umida (p t  DMF) sono stati inseriti in sacchetti termici e trasportati rapidamente al laboratorio, dove sono stati immediatamente congelati e poi conservati a una temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'utilizzo.



Figura 3.2. Olive di *Olea europaea* L. cv. “Dritta”.

3.2.2. Caratterizzazione del pat  fresco DMF

- *pH, acidit  titolabile, umidit , ceneri e contenuto in olio*

Il pH del pat    stato misurato con un pHmetro Istek modello 730P (Istek, Inc., Seul, Repubblica di Corea).

L'acidit  titolabile   stata determinata mediante titolazione di 20 g di pat  con una soluzione di NaOH 0,1 N, utilizzando come indicatore una soluzione di fenoltaleina all'1% (*p/v*) in etanolo. I risultati sono espressi in grammi di acido citrico per 100 g di pat  fresco.

L'umidit  (M)   stata determinata mediante un processo di essiccazione.

Campioni omogeneizzati (circa 20 g) sono stati posti e pesati in un crogiolo di Pyrex, precedentemente essiccato a 105  C fino al raggiungimento del peso costante. I campioni sono stati posti in stufa a 105  C per almeno 24 ore fino al raggiungimento del peso costante (± 0.005 g). Il contenuto di umidit    stato calcolato come differenza di peso ed espresso in % con due cifre decimali.

Per determinare il contenuto di ceneri, campioni omogeneizzati (circa 5 g) sono stati posti e pesati in un crogiolo di porcellana, precedentemente essiccato a 105  C fino a peso costante. Successivamente, sono stati riscaldati a 550  C in

un forno a muffola a controllo termostatico per almeno 24 ore e fino al raggiungimento di un colore marrone-biancastro. La sostanza secca (DM) è stata calcolata utilizzando la formula $DM = 100 - M$. La materia organica (OM) è stata calcolata tramite la formula $OM = 100 - M - \text{ceneri}$. Il carbonio organico (OC) è stato calcolato considerando il 58% di OM.

Il contenuto in olio è stato determinato utilizzando un estrattore Soxhlet. L'olio è stato estratto dalla polpa di oliva essiccata utilizzata per la determinazione dell'umidità mediante lavaggi ripetuti (percolazione) con etere di petrolio 40–60 a riflusso in un'apparecchiatura di vetro speciale. L'etere è stato rimosso per evaporazione e l'olio residuo è stato pesato.

- *Composizione degli acidi grassi*

La composizione degli acidi grassi dell'olio è stata determinata secondo il metodo descritto nel Regolamento della Commissione dell'Unione Europea CEE/2568/91 e nelle sue successive modifiche (Allegato XB). La procedura impiega un sistema di gascromatografia (HRGC Mega 2 serie 8560; Carlo Erba, Milano, Italia) dotato di una colonna capillare in silice fuso SPTM-2380 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) ($60 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ di diametro interno $\times 0.2 \text{ }\mu\text{m}$ di spessore del film). Il programma di temperatura del forno prevedeva un aumento da $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $165 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocità di $20 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguito da un mantenimento a $165 \text{ }^{\circ}\text{C}$ per 23 minuti; poi da $165 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocità di $1.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$ e mantenuta a $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 min; e poi da $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocità di $2 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$ e mantenuta a $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 min. La temperatura del rivelatore era di $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Come gas vettore è stato utilizzato l'idrogeno a una pressione di testa della colonna di 60 kPa. I campioni ($0.4 \text{ }\mu\text{L}$) sono stati iniettati tramite iniezione sulla colonna.

- *L'attività dell'acqua (a_w)*

L'attività dell'acqua (a_w) è stata determinata utilizzando il misuratore di attività dell'acqua AquaLab Pre (METER Group, Pullman, WA, USA). È stata effet-

tuata una calibrazione iniziale con due soluzioni standard (a_w 0.760 e a_w 0.920). L'analisi è stata eseguita prelevando tre campioni di paté a temperatura ambiente.

- *Colore*

Il colore del paté è stato misurato utilizzando uno spettrofotometro Colour-view (Konica Minolta Optics, 2970 Ishikawa-machi, Hachioji, Tokyo, Giappone; modello CM-2600D). Il colore è stato espresso in termini di CIE (Commission Internationale de l'Eclairage): L^* (luminosità), a^* (rosso/verde), b^* (giallo/blu) e il loro derivato Chroma [$C = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$].

L^* ha valori che vanno da 0 (scuro) a +100 (chiaro), a^* va da -120 (rosso) a +120 (verde), mentre b^* va da +120 (giallo) a -120 (blu).

- *Preparazione del brodo di succo d'oliva (OJB)*

La preparazione del brodo di succo d'oliva (OJB) è illustrata nella Figura 3.3. Dopo il trasporto refrigerato, i campioni di paté prelevati al momento del recupero dal decanter sono stati filtrati con una pompa a vuoto attraverso setacci a pori di dimensioni decrescenti (dimensione minima dei pori 0.45 μm) e successivamente centrifugati due volte (3756 g, 15 min, 4 °C). Una volta rimossa la parte oleosa in superficie, è stato recuperato il surnatante o “succo”. Una parte del succo è stata trattata per la successiva iniezione in HPLC per la determinazione del contenuto fenolico iniziale; il succo rimanente è stato sterilizzato con raggi UV per 1 ora e poi aggiunto, in rapporto 1:1, a una soluzione di acqua demineralizzata sterilizzata in autoclave contenente il 2% di glucosio e lo 0.4% di estratto di lievito, ottenendo così un terreno di coltura arricchito (OJB — Olive Juice Broth) su cui testare i microrganismi oleuropeinolitici. Le provette contenenti OJB e microrganismi sono state incubate per 24 ore a 30 °C in atmosfera anaerobica rispetto a un test di crescita in brodo MRS. La percentuale di sopravvivenza in OJB è stata valutata attraverso la crescita su agar MRS. Aliquote di succo, prima e dopo la sterilizzazione UV, e OJB degradato sono state analizzate mediante HPLC per la determinazione del contenuto fenolico iniziale e residuo.

- *Test di sopravvivenza dei microrganismi in OJB*

Una parte del brodo OJB è stata iniettata nell'HPLC, mentre il resto è stato suddiviso in 35 provette sterili, ciascuna delle quali è stata inoculata con un ceppo batterico diverso di *L. plantarum* proveniente dalla collezione di microrganismi CREA-IT di Pescara. Le provette sono state incubate per 24 ore a 30 °C in brodo MRS per valutare la crescita. La crescita dei ceppi (provenienti dall'OJB e dal brodo MRS) è stata valutata attraverso la crescita su agar MRS, e i risultati sono stati espressi come unità formanti colonie (CFU) per mL. Successivamente, la percentuale di sopravvivenza è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\% \text{ di sopravvivenza} = (\log \text{CFU/mL}_{\text{OJB}}) / (\log \text{CFU/mL}_{\text{MRS}}) \times 100$$

- *Test di degradazione fenolica da parte dei microrganismi in OJB*

Il contenuto di ciascuna provetta è stato centrifugato (3 × 756 g, 15 min, 4 °C) per precipitare la sospensione batterica. Il surnatante è stato trattato per essere iniettato nell'HPLC al fine di ottenere il contenuto fenolico residuo.

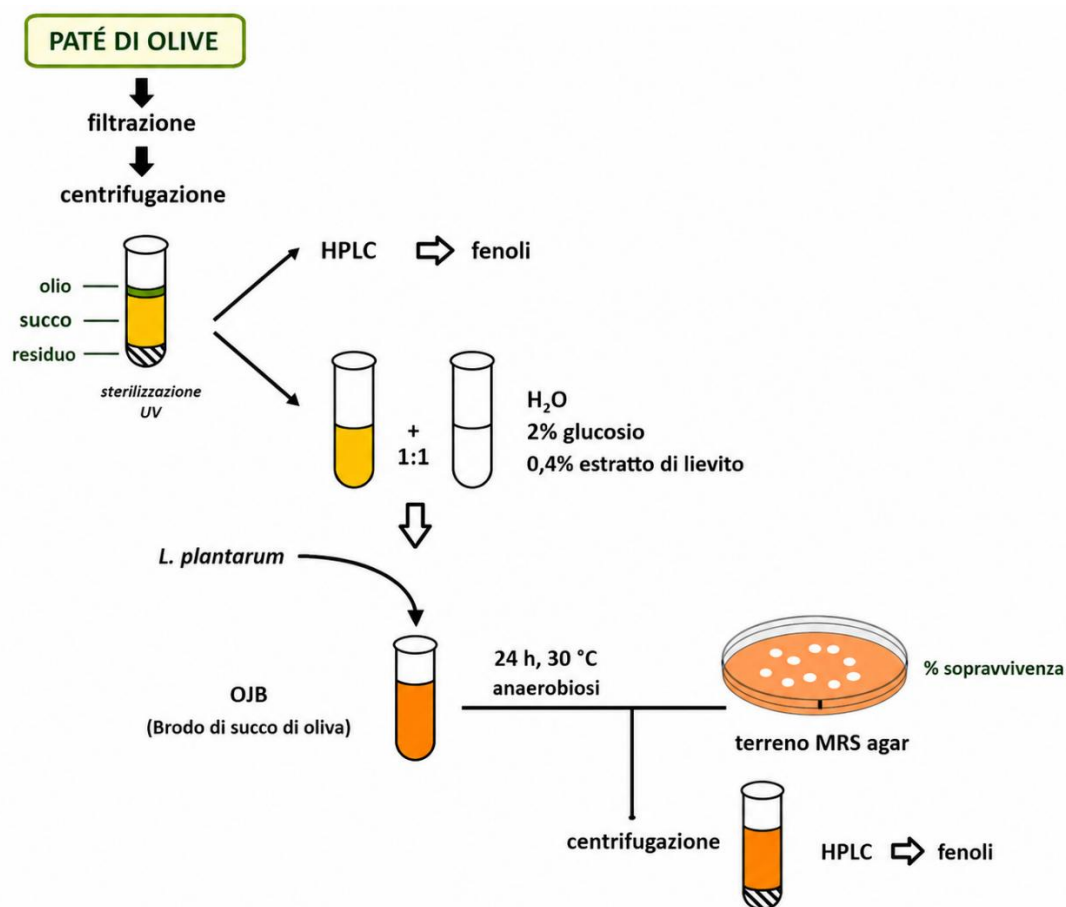


Figura 3.3- Preparazione del brodo di succo d'oliva (OJB) e test sui microrganismi [immagine tradotta in italiano e tratta da articolo di cui sono co-autore: Lanza, B.; Bacceli, M.; Di Marco, S.; Simone, N.; Di Loreto, G.; Flammini, F.; Mollica, A.; Cichelli, A. A New Culture Medium Rich in Phenols Used for Screening Bitter Degrading Strains of Lactic Acid Bacteria to Employ in Table Olive Production. *Molecules* 2024, 29, 2236. <https://doi.org/10.3390/molecules29102236>]

- *Test di fermentazione spontanea e controllata su scala di laboratorio*

I frutti di *Olea europaea* L., varietà Itrana, sono stati raccolti a mano nel loro stadio di maturazione verde-maturo (indice di Jaén pari a 1.9) nel mese di dicembre. Le olive sono state suddivise in quattro lotti da 2.7 kg (circa 700 drupe) e poste in barattoli di vetro; quindi, immerse in salamoia all'8% preparata con 80 g/L di sale marino sterilizzato IGP di Trapani, seguendo il metodo di tipo greco. Sono state valutate due diverse fermentazioni: A, fermentazione spontanea; B, fermentazione con un inoculo (*Lactiplantibacillus plantarum* B51).

La scelta di questo microrganismo si è basata sui test descritti nei due paragrafi precedenti e sulla caratterizzazione tecnologica/probiotica descritta in pre-

cedenti articoli [1, 26, 27]. Le preculture batteriche di *L. plantarum* B1 (5 mL) sono state trasferite in beute contenenti 100 mL di brodo MRS e incubate per 24 ore a 30 °C per ottenere la biomassa dell'inoculo; le cellule sono state centrifugate a 3756 g per 15 minuti a 15 °C e il pellet è stato risospeso in 100 mL di salamoia sterilizzata (80 g/L di sale marino IGP di Trapani). Le preculture batteriche di *L. plantarum* B51 (2.5 mL) sono state trasferite in beute contenenti 50 mL di brodo MRS e incubate per 24 ore a 30 °C per ottenere la biomassa dell'inoculo; le cellule sono state centrifugate a 3756 g per 15 min a 15 °C, e ciascun pellet è stato risospeso in 100 mL di salamoia sterilizzata (80 g/L di sale marino IGP di Trapani). Dopo una settimana dall'immersione delle olive nella salamoia, la coltura batterica (livello di inoculo: 6 log/mL) è stata distribuita nei barattoli di vetro e quindi incubata a temperatura ambiente. Il campionamento è stato effettuato durante l'intero processo di fermentazione dopo 25, 60, 100, 180 e 240 giorni. Abbiamo determinato la fine della fermentazione al 5° campionamento, sulla base dei parametri chimico-fisico-microbiologici analizzati. Lo studio è stato condotto in duplicato.

- *Monitoraggio del processo di fermentazione*

Durante tutto il processo di fermentazione sono stati monitorati i valori di acidità titolabile e di pH e sono state effettuate analisi microbiologiche per verificare la microflora presente.

- *Estrazione dell'olio e recupero della polpa da olive fresche*

Ogni campione era composto da 30 olive, denocciolate manualmente e triturate con un macina caffè nuovo e impiegato unicamente a questo scopo. La pasta di olive è stata riscaldata e mescolata ogni 5 minuti in un bagno d'acqua a 28°C per 30 minuti, quindi centrifugata a 3756 g per 30 minuti a 10 °C in una centrifuga refrigerata. L'olio surnatante così ottenuto è stato raccolto con una pipetta Pasteur, filtrato in presenza di solfato di sodio anidro per renderlo privo di umidità, conservato in provette di plastica Falcon® da 10

mL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) avvolte in un foglio di alluminio per tenerle al buio e infine mantenute a 4 °C fino all'analisi.

Questa procedura simula l'estrazione dell'olio d'oliva nei frantoi (cioè frantumazione, granulazione e centrifugazione) ed è stata utilizzata per prevenire il più possibile alterazioni nella qualità dell'olio.

- *Biofenoli*

L'estrazione delle sostanze fenoliche dal succo del paté è stata effettuata secondo il metodo del Consiglio Oleicolo Internazionale COI/T.20/Doc. n. 29/2009, adattato come spiegato di seguito. In primo luogo, 1 mL di succo è stato trasferito in una provetta con 1 mL di standard interno (acido siringico 0,015 mg/mL in metanolo/acqua 80/20 v/v) e agitato con il vortex per 30 s. Successivamente, sono stati aggiunti alla miscela 5 mL di metanolo/acqua 80/20 v/v, agitati con il vortex per 1 minuto, trattati con ultrasuoni in un bagno a ultrasuoni per 15 minuti e centrifugati a 3756 g per 5 minuti a temperatura ambiente.

Un'aliquota di 1 mL della fase superiore risultante è stata filtrata su PVDF 0,45 µm (Merck, Darmstadt, Germania) per essere analizzata. L'analisi HPLC degli estratti fenolici è stata effettuata utilizzando un cromatografo liquido ad alta risoluzione LC 200, dotato di un rilevatore UV/Vis Serie 200 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), un iniettore Rheodyne 7725, un anello di campionamento da 20 µL e una workstation Totalchrom (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) per l'acquisizione dei dati.

La separazione su una colonna Spherisorb ODS2 (250 × 4.6 mm di diametro interno, 5 µm; Waters, Milford, MA, USA) è stata eseguita a 25 °C con una portata costante di 1 mL/min e il seguente programma a gradiente ternario (in %): t = 0 min, A (acqua 0.2% H₃ PO₄ (v/v))/B (metanolo)/C (acetonitrile) = 96/2/2 v/v/v; t = 40 min, A/B/C = 50/25/25 v/v/v; t = 45 min, A/B/C = 40/30/30 v/v/v; t = 60 min, A/B/C = 0/50/50 v/v/v; t = 70 min, A/B/C = 0/50/50 v/v/v; t = 72 min, A/B/C = 96/2/2 v/v/v; t = 82 min, A/B/C = 96/2/2 v/v/v.

I composti eluiti sono stati rilevati a 280 nm. Innanzitutto, sono stati iniettati

20 μL della soluzione standard di calibrazione esterna per calcolare i valori dei fattori di risposta per 0.030 mg/mL di tirosolo e 0,015 mg/mL di acido sirringico. Infine, sono stati iniettati 20 μL della soluzione campione nel sistema HPLC. La quantificazione dei composti fenolici è stata eseguita in base alla concentrazione dello standard interno e al fattore di risposta.

Per quanto riguarda l'estrazione della frazione fenolica dalla polpa, dall'olio e dalla salamoia dei campioni di fermentazione su scala di laboratorio, è stata adottata la seguente procedura.

Per preparare l'estratto fenolico della polpa di oliva, 0.5 g di polpa omogeneizzata (peso considerato alla quarta cifra decimale) sono stati trasferiti in una provetta con 1 μL di standard interno (acido sirringico 0.015 mg/mL in metanolo/acqua 80/20 v/v) e agitati con il vortex per 30 s. Alla miscela sono stati aggiunti 5 mL di metanolo/acqua 80/20 v/v, agitati con vortex per 1 min, sonicati in un bagnetto a ultrasuoni per 15 min e centrifugati a 3756 g per 5 min a temperatura ambiente; 1 mL del surnatante è stato filtrato su PVDF 0,45 μm (Merck, Darmstadt, Germania) per essere analizzato.

Per preparare gli estratti fenolici di olio d'oliva, sono stati aggiunti 2.500 g di olio a 500 μL di soluzione di standard interno (acido sirringico 0.015 mg/mL in metanolo/acqua 80/20 v/v). Dopo la rimozione del metanolo sotto pressione ridotta a una temperatura $<35^\circ\text{C}$, il campione è stato disciolto in 6 mL di esano e caricato su una colonna SPE (Discovery DSCDIOL 500 mg, 6 mL; Supelco, Bellefonte, PA, USA) precedentemente condizionata con 6 mL di metanolo e 6 mL di esano. Il campione è stato quindi sottoposto a due lavaggi con 3 mL di esano e infine con 4 mL di esano/acetato di etile 90/10, per poi essere estratto con 10 mL di metanolo. Dopo la rimozione del metanolo con un evaporatore rotante a una temperatura $<35^\circ\text{C}$, il campione secco è stato solubilizzato in 1 mL di miscela metanolo/acqua 50/50 v/v e, dopo filtrazione su una membrana in PVDF da 0.45 μm , ne è stata iniettata una aliquota di 20 μL nel sistema HPLC.

Contemporaneamente all'analisi degli estratti di olive, è stata monitorata la composizione fenolica della salamoia di fermentazione. Un volume di 1 mL di salamoia è stato trasferito in un matraccio tarato da 5 mL, portato a volume con la soluzione di metanolo/acqua 80/20 (v/v) e filtrato attraverso una membrana in

PVDF da 0.45 μm . Infine, 20 μL della soluzione campione sono stati iniettati direttamente nel sistema HPLC.

Tutte le analisi sono state effettuate in duplicato per ciascun campione.

- *Statistica*

I dati derivati dai test di sopravvivenza e degradazione sono stati elaborati tramite analisi delle componenti principali (PCA), effettuata con il software Past PAleontological STatistics (Versione 2.12, Øyvind Hammer, Museo di Storia Naturale, Università di Oslo, Norvegia).

3.3 Risultati

I risultati includono dati sulla caratterizzazione chimico-fisica del pat  di DMF (Tabella 3.1), l'utilizzo del Brodo di Succo d'Oлива (OBJ) da parte dei LAB e il comportamento del ceppo con le migliori prestazioni applicato a una prova di fermentazione.

Tab. 3.1 – Caratteristiche chimico- fisiche del pat  DMF fresco. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard

Parametro	Valore
pH	4,56 $\pm$ 0,03
Acidit� titolabile (g acido citrico/100 g di pat� fresco)	0,716 $\pm$ 0,015
Acqua di attivit� (aw)	0,9883 $\pm$ 0,0025
Umidit� %	80,89 $\pm$ 0,03
Ceneri (g 100 di pat� fresco)	1,10 $\pm$ 0,05
DM (g/100 di pat� fresco)	19,11
OM (g/100 di pat� fresco)	18,01
OC (g/100 di pat� fresco)	10,45
Contenuto di olio (g/100 g di pat� fresco)	7,30 $\pm$ 0,10
L*	29,73 $\pm$ 4,94
a*	9,74 $\pm$ 2,28
b*	26,55 $\pm$ 9,16
CROMA	28,29 $\pm$ 9,38

A causa del contenuto di acidi organici presenti nelle olive (principalmente

acido malico e citrico), il paté della varietà Dritta presenta un pH acido (circa 4.5) e un'elevata acidità (0.716 g acido citrico/100 g di paté fresco). Queste caratteristiche potrebbero impedire la crescita dei microrganismi Gram-negativi e favorire lo sviluppo dei batteri lattici.

L'attività dell'acqua negli alimenti esprime la quantità di acqua biodisponibile per i microrganismi ed è utilizzata dalla Food and Drug Administration per stabilire le soglie oltre le quali gli alimenti sono soggetti all'attacco di muffe. I valori possono essere compresi tra 0 e 1, dove 1 indica un'elevata probabilità di sviluppo dei microrganismi. L'alto valore ottenuto per il nostro paté (0.9883) è sicuramente dovuto all'elevata umidità intrinseca (M) del prodotto (80.89%). Tuttavia, questo valore di umidità era inferiore a quello riscontrato in altri paté precedentemente analizzati e derivati da cultivar diverse [1], nei quali si presume che sia stata aggiunta acqua durante la lavorazione.

Gli elevati valori relativi a ceneri, sostanza secca (DM), sostanza organica (OM) e carbonio organico (OC) (Tabella 3.1) indicano che il paté presenta un'alta concentrazione di sostanze organiche, quali zuccheri, pectine, sostanze azotate, polialcoli e poliacidi. Queste caratteristiche possono rappresentare fattori di crescita per i microrganismi ed essere quindi importanti nella produzione di un terreno di coltura, poiché limiterebbero l'aggiunta di componenti extra.

È stato osservato un elevato contenuto di olio (>7%), il che potrebbe essere dovuto al fatto che la cultivar Dritta è molto ricca di olio e quindi potrebbe esserci un residuo maggiore dopo il processo di estrazione dell'olio [28]. Inoltre, il colore è stato valutato come un attributo importante per monitorare il grado di ossidazione di una matrice vegetale. Il valore di luminosità (L^*) del nostro campione indica una tendenza cromatica verso il marrone scuro. I valori positivi di a^* e b^* suggeriscono una dominante rossastra e giallastra, mentre il CHROMA (cromaticità) rivela un colore opaco.

Nella tabella 3.2 sono riportati i risultati relativi alla composizione in acidi grassi (in percentuale), con la media e la deviazione standard dell'olio estratto dal paté mediante un sistema Soxhlet, confrontati con la composizione media in acidi grassi degli oli extravergini di oliva monovarietali (MEVOO) relativi alla varietà Dritta. Come illustrato nella tabella 3.2, i dati medi di questo studio sono molto

simili a quelle pubblicate per questa cultivar [28]. La frazione oleosa dei pat  analizzati contiene percentuali ottimali di acidi grassi ω -3, ω -6 e ω -9 e non contiene acidi grassi trans. In particolare, la composizione degli acidi grassi rivela caratteristiche medie simili a quelle dell'olio d'oliva di alta qualit  [29], con un contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) superiore al 70% e un elevato rapporto MUFA/acidi grassi saturi (SFA).

Tab.3.2- Composizione degli acidi grassi della frazione oleosa del pat  DMF. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. MEVOO, olio extravergine di oliva monovarietale.

Acidi grassi	Pat� DMF	MEVOO Dritta cv. ¹	MEVOO Dritta cv. ²
C14:0 (Acido miristico)	0,06 $\pm$ 0,01		
C16:0 (Acido palmitico)	12,98 $\pm$ 0,07	13,75 $\pm$ 1,36	13,11 $\pm$ 0,35
C16:1 (Acido palmitoleico)	0,89 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,20	1,26 $\pm$ 0,07
C17:0 (Acido eptadecanoico)	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	
C17:1 (Acido eptadecenoico)	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02	
C18:0 (Acido stearico)	2,98 $\pm$ 0,07	2,65 $\pm$ 0,46	1,85 $\pm$ 0,01
C18:1 ω 9 (Acido oleico)	72,18 $\pm$ 0,13	72,83 $\pm$ 2,58	74,77 $\pm$ 0,74
C18:2 ω 6 (Acido linoleico)	9,33 $\pm$ 0,05	8,23 $\pm$ 1,35	8,02 $\pm$ 0,12
C20:0 (Acido arachidico)	0,43 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,02
C18:3 ω 3 (Acido α -linolenico)	0,65 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,02
C20:1 (Acido eicosenoico)	0,22 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,07	
C22:0 (Acido behenico)	0,13 $\pm$ 0,00		
C24:0 (Acido lignocerico)	0,03 $\pm$ 0,01		
SFA	16,66	16,90	15,14
MUFA	73,36	74,12	76,03
PUFA	9,98	8,90	8,73
Acido oleico/Acido linoleico	7,74	8,85	9,32
Acido oleico/Acido palmitico	5,56	5,30	5,70
Acido linoleico/Acido palmitico	0,72	0,60	0,61
MUFA/SFA	4,40	4,39	5,02
(PUFA+MUFA) /SFA	5,00	4,91	5,59
PUFA/SFA	0,60	0,53	0,57
Omega-6/Omega-3	14,35	12,28	11,29

¹Database nazionale di oli extravergini di oliva monovarietali (<https://www.olimonovarietali.it/en/data-base/detail/?id=DRITTA®ione=ABRUZZO>); ² Flamminii et al. [28].

Dal momento che i campioni di pat  prelevati dal decanter sono stati filtrati con una pompa a vuoto attraverso setacci a pori di dimensioni decrescenti e successivamente centrifugati due volte,   stata rimossa la parte oleosa in superficie e recuperato il surnatante o "succo". Questo   stato in parte sterilizzato con raggi UV per 1 ora e poi aggiunto, in rapporto 1:1, a una soluzione di acqua demineralizzata sterilizzata in autoclave contenente il 2% di glucosio e lo 0.4% di estratto di lievito, ottenendo cos  un terreno di coltura

arricchito (OJB — Olive Juice Broth).

La tabella 3.3 riporta tutti i composti fenolici rilevati nell'OJB prima e dopo la sterilizzazione con raggi UV. L'irradiazione UV è un metodo ampiamente diffuso per sterilizzare alimenti sia solidi che liquidi, rientrando tra le tecnologie non termiche adatte a ridurre al minimo la perdita di nutrienti e proprietà sensoriali con un basso consumo energetico [30]. Questo metodo ci ha permesso di ottenere succo sterilizzato come punto di partenza per preparare il nuovo terreno di coltura. La sua analisi ha rivelato un aumento di molti composti fenolici, come l'idrossitirosolo e il tirosolo, anche se il contenuto totale finale è risultato ridotto.

La diminuzione del contenuto totale di fenoli (TPC), sebbene minima, era prevedibile a causa dell'azione ossidante della luce [31], ma questa fase non poteva essere saltata, data la necessità di sterilizzare il substrato da inoculare.

Come specificato nell'introduzione, lo scopo di questo studio era quello di creare un nuovo terreno di coltura, il brodo di succo d'oliva (OJB), a partire dal pat  DMF (tramite il procedimento riportato in 3.2.2), e di applicarlo a ceppi batterici selezionati in grado di sopravvivere e degradare le sostanze amare normalmente presenti nel frutto dell'olivo.

Sono state testate le capacità di trentacinque diversi ceppi batterici di *Lactiplantibacillus plantarum* provenienti dalla collezione di microrganismi del CREA-IT di Pescara.

Tab. 3.3- Profilo dei singoli composti fenolici nel succo d'oliva prima e dopo la sterilizzazione UV. I valori sono espressi in mg/kg (media $\pm$ deviazione standard)

Composto fenolico (mg/kg)	Succo di oliva pre-UV	Succo di oliva post-UV
3,4-DHPEA (Idrossitirosolo)	127,5 $\pm$ 22,2	138,0 $\pm$ 19,5
p-HPEA (Tirosolo)	14,6 $\pm$ 2,8	15,6 $\pm$ 2,5
Acido p-idrossibenzoico	61,5 $\pm$ 11,2	63,4 $\pm$ 6,3
Acido vanillico	48,1 $\pm$ 10,7	34,4 $\pm$ 3,5
Acido caffeico	17,8 $\pm$ 5,8	17,4 $\pm$ 4,4
Vanillina	10,3 $\pm$ 3,8	17,4 $\pm$ 2,5
Acido p-cumarico	12,6 $\pm$ 4,9	25,2 $\pm$ 7,0
Acetato di idrossitirosolo	11,9 $\pm$ 4,3	10,6 $\pm$ 1,4
Acido ferulico	18,7 $\pm$ 5,8	65,8 $\pm$ 5,4
Verbascoside	47,8 $\pm$ 5,2	47,5 $\pm$ 4,9
Acido o-cumarico	60,3 $\pm$ 7,0	37,8 $\pm$ 6,8
3,4-DHPEA-EDA (Oleaceina)	29,6 $\pm$ 8,5	38,6 $\pm$ 6,6
Oleuropeina	17,8 $\pm$ 1,7	9,1 $\pm$ 3,1
3,4-DHPEA-EA (Aglicone dell'oleuropeina)	12,1 $\pm$ 1,2	26,2 $\pm$ 2,5
Acetato di tirosolo	15,1 $\pm$ 1,3	37,4 $\pm$ 2,2
Rutina	49,5 $\pm$ 7,5	48,7 $\pm$ 12,1
p-HPEA-EDA (Oleocantale)	25,0 $\pm$ 9,9	39,4 $\pm$ 5,2
Pinoresinolo, 1-Acetossipinoresinolo	4,8 $\pm$ 1,3	4,0 $\pm$ 0,2
Acido cinnamico	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1
p-HPEA-EA (Aglicone del ligstroside)	2,8 $\pm$ 0,9	4,4 $\pm$ 0,9
Luteolina	5,5 $\pm$ 1,7	5,4 $\pm$ 0,5
3,4-DHPEA,-EA,H	8,5 $\pm$ 1,6	6,2 $\pm$ 0,7
Apigenina	0,0	0,0
7-O-Metil-luteolina	0,0	0,0
p-HPEA,-EA,H	0,9 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1
Contenuto Fenolico Totale (TPC)	554	349

Come mostrato nella Tabella 3.4, i risultati sono incoraggianti per diversi ceppi. Sette di essi mostrano una percentuale di sopravvivenza superiore al 50% e una percentuale piuttosto elevata di degradazione del TPC. Nella colonna 2 è riportata la distribuzione della sopravvivenza dei 35 ceppi di *L. plantarum* nell'OJB rispetto al controllo nel brodo MRS. Nella colonna 3 è riportato il contenuto fenolico totale residuo dei campioni inoculati rispetto al contenuto fenolico iniziale. Tutti e sette i ceppi caratterizzati da una crescita $\geq 50\%$ in OJB (B31, B137, B28, B39, B124, B130 e B51) hanno mostrato una degradazione del contenuto fenolico totale dell'OJB $\geq 25\%$.

Tab. 3.4 – Percentuale di sopravvivenza e di degradazione del TPC (contenuto totale di fenoli) per tutti i microrganismi testati.

Ceppo	% Sopravvivenza	TPC Residuo (mg/kg)	% Degradazione TPC
B31	59	256	27
B137	54	262	25
B28	53	247	29
B39	52	250	28
B124	51	241	31
B130	51	234	33
B51	51	260	26
B138	48	261	25
B162	47	281	19
B136	47	250	28
B8	46	329	6
B2	45	318	9
B15	44	302	13
B10	44	330	5
B53	44	226	35
B1	43	331	5
B7	43	330	5
B160	43	254	27
B4	42	325	7
B25	41	227	35
B17	41	290	17
B13	41	341	2
B3	40	320	8
B21	39	224	36
B158	38	226	35
B14	38	303	13
B146	36	272	22
B23	36	225	36
B142	36	277	21
B165	36	262	25
B44	34	255	27
B19	34	320	8
B12	34	318	9
B27	32	243	30
B126	11	240	31

Il bi-plot PCA riportato nella Figura 3.4 mostra le differenze tra i ceppi. La Tabella 5 mostra la varianza spiegata dalle componenti principali (la varianza > 95% è spiegata dalla PC1).

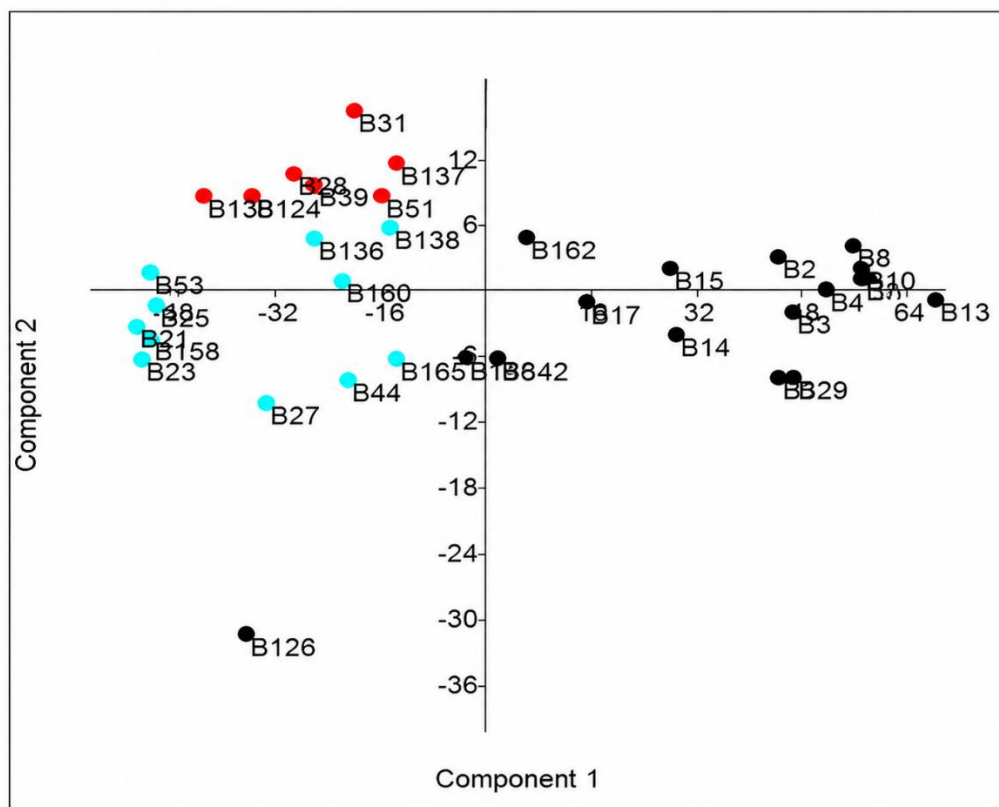


Figura 3.4. Bi-plot ottenuto tramite PCA

Tab. 3.5- Autovalori e contributi percentuali alla varianza per ciascuna componente principale (PC) dell'insieme di dati.

PC	Autovalore	%di varianza	Varianza cumulativa
1	1585,570	95,620	95,620
2	72,558	4370	99,990
3	0,068	0,010	100,00

Come mostrato nella Tabella 3.4 e nella Figura 3.4, oltre ai sette ceppi promettenti (in rosso nella Figura 3.4), vi sono altri undici ceppi (in azzurro nella figura; B138, B136, B53, B160, B25, B21, B158, B23, B165, B44 e B27) che potrebbero essere considerati interessanti in quanto mostrano sia una percentuale di sopravvivenza che una percentuale di degradazione molto elevata. Il ceppo B126 mostra un'elevata percentuale di degradazione del TPC ma una percentuale di crescita estremamente bassa, evidenziando la sua scarsa tolleranza ai prodotti di degradazione.

Sono state quindi valutate due diverse fermentazioni: A, fermentazione spontanea; B, fermentazione con un inoculo (*L. plantarum* B51). La scelta di questo

microrganismo è dipesa dai test di sopravvivenza e degradazione e dalla precedente caratterizzazione tecnologica/probiotica [1, 26, 27].

Abbiamo seguito l'intero processo di fermentazione su olive della varietà Itrana per testare la degradazione dei composti fenolici amari, quali oleuropeina, ligstroside e verbascoside, quantificando la produzione dei loro derivati non amari, quali idrossitirosolo e tirosolo. Durante tutto il processo di fermentazione sono stati monitorati i valori di acidità titolabile e di pH e sono state eseguite analisi microbiologiche per verificare la microflora presente.

Le figure 3.5 e 3.6 mostrano le variazioni dei biofenoli (idrossitirosolo e tirosolo) che si verificano nella polpa, nell'olio e nella salamoia durante sia la fermentazione spontanea che quella indotta. Come si può vedere nelle figure, i contenuti di idrossitirosolo e tirosolo sono aumentati in tutte le frazioni rispetto al frutto fresco, specialmente nelle olive inoculate, grazie all'idrolisi dei glucosidi iniziali. La loro elevata produzione è particolarmente evidente negli ultimi due campionamenti, dopo 180 e 240 giorni dall'inizio del processo di fermentazione.

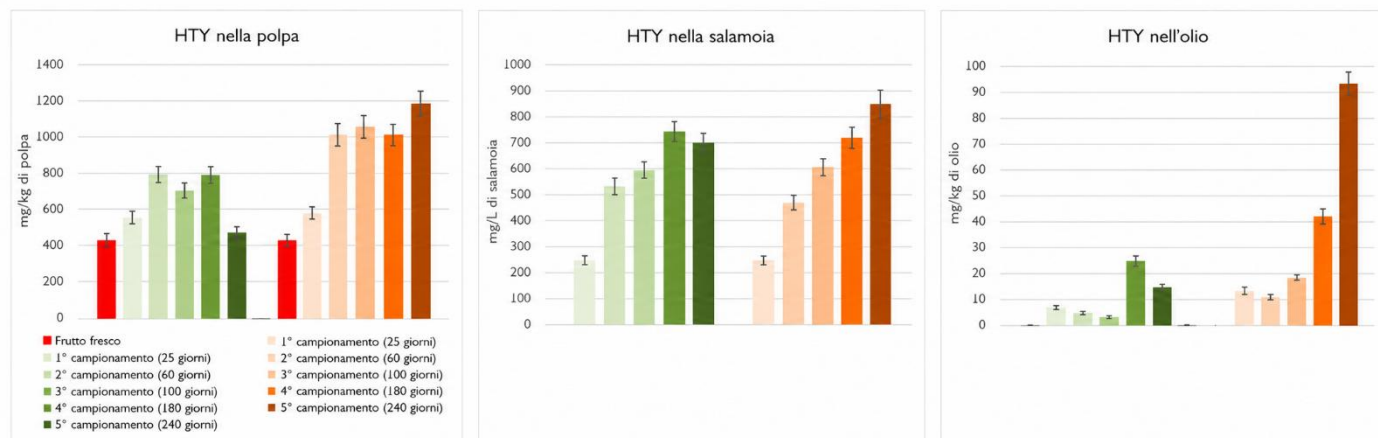


Figura 3.5- Variazioni dell'idrossitirosolo (HTY) nelle frazioni di polpa, salamoia e olio durante le fermentazioni spontanee (in verde) e inoculate (in arancione).

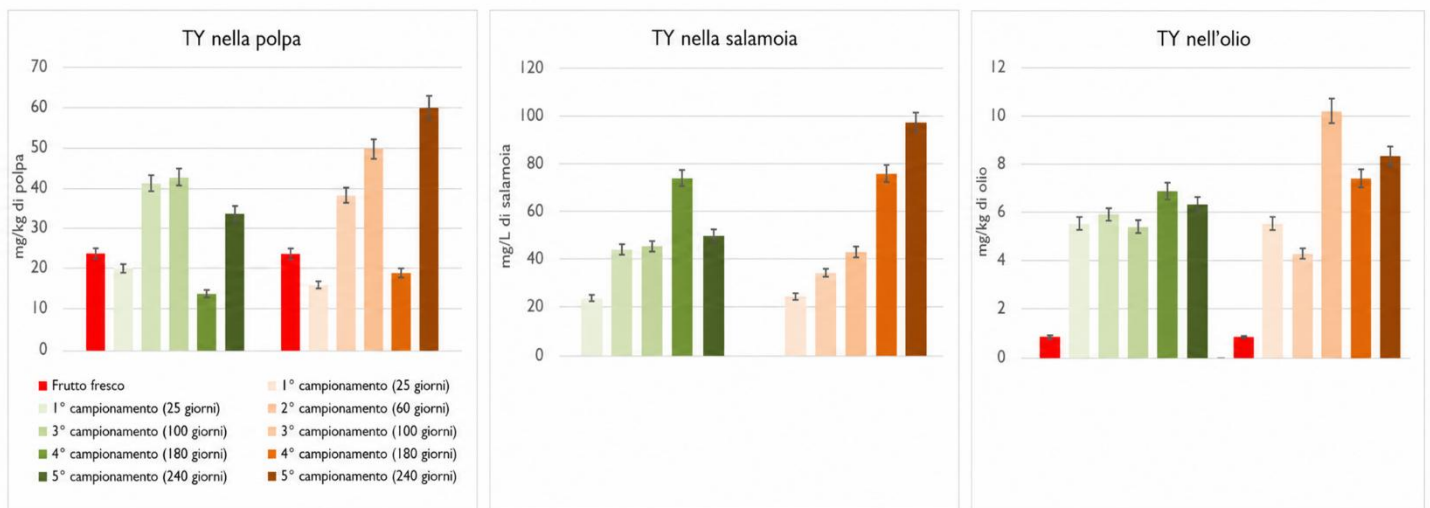


Figura 3.6- Variazioni del tirosolo (TY) nella polpa, nella salamoia e nella frazione oleosa durante le fermentazioni spontanee (in verde) e quelle indotte (in arancione).

3.4 Discussione

Il pat  Dritta DMF   caratterizzato da quanto segue:

- un elevato contenuto di materia organica;
- un elevato contenuto di olio (>7%) la cui composizione in acidi grassi   molto simile a quella degli oli extravergini di oliva, straordinariamente ricchi di acido oleico e con una buona percentuale di acido linoleico;
- un elevato contenuto di composti fenolici, rappresentati principalmente da secoiridoidi e verbascoside.

Queste caratteristiche risultano coerenti con quanto riportato da altri autori [1, 7, 31, 32], i quali descrivono il pat  di olive e gli altri sottoprodotti dell'industria olearia come matrici naturalmente ricche di composti bioattivi, capaci di conservare una quota significativa dei polifenoli originariamente presenti nel frutto. Analogamente, Di Nunzio M. e colleghi [33] hanno evidenziato come tali sottoprodotti rappresentino una promettente fonte di ingredienti funzionali per lo sviluppo di nuovi alimenti ad elevato valore nutrizionale.

Sulla base di queste caratteristiche,   stato utilizzato questo substrato per preparare un nuovo terreno di coltura (Olive Juice Broth — OJB) al fine di selezio-

nare microrganismi, principalmente batteri lattici, in grado sia di crescere in presenza di elevate concentrazioni di fenoli sia di degradare i fenoli responsabili del sapore amaro del frutto in fenoli semplici e non amari. Grazie alla sua elevata concentrazione di sostanze organiche, sono stati aggiunti come fattori di crescita solo il 2% di glucosio e lo 0.4% di estratto di lievito.

A differenza dei tradizionali terreni di coltura, come il terreno MRS, basato prevalentemente su ingredienti di origine animale, l'OJB sfrutta un sottoprodotto agroindustriale come principale fonte di nutrienti. Questo approccio è in linea con le più recenti strategie di bioeconomia circolare e di valorizzazione degli scarti agroalimentari, che promuovono la trasformazione dei residui di lavorazione in prodotti ad elevato valore aggiunto [34, 35]. Infatti, le nuove forme di nutrienti possono essere utilizzate per preparare nuovi terreni di coltura basati su fonti sostenibili, con un'impronta di carbonio pari a zero o negativa e senza origine animale. Il nuovo terreno di coltura OJB preparato con scarti di olive DMF (pâté) potrebbe essere un'alternativa adeguata ai terreni convenzionali, come l'MRS, per selezionare i batteri lattici. Oltre ai composti fenolici, nel pâté DMF sono naturalmente presenti proteine e zuccheri come fonte di azoto e carboidrati, ai quali abbiamo aggiunto estratto di lievito e glucosio come fattori di crescita. Per tanto, il terreno OJB rappresenta un esempio innovativo di applicazione dei principi dell'economia circolare, poiché trasforma un sottoprodotto dell'industria olearia in uno strumento microbiologico destinato alla selezione di colture starter funzionali.

Caratterizzare in modo adeguato la materia prima utilizzata per ottenere l'OJB nei nostri test è stato importante data la natura del prodotto. Per condurre questa sperimentazione (fermentazione delle olive su scala di laboratorio), sono state scelte olive allo stadio di maturazione verde, data la loro elevata concentrazione di sostanze amare. I parametri chimici e fisici del frutto dell'olivo dipendono da molte variabili diverse, quali la posizione geografica, l'insolazione, la temperatura media, l'escursione termica, le precipitazioni/l'irrigazione, la composizione del suolo, le diverse concimazioni, l'apporto di carbonio organico al suolo, gli stress biotici e abiotici e molte altre [36, 37]. Tutte queste variabili influenzano la composizione chimica e fisica del frutto e possono variare di anno in anno [38]; per-

tanto, è stata ritenuta di primaria importanza una caratterizzazione approfondita, soprattutto per ripetere e/o riprodurre gli esperimenti con un prodotto simile e per standardizzare la produzione di OJB.

La tabella 3.3 mostra il TPC del paté di DMF prima e dopo la sterilizzazione UV, che costituisce una fase indispensabile prima dell'inoculo. La diminuzione del TPC è probabilmente dovuta all'azione ossidante della luce. In ogni caso, questa fase ha determinato un leggero aumento dell'idrossitirosolo e del tirosolo, probabilmente grazie all'idrolisi dei secoiridoidi complessi, quali l'oleuropeina e il ligstroside, che, invece, sono diminuiti. Questo è stato già osservato da Romero et al. e Irmak S. [39, 40], che hanno evidenziato come differenti trattamenti tecnologici possano favorire la formazione di fenoli semplici ad elevata attività antiossidante. I risultati ottenuti hanno spinto a concentrare l'attenzione su sette ceppi promettenti da utilizzare come starter nella lavorazione delle olive da tavola durante la fase di deamarizzazione. Sono state valutate due diverse fermentazioni: A, fermentazione spontanea; B, fermentazione con un inoculo (*Lactiplantibacillus plantarum* B51). La scelta per un test di fermentazione specifico è ricaduta sul ceppo B51 grazie a ricerche precedenti che ne hanno dimostrato l'attività probiotica [1,26,27] e alla sua posizione in termini di percentuale di sopravvivenza e degradazione del TPC (Tabella 3.4). La Tabella 3.4 mostra le prestazioni di questo ceppo in termini di capacità di sopravvivenza nel terreno OJB e di attività di deamarizzazione. L'inoculante selezionato sembra ridurre il tempo di eliminazione dell'amaro; l'idrossitirosolo, il principale composto non amaro derivato dalla degradazione dell'oleuropeina e del verbascoside, e il tirosolo, il principale composto non amaro derivato dalla degradazione del ligstroside, sono stati prodotti più rapidamente rispetto alla fermentazione spontanea. Questo fenomeno può essere facilmente osservato nelle Figure 3.5 e 3.6.

Inoltre, nelle figure 3.5 e 3.6 si osserva un aumento piuttosto costante dei livelli di idrossitirosolo e tirosolo nella salamoia, nella polpa e nell'olio dei campioni inoculati. Tale andamento non si riscontra nei campioni sottoposti a fermentazione spontanea. Il più rapido accumulo di idrossitirosolo e tirosolo osservato nei campioni inoculati suggerisce una maggiore efficienza metabolica del ceppo selezionato rispetto alla microflora spontanea. Questo comportamento con-

ferma quanto riportato da Bonatsou et al. e da Perpetuini et al. [41, 42], secondo i quali l'impiego di colture starter selezionate consente di ottenere fermentazioni maggiormente controllate, standardizzate e riproducibili, migliorando contemporaneamente la qualità del prodotto finale.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato il potenziale dei sottoprodotti dell'industria olearia come fonte di composti bioattivi ad elevato valore aggiunto [43, 44].

Il presente lavoro si distingue rispetto agli approcci descritti in letteratura poiché il paté DMF non viene considerato esclusivamente una matrice da valorizzare dal punto di vista nutraceutico, ma anche una piattaforma biologica per la selezione di ceppi microbici adattati ad ambienti ricchi di polifenoli. Lo sviluppo dell'Olive Juice Broth rappresenta pertanto un'applicazione innovativa dei principi dell'economia circolare, consentendo la trasformazione di un sottoprodotto agroindustriale in uno strumento microbiologico potenzialmente trasferibile su scala industriale. I risultati ottenuti suggeriscono inoltre che la selezione preventiva dei ceppi in una matrice naturalmente ricca di composti fenolici possa migliorarne l'efficienza durante la fermentazione delle olive da tavola.

3.5. Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano che sette ceppi di LAB (B31, B137, B28, B39, B124, B130 e B51) sono sopravvissuti in misura superiore al 50% in un terreno OJB e hanno determinato una significativa riduzione del contenuto fenolico totale. Altri ceppi degradano il TPC in misura maggiore, ma non sono stati presi in considerazione a causa della loro scarsa capacità di sopravvivenza (inferiore al 50%). Tra questi sette ceppi, il ceppo *L. plantarum* B51 è stato la nostra scelta preferita grazie alla sua intrinseca attività probiotica dimostrata in ricerche precedenti, unita alla capacità di sopravvivere in OJB e di ridurre il tempo di eliminazione dell'amaro quando inoculato nella fermentazione delle olive, aggiungendo al contempo caratteristiche probiotiche al prodotto finale. Come previsto, questo si è dimostrato un vantaggio concreto rispetto alla fermentazione spontanea.

Il terreno OJB sviluppato a partire dal pat  di DMF si conferma come un metodo economico ed efficace per la coltura e la selezione di ceppi batterici resistenti al complesso ambiente fenolico del frutto dell'olivo. Ci  potrebbe rivelarsi utile anche nella selezione di ceppi destinati alla degradazione biologica delle acque reflue dei frantoi e di altri rifiuti liquidi o solidi ricchi di sostanze fenoliche. Ulteriori e pi  approfonditi studi che coinvolgano inoculi singoli e multipli dei migliori ceppi sopravvissuti dovrebbero essere ripetuti sui processi industriali delle olive da tavola basati sulla fermentazione naturale, data la maggiore efficienza nella degradazione delle sostanze amare, con conseguente salamoia con un TPC pi  basso e, di conseguenza, COD e BOD₅ pi  bassi, ottenendo cos  un rifiuto pi  rispettoso dell'ambiente.

La caratterizzazione del pat  DMF e lo sviluppo dell'Olive Juice Broth ampliano le possibilit  di valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria olearia, dimostrando come questi possano essere impiegati non solo come matrici ad elevato contenuto fenolico, ma anche come strumenti per la selezione di colture starter funzionali. Questa fase della ricerca consolida il collegamento tra sostenibilit  della filiera e sviluppo di nuovi alimenti funzionali.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 3

- 1- Lanza, B.; Cellini, M.; Di Marco, S.; D'Amico, E.; Simone, N.; Giansante, L.; Pompilio, A.; Di Loreto, G.; Bacceli, M.; Del Re, P.; et al. Olive pâté by multi-phase decanter as potential source of bioactive compounds of both nutraceutical and anticancer effects. *Molecules* 2020, 25, 5967.
- 2- Cucci, G.; Lacolla, G.; Caranfa, L. Improvement of soil properties by application of olive oil waste. *Agron. Sustain. Dev.* 2008, 28, 521–526.
- 3- Castellani, F.; Vitali, A.; Bernardi, N.; Marone, E.; Grotta, L.; Martino, G. Lipolytic volatile compounds in dairy products derived from cows fed with dried olive pomace. *Eur. Food Res. Technol.* 2018, 245, 159–166.
- 4- Valenti, F.; Arcidiacono, C.; Chinnici, G.; Cascone, G.; Porto, S.M.C. Quantification of olive pomace availability for biogas production by using a GIS-based model. *Biofuel Bioprod. Biorefin.* 2017, 11, 784–797. [CrossRef]
- 5- Lozano-Sánchez, J.; Bendini, A.; Di Lecce, G.; Valli, E.; Toschi, T.; Segura-Carretero, A. Macro-and microfunctional components of a spreadable olive by-product (pâté) generated by the new concept of the two-phase decanter. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017, 119, 1600096.
- 6- Cecchi, L.; Bellumori, M.; Cipriani, C.; Mocali, A.; Innocenti, M.; Mulinacci, N.; Giovannelli, L. A two-phase olive mill by-product (pâté) as a convenient source of phenolic compound: Content, stability, and antiaging properties in cultured human fibroblast. *J. Funct. Foods* 2018, 40, 751–759.
- 7- Nunes, M.A.; Costa, A.S.G.; Bessada, S.; Santos, J.; Puga, H.; Alves, R.C.; Freitas, V.; Oliveira, M.B.P.P. Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Sci. Total Environ.* 2018, 644, 229–236.
- 8- Tufariello, M.; Durante, M.; Veneziani, G.; Taticchi, A.; Servili, M.; Bleve, G.; Mita, G. Pâté olive cake: Possible exploitation of a by-product for food applications. *Front. Nutr.* 2019, 6, 3.
- 9- Rufino-Palomares, E.E.; Perez-Jimenez, A.; Reyes-Zurita, F.J.; Garcia-Salguero, L.; Mokhtari, K.; Herrera-Merchan, A.; Medina, P.P.; Peragón, J.; Lupiáñez, J.A.

- Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic triterpenoids and some of their chemical derivatives. *Curr. Org. Chem.* 2015, 19, 919–947.
- 10- Attia, Y.M.; El- Kersh, D.M.; Wagdy, H.A.; Elmazar, M.M. Verbascoside: Identification, quantification, and potential sensitization of colorectal cancer cells to 5-FU by targeting PI3K/AKT pathway. *Sci. Rep.* 2018, 8, 16939.
 - 11- Martín-Peláez, S.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Kušar, A.; Pravst, I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 760–771.
 - 12- Covas, M.I.; Nyyssönen, K.; Poulsen, H.E.; Kaikkonen, J.; Zunft, H.J.; Kieseletter, H.; Gaddi, A.; de la Torre, R.; Mursu, J.; Bäuml, H.; et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145, 333–341.
 - 13- Estruch, R.; Martínez-González, M.A.; Corella, D.; Salas-Salvado, J.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Covas, M.I.; Fiol, M.; Gómez-García, E.; López-Sabater, M.C.; Vinyoles, E.; et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2006, 145, 1–11.
 - 14- Vilaplana-Pérez, C.; Auñón, D.; García-Flores, L.A.; Gil-Izquierdo, A. Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Front. Nutr.* 2014, 1, 18.
 - 15- Termopoli, V.; Piergiovanni, M.; Cappiello, A.; Palma, P.; Famiglini, G. Tyrosol and hydroxytyrosol determination in extra virgin olive oil with direct liquid electron ionization-tandem mass spectrometry. *Separations* 2021, 8, 173.
 - 16- Beauchamp, G.K.; Keast, R.S.J.; Morel, D.; Lin, J.M.; Pika, J.; Han, Q.; Lee, C.H.; Smith, A.B.; Breslin, P.A.S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005, 437, 45–46.
 - 17- Andrewes, P.; Busch, J.H.C.; de Joode, T.; Groenewegen, A.; Alexandre, H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1415–1420.

- 18- Siliani, S.; Mattei, A.; Benevieri Innocenti, L.; Zanoni, B. Bitter taste and phenolic compounds in extra virgin olive oil: An empirical relationship. *J. Food Qual.* 2006, 29, 431–441.
- 19- Santos, M.M.; Piccirillo, C.; Castro, P.M.L.; Kalogerakis, N.; Pintado, M.E. Bio-conversion of oleuropein to hydroxytyrosol by lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 28, 2435–2440.
- 20- Ramírez, E.; Brenes, M.; De Castro, A.; Romero, C.; Medina, E. Oleuropein hydrolysis by lactic acid bacteria in natural green olives. *Food Sci. Technol.* 2016, 78, 165–171.
- 21- 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, 126.
- 22- Papanikolaou, C.; Eleni Melliou, E.; Magiatis, P. Olive oil phenols. In *Functional Foods*; Lagouri, V., Ed.; Intechopen: London, UK, 2019.
- 23- Ferro, M.D.; Santos, S.A.O.; Silvestre, A.J.D.; Duarte, M.F. Chromatographic separation of phenolic compounds from extra virgin olive oil: Development and validation of a new method based on a biphenyl HPLC column. *J. Mol. Sci.* 2019, 20, 201.
- 24- Tsimidou, M.Z. Analytical methodologies: Phenolic compounds related to olive oil taste issues. In *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*; Aparicio, R., Harwood, J., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2013; pp. 311–333.
- 25- Paramithiotis, S.; Das, G.; Shin, H.-S.; Patra, J.K. Fate of bioactive compounds during lactic acid fermentation of fruits and vegetables. *Foods* 2022, 11, 733.
- 26- Lanza, B.; Zago, M.; Carminati, D.; Rossetti, L.; Meucci, A.; Marfisi, P.; Russi, F.; Iannucci, E.; Di Serio, M.G.; Giraffa, G. Isolation and preliminary characterization of *Lactobacillus plantarum* bacteriophages from table olive fermentation. *Ann. Microbiol.* 2012, 62, 1467–1472.
- 27- Zago, M.; Lanza, B.; Rossetti, L.; Muzzalupo, I.; Carminati, D.; Giraffa, G. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains to use as starters in fermented table olives: Oleuropeinase activity and phage sensitivity. *Food Microbiol.* 2013, 34, 81–87.

- 28- Flamminii, F.; Marone, E.; Neri, L.; Pollastri, L.; Cichelli, A.; Di Mattia, C.D.
The effect of harvesting time on olive fruits and oils quality parameters of Tortiglione and Dritta olive cultivars. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2021, 123, 2000382.
- 29- Jimenez-Lopez, C.; Carpena, M.; Lourenço-Lopes, C.; Gallardo-Gomez, M.; Lorenzo, J.M.; Barba, F.J.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Bioactive compounds and quality of extra virgin olive oil. *Foods* 2020, 9, 1014.
- 30- Chiozzi, V.; Agriopoulou, S.; Varzakas, T. Advances, applications, and comparison of thermal (pasteurization, sterilization, and aseptic packaging) against non-thermal (ultrasounds, UV Radiation, ozonation, high hydrostatic pressure) technologies in food processing. *Appl. Sci.* 2022, 12, 2202.
- 31- Bendini, A.; Cerretani, L.; Carrasco-Pancorbo, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Lercker, G. Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 2007, 12, 1679–1719.
- 32- Ronca CL, Marques SS, Ritieni A, Giménez-Martínez R, Barreiros L, Segundo MA. Olive Oil Waste as a Source of Functional Food Ingredients: Assessing Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in Olive Leaves. *Foods*. 2024 Jan 6;13(2):189
- 33- Di Nunzio M, Picone G, Pasini F, Chiarello E, Caboni MF, Capozzi F, Gianotti A, Bordoni A. Olive oil by-product as functional ingredient in bakery products. Influence of processing and evaluation of biological effects. *Food Res Int.* 2020 May; 131:108940.
- 34- European Commission. A Sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the Connection between Economy, Society and the Environment, 2018. ISBN 978-92-79-94144-3.
- 35- Roig A, Cayuela ML, Sánchez-Monedero MA. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Manag.* 2006;26(9):960-9. doi: 10.1016/j.wasman.2005.07.024.
- 36- Pierfrancesco Deiana, Andrea Motroni, Maria Rosaria Filigheddu, Sandro Dettori, Giovanni Nieddu, Luca Mercenaro, Barbara Alfei, Nicola Culeddu, Mario

- Santona. Effect of pedoclimatic variables on analytical and organoleptic characteristics in olive fruit and virgin olive oil. *European Journal of Agronomy*, 2023.Vol 148, 126856.
- 37- Lechhab T, Lechhab W. Geographical and climatic influences on olive oil fatty acid composition: a comparative review across hemispheres. *Food Chem.* 2026 Feb 28; 503:147797.
- 38- Bortoluzzi L, Casal S, Cruz R, Peres AM, Baptista P, Rodrigues N. Influence of Interannual Climate Conditions on the Composition of Olive Oil from Centenarian Olive Trees. *Agronomy*. 2023; 13(12):2884.
- 39- Romero C, Brenes M, Yousfi K, García P, García A, Garrido A. Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J Agric Food Chem.* 2004 Feb 11;52(3):479-84.
- 40- Irmak S. The effects of processing methods on polyphenol content of olive. *La rivista italiana delle sostanze grasse*, 2021. Vol. XCVIII, art. 05.
- 41- Bonatsou S, Tassou CC, Panagou EZ, Nychas G-JE. Table Olive Fermentation Using Starter Cultures with Multifunctional Potential. *Microorganisms*. 2017; 5(2):30.
- 42- Perpetuini G, Prete R, Garcia-Gonzalez N, Khairul Alam M, Corsetti A. Table Olives More than a Fermented Food. *Foods*. 2020; 9(2):178.
- 43- Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Selvaggini R, Taticchi A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants (Basel)*. 2013 Dec 20;3(1):1-23.
- 44- Cuffaro D, Bertolini A, Bertini S, Ricci C, Cascone MG, Danti S, Saba A, Macchia M, Digiacomo M. Olive Mill Wastewater as Source of Polyphenols with Nutraceutical Properties. *Nutrients*. 2023; 15(17):3746.

CAPITOLO 4

Caratterizzazione del pat  di olive

4. Caratterizzazione del paté di olive³

4.1 Introduzione

Il paté di olive, ottenuto da olive da tavola verdi e nere, è un prodotto commerciale molto diffuso in tutta l'Italia, tipico della tradizione culinaria mediterranea. La sua rilevanza nella cucina mediterranea è sottolineata anche dall'esistenza di una norma turca per la pasta di olive nere, anche se manca una norma per la pasta di olive verdi [1].

Le olive da tavola sono ricche di composti antiossidanti e nutraceutici [2], pertanto l'uso del paté di olive sta diventando sempre più diffuso non solo per il suo impiego gastronomico, ma anche per i suoi effetti positivi sulla salute umana. Recenti studi hanno valutato gli effetti nutraceutici del paté di olive oltre a quelli degli antiossidanti estratti dalle acque reflue dei frantoi [3].

Il processo di produzione del paté di olive è semplice, il che ne consente una produzione su larga scala; tuttavia, permangono ancora molte incertezze riguardo al suo profilo sensoriale e nutrizionale, strettamente legati alle cultivar, agli stadi di maturazione e ai metodi di deamarizzazione.

La letteratura relativa alla produzione e alla qualità del paté di olive è molto scarsa [4,5] e non sempre viene considerato un prodotto a sé stante, ma piuttosto in associazione con altre creme, sia di origine vegetale che animale [6].

Il dinamico settore dell'industria alimentare è costantemente alla ricerca di nuovi prodotti alimentari per soddisfare i consumatori. Tra gli aspetti da considerare nella commercializzazione di nuovi prodotti, le proprietà cinestetiche rivestono un ruolo essenziale [7].

Poco si sa anche sulle preferenze dei consumatori di olive da tavola in relazione alle proprietà cinestetiche, considerate estremamente interessanti in quanto caratterizzano gli elementi di un alimento. L'impatto della consistenza sulle scelte e sulle preferenze alimentari è significativo (oltre il 30%) [8]. I cambiamenti di

³ Capitolo ottenuto da rielaborazione di articolo di cui sono co-autore: Lanza, B.; Bacceli, M.; Simone, N. *Development of a Specific Lexicon to Describe Sensory and Textural Characteristics of Olive Paté*. *Appl. Sci.* 2023, 13, 11745. <https://doi.org/10.3390/app132111745>

consistenza in un alimento possono anche influenzare la percezione del sapore attraverso la via olfattiva [9]. Pertanto, le proprietà di consistenza rappresentano un vero e proprio punto di controllo per la percezione della qualità del cibo.

La consistenza strumentale dei campioni viscosi può essere valutata mediante un metodo di estrusione inversa relativamente semplice, rapido ed economico, utile per la caratterizzazione degli alimenti e il controllo di qualità [10]. Questo test può essere applicato a un'ampia gamma di prodotti, quali yogurt mescolato [11], kiwi [12], concentrati di proteine di soia [13], porridge e pasta d'aglio [14,15], gel di latte acido [16] e miele [17]. È stato utilizzato anche per valutare il dodol, un alimento tradizionale asiatico noto per le sue proprietà sensoriali uniche [18].

La matrice acqua/olio dei paté di oliva garantisce un carico di polifenoli maggiore rispetto alla singola matrice olio perché include anche tutti quei composti che per loro natura sono solubili in acqua.

Pertanto, uno degli obiettivi conseguiti è stato quello di caratterizzare il paté di olive dal punto di vista sensoriale e texturale allo scopo di valorizzare tale prodotto emergente che tanto interessa la filiera olivicola.

4.2. Materiali e Metodi

4.2.1. Sviluppo del lessico sensoriale

Di seguito viene riassunto il procedimento per lo sviluppo del lessico in diverse fasi, secondo i suggerimenti di Lawless e Civille [19]:

1. studio della bibliografia relativa ad alimenti simili;
2. descrizione del prodotto «paté di olive» utilizzando diversi termini;
3. eliminazione degli attributi generici e superflui;
4. sviluppo e convalida dell'elenco finale dei descrittori per il lessico;
5. creazione della scheda di profilo per il paté di olive;
6. formazione della giuria utilizzando i riferimenti.

4.2.2. Panel di assaggiatori

Il CREA-IT di Pescara dispone di un panel di assaggio di olive da tavola composto da dodici membri (più un capo Panel e un vicecapo Panel), approvato e riconosciuto dal Consiglio Oleicolo Internazionale (COI), operativo dal 2006, e di una commissione di degustazione ufficiale anche per gli oli di oliva vergini. Questa esperienza ha consentito ai membri della commissione di percepire gli attributi specifici del pat  di olive e ha migliorato le loro capacit  di selezionare un lessico specifico.

Per questo progetto sono state necessarie venti ore di formazione per istruire i degustatori della commissione. La commissione   composta come segue: 10 donne e 4 uomini, di et  compresa tra i 35 e i 70 anni. Tutti possiedono almeno 5 anni di esperienza nell'analisi sensoriale delle olive da tavola e sono certificati come degustatori professionisti di olio extravergine di oliva dal Ministero dell'Agricoltura, della Sovranit  Alimentare e delle Foreste (ex-MIPAAF).

4.2.3. Selezione dei campioni

Il set di campioni   stato eterogeneo e rappresentativo dell'intera categoria di prodotti, spaziando dal pat  di olive verdi a quello di olive mature fino a quello di olive nere, da paste pi  granulose a paste meno granulose, ecc. Tutti i campioni sono stati forniti dalla Ficacci Olive Co. (Castel Madama, Roma, Italia).

I campioni sono stati ottenuti da cinque diverse cultivar di olive, quali Nocellara del Belice, Bella di Cerignola, Nocellara etnea, Itrana e Hojiblanca.

4.2.4. Processo di valutazione

L'analisi descrittiva quantitativa (QDA)   stato il metodo descrittivo sensoriale scelto, in quanto fornisce dati sia qualitativi che quantitativi;   infatti in grado di creare nuovi attributi e valutarne l'intensit , seguita dall'analisi statistica dei risultati e dall'ottenimento di un profilo sensoriale dell'alimento analizzato.

La fase di addestramento   stata svolta da una serie di panel di consenso; le valutazioni sono state invece effettuate da singoli panel ripetuti.

Tutti i campioni sono stati presentati ai membri della giuria in piccoli bicchierini a temperatura ambiente. Il numero di campioni era sempre lo stesso. I membri della giuria erano tutti muniti di prodotti per la pulizia del palato (acqua frizzante) e di palette per il caffè. Tutti i campioni erano contrassegnati da un codice in cieco per i membri della giuria, in modo che solo il capo panel conoscesse l'identità del campione. Per ogni sessione della giuria sono stati valutati da tre a quattro campioni.

4.2.5. Selezione e convalida dei descrittori

I descrittori caratteristici vengono individuati tramite un consenso raggiunto nel corso di una tavola rotonda [20]. Durante la tavola rotonda, il responsabile del panel conduce una discussione basata su una serie di campioni provenienti da prodotti di origine nota, illustrando le caratteristiche specifiche più rilevanti del paté di olive. Il metodo della tavola rotonda è uno strumento molto potente per estrapolare i descrittori specifici di un prodotto direttamente dalle sensazioni percepite dalla giuria. Consente di ottenere descrittori molto più solidi, poiché sono il risultato diretto delle capacità descrittive dei membri della giuria. Dopo questa discussione che coinvolge tutti i giurati, viene stilato un elenco di tutti i possibili descrittori. L'elenco dei descrittori dovrebbe seguire un ordine preciso e logico in cui le variabili sensoriali sono disposte in termini di:

- sensazioni negative, ovvero i difetti che si possono riscontrare nei campioni di paté, da quelli tipici delle olive da tavola ad alcune caratteristiche degli oli d'oliva;
- sensazioni olfattive/gustative;
- attributi cinestetici (consistenza) [21].

Al termine della valutazione, l'affidabilità e la validità di ciascun descrittore possono essere valutate in base alla sequenza di + (presenza) o — (assenza) assegnata da ciascun degustatore per il descrittore [20].

Se la sequenza è uniforme almeno all'80%, significa che il descrittore è stato inter-

pretato in modo univoco dall'intera commissione. Al contrario, se la sequenza presenta lo stesso numero di segni (+) e (-), il descrittore non è stato interpretato correttamente o in modo univoco dall'intera commissione. In questo caso, ci sono due possibili soluzioni: o eliminare il descrittore oppure, se è di una certa importanza, intensificare la formazione della giuria ripetendo la discussione della tavola rotonda per quel descrittore specifico. Il descrittore riconosciuto da meno del 50% dei giurati viene eliminato durante la validazione perché non sempre si riscontra chiaramente nel prodotto.

La selezione dei descrittori è stata, quindi, condotta seguendo i principi comunemente adottati nella QDA, privilegiando esclusivamente attributi in grado di risultare discriminanti per la caratterizzazione del paté di olive. Dopo una fase preliminare di raccolta dei termini descrittivi derivati dalla letteratura e dall'esperienza del panel, ciascun descrittore è stato sottoposto a discussione collegiale durante specifiche sessioni di consenso, con l'obiettivo di verificarne la chiarezza semantica, la pertinenza rispetto alla matrice alimentare e l'assenza di sovrapposizioni con altri attributi. Sono stati pertanto eliminati i termini ritenuti ridondanti, poco discriminanti o suscettibili di interpretazioni differenti da parte degli assaggiatori, mantenendo esclusivamente quelli caratterizzati da una definizione univoca e da una reale capacità descrittiva.

La validazione del lessico è stata successivamente effettuata valutando il grado di concordanza tra gli assaggiatori durante le prove di consenso. In accordo con la metodologia proposta in letteratura, un descrittore è stato considerato validato quando è stato riconosciuto in modo uniforme da almeno l'80% dei componenti del panel, mentre gli attributi caratterizzati da una scarsa riproducibilità o da un limitato potere discriminante sono stati eliminati oppure ridefiniti attraverso ulteriori sessioni di addestramento. Tale procedura ha consentito di ottenere un lessico costituito da descrittori chiaramente definiti, riproducibili e specificamente adattati alle caratteristiche del paté di olive.

Al fine di uniformare ulteriormente l'utilizzo della scala di intensità, ciascun descrittore è stato associato a specifici standard sensoriali costituiti da alimenti o sostanze di riferimento previamente selezionati. L'impiego di tali standard ha permesso di ancorare la percezione degli assaggiatori a livelli di intensità condivisi,

riducendo la variabilità individuale e migliorando la ripetibilità delle valutazioni. Questo approccio è coerente con le raccomandazioni internazionali per l'addestramento dei panel sensoriali e rappresenta uno degli elementi qualificanti della metodologia sviluppata nel presente studio.

Di seguito è riportato un lessico sensoriale per il paté di olive, che include tutte le definizioni dei descrittori scelti.

Sensazioni negative

- *Fermentazione putrida*: sensazione olfattiva percepita direttamente e/o per via retronasale che ricorda l'odore di liquami o di uova marce; caratteristica delle fermentazioni anomale dovute allo sviluppo di microrganismi che degradano la materia organica [22,23].
- *Fermentazione butirrica*: sensazione olfattiva percepita direttamente e/o per via retronasale che ricorda il burro o il formaggio; caratteristica di fermentazioni anomale dovute allo sviluppo di anaerobi butirrici [22,23].
- *Zapateria*: sensazione olfattiva percepita direttamente e/o per via retronasale che ricorda il cuoio marcio; caratteristica di fermentazioni anomale dovute allo sviluppo di microflora che metabolizza l'acido lattico per produrre acido propionico e acidi grassi volatili [22,23].
- *Fermentazione alcolica/acetica*: sensazione olfattiva/gustativa percepita direttamente e/o per via retronasale che ricorda il vino o l'aceto; caratteristica di fermentazioni anomale dovute a lieviti o batteri eterofermentanti [22,23].
- *Muffa*: sensazione olfattiva/gustativa percepita direttamente e/o per via retronasale, caratteristica delle olive attaccate da muffe [23].
- *Cotto*: sensazione olfattiva percepita direttamente e/o per via retronasale, caratteristica delle olive che hanno subito un riscaldamento eccessivo in termini di temperatura e/o durata durante la pastorizzazione o la sterilizzazione, che ricorda le verdure bollite o lo zucchero caramellato [23].
- *Saponoso*: sensazione olfattiva/gustativa che ricorda il sapone; caratteristica delle olive trattate con liscivia (metodi di Siviglia e Castelvetro) che non

sono state risciacquate a sufficienza o consumate poco dopo la deceratura [23].

- *Metallico*: sensazione olfattiva/gustativa che ricorda i metalli. La sensazione metallica è causata dalla presenza di ioni Fe. Si riscontra soprattutto nelle olive annerite per ossidazione a cui sono stati aggiunti sali ferrosi, come il gluconato o il lattato ferroso, utilizzati come stabilizzatori del colore (sistema californiano e olive nere essiccate al forno) [23].
- *Rancido*: sensazione olfattiva percepita direttamente e/o per via retronasale, caratteristica delle olive che hanno subito un processo di irrancidimento [23].

Sensazioni olfattive/gustative:

- *Salato*: sensazione percepibile principalmente nella zona laterale-anteriore della lingua. È associata alle soluzioni acquose addizionate con cloruro di sodio e, quindi, alla concentrazione delle salamoie di fermentazione o di confezionamento [23].
- *Amaro*: sensazione percepibile principalmente alla base della lingua. È associata alla presenza di sostanze amare, soprattutto polifenoli. Può quindi risultare più intensa nelle preparazioni in cui la rimozione dell'amaro non avviene chimicamente, ma microbiologicamente (nel sistema greco o naturale) [23].
- *Acido*: sensazione percepibile principalmente nella zona latero-posteriore della lingua. È associata alla presenza di acidi naturalmente presenti (ad es. acido tartarico, malico o citrico) o prodotti durante la fermentazione lattica da batteri lattici omo- ed etero fermentanti (ad es. acido lattico, acido acetico), ma può anche dipendere da un uso inappropriato di acidi quali correttori di acidità o antiossidanti (ad es. acido citrico, acido ascorbico). La sensazione di acidità si riscontra anche in quelle olive la cui preparazione prevede l'aggiunta di aceto (ad esempio, le olive di Kalamata) [23].
- *Piccante*: una sensazione tattile piccante (formicolio) simile al bruciore, ma non associata ad alte temperature. La sensazione è causata da alcune sostanze chimiche in grado di stimolare direttamente i recettori del calore presenti sulle mucose (in questo caso, la gola) con cui entrano in contatto. È associata prin-

cipalmente alle olive verdi con un elevato contenuto di oleocantale [24,25]. Può dipendere anche dall'olio aggiunto o da spezie piccanti (ad es. il peperoncino).

- *Fruttato*: sensazioni olfattive percepite direttamente e/o retro-olfattivamente, a seconda della varietà di olive e delle caratteristiche del frutto sano e fresco, sia verde che maturo.
- *Astringenza*: sensazione di secchezza del cavo orale causata dalla perdita della capacità lubrificante della saliva, caratterizzata da contrazione delle gengive, sensazione di ruvidità sulla lingua e da una marcata diminuzione della salivazione.
- *Aromatico/speziato*: sensazioni olfattive percepite direttamente e/o retro-olfattivamente, dovute al rilascio di sostanze aromatiche di origine vegetale provenienti dalle spezie aggiunte (ad esempio origano, finocchio, timo e maggiorana). Può dipendere anche dalle varietà di olive.

Attributi cinestetici (consistenza):

- *Consistenza*: attributo relativo alla resistenza che un alimento oppone alla deformazione. Viene valutato attraverso la percezione della forza necessaria per premere l'alimento contro le parti boccali.
- *Fibrosità*: attributo relativo alla percezione della forma e dell'orientamento delle particelle allungate dell'alimento (fibre vegetali). Viene valutato attraverso la percezione delle fibre tra la lingua e il palato durante la masticazione.
- *Coesività*: attributo che descrive la tendenza, durante la masticazione, a formare una massa compatta difficile da deglutire.
- *Adesività*: attributo che descrive il grado di aderenza di un alimento ai denti e/o al palato durante la masticazione.
- *Solubilità*: attributo che misura la velocità con cui l'alimento si scioglie a contatto con la saliva.
- *Oleosità*: attributo legato alla percezione di una pellicola untuosa che ricopre la superficie del cavo orale durante la masticazione e permane fino al termine della stessa.

- *Masticabilità*: attributo relativo al numero di masticazioni necessarie per ridurre un alimento a una consistenza che ne consenta la deglutizione.
- *Granulosità*: attributo percepibile al palato dovuto alla presenza di particelle (granelli) nella struttura dell'alimento.

4.2.6. Creazione di una scheda di profilo specifica

Questa nuova scheda di profilo sensoriale ha mantenuto la stessa struttura della scheda di profilo sensoriale delle olive da tavola [23], in cui nella parte superiore sono riportate le sensazioni negative, al centro quelle olfattivo-gustative e nella parte inferiore le proprietà cinestetiche. Alla fine della scheda è stata aggiunta una scala edonistica di Likert a cinque punti con emoji per valutare l'accettabilità del prodotto, trattandosi di una novità per il nostro panel. Ogni degustatore sceglie una delle emoji in base al proprio livello di soddisfazione globale, dalla più deludente, corrispondente al punteggio 1, alla più piacevole, corrispondente al punteggio 5 [26]. Inoltre, l'uso delle emoji per la scala edonistica di Likert rende la valutazione più semplice se applicata ai bambini.

La figura 4.1 mostra la scheda di profilo sensoriale sperimentale utilizzata per la degustazione.

4.2.7. Formazione dei membri del Panel

- *Selezione degli standard*

Gli standard sono sostanze, alimenti o preparazioni formulate con concentrazioni note di specifici composti, necessari per addestrare gli assaggiatori a riconoscere correttamente l'intensità percepita di un attributo sensoriale, costituendo un punto di riferimento oggettivo che permette agli assaggiatori di attribuire la stessa intensità a uno stesso stimolo sensoriale.

La formazione degli assaggiatori è stata effettuata utilizzando alimenti di qualità costante, facilmente reperibili in tutto il mondo. Per le sensazioni negative e olfattive/gustative, ci siamo basati su precedenti esperienze nel campo delle olive

da tavola e dell'olio d'oliva utilizzando alcune sostanze chimiche, quali il 2-mercaptoetanololo, l'acido butirrico e l'acido cicloesancarbossilico per le fermentazioni anomale, l'olio d'oliva rancido per il difetto di rancido, e NaCl, chinino e acido lattico per le sensazioni salato, amaro e acido, rispettivamente [27]. Per ogni attributo cinestetico, abbiamo scelto come standard un paio di alimenti che possono essere collocati nella parte più bassa e più alta della scala, con valori mediani rispettivamente di 2.0–3.0 e 8.0–10.00 (Figura 4.2), quali: formaggi Philadelphia e Leerdammer per valutare la consistenza; pesche e ananas sciroppati per la fibrosità; fette biscottate e briciole di pane da sandwich per la coesione; yogurt magro e burro di arachidi per l'adesività; tuorlo d'uovo sodo e maionese Calvé per la solubilità; latte vaccino intero e margarina per l'oleosità; banana e prugne secche snocciolate per la masticabilità; hummus di ceci e cous-cous per la granulosità (Figura 4.3).

4.3. Studio sperimentale

4.3.1. Campionamento

L'azienda italiana Ficacci Olive Co. (Castel Madama, RM, Italia) ha fornito 40 campioni di paté di olive provenienti da cinque diverse cultivar di *Olea europaea* L. (Bella di Cerignola, Nocellara del Belice, Hojiblanca, Nocellara etnea e Itrana). Il calendario del progetto ha previsto l'invio di quattro lotti al nostro centro di ricerca.

4.3.2. Analisi sensoriale

I campioni vengono valutati come sopra descritto, utilizzando la scheda di profilo mostrata nella Figura 4.1.

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 4.1 - Scheda di profilo sensoriale per il paté di olive.

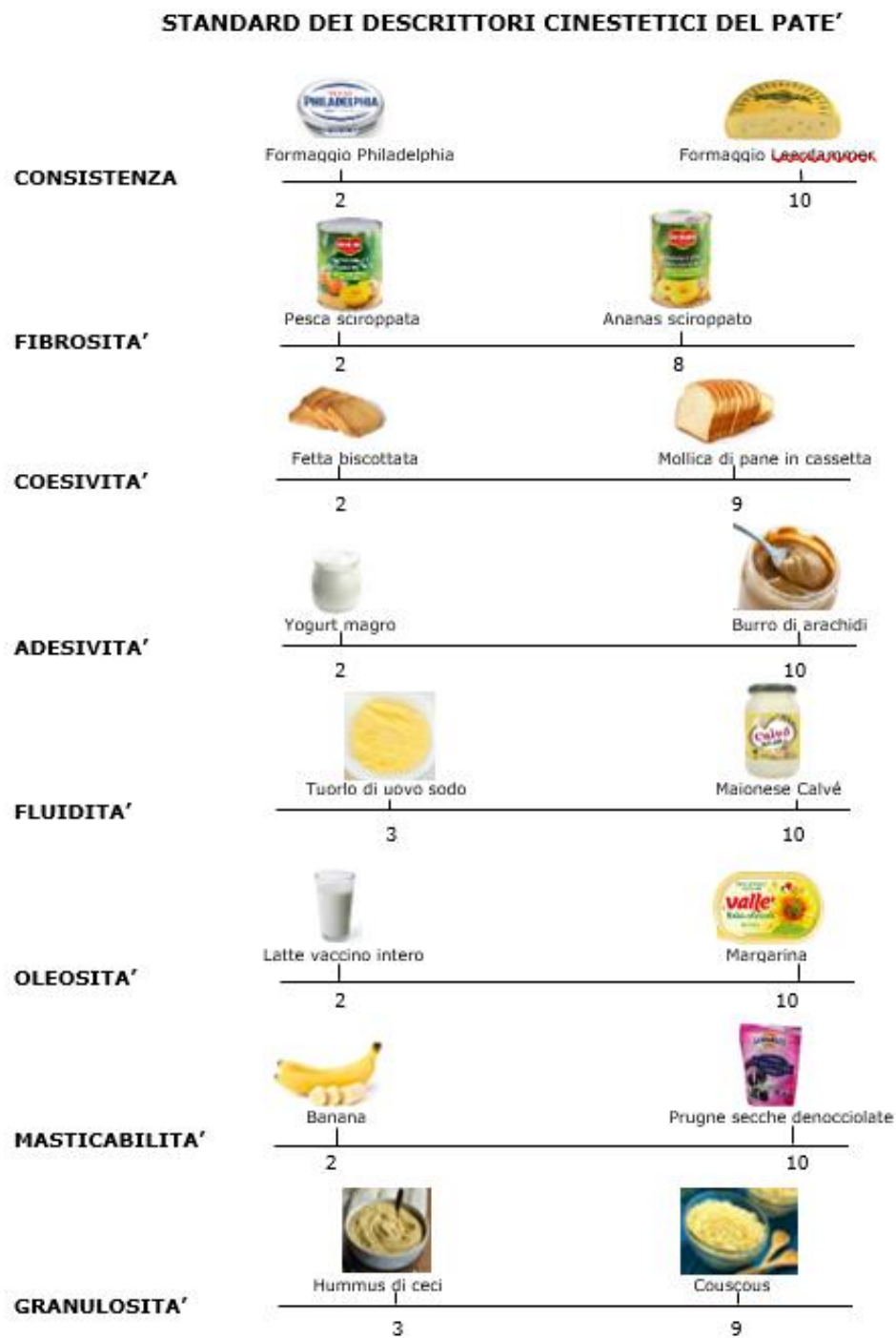


Figura 4.2- Valori mediani degli standard relativi agli attributi cinestetici.



Figura 4.3. - Immagine degli standard alimentari finali scelti per le proprietà cinestetiche.

4.3.3. Analisi della texture

L'analisi della Texture è stata eseguita con il Texture Analyser TA.XT_PlusC TM (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Regno Unito) dotato di una cella di carico da 10 kg, effettuando un test di "estrusione di ritorno" che utilizza una sonda circolare da 4 cm (P/40) e un contenitore cilindrico in plexiglass da 5 cm in cui è stato collocato il campione (Fig. 4.4).

La sonda esegue una compressione, spingendo verso il basso il campione fino a quando il prodotto non viene estruso verso l'alto e attorno al disco circolare, come mostrato nella Figura 4.5. Questo test fornisce misure di “consistenza” e contemporaneamente di “coesività/pastosità” del prodotto.

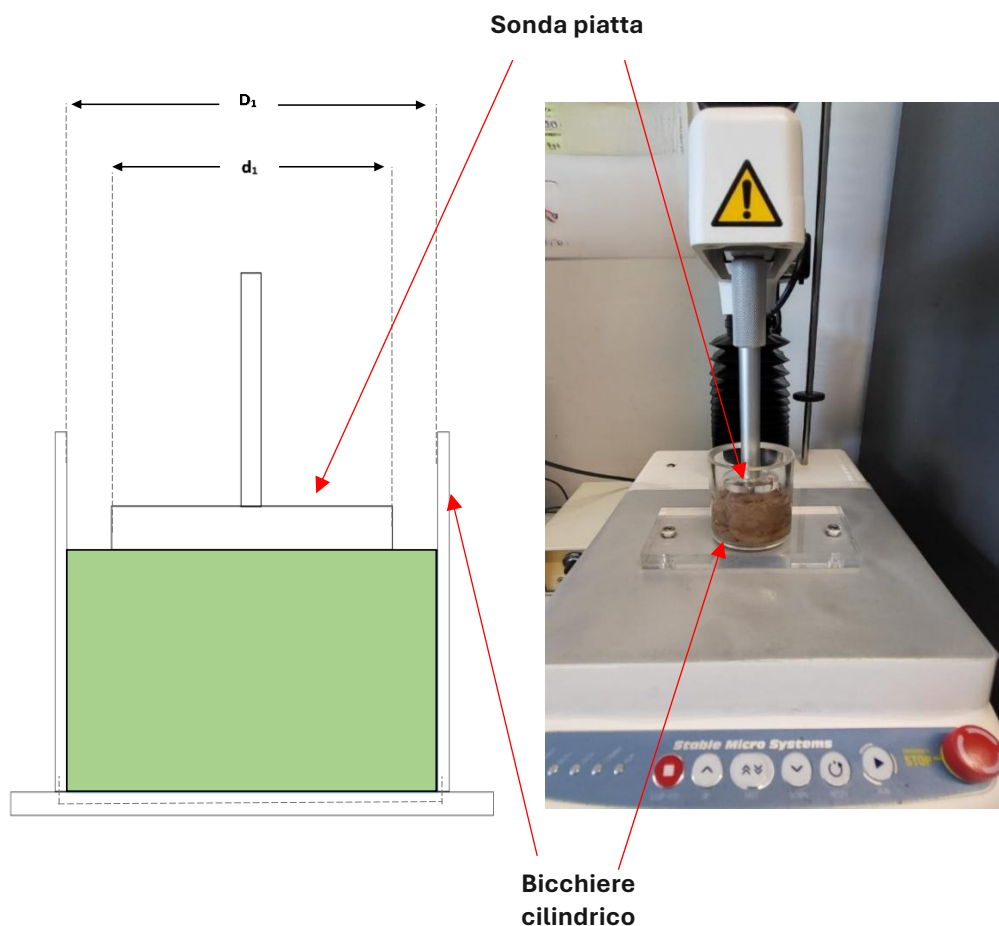
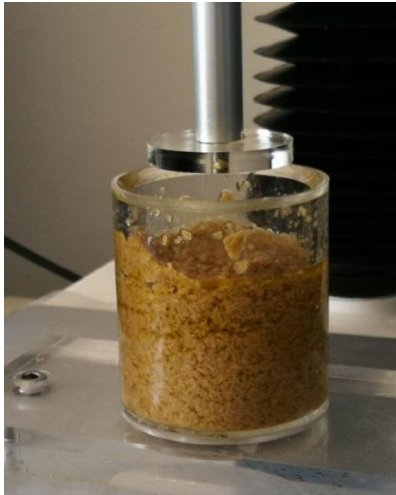


Fig.4.4 – Meccanismo di funzionamento di Texture Analyser durante test di estrusione di ritorno

(a)



(b)



(c)



(d)



Figura 4.5. Prova di estrusione di ritorno (a–d), fasi operative principali con un campione di pat  di olive.

Il segnale emesso viene rilevato e inviato al PC utilizzando uno specifico software proprietario (Texture Exponent Connect versione 7.0). Il segnale viene trasformato in un grafico forza/tempo, come mostrato nella Figura 4.6.

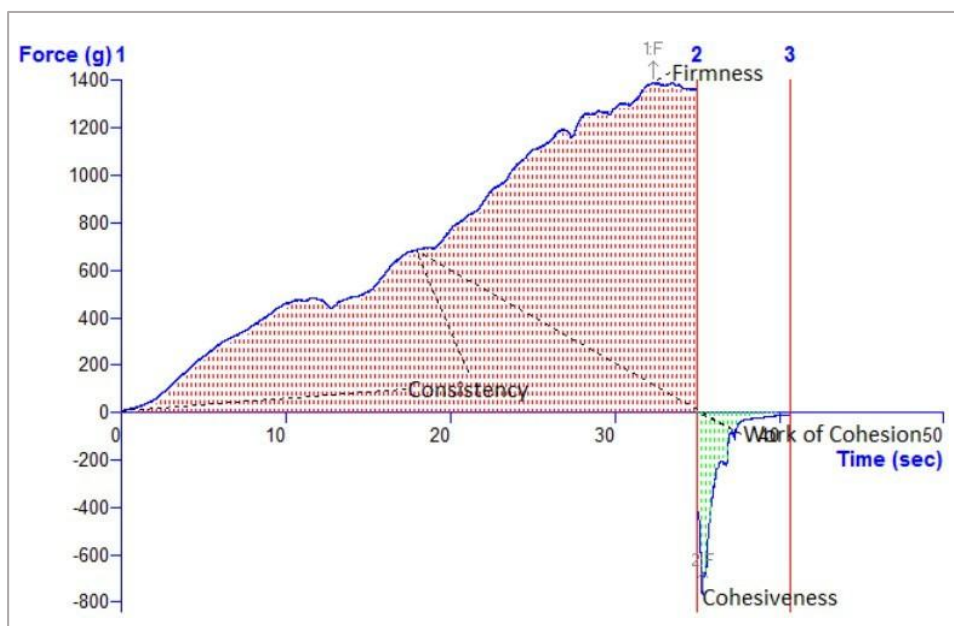


Figura 4.6. Grafico forza/tempo risultante dal segnale emesso dalla sonda durante la prova di estrusione a ritroso.

I parametri considerati nella prova di estrusione di ritorno sono:

- durezza;
- consistenza;
- coesività;
- lavoro di coesione.

La *durezza* è la forza massima applicata dalla sonda per penetrare all'interno del campione. È una proprietà che descrive la resistenza del prodotto alla deformazione. Nella Figura 4.6 è rappresentata dal picco positivo della forza massima. Valori di consistenza più elevati indicano una maggiore solidità dei campioni.

La *consistenza* è una proprietà strutturale correlata alla compattezza, allo spessore e alla viscosità di un materiale liquido o semisolido. È rappresentata nel grafico come l'area sotto la curva positiva.

La *coesività* esprime la forza necessaria alla sonda per staccarsi dal campione ed è determinata dalle attrazioni intramolecolari. È correlata alla viscosità interna

ed è rappresentata dal picco negativo nel grafico forza/tempo. Più i valori sono negativi, più i campioni sono coesivi.

Il *lavoro di coesione* è un indice di viscosità visualizzato nel grafico nell'area negativa sotto la curva. Ci fornisce informazioni sulla viscosità e sulla coesività del campione, poiché il picco è più alto quando il campione è più resistente al sollevamento della sonda.

4.3.4. *Analisi statistica dei dati*

L'analisi statistica dei dati sensoriali è stata effettuata considerando i valori mediani, il coefficiente di variazione robusto (CVr%) e la deviazione standard robusta, facendo riferimento al programma statistico specifico per le olive da tavola fornito dal COI/OT/MO/Doc.1/Rev.3 Allegato 3: *Analisi sensoriale delle olive da tavola - programma informatico* [14]. Esso consente di mettere in relazione i profili sensoriali (grafici a ragnatela). Le analisi statistiche dei dati relativi alla consistenza sono state effettuate tramite un test ANOVA a una via e una classificazione gerarchica ascendente (AHC) con la licenza XLStat Premium—Student (Lumivero, Denver, CO, USA).

4.4. Risultati

I dati sensoriali sono stati convalidati in base ai valori di CVr%, risultando tutti inferiori al 20%. I profili sensoriali del paté di olive sono stati ricavati da tutti i descrittori della scheda di profilo espressi come valori mediani e sono visualizzati come grafici a ragnatela, con colori distinti per ciascuna varietà e sovrapposti tra loro (Figura 4.7).

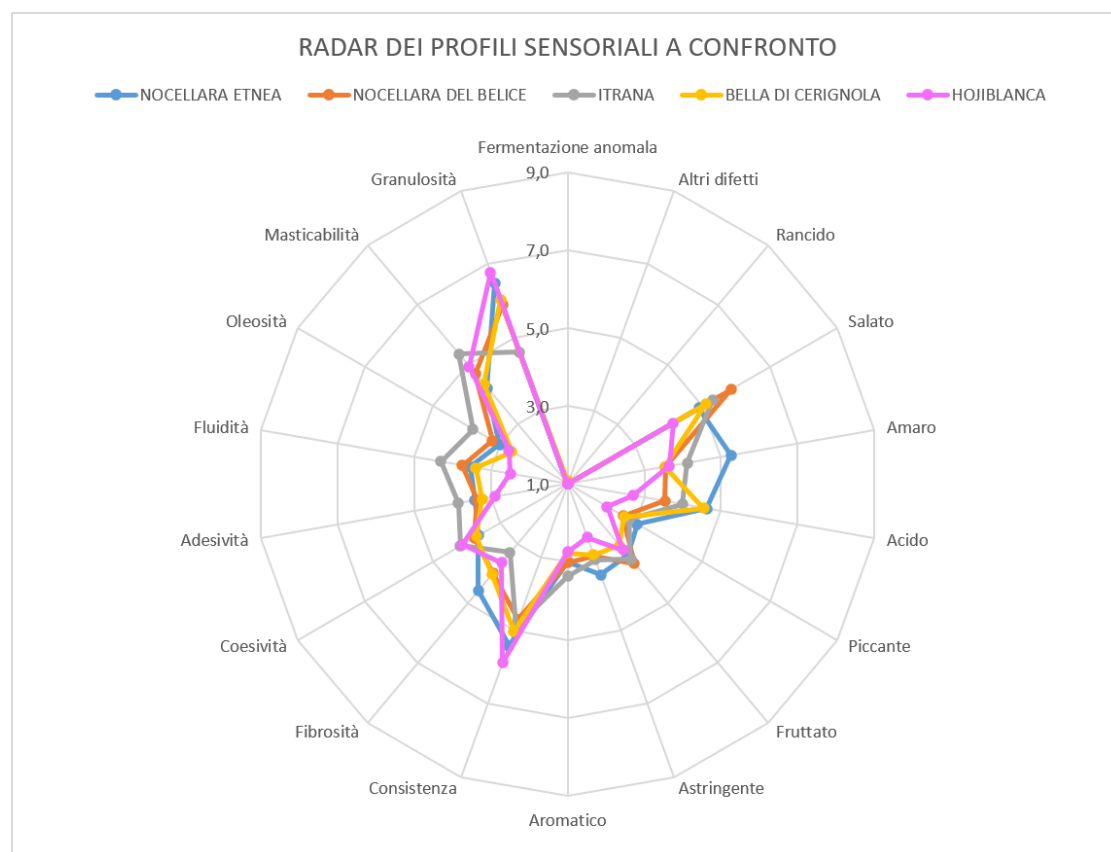


Figura 4.7 -Grafici a ragnatela risultanti dall'analisi sensoriale dei campioni di paté di olive.

Nessuno dei campioni ha presentato difetti. I campioni di Nocellara del Belice sono stati percepiti come i più salati, mentre quelli di Nocellara etnea come i più amari. I campioni di Hojiblanca sono risultati più equilibrati a livello olfattivo/gustativo, poiché i descrittori sono più vicini tra loro rispetto alle altre cultivar; inoltre, sono apparsi meno acidi. In termini di consistenza, il paté di olive Hojiblanca è risultato più denso e granuloso rispetto agli altri, ma meno fluido e meno adesivo; quindi, si amalgamava a fatica con la saliva e aderiva appena al palato e ai denti durante la masticazione.

I campioni di Itrana presentano i valori più elevati in termini di adesività, solubilità, untuosità e masticabilità rispetto a tutte le altre cultivar. Il paté di olive Bella di Cerignola si contraddistingue principalmente per le caratteristiche olfattive e gustative piuttosto che per quelle strutturali, poiché questi descrittori presentano valori estremamente bassi, soprattutto per quanto riguarda l'untuosità,

trattandosi di una cultivar con un contenuto di olio molto ridotto.

Analizzando le preferenze degli assaggiatori (Figura 4.8), si nota che i campioni di Itrana sono stati i più apprezzati (circa il 20% degli assaggiatori li ha graditi), seguiti dai campioni di Hojiblanca, che hanno ottenuto un punteggio di gradimento pari a 4 da circa il 75% degli assaggiatori. Anche i campioni di Nocellara etnea hanno registrato un gradimento elevato (punteggio 4) per circa il 45% degli assaggiatori, raggiungendo il 77% con il punteggio più basso (3). I campioni di Nocellara del Belice, Bella di Cerignola e Itrana sono stati meno apprezzati, ottenendo punteggi di 3 e 4 per il 60% degli assaggiatori.

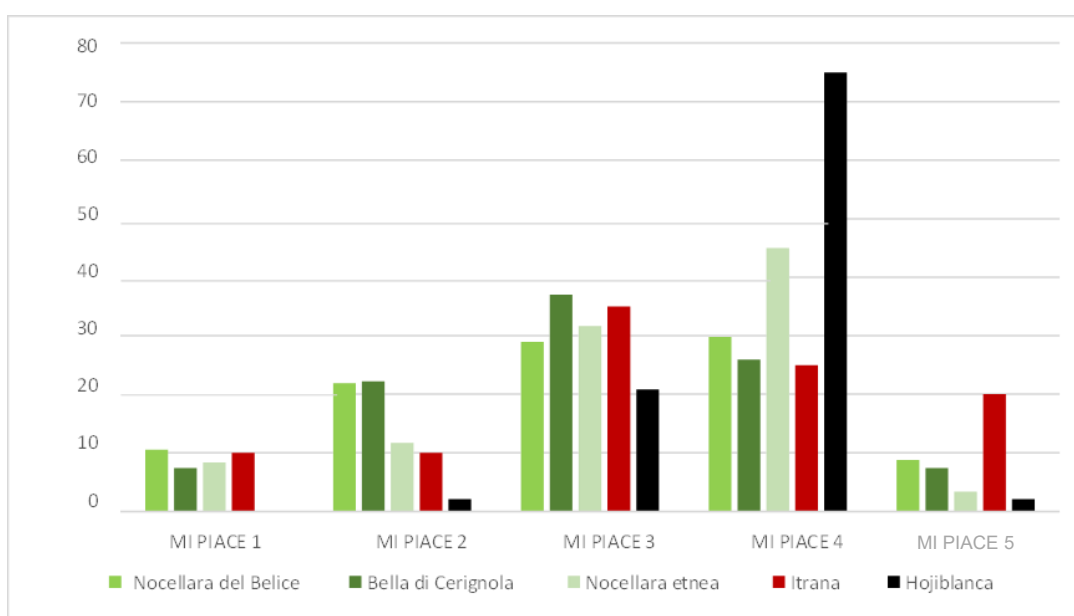


Figura 4.8- Grafico della distribuzione delle preferenze tra gli assaggiatori.

Data la natura qualitativa dei dati riportati nella Figura 4.7, è possibile ricavare solo la mediana e la relativa deviazione standard di ogni singolo CV analizzato, come illustrato nella Tabella 4.1.

Tab. 4.1 – Scala di Likert: valori della mediana e della deviazione standard.

Parametri statistici	Nocellara del Belice	Bella di Cerignola	Nocellara Etna	Itrana	Hojiblanca
Mediana	3	3	3	3	4
Deviazione standard	1,140	1,041	0,998	1,226	0,515

I parametri di consistenza dei campioni di pat  di olive ottenuti dal test di estrusione di ritorno sono stati analizzati mediante un test statistico ANOVA a una via, che ha evidenziato numerose differenze tra i vari tipi di pat  di olive (Tabella 4.2).

Tab. 4.2- Parametri di consistenza dei campioni di pat  di olive ottenuti dal test di estrusione a contropressione. I dati sono espressi come media e deviazione standard (DS) di dieci repliche, seguite da un test ANOVA a una via. Le differenze significative sono indicate da lettere diverse ($p < 0,05$) all'interno della stessa colonna. ns, non significativo.

Cultivar	Durezza (g)	Consistenza (g/s)	Coesivit� (g)	Lavoro di coesione (g/s)
Nocellara del Belice	2600,48 (286,42)a	44.379,18 (11.666,80)a	-695,74 (150,64)a	-719,72 (226,43)ns
Bella di Cerignola	6513,95 (1006,36)b	72.989,20 (30.418,06)b	-829,46 (443,01)ab	-934,39 (574,48)ns
Nocellara Etnea	6309,97 (806,03)b	69.483,23 (16.394,43)b	-1095,85 (576,68)a	-667,85 (422,09)ns
Itrana	2170,29 (775,11)a	32.693,32 (6903,52)a	-741,31 (227,71)a	-724,23 (56,06)ns
Hojiblanca	8284,12 (1523,32)bc	88.283,62 (18.857,78)b	-1140,81 (287,99)ab	-957,54 (197,70)ns

La durezza dei campioni di Nocellara del Belice   significativamente diversa da quella del pat  di olive Bella di Cerignola, Nocellara etnea e Hojiblanca, ma pi  vicina a quella dei campioni di Itrana. L'attributo di consistenza del pat  di olive Bella di Cerignola   statisticamente simile a quello di tutte le altre cultivar, ad eccezione dei campioni di Nocellara del Belice e Itrana. La coesivit  della Nocellara del Belice   significativamente diversa da quella dei campioni di Bella di Cerignola e Hojiblanca;   il pat  di olive meno coesivo, il che significa che presenta una minore adesivit  tra le sue particelle. I campioni di Nocellara del Belice si sono rivelati pi  simili solo ai campioni di Itrana, considerando parametri texturali generali. Per quanto riguarda il lavoro di coesione, non emergono differenze statistiche tra i campioni.

Dopo aver condotto un test di correlazione tra la consistenza valutata mediante analisi sensoriale e la consistenza e la compattezza misurate dal Texture Analyzer, sono stati ottenuti i seguenti valori di R:

$$R = 0,8515 \text{ (S_Durezza vs. TE_Durezza)}$$

$$R = 0,8200 \text{ (S_Durezza vs. TE_Consistenza)}$$

dove S_Durezza   la durezza valutata dall'analisi sensoriale; TE_durezza   la du-

rezza misurata dal Texture Analyzer; TE_Consistency è la consistenza misurata dal Texture Analyzer.

I dati mostrano una buona correlazione tra l'analisi sensoriale e quella texturale.

Analizzando le differenze tra i campioni e tenendo conto di tutti i parametri cinestetici ottenuti dalle analisi sensoriali e tattili tramite l'analisi gerarchica agglomerativa (AHC), i vari campioni hanno mostrato un chiaro raggruppamento in due gruppi (cluster): C1 e C2. Gli stessi risultati di raggruppamento, ma con valori di dissomiglianza diversi, sono stati ottenuti utilizzando sia il metodo di agglomerazione a collegamento singolo (Figura 4.9) che quello a collegamento completo (Figura 4.10).

Come mostrato, i valori di dissimilarità differiscono logicamente tra i due diversi metodi di agglomerazione, ad eccezione del sottocluster C1-Nocellara etnea-Bella di Cerignola. La clusterizzazione utilizzata è una distanza euclidea di dissimilarità che utilizza l'indice di Hartigan per il troncamento (valori predefiniti: da 2 a 5).

All'interno del cluster C1 sono raggruppate tre cultivar: Hojblanca, Nocellara etnea e Bella di Cerignola. Queste ultime due cultivar sono raggruppate in un sottocluster con un valore di dissimilarità ancora più basso, che risulta esattamente lo stesso sia con il metodo a collegamento singolo che con quello a collegamento completo (3532.059).

All'interno del cluster C2, con un valore di dissomiglianza pari a 11.693,865, si trovano le due cultivar rimanenti: Nocellara del Belice e Itrana. Il valore di dissomiglianza tra i due cluster è pari a 55.927,403.

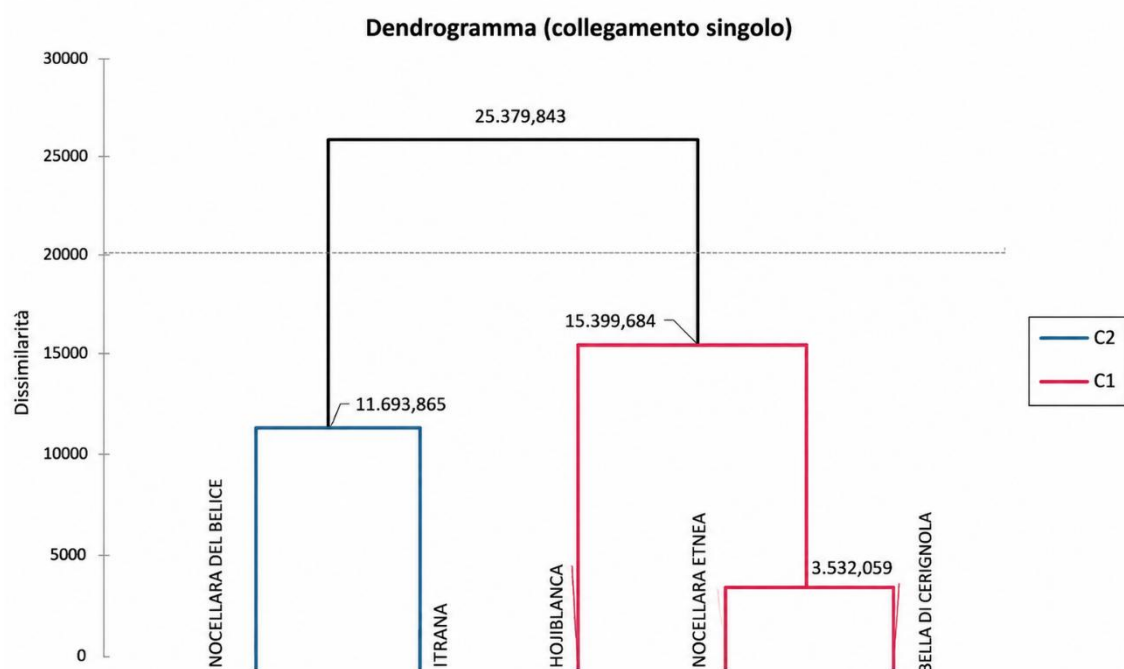


Figura 4.9 - Dendrogramma AHC ottenuto utilizzando il metodo di agglomerazione a collegamento singolo.

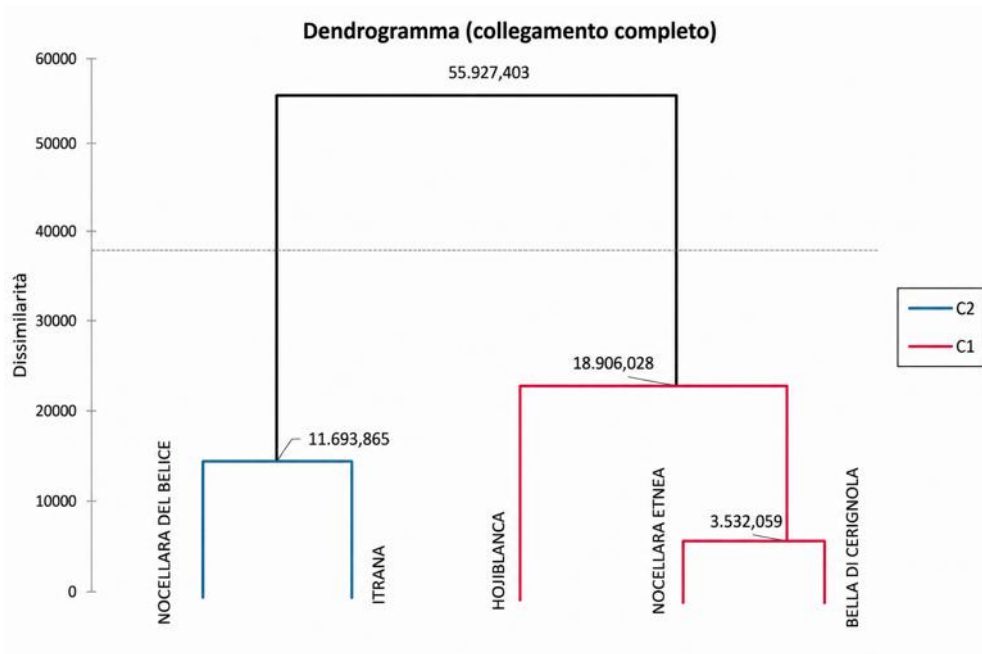


Figura 4.10- Dendrogramma AHC ottenuto utilizzando il metodo di agglomerazione a collegamento completo.

4.5. Discussione

La caratterizzazione sensoriale del pat  di olive rappresenta un ambito di ricerca ancora relativamente poco approfondito rispetto a quello degli oli vergini di oliva e delle olive da tavola. Sebbene il COI (Consiglio Oleicolo Internazionale) abbia sviluppato metodi ufficiali sia per la valutazione sensoriale degli oli vergini sia delle olive da tavola [28, 23], non sono attualmente disponibili protocolli specificamente validati per il pat  di olive, prodotto caratterizzato da una matrice complessa e da una notevole variabilit  compositiva. In questo contesto, la scheda sensoriale sviluppata nel presente studio   stata progettata per descrivere in maniera esaustiva sia gli attributi olfattivo-gustativi sia quelli cinestetici, considerando contemporaneamente l'influenza della cultivar, del processo tecnologico e della formulazione del prodotto.

L'inserimento del difetto di rancido tra gli attributi negativi nella scheda di profilo sensoriale che   scaturita dal presente lavoro appare giustificato dalla natura lipidica della matrice, in quanto pu  derivare dall'olio d'oliva aggiunto per la preparazione del pat  di olive. La presenza di una consistente frazione lipidica rende il pat  di olive suscettibile ai fenomeni di ossidazione durante la conservazione. L'ossidazione degli acidi grassi determina infatti la formazione di aldeidi, chetoni e altri composti volatili responsabili della comparsa del difetto sensoriale di rancido, come ampiamente documentato per l'olio vergine di oliva e per altri prodotti ricchi di lipidi [29, 30, 31]. Infatti, i prodotti derivati dalle olive sono particolarmente suscettibili ai fenomeni ossidativi durante la conservazione, soprattutto in presenza di olio aggiunto, con conseguente formazione di composti volatili responsabili della percezione del rancido. Pertanto, la valutazione di questo attributo assume particolare rilevanza non solo ai fini della caratterizzazione sensoriale, ma anche come indicatore della stabilit  qualitativa del prodotto nel tempo.

Le propriet  cinestetiche selezionate sono 8, data la complessit  della matrice analizzata, che presenta numerosi attributi reologici diversi. Inoltre, le sensazioni olfattive-gustative scelte coinvolgono non solo le caratteristiche specifi-

che delle olive da tavola, ma anche tutte le caratteristiche che possono derivare da qualsiasi possibile additivo incluso nel processo di lavorazione. Data la natura di un alimento che può variare nella sua composizione — da quelli con grani grandi a quelli con grani minuscoli, da quelli con più olio a quelli con meno, da quelli con solubilità diverse, ecc. — la scheda di profilo doveva essere il più esaustiva possibile.

I campioni ottenuti dalla cultivar Nocellara del Belice sono risultati significativamente più salati rispetto agli altri. Tale evidenza appare parzialmente inattesa, considerando che il metodo Castelvetro con cui sono state trasformate le olive costituenti il paté prevede normalmente una permanenza relativamente breve in salamoie a moderata concentrazione salina [2]. A causa delle specifiche dell'azienda di lavorazione, non è stata effettuata alcuna aggiunta di sale alla ricetta del paté, quindi questo risultato potrebbe essere dovuto a una salamoia ad alto contenuto di sale ($>5\%$) per migliorare la conservabilità delle olive da tavola prima della loro trasformazione, cosicché il prodotto finale risultasse più salato rispetto agli altri. Tuttavia, la concentrazione finale di sale nelle olive da tavola è influenzata dal metodo di trasformazione, dalla durata della permanenza in salamoia, dalle condizioni di conservazione e dalle strategie tecnologiche adottate per garantire la stabilità microbiologica e la shelf-life del prodotto [32, 33, 34]. Differenze anche modeste nella concentrazione della salamoia possono determinare variazioni sensoriali facilmente percepibili dal consumatore. È quindi plausibile che la maggiore sapidità osservata rifletta specifiche scelte tecnologiche dell'azienda produttrice piuttosto che caratteristiche intrinseche della cultivar.

L'attributo amaro ha raggiunto i valori più elevati nei campioni di Nocellara Etnea. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che i frutti siano stati raccolti precocemente, poi tagliati e frantumati; probabilmente presentavano un'elevata consistenza della polpa ed erano resistenti alla concia, per cui il processo di deamarizzazione potrebbe aver avuto meno successo. Questo risultato risulta pienamente coerente con quanto riportato in letteratura sul ruolo dei composti fenolici nelle olive da tavola. L'oleuropeina e i suoi prodotti di trasformazione rappresentano infatti i principali responsabili della percezione dell'amaro, mentre la loro concentrazione residua dipende sia dalla cultivar sia dallo stadio di maturazione

sia dall'efficacia del processo di deamarizzazione [35, 36]. Olive raccolte precocemente presentano generalmente concentrazioni fenoliche superiori rispetto a quelle raccolte a maturazione avanzata; inoltre, una polpa particolarmente consistente può limitare la penetrazione della soluzione alcalina durante il trattamento con NaOH, riducendo l'idrolisi dell'oleuropeina [37]. I risultati ottenuti sembrano pertanto confermare che le caratteristiche varietali e tecnologiche abbiano esercitato un effetto congiunto sulla percezione dell'amaro.

I campioni ottenuti dalla cultivar Hojiblanca sono risultati i meno acidi. Sebbene il gluconato e il lattato ferroso impiegati nel metodo californiano abbiano come funzione principale la stabilizzazione del colore, il trattamento ossidativo caratteristico di tale processo modifica profondamente la composizione fenolica e il profilo chimico del frutto, influenzando indirettamente anche il bilanciamento gustativo complessivo. Diversi autori hanno evidenziato che il metodo di trasformazione rappresenta uno dei principali fattori responsabili della variabilità sensoriale delle olive da tavola, influenzando in modo significativo il profilo fenolico, le caratteristiche aromatiche, la consistenza e gli attributi gustativi [36, 38, 39]. Tali effetti si sovrappongono a quelli della cultivar e, in molti casi, possono contribuire in misura determinante alla definizione del profilo sensoriale finale del prodotto. I dati del presente studio sembrano confermare tale osservazione, suggerendo un ruolo determinante del processo tecnologico nella modulazione della percezione dell'acidità.

Per quanto riguarda le caratteristiche di texture, la maggiore consistenza osservata nei campioni di Bella di Cerignola, Nocellara Etnea e Hojiblanca appare compatibile con una granulometria più elevata e con una minore disgregazione della polpa durante la lavorazione. La letteratura evidenzia infatti come la dimensione delle particelle e l'integrità della parete cellulare rappresentino due dei principali fattori responsabili della percezione della durezza, della granulosità e della spalmabilità dei prodotti semisolidi [40]. La somiglianza nella consistenza tra i campioni di Bella di Cerignola, Nocellara etnea e Hojiblanca può essere spiegata dal fatto che questi paté di olive sono costituiti da particelle più grandi, il che si traduce in una consistenza più solida e ruvida; per questo motivo, devono essere deformati con una forza maggiore. Al contrario, i campioni di Itrana hanno mo-

strato la consistenza minore, suggerendo una struttura più fine e una maggiore omogeneizzazione della matrice. Analogamente, la ridotta coesività osservata nella Nocellara del Belice potrebbe derivare da una maggiore consistenza della polpa, che risulta estremamente compatta e dura, con il risultato che il paté di olive si stacca a malapena dalla sonda.

Un elemento di particolare interesse emerso dal presente lavoro è rappresentato dalla sostanziale concordanza tra le valutazioni sensoriali e le analisi strumentali. Le differenze osservate negli attributi di consistenza trovano infatti riscontro nei parametri ottenuti mediante Texture Profile Analysis, mentre l'intensità dell'amaro appare coerente con il differente contenuto di composti fenolici determinato nelle diverse cultivar. Tale convergenza conferma che l'approccio integrato adottato, basato sulla combinazione di analisi sensoriale descrittiva, caratterizzazione reologica e determinazione del contenuto fenolico, consente una descrizione più completa delle proprietà qualitative del prodotto rispetto all'impiego di una singola tecnica analitica. Questo risultato assume particolare rilevanza dal momento che, per quanto a nostra conoscenza, gli studi dedicati al paté di olive risultano ancora limitati e sono prevalentemente focalizzati su aspetti formulativi o compositivi, mentre risultano rare applicazioni che integrino in un unico protocollo analisi sensoriale descrittiva, caratterizzazione strumentale della texture e determinazione del contenuto fenolico.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano che il profilo sensoriale del paté di olive è il risultato dell'interazione tra fattori genetici (cultivar), tecnologici (metodo di trasformazione e conservazione) e strutturali (granulometria e organizzazione della matrice). L'approccio metodologico proposto rappresenta pertanto un contributo originale alla caratterizzazione di questa categoria di prodotti, offrendo uno strumento potenzialmente utile sia per il controllo qualità sia per lo sviluppo di future procedure di standardizzazione. Tuttavia, i risultati devono essere interpretati considerando alcune limitazioni dello studio, in particolare il numero contenuto di cultivar e di produzioni aziendali analizzate. Sarà quindi opportuno estendere l'applicazione della metodologia a un numero maggiore di campioni e di tecnologie di trasformazione, al fine di verificarne la robustezza e la riproducibilità in differenti contesti produttivi.

4.6. Conclusioni sulla scheda di profilo

I risultati ottenuti dall'analisi sensoriale, dall'analisi della consistenza mediante un Texture Analyzer dotato di dispositivo di estrusione di ritorno e dall'elaborazione statistica dei dati raccolti hanno dimostrato la validità della scheda di profilo per valutare correttamente i diversi prodotti.

Poiché il paté di olive sta diventando un ingrediente aromatizzante molto diffuso, potrebbe essere utile per i produttori conoscerne le caratteristiche sensoriali, al fine di migliorare la qualità del prodotto e renderlo competitivo sul mercato. Ciò comporterà anche una maggiore attenzione da parte dei consumatori.

Un nuovo lessico specifico e un innovativo foglio di profilo sensoriale possono aiutare a determinare con precisione la qualità sensoriale del paté di olive e, col tempo, diventare uno "standard" per certificare le produzioni tipiche. Il foglio di profilo sviluppato e testato in questa ricerca ha dimostrato la sua efficacia e sarà ulteriormente testato in ricerche future. Il lessico sviluppato potrebbe anche promuovere la comunicazione sulla qualità del prodotto tra gli scienziati sensoriali e molte parti interessate, come sviluppatori di prodotti, professionisti del marketing e fornitori.

4.7. Prova di applicazione del nuovo foglio di profilo

Dopo aver messo a punto un validato foglio di profilo sensoriale per paté di olive, sono stati analizzati circa 50 paté di olive monocultivar del commercio, vincitori del concorso Ercole Olivario dal punto di vista sensoriale, attraverso la valutazione organolettica.

I campioni di paté di olive appartenevano alle cv. Leccino, Ogliarola garbanica, Cellina di Nardò e Bella di Cerignola (dalla Puglia), Tonda di Cagliari e Bosana (dalla Sardegna), Ascolana tenera e Lea (dalle Marche), Itrana (del Lazio), Salella (della Campania) e Taggiasca (della Liguria).

Le caratteristiche sensoriali di tali paté di olive sono state valutate dal Comitato di assaggio del CREA-IT di Pescara, che è stato appositamente addestrato

per l'analisi sensoriale di paté di olive (paragrafi 4.2.2 e 4.2.7).

Sul piano sensoriale (figg. 4.11- 412) tutti i paté sono risultati privi di difetti e hanno riportato alcune caratteristiche cinestetiche distintive tra paté verdi e paté neri, come la maggiore fluidità dei neri o la maggiore granulosità dei verdi.

Nel complesso, l'analisi sensoriale ha evidenziato come i paté di olive monocultivar presentino un elevato standard qualitativo e una marcata tipicità sensoriale, strettamente correlata alla cultivar di origine.

L'assenza di difetti organolettici e la presenza di caratteristiche cinestetiche distintive tra paté verdi e neri confermano l'efficacia del foglio di profilo sensoriale sviluppato, dimostrandone l'idoneità come strumento per la caratterizzazione e la valorizzazione qualitativa dei paté di olive.

Inoltre, i risultati ottenuti evidenziano come la cultivar influenzi significativamente il profilo sensoriale del prodotto finale, rappresentando un elemento chiave per la differenziazione commerciale e la valorizzazione delle produzioni territoriali.

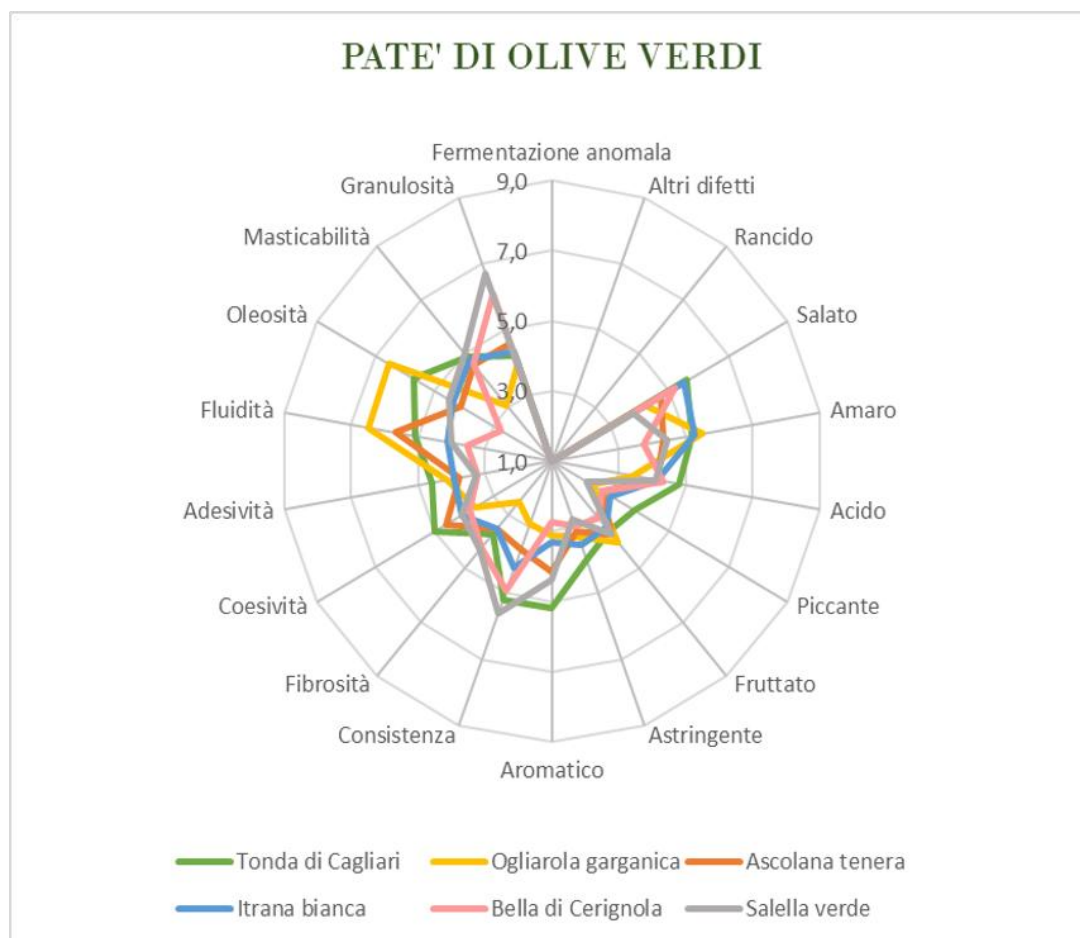


Fig. 4.11 - Profili sensoriali sovrapposti dei pat  di olive verdi analizzati, ottenuti dai valori medi di ogni descrittore⁴

⁴ Immagine usata per Poster presentato al VI Convegno Nazionale dell'Olio ed Olio - Ascoli Piceno 13-15 novembre 2024. Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Proposta di applicazione del claim salutistico "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" anche per le olive da tavola e i pat  di olive.

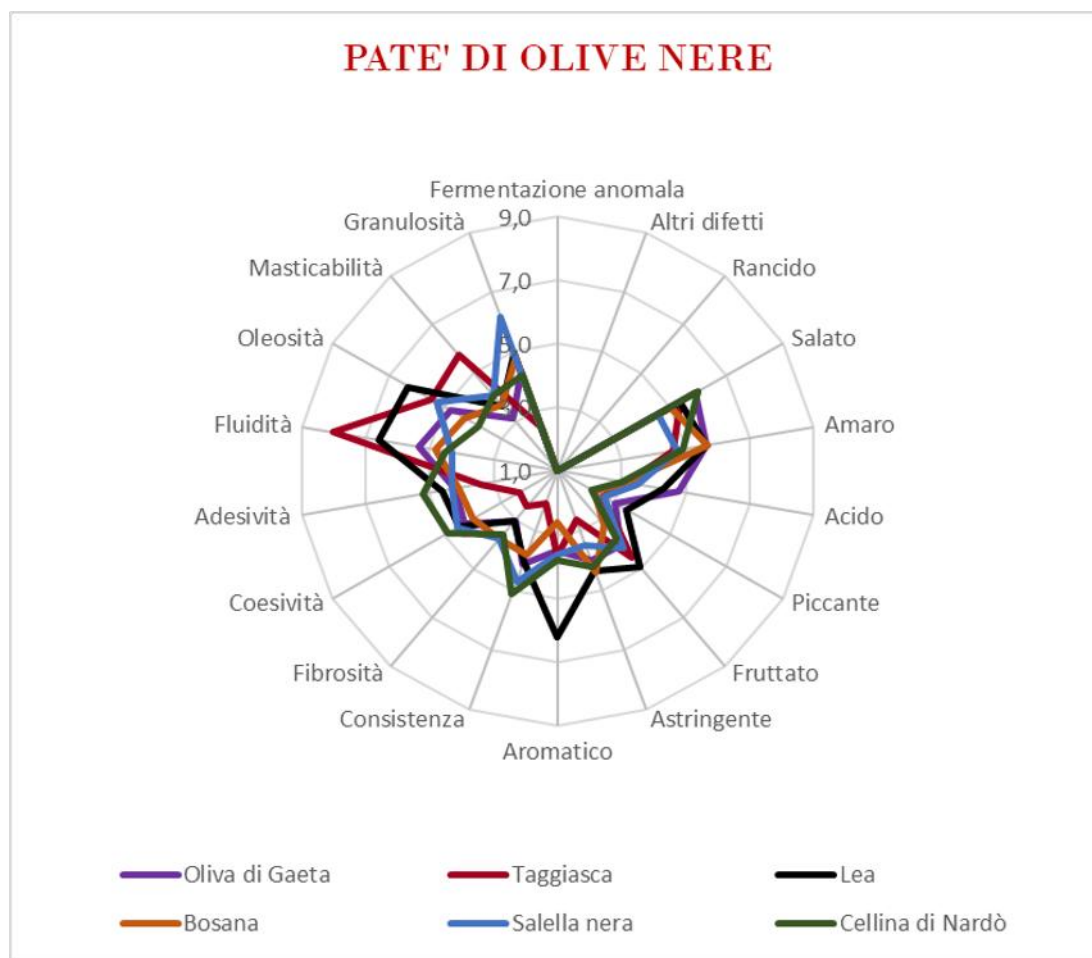


Fig. 4.12 - Profili sensoriali sovrapposti dei paté di olive nere analizzati, ottenuti dai valori medi di ogni descrittore⁵

La definizione di un metodo affidabile per la caratterizzazione sensoriale e nutraceutica del paté di olive rappresenta il passaggio necessario per la progettazione del prodotto finale. Le informazioni ottenute costituiscono infatti i criteri scientifici utilizzati nella selezione della materia prima destinata alla formulazione dello snack innovativo descritto nel capitolo successivo.

⁵ Immagine usata per Poster presentato al VI Convegno Nazionale dell'Olio ed Olio - Ascoli Piceno 13-15 novembre 2024. Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Proposta di applicazione del claim salutistico "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" anche per le olive da tavola e i paté di olive.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 4

- 1- TS 7630:1989; Siyah Zeytin Ezmesi Standardi. TSE Standard Hazırlama Merkezi Başkanlığı: Bakanlıklar, Ankara, Turkish, 2023. (In Turkish)
- 2- Lanza, B. Nutritional and sensory quality of table olives. In Olive Germplasm—The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; p. 343.
- 3- Cavallo, P.; Dini, I.; Sepe, I.; Galasso, G.; Fedele, F.L.; Sicari, A.; Censi, S.B.; Gaspari, A.; Ritieni, A.; Lorito, M.; et al. An innovative olive pâté with nutraceutical properties. *Antioxidants* 2020, 9, 581.
- 4- Escudero-Gilete, M.L.; Meléndez-Martínez, A.J.; Heredia, F.J.; Vicario, I.M. Optimization of olive-fruit paste production using a methodological proposal based on a sensory and objective color analysis. *Grasas Aceites* 2009, 60, 396–404.
- 5- Schwartz, M.; Quitral, V.; Daccaretta, C.; Callejas, J. Desarrollo de pasta unttable de aceituna variedad Sevillana. *Grasas Aceites* 2009, 60, 451–457.
- 6- Alvarenga, N.B.; Cebola Lidon, F.J.; Silva, A.; Martins, G.; Cruz, T.; Palma, V.; Canad, J. Production and characterization of green and black olive paste using cream of animal and vegetable origins. *Emir. J. Food Agric.* 2012, 24, 12–16.
- 7- Aka-Kayguluoglu, A.; Akpinar-Bayizit, A.; Sahin-Cebeci, O.Y. Evaluation of physiochemical and sensory properties of green olive pastes. *Indian J. Tradit. Knowl.* 2014, 13, 654–658.
- 8- Nishinara, K. New texture modifiers for food, interactions among different food hydrocolloids and their potential of application. *Kagaku Seibutsu* 1996, 34, 197–204.
- 9- Won-Seok, C.; Han-Seok, S. Effects of age group, gender, and consumption frequency on texture perception and liking of cooked rice or bread. *Foods* 2023, 12, 1793.
- 10- Brusewitz, G.H.; Yu, H. Back extrusion method for determining properties of

- mustard slurry. *J. Food Eng.* 1996, 27, 259–265.
- 11- Rawson, H.L.; Marshall, V.M. Effect of ‘ropy’ strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1997, 32, 213–220
 - 12- Robbers, M.; Singh, R.P.; Cunha, L.M. Osmotic-convective dehydrofreezing process for drying kiwifruit. *J. Food Sci.* 1997, 62, 1039–1043.
 - 13- Surówka, K.; Zmudzinski, D.; Surówka, J. Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends Food Sci. Technol.* 2004, 15, 153–160.
 - 14- Konstance, R.P.; Onwulata, C.I.; Smith, P.W.; Lu, D.; Tunick, M.H.; Strange, E.D. Nutrientbased corn and soy products by twin-screw extrusion. *J. Food Sci.* 1998, 63, 864–868.
 - 15- Carbonell-Barrachina, A.A.; Zaragoza, P.; Lario, Y.; Aracil, P.; Burlo, F. Development of a high sensory quality garlic paste. *J. Food Sci.* 2003, 68, 2351–2355.
 - 16- Pereira, R.B.; Singh, H.; Munro, P.A.; Luckman, M.S. Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *Int. Dairy J.* 2003, 13, 655–667.
 - 17- Soria, A.C.; González, M.G.; de Lorenzo, C.; Martínez-Castro, I.; Sanz, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. *Food Chem.* 2004, 85, 121–130.
 - 18- Nasaruddin, F.; Chin, N.L.; Yusof, Y.A. Effect of processing on instrumental textural properties of traditional Dodol using back extrusion. *Int. J. Food Prop.* 2012, 15, 495–506.
 - 19- Lawless, L.J.R.; Civille, G.V. Developing lexicons: A review. *J. Sens. Stud.* 2013, 28, 270–281.
 - 20- IOC. Method for the Organoleptic Assessment of Extra Virgin Olive Oil Applying to Use a Designation of Origin; COI/T.20/Doc. no. 22 November 2005; International Olive Council: Madrid, Spain, 2005. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/wpcontent/uploads/2019/11/COI-T.20->

- 21- ISO 11036; Sensory Analysis—Methodology—Texture Profile. ISO Copyright Office: Geneva, Switzerland, 2020.
- 22- Lanza, B. Abnormal fermentations in table-olive processing: Microbial origin and sensory evaluation. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 91.
- 23- IOC. Method for the Sensory Analysis of Table Olives; COI/OT/MO No. 1/Rev. 3 June 2021; International Olive Council: Madrid, Spain, 2021. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/07/COI-OT-MO-1-Rev.3-20ENG.pdf>
- 24- Beauchamp, G.K.; Keast, R.S.J.; Morel, D.; Lin, J.; Pika, J.; Han, Q.; Lee, C.-H.; Smith, A.B.; Breslin, P.A.S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 2005, 437, 45–46.
- 25- Des Gachons, C.P.; Uchida, K.; Bryant, B.; Shima, A.; Sperry, J.B.; Dankulich-Nagrudny, L.; Tominaga, M.; Smith, A.B., III; Beauchamp, G.K.; Breslin, P.A.S. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J. Neurosci.* 2011, 31, 999–1009.
- 26- Guinard, J.-X. Sensory and consumer testing with children. *Trends Food Sci. Technol.* 2001, 11, 273–283.
- 27- Lanza, B.; Amoruso, F. Panel performance, discrimination power of descriptors, and sensory characterization of table olive samples. *J. Sens. Stud.* 2019, 35, e12542.
- 28- COI/T.20/Doc. No 15 – Sensory Analysis of Olive Oil – Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil - Rev. 11/2024: https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2024/07/III-2.2.COI-T20-Doc.-15-REV-11-2024_EN-1.pdf
- 29- Morales M. T., Rios J. J., Aparicio R. Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. Vol 45. Issue 7; 2666- 2673.
- 30- C.M. Kalua, M.S. Allen, D.R. Bedgood, A.G. Bishop, P.D. Prenzler, K.

- Robards. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 2007. Volume 100, Issue 1, 273-286.
- 31- Cecchi L, Migliorini M, Giambanelli E, Rossetti A, Cane A, Mulinacci N. New Volatile Molecular Markers of Rancidity in Virgin Olive Oils under Nonaccelerated Oxidative Storage Conditions. *J Agric Food Chem*. 2019 Nov 27;67(47):13150-13163.
 - 32- Rocha J, Borges N, Pinho O. Table olives and health: a review. *J Nutr Sci*. 2020 Dec 2;9: e57.
 - 33- Sab C, Romero C, Brenes M, Montaña A, Ouelhadj A, Medina E. Industrial Processing of Algerian Table Olive Cultivars Elaborated as Spanish Style. *Front Microbiol*. 2021 Nov 4; 12:729436.
 - 34- Campus M, Değirmencioğlu N and Comunian R (2018) Technologies and Trends to Improve Table Olive Quality and Safety. *Front. Microbiol*. 9:617.
 - 35- Charoenprasert S, Mitchell A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*. 2012 Jul 25;60(29):7081-95.
 - 36- Conte P, Fadda C, Del Caro A, Urgeghe PP, Piga A. Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods*. 2020; 9(4):514.
 - 37- Rebecca L. Johnson and Alyson E. Mitchel. Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality*, 2018. 2018(5):1-12.
 - 38- Romero C., Brenes M., Yousfi K., García P., García A., Garrido A. Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. Vol 52/Issue 3; 479- 484.
 - 39- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. E. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 60, 7081–7095.
 - 40- Engelen, L., de Wijk, R. A., Prinz, J. F., Janssen, A. M., Weenen, H., & Bosman, F. Relating particles and texture perception. *Physiology & Behavior*, 2005. 86(1–2), 111–117.

CAPITOLO 5

Realizzazione del prodotto innovativo (snack di soccorso)

5. Realizzazione del prodotto innovativo (snack di soccorso)

5.1 Introduzione

Negli ultimi decenni il rapporto tra alimentazione e salute ha assunto un ruolo centrale nella ricerca scientifica. Le moderne acquisizioni della nutrizione molecolare hanno evidenziato come numerosi componenti degli alimenti siano in grado di modulare processi metabolici, vie di segnalazione cellulare ed espressione genica, contribuendo al mantenimento dello stato di salute e alla prevenzione di diverse patologie croniche. In questo contesto si sono affermati i concetti di *alimento funzionale* e *nutraceutico*, oggi considerati strumenti fondamentali della nutrizione preventiva.

Gli alimenti funzionali sono definiti come prodotti che, consumati nell'ambito della normale dieta, esercitano effetti benefici documentati su una o più funzioni fisiologiche dell'organismo, oltre al semplice apporto nutrizionale [1, 2]. Parallelamente, il termine *nutraceutico*, introdotto da De Felice nel 1989 [3], identifica alimenti, componenti alimentari o sostanze derivate dagli alimenti dotati di proprietà biologiche potenzialmente utili nella prevenzione o nel supporto terapeutico di diverse condizioni patologiche [4,5].

L'interesse verso tali prodotti è strettamente correlato all'aumento delle malattie croniche non trasmissibili, tra cui patologie cardiovascolari, diabete, obesità, sindrome metabolica e malattie neurodegenerative. Numerosi studi hanno dimostrato che composti bioattivi quali polifenoli, carotenoidi, fitosteroli, fibre alimentari, probiotici e prebiotici possono esercitare effetti antiossidanti, antinfiammatori e immunomodulanti, contribuendo alla regolazione dell'omeostasi metabolica e alla riduzione dei fattori di rischio associati a tali patologie [6, 2].

Negli ultimi anni è emerso inoltre il ruolo del microbiota intestinale come mediatore degli effetti salutistici della dieta. Fibre alimentari, probiotici e prebiotici possono modulare favorevolmente la composizione del microbiota, favorendo la produzione di metaboliti bioattivi associati a benefici metabolici e immunitari. Tali evidenze hanno contribuito ad ampliare ulteriormente il concetto di alimento funzionale, orientando la ricerca verso lo sviluppo di prodotti sempre

più mirati e personalizzati.

Recentemente, nell'ambito della nutrizione clinica e della tecnologia alimentare, si è diffuso un crescente interesse verso lo sviluppo di alimenti specificamente progettati per rispondere a esigenze fisiologiche particolari o a condizioni di emergenza nutrizionale [7, 8]. In questo contesto si inserisce il concetto di rescue snack o "snack di soccorso", inteso come un alimento pronto al consumo, formulato per fornire un apporto nutrizionale mirato in situazioni nelle quali è necessario un intervento rapido, sicuro e facilmente gestibile. Sebbene il termine sia utilizzato principalmente nell'ambito del trattamento dell'ipoglicemia lieve-moderata nel paziente diabetico [9, 10], il concetto si è progressivamente esteso anche allo sviluppo di prodotti destinati a garantire un rapido supporto energetico in differenti condizioni di vulnerabilità nutrizionale, mantenendo elevati standard di sicurezza, praticità e stabilità [11].

La progettazione di uno snack di soccorso richiede un'attenta integrazione tra aspetti nutrizionali, tecnologici e sensoriali. Dal punto di vista nutrizionale, il prodotto deve assicurare un contenuto controllato e riproducibile dei nutrienti di interesse, un'elevata biodisponibilità dei componenti funzionali e una composizione compatibile con l'obiettivo fisiologico per il quale è stato sviluppato. Parallelamente, i requisiti tecnologici comprendono la stabilità chimica e microbiologica durante la conservazione, la facilità di trasporto, la praticità di utilizzo, il porzionamento preciso e una buona accettabilità sensoriale, fattore essenziale per favorire l'aderenza del consumatore e l'efficacia dell'intervento nutrizionale. La crescente attenzione verso la sostenibilità alimentare ha inoltre orientato la ricerca verso l'impiego di ingredienti di origine vegetale ricchi di composti bioattivi, capaci di associare un adeguato apporto nutrizionale a proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, senza compromettere le caratteristiche tecnologiche del prodotto finale.

Caratteristica principale di uno "snack di soccorso" è quella di essere pronto al consumo, progettato non solo per fornire un rapido apporto energetico, ma anche per garantire una composizione nutrizionale controllata, elevata stabilità durante la conservazione, facilità di trasporto e praticità di utilizzo [12, 13]. Le moderne strategie di progettazione alimentare mirano inoltre ad arricchire tali pro-

dotti con ingredienti funzionali e composti bioattivi, al fine di coniugare efficacia nutrizionale, qualità sensoriale e potenziali effetti benefici sulla salute [14].

In questo scenario, la valorizzazione di matrici vegetali ricche di polifenoli, fibre alimentari e acidi grassi insaturi rappresenta una strategia particolarmente promettente. In particolare, i derivati della filiera olivicola si distinguono per il loro elevato contenuto di composti bioattivi e per il potenziale impiego nello sviluppo di alimenti innovativi ad elevato valore nutrizionale e funzionale. L'utilizzo di tali matrici nella formulazione di snack di soccorso consente di coniugare aspetti nutrizionali, tecnologici e di sostenibilità, in linea con i principi dell'economia circolare e della moderna nutrizione funzionale.

Le attività sperimentali descritte nei capitoli precedenti convergono nella presente fase progettuale. Lo studio dei processi fermentativi, la caratterizzazione chimico-fisica e nutraceutica del pat , lo sviluppo degli strumenti di valutazione sensoriale e l'identificazione delle caratteristiche qualitative della materia prima hanno fornito le basi scientifiche per la formulazione del prototipo alimentare. La realizzazione dello snack rappresenta pertanto il punto di sintesi dell'intero percorso di ricerca.

5.2. Materiali e metodi

5.2.1. Biofenoli del pat  di olive

La caratterizzazione del profilo dei biofenoli presenti nel pat    stata effettuata al fine di approfondire la conoscenza della materia prima anche dal punto di vista nutraceutico, identificandone i composti bioattivi di maggiore interesse e valutandone il potenziale valore funzionale in vista del suo impiego nella formulazione dello snack finale.

Dal momento che   stato ipotizzato un possibile utilizzo anche per i pat  di olive della stessa indicazione salutistica prevista per l'olio EVO, ovvero "I polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo",   stato caratterizzato questo prodotto a livello nutraceutico. Il

valore soglia da eguagliare e/o superare (5 mg di idrossitirosolo e prodotti correlati) è riferito a 20 g di olio EVO (Reg. UE 432/2012 e successive modifiche in materia di “health claims”).

Circa 50 paté di olive monocultivar del commercio, vincitori del concorso Ercole Olivario, sono stati analizzati dal punto di vista nutraceutico, attraverso la determinazione del contenuto fenolico con HPLC.

Sono stati quantificati mediante HPLC i seguenti principali fenoli e loro derivati: oleuropeina, 3,4-DHPEA-EDA (oleaceina), 3,4-DHPEA-EA (aglicone dell'oleuropeina), 3,4-DHPEA,-EA,H, idrossitirosolo, p-HPEA-EDA (oleocantale), p-HPEA-EA (aglicone del ligstroside) p-HPEA,-EA,H, tirosolo e verbascoside riferiti a campioni di paté di olive, appartenenti alle cv. Leccino, Ogliarola garganica, Cellina di Nardò e Bella di Cerignola (dalla Puglia), Tonda di Cagliari e Bosana (dalla Sardegna), Ascolana tenera e Lea (dalle Marche), Itrana (del Lazio), Salella (della Campania) e Taggiasca (della Liguria).

Il contenuto di sostanze fenoliche è stato studiato tramite apposito metodo di estrazione da olio e da polpa messo a punto presso i laboratori del CREA- IT di Pescara.

Il paté viene inizialmente centrifugato a 3756 g per 30 min a 10°C al fine di separare la polpa di olive dall'olio di governo.

Per quanto riguarda l'estrazione delle sostanze fenoliche dalla polpa di olive, 0.5 g di polpa vengono addizionati di 1 mL di standard interno (ac. siringtonico 0.015 mg/mL in metanolo/acqua 80/20 v/v) e la miscela risultante viene sottoposta ad una prima agitazione in vortex per 30 sec. A questo punto vengono aggiunti ulteriori 5 mL di metanolo/acqua 80/20 v/v e la nuova miscela di nuovo agitata al vortex per 60 sec. Segue un passaggio in bagnetto a ultrasuoni per 15 min (fase di estrazione). Il campione viene quindi centrifugato a 3500 rpm (centrifuga ALC 4235) per 5 min. a T.A. 1mL di surnatante viene filtrato con una siringa dotata di filtro PVDF 0.45 mm (Merck). 20 ml di campione filtrato vengono infine iniettati in HPLC (Perkin Elmer LC 200) seguendo la procedura descritta nel capitolo 3 e in una pubblicazione [15].

Sono state poi estratte le sostanze fenoliche dall'olio di governo, cioè l'olio utilizzato per ricoprire o conservare un alimento, con la funzione di proteggerlo

dai fenomeni ossidativi e dalle contaminazioni esterne, contribuendo al mantenimento delle caratteristiche chimiche, microbiologiche e sensoriali durante la shelf-life. Nei paté di olive e nelle conserve vegetali esso è generalmente costituito da olio di oliva, che svolge sia una funzione tecnologica di conservazione sia una funzione nutrizionale e organolettica, migliorando la qualità complessiva del prodotto. 2.5 g di olio sono stati addizionati con 500 mL di standard interno e si è proceduto all'evaporazione del solvente in Rotavapor. Il campione è stato poi addizionato di 6 mL di esano, caricato su una colonna SPE (Discovery DSC DIOL 500 Supelco), sottoposto a lavaggi con esano e poi con esano/acetato di etile 90/10 v/v, quindi estratto con metanolo. Dopo evaporazione del metanolo in Rotavapor, il residuo secco è stato ripreso con 1 mL di metanolo/acqua 50/50 v/v e filtrato con una siringa dotata di filtro PVDF 0.45 mm (Merck). 20 mL di campione filtrato sono stati infine iniettati in HPLC (Perkin Elmer LC 200) seguendo la procedura descritta in un precedente articolo [15].

5.2.2. Scelta dello snack

È stata avviata la produzione sperimentale di un nuovo alimento in scala di laboratorio con le risorse a disposizione, scegliendo di utilizzare i paté disponibili in commercio, trattandosi di una materia prima maggiormente performante dal punto di vista organolettico, della consistenza e del potere nutraceutico.

A seguito di iniziali prove condotte con lievitati, si è optato per un prodotto tipico della tradizione abruzzese, che ben si presta ad una rapida e ben riproducibile realizzazione: la *pizzella* abruzzese, che dipendentemente dalle zone, prende il nome anche di *ferratella* o *neola*.

Comunemente prodotta come dolce della tradizione abruzzese, si consuma tal quale o con un sottile strato di marmellata o, più recentemente, di crema di nocciole. Viene prodotta tramite lavorazione manuale dell'impasto, che prevede l'impiego di olio extra-vergine di oliva, come la maggior parte dei dolci tradizionali abruzzesi.

La peculiarità è rappresentata dalla cottura in apposito ferro (Fig. 5.1), intagliato con specifiche venature, leggermente differenti da zona a zona, che veniva

tradizionalmente scaldato sul fuoco una volta inserito il quantitativo di un cucchiaino di pastella all'interno, lasciando cuocere pochi secondi per lato, per poi estrarre il prodotto finito schiacciato e con le tipiche venature a rilievo (Fig. 5.2).



Fig. 5.1 – Ferri tipici della tradizione abruzzese usati per la realizzazione delle pizzelle, in diverse forme e dimensioni, con differenti scanalature



Fig. 5.2 – *Pizzelle* abruzzesi con forme differenti e decorazioni interne diverse

La tipicità di tali prodotti è riconosciuta anche dal MASAF (Ministero dell'agricoltura, della sovranità alimentare e delle foreste), grazie al loro inserimento all'interno degli elenchi dei PAT (Prodotti Agroalimentari Tradizionali), che vengono aggiornati annualmente e oggi alla loro XXVI revisione, consultabili sul sito del MASAF [16].

Tramite indagine e ricerca specifica del prodotto tra punti vendita locali è

emersa la possibilità di creare tali alimenti anche in versione salata, così da permettere l'inserimento di paté di olive all'interno.

5.2.3. *Screening delle formulazioni*

Sulla base delle precedenti analisi condotte sui paté del commercio a nostra disposizione, ne sono stati selezionati alcuni più ricchi in polifenoli. È così iniziata la sperimentazione per la migliore combinazione di ingredienti, facendo attenzione a ridurli al minimo necessario, allo scopo di non inficiare eccessivamente il contenuto fenolico (farina, acqua, vino, sale).

La progettazione delle diverse formulazioni è stata condotta secondo un approccio progressivo di ottimizzazione, finalizzato a individuare la combinazione di ingredienti in grado di garantire il miglior equilibrio tra caratteristiche nutrizionali, proprietà tecnologiche e accettabilità sensoriale del prodotto. In una prima fase è stato valutato l'effetto dell'incremento della percentuale di paté di olive (10%, 22% e successivamente 30%), al fine di determinarne il livello massimo di inclusione compatibile con il mantenimento delle caratteristiche qualitative dello snack. Successivamente, sulla base delle evidenze riportate in letteratura, sono stati sperimentati ingredienti ad elevato valore proteico, quali spirulina, farina di ceci, farina di piselli e farina di farro, con l'obiettivo di incrementare il contenuto nutrizionale del prodotto senza comprometterne le proprietà reologiche, la lavorabilità dell'impasto e le caratteristiche sensoriali [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Tale percorso sperimentale ha consentito di selezionare le formulazioni più promettenti da sottoporre alle successive analisi di caratterizzazione.

Il razionale scientifico è determinato dal fatto che ogni fase valuta un fattore specifico:

- *pizzella* senza paté → campione di controllo (baseline);
- *pizzella* con 10% e 22% di paté → studio dell'effetto crescente dell'ingrediente funzionale sulla matrice alimentare;
- *pizzella* con 20% paté + 10% spirulina → incremento del valore proteico mediante un ingrediente funzionale già descritto in letteratura;

- *pizzelle* con farine di ceci, piselli e farro → confronto tra differenti fonti proteiche vegetali per valutarne l'influenza su composizione, struttura dell'impasto e qualità finale;
- *pizzelle* con farine di ceci, piselli e farro + 20% pat  → incremento del valore proteico con aggiunta di ingrediente funzionale per aumentarne il valore nutrizionale e nutraceutico;
- *pizzella* con 30% di pat  → verifica del limite massimo di incorporazione del pat  mantenendo una buona qualit  tecnologica e sensoriale.

Tutte le prove sono state realizzate in triplicato e con differenti tipologie di pat  di olive monocultivar. I campioni testati sono riassunti in tabella 5.1, con le loro diverse formulazioni.

a.



b.



Fig. 5.3a. - Un impasto di *pizzella* con 10% di pat ; **fig. 5.3b** – Un impasto di *pizzella* con 20% di pat  e 10% di Spirulina.

Per la realizzazione del prodotto finito   stata usata una piastra elettrica apposita, che oggi ha sostituito il ferro tradizionale (Fig. 5.4).

La produzione di *pizzelle*   stata standardizzata nel peso di ciascun campione (25 g a crudo) e nei tempi di cottura (50 secondi).

Tab. 5. 1 – Campioni prova realizzati e loro diverse formulazioni

Campioni	Farina 00	Paté di olive	Spirulina in polvere	Farina di ceci	Farina di piselli	Farina di farro
P1	X	10% Leccino				
P2	X	20% Leccino				
P3	X	20% Leccino	10%			
P4	X	22% Leccino				
P5	X			X		
P6	X	20% Leccino		X		
P7	X				X	
P8	X	20% Leccino			X	
P9	X	20% Leccino				
P10	X	30% Leccino				
P11						X
P12		20% Leccino				X
P13	X	30% Tonda di Cagliari				



Fig. 5.4 – Piastra elettrica impiegata per la realizzazione delle pizzelle

5.2.4. Realizzazione del foglio di profilo 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) e dal MASAF (Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità alimentare e delle Foreste), che è stato appositamente addestrato anche per l'analisi sensoriale di paté di olive (Capitolo 4).

Sulla base di tale expertise, è stato messo a punto un foglio di profilo che fosse applicabile alle *pizzelle*, così come già fatto in precedenza per l'analisi organolettica di paté di olive (Capitolo 4) [25].

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 simili;
- attività di gruppo volta all'identificazione di tutti gli attributi sensoriali che possono riguardare il prodotto, attraverso panel aperti;
- eliminazione degli attributi troppo generici o ridondanti e validazione degli attributi rimanenti.

5.2.5. Analisi texturale

È stata, inoltre, condotta l'analisi texturale delle *pizzelle* ottenute, impiegando un Texture Analyser TA.XT_PlusC TM (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, UK). Il test eseguito è stato il TPA (Texture Profile Analysis) con sonda P/25 (cilindro dal diametro di 25 mm), che consiste nell'analisi del profilo strutturale di un prodotto attraverso una prova a doppia compressione che determina le proprietà strutturali degli alimenti simulando la masticazione. Il suo impiego è estremamente frequente in ambito alimentare.

Durante un test TPA i campioni vengono compressi due volte utilizzando un analizzatore di consistenza per fornire informazioni su come si comportano i prodotti quando vengono masticati. Questo test è stato spesso chiamato “test dei due morsi” perché lo strumento di misura imita l'azione della bocca durante la masticazione. Un pezzo di cibo di dimensioni ridotte viene compresso due volte con un idoneo accessorio per alimenti per imitare l'azione esercitata dalla mascella. Si ottiene, così, un grafico con due picchi che permette di quantificare più parametri strutturali in un unico test. Eseguendo un test TPA si possono ottenere sette caratteristiche distinte (5 misurate e 2 calcolate dai parametri misurati) riconoscibili in punti precisi della curva del grafico:

- fratturabilità;
- durezza;
- coesività;
- adesività;
- elasticità;
- gommosità;
- masticabilità.

Questi parametri permettono di caratterizzare al meglio l'identità strutturale di qualsiasi alimento, che raramente si può semplificare in un singolo parametro reologico come la durezza o la coesività. Infatti, la texture di qualsiasi alimento è multiforme ed è legata alle aspettative sensoriali dei consumatori.

5.2.6. Scelta dei pat 

Dall'analisi organolettica, il Panel ha individuato la migliore composizione di ingredienti, selezionando due pat  di olive pi  idonei alla realizzazione di uno snack che risultasse gradevole ed equilibrato.

Nello specifico sono stati selezionati:

1. **pat  di cv. Tonda di Cagliari**, C.O.PAR. Soc. Coop. Agricola (Via Emilio Lussu, 43 – 09041 Dolianova SU – Italia - Prodotto nello stabilimento di Borgata Santa Sofia Laconi OR – Italia);
2. **pat  di cv. Itrana nera**, Cosmo Di Russo Az. Agricola (Via Pontone snc - 04024 Gaeta LT – Confezionato presso stabilimento in strada 609 Carpinetana snc - 04010 Loc. Ponte Pisello Maenza LT).

Gli ingredienti del primo risultano essere dall'etichetta: pasta di olive verdi 79%, olio di oliva vergine, miscela di spezie e/o piante aromatiche, correttori di acidit : acido lattico, acido citrico.

Gli ingredienti del secondo in proporzione variabile sono: polpa di olive, olio extra vergine di oliva, sale.

5.2.7. Analisi nutrizionale

  stata affidata l'analisi nutrizionale ad un laboratorio esterno al nostro, LabAnalysis Group S.r.l. (Sede legale Via Europa, 5 - 27041 Casanova Lonati - PV), per mancanza della strumentazione necessaria; pertanto, non vengono riportate le metodiche impiegate, non essendo di nostra esecuzione. Per il calcolo dei fenoli   stato impiegato il metodo Folin Ciocalteau.

5.2.8. Analisi statistica

I risultati ottenuti dall'analisi sensoriale sono stati valutati attraverso la mediana, il coefficiente di variazione robusto e la realizzazione di profili sensoriali

specifici per pat  di olive, oltre che alle medie e all'elaborazione grafica del gradimento dei campioni, utilizzando Excel.

Anche i risultati dell'analisi texturale e di quella nutrizionale sono stati elaborati utilizzando Excel e PAleontological STatistics (Versione 2.12, Øyvind Hammer, Museo di Storia Naturale, Universit  di Oslo, Norvegia).

5.3 Risultati

5.3.1. Caratteristiche nutrizionali del pat  e delle pizzelle

In Tab. 5.2 e in Tab. 5.3   possibile osservare i principali biofenoli riscontrati nei pat  di olive testati, distinti tra pat  ottenuti da olive verdi (Tab. 5.2) e pat  ottenuti da olive nere (Tab.5.3).

Tab. 5.2 – Principali biofenoli nei pat  di olive verdi (mg/kg). I dati sono espressi come medie di almeno 2 determinazioni e il coefficiente di variazione   <5% ⁶

	Itrana bianca	Ascolana tenera	Tonda di Cagliari	Salella verde	Ogliarola garganica	Bella di Ceri- gnola
3,4-DHPEA (Idrossitirosolo)	1623.3	177.5	1192.9	146.2	1219.9	187.9
p-HPEA (Tirosolo)	105.2	24	79.8	13	61.5	7.4
Verbascoside	0	0	3	0	0	0
3,4-DHPEA-EDA (Oleaceina)	30.3	0	87.4	6.9	0	5.4
Oleuropeina	5.9	0	0	0	7.3	0
3,4-DHPEA-EA (Oleuropeina aglicone)	36.3	0	27.4	7.3	18.8	2.6
p-HPEA-EDA (Oleocantale)	0	0	107.9	42.9	0	0
p-HPEA-EA (Ligstroside aglicone)	0	9.9	0	0	0	0
3,4-DHPEA-EA,H	200.4	46.2	72.7	61.3	18	17.1
p-HPEA-EA,H	33.7	8.9	25.1	7.3	0	9
CFT (Contenuto Fenolico Totale)	2035.1	266.5	1596.2	277.6	1325.5	229.4
Tot per porzione (20 g)	41	5	32	6	27	5

⁶Tabella usata per Poster presentato al VI Convegno Nazionale dell'Olio ed Olio - Ascoli Piceno 13-15 novembre 2024. Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Proposta di applicazione del claim salutistico "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" anche per le olive da tavola e i pat  di olive.

Tab. 5.3 – Principali biofenoli nei pat  di olive nere (mg/kg). I dati sono espressi come medie di almeno 2 determinazioni e il coefficiente di variazione   <5% ⁷

	Oliva di Gaeta	Cellina di Nard�	Salella nera	Lea	Taggiasca	Bosana
3,4-DHPEA (Idrossitirosolo)	1327,2	1296,3	139,2	831,7	1022	1571,4
p-HPEA (Tirosolo)	69,2	106	53,6	81,5	126,5	123,3
Verbascoside	0	0	0	0	11,7	74,3
3,4-DHPEA-EDA (Oleaceina)	176,9	66,5	33,8	0	22,8	0
Oleuropeina	8,9	0	0	0	0	0
3,4-DHPEA-EA (Oleuropeina aglicone)	22,9	0	14,3	0	11,2	28,6
p-HPEA-EDA (Oleocantale)	0	0	66,8	0	4,9	0
p-HPEA-EA (Ligstroside aglicone)	0	0	0	14,2	0	0
3,4-DHPEA-EA,H	278,7	312	254,9	521,5	153	415,3
p-HPEA-EA,H	163,8	36,6	34	84,9	41,9	54,7
CFT (Contenuto Fenolico Totale)	2047,7	1817,4	596,6	1533,9	1394	2267,6
Tot per porzione (20 g)	41	36	12	31	28	45

L'idrossitirosolo e il 3,4-DHPEA-EA, H, derivati dell'oleuropeina, sono i fenoli pi  abbondanti nella quasi totalit  dei campioni analizzati, mentre come derivati del ligstroside troviamo quasi esclusivamente il tirosolo e il p-HPEA-EA, H. Quasi del tutto assenti risultano l'oleocantale e l'aglicone del ligstroside.

In alcuni campioni (Leccino e Taggiasca) sono presenti discrete quantit  di verbascoside. L'idrossitirosolo   il fenolo pi  abbondante in quasi tutti i campioni di pat  analizzati. Considerando una porzione giornaliera di 20 g di pat  di olive si ottengono valori di idrossitirosolo e derivati > 35 mg/20g per le cultivar Itrana (sia verde che nera), Bosana e Cellina di Nard . Contenuti bassi ma comunque uguali o superiori a 5 mg/20g si sono riscontrati solo per le cv. Ascolana tenera, Bella di Cerignola e Salella.

Il valore soglia di 5 mg di idrossitirosolo e derivati riferito a 20 g di olio EVO   ampiamente superato dalla maggior parte delle cultivar analizzate.

L'estrema variabilit  nella composizione dei pat  di olive dipende dalla cultivar, dal

⁷Tabella usata per Poster presentato al VI Convegno Nazionale dell'Olivo ed Olio - Ascoli Piceno 13-15 novembre 2024. Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Proposta di applicazione del claim salutistico "i polifenoli dell'olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo" anche per le olive da tavola e i pat  di olive.

metodo di trasformazione impiegato e dallo stadio di maturazione delle olive di partenza.

In tabella 5.4 sono riportati i risultati dell'analisi nutrizionale effettuata sui campioni di pizzella.

Tab.5.4– Valori nutrizionali dei campioni esaminati

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Polifenoli totali (mg/kg)	<25	60	414	275	114	102
Valore energetico (kcal/100)	421	451	440	447	454	469
Valore energetico (Kj/100)	1766	1887	1841	1870	1901	1960
Carboidrati (g/100 g)	56,3	50,9	48,6	50,6	52,1	50,7
Umidità (g/100 g)	15,91	14,2	17,22	13,93	12,3	11,07
Ceneri (g/100 g)	1,15	1,18	0,82	1,64	1,35	1,77
Sostanza proteica (g/100 g)	7,4	8,88	8,31	7,67	7,56	7,38
Fibra alimentare (g/100 g)	1,006	1,56	1,83	3,09	3,48	3,63
Sostanza grassa (g/100 g)	18,25	23,2	23,2	23,1	23,2	25,5
Acidi grassi saturi (%)	3,24	4,18	4,22	4,22	3,83	4,13
Acidi grassi monoinsaturi (%)	12,7	16,1	15,7	15,7	16,7	18,3
Acidi grassi poliinsaturi (%)	2,3	2,97	3,26	3,18	2,67	3,01
Zuccheri (g/100 g)	0,634	0,56	0,473	0,542	0,673	0,632
Fruttosio (g/100g)	<0,1	<0,096	<0,096	<0,1	<0,098	<0,099
Glucosio (g/100 g)	<0,1	<0,096	<0,097	<0,1	<0,098	<0,099
Saccarosio (g/100 g)	0,181	0,167	0,125	0,147	0,139	0,148
Maltosio (g/100 g)	0,453	0,397	0,348	0,395	0,534	0,484
Lattosio (g/100 g)	<10	<0,096	<0,097	<0,1	<0,098	<0,099
Sale (g/100 g)	0,729	0,798	0,703	1,59	0,855	1,4

Dai dati ottenuti si evince come il campione F3 risulti a maggior contenuto fenolico (414 mg/kg) rispetto agli altri campioni e con il più basso tenore di sale Na (0,703 g/100g).

Il tenore lipidico varia leggermente tra 18.25 e 25.5 g/100 g, valori nella media di molti snack del commercio; positivo il riscontro del basso contenuto di acidi grassi saturi, che varia in una forbice compresa tra 3.24% e 4.22%, in favore degli acidi grassi monoinsaturi e poliinsaturi, associati ad un fattore protettivo per malattie cardiovascolari. Il tenore proteico è nel range 7.38-8.88 g/100 g.

Il contenuto di fibra alimentare risulta essere superiore a 3 g/100 g in 3 campioni (F4, F5, F6), che in etichetta potrebbero figurare con il claim “Fonte di fibre”, stando al Reg. (CE) N. 1924/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006, relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari [26].

La quota dei carboidrati è allineata a quella presente in altri prodotti alimentari a base di farina, quali pane, focacce, ecc., presentando una bassa quantità di zuccheri semplici, compresa tra 0.47 g/100 g e 0.67 g/100 g, tale da poter riportare l’indicazione nutrizionale “a basso contenuto di zuccheri” [26].

In figura 5.5 sono riportati i dati riguardanti i principali macronutrienti (carboidrati, lipidi e proteine), la fibra alimentare, gli zuccheri semplici e il contenuto di sale del campione di controllo F1 a confronto con i valori di altri prodotti a base di farina, quali il pane bianco, il panino all’olio, i crackers salati e i crackers al formaggio, i cui dati sono stati estrapolati dalle tabelle di nutrizione degli alimenti ufficiali di riferimento per la nostra nazione [27] (Tabelle di Composizione degli alimenti, CREA – Alimenti e Nutrizione).

La scelta di tali alimenti è stata dettata dalla necessità di confrontare il nostro prodotto con un alimento base della nostra alimentazione mediterranea come il pane bianco, ma anche con altri alimenti arricchiti in grassi (panini all’olio, crackers e crackers al formaggio).

Inoltre, è stato aggiunto nel confronto anche un prodotto simile, una *pizzella* salata del commercio, distribuita da un forno della Provincia de l’Aquila (AQ), Nunzio Noletti, i cui valori nutrizionali sono dichiarati in etichetta per la vendita.

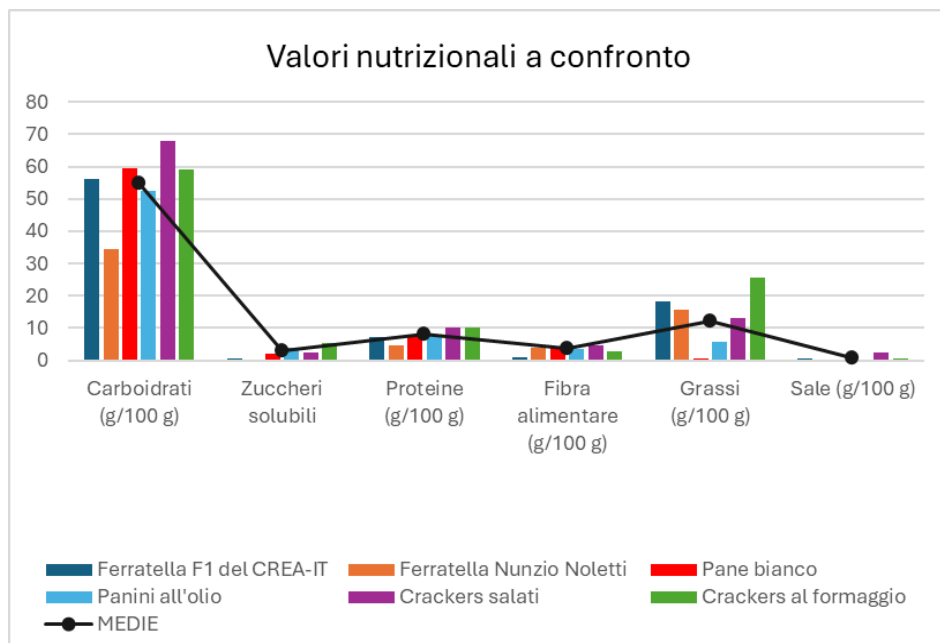


Fig. 5.5 - Confronto di valori nutrizionali tra prodotti a base di farina

Il prodotto base (F1) da noi realizzato presenta valori nella media per contenuto di carboidrati e proteine, leggermente più alti per tenore lipidico; significativamente ridotto risulta essere il contenuto di zuccheri semplici. Il sale è poco al di sotto del quantitativo presente in altri snack del commercio e della media dei prodotti oggetto del nostro confronto, la fibra è sensibilmente più bassa.

In figura 5.6 possiamo osservare nel dettaglio il confronto dei prodotti da noi realizzati a base di pat  con gli alimenti gi  menzionati, in modo da avere una panoramica pi  completa.

I valori medi riportati sono quelli ottenuti dagli alimenti sopraindicati. Si pu  osservare un contenuto di carboidrati e di zuccheri semplici inferiore alla media, mentre il contenuto proteico risulta nella media e quello lipidico al di sopra. Il sale e la fibra risultano nella media per quasi tutti i campioni testati.

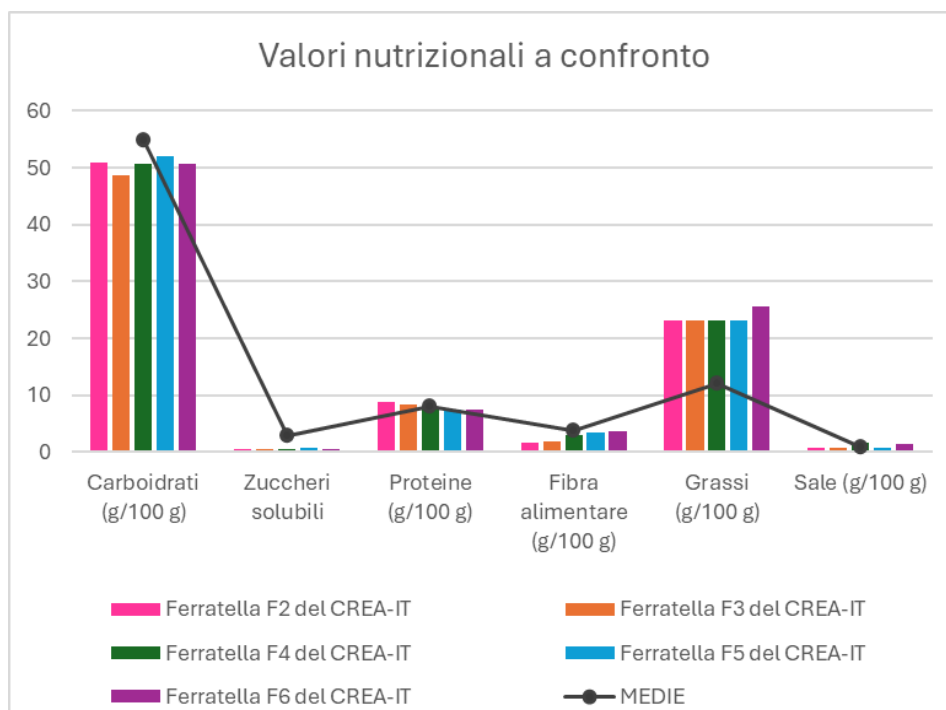


Fig. 5.6 - Confronto di valori nutrizionali dei nostri campioni con le medie di prodotti comuni a base di farina

5.3.2. Foglio di profilo sensoriale

Nel foglio di profilo delle *pizzelle*, come nel foglio di profilo delle olive da tavola (COI/OT/MO No.1/Rev.3 June2021) [28], la parte superiore è incentrata sugli attributi negativi (genericamente “difetti” da specificare e “rancido”). Tra i difetti riscontrabili, si è voluto dare risalto al difetto di rancido, che può derivare, oltre che dall’olio presente impiegato nell’impasto, anche dall’olio aggiunto all’interno del pat  di olive impiegato.

Trattandosi di una matrice complessa a base di farina e pat  e di olive,   stata inserita l’indicazione generica di “difetti”, dal momento che questi potrebbero essere di diversa natura e in fase sperimentale non si   voluto limitare le possibilit  percepibili.

Seguono poi gli attributi olfattivo-gustativi (“salato”, “amaro”, “percezione del pat ”, “aromatico- speziato”).

Nell’ultima parte   stato inserito il gruppo degli attributi cinestetici (“consistenza”, “croccantezza”, “friabilit ”, “adesivit ”, “oleosit ”, “masticabilit ”, “gommosit ”).

Per misurare l'accettabilità del prodotto è stata utilizzata una scala edonica facciale a 5 punti, consistente nello scegliere una delle faccine stilizzate a seconda del gradimento, dalla più contrariata (corrispondente a punteggio 1) alla più sorridente (corrispondente a punteggio 5) [29].

In Fig. 5.7 è mostrato il foglio di profilo impiegato per gli assaggi, derivante dall'iter procedurale suddetto, che ha comportato, tra l'altro, numerosi incontri con gli assaggiatori per determinare la stesura finale.

FOGLIO DI PROFILO PER L'ASSAGGIO DI SNACK A BASE DI PATE'

PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI NEGATIVE

Difetti (precisare)

Rancido

PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI OLFATTIVO/ GUSTATIVE

Salato

Amaro

Percezione del pate'

Aromatico (speziato)

PERCEZIONE DELLE SENSAZIONI CINESTETICHE

Consistenza (durezza)

Croccantezza

Friabilità

Adesività (collosità)

Oleosità

Masticabilità

Gommosità

Nome assaggiatore:

Codice campione:

Data:

GRADIMENTO:



Fig. 5.7 – Foglio di profilo per l'analisi sensoriale delle *pizzelle*, impiegato per gli assaggi, ottenuto a seguito di specifico iter procedurale da parte del Panel

Di seguito viene riportato il “Glossario sensoriale per lo snack a base di paté” con le definizioni dei descrittori utilizzati.

GLOSSARIO SENSORIALE PER LO SNACK A BASE DI PATÉ

- **Difetti (specificare):** percezione olfattivo-gustativa-cinestetica di sentori anomali e/o non attesi.
- **Rancido:** sensazione olfattiva percepita per via diretta e/o retronasale, caratteristica di olive o di oli che hanno subito un processo di irrancidimento.

SENSAZIONI OLFATTIVO/GUSTATIVE

- **Salato:** sensazione gustativa percepibile prevalentemente nella zona latero-anteriore della lingua. È associata alla presenza di cloruro di sodio.
- **Amaro:** sensazione gustativa percepibile prevalentemente alla base della lingua, associata alla presenza di sostanze amare, principalmente polifenoli.
- **Percezione del paté:** sensazione gustativa dipendente dalla presenza maggiore o minore di paté nell’impasto e dalla capacità del paté di essere più o meno percepibile.
- **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) nei paté di olive. impiegati nell’impasto

SENSAZIONI CINESTETICHE

- **Consistenza (durezza):** 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.
- **Croccantezza:** attributo relativo al rumore prodotto dall’attrito o dalla rottura tra due superfici. È legato alla forza necessaria per rompere un prodotto con i denti e si determina comprimendo l’alimento tra i molari.
- **Friabilità:** attributo relativo alla capacità di un alimento di ridursi in mi-

nutri frammenti in seguito a pressione o a una qualsiasi azione meccanica all'interno della cavità orale.

- **Adesività (collosità):** descrive il grado di aderenza di un alimento ai denti e/o al palato durante la masticazione.
- **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.
- **Gommosità:** sensazione tattile che definisce la consistenza di un alimento simile alla gomma, caratterizzato da morbidezza, elasticità e spesso da una natura appiccicosa o vischiosa.

5.3.3. Analisi sensoriale

In figura 5.8 è possibile osservare alcuni dei campioni testati utilizzando il foglio di profilo messo a punto, nelle diverse preparazioni valutate dal Panel.

In figura 5.9 si possono osservare i dati risultati dall'analisi sensoriale dei campioni contenenti paté e di quello di controllo, privo di paté, che sono stati quelli mostrati in tabella 5.5.

Tab. 5.5. Elenco dei campioni di *pizzelle* testati

CAMPIONI	COMPOSIZIONE
F1	0% Paté di olive - Controllo
F2	10% di paté di cv. Tonda di Cagliari (C.O.PAR. Soc. Coop. Agricola)
F3	20% di paté di cv. Tonda di Cagliari (C.O.PAR. Soc. Coop. Agricola)
F4	30% di paté di cv. Tonda di Cagliari (C.O.PAR. Soc. Coop. Agricola)
F5	20% di paté di cv. Itrana nera (Cosmo Di Russo Az. Agricola)
F6	30% di paté di cv. Itrana nera (Cosmo Di Russo Az. Agricola)



Fig. 5.8 – Alcuni campioni di *pizzelle* valutati dal Panel

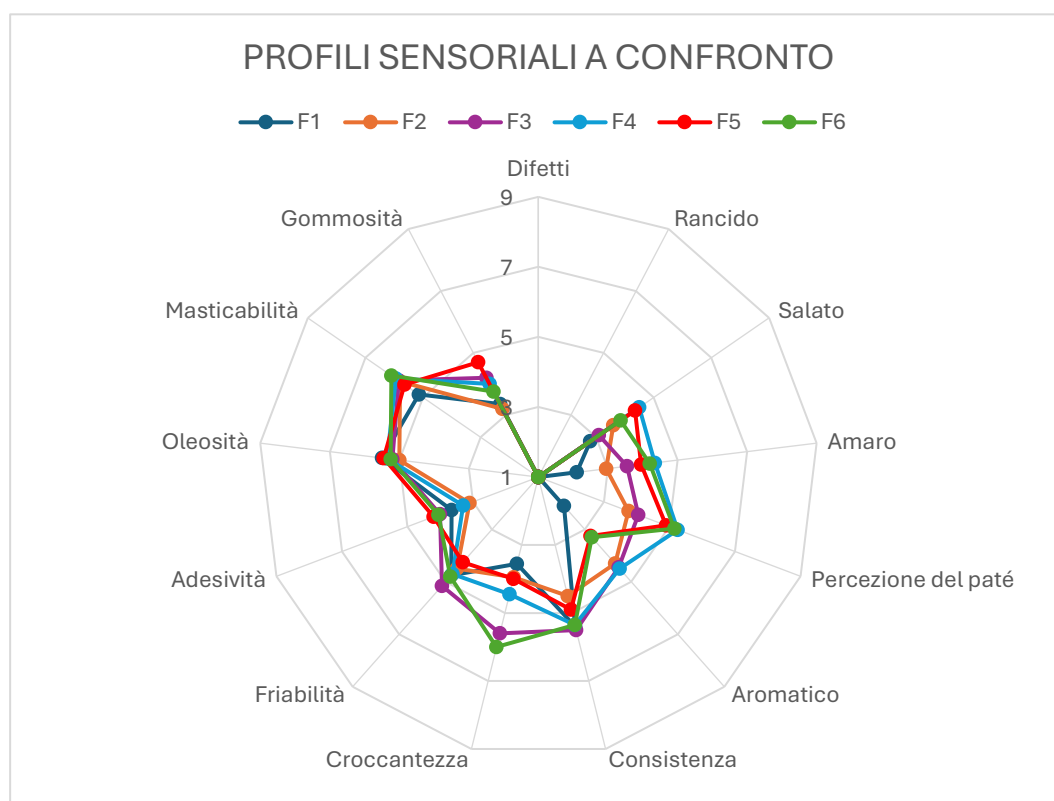


Fig. 5.9 – Profili sensoriali sovrapposti dei campioni di *pizzelle* analizzati

Dai radar ottenuti e sovrapposti si osserva l'assenza in tutti i casi di difetti,

delineando così dei prodotti gradevoli a livello organolettico. Il campione F4 è risultato essere il più salato e il più amaro, in quanto a maggior contenuto di paté, presumibilmente in partenza più amaro e più salato rispetto a quello dei campioni F5 e F6.

Tuttavia, quest'ultimo ha riscontrato la più alta percezione di paté, probabilmente a causa di sentori più spiccati delle olive da cui si è ottenuto. Naturalmente, nel campione F1, essendo privo di paté, tale parametro non è stato riscontrato.

La consistenza e la croccantezza aumentano parallelamente, quasi linearmente rispetto all'aumentare del contenuto di paté.

L'oleosità percepita risulta essere maggiore nel campione F1, in quanto si percepisce maggiormente la presenza di olio di oliva che, seppur in minima parte, è stato usato per la realizzazione del campione di controllo F1.

In generale, risultano alimenti scarsamente gommosi e abbastanza friabili; l'aroma più gradevole è quello dei campioni F2, F3 e F4, ottenuti con lo stesso paté, seppur in diverse percentuali.

In figura 5.10 si possono osservare, infine, i dati ottenuti dalla scala likert, come espressione del gradimento generale del prodotto valutato. I campioni che sono stati maggiormente apprezzati all'analisi sensoriale risultano essere F2 e F6, riportando il 63% del valore di massimo gradimento (mi piace 5), immediatamente seguiti da F4 con il 50% di valutazione al massimo gradimento. In generale, tutti i prodotti risultano molto appetibili e gustosi, non riscontrando alcun valore di gradimento basso (mi piace 1 o mi piace 2).

Anche F1, pur essendo un campione di controllo privo di paté, è considerato un prodotto abbastanza gradevole sul piano organolettico.

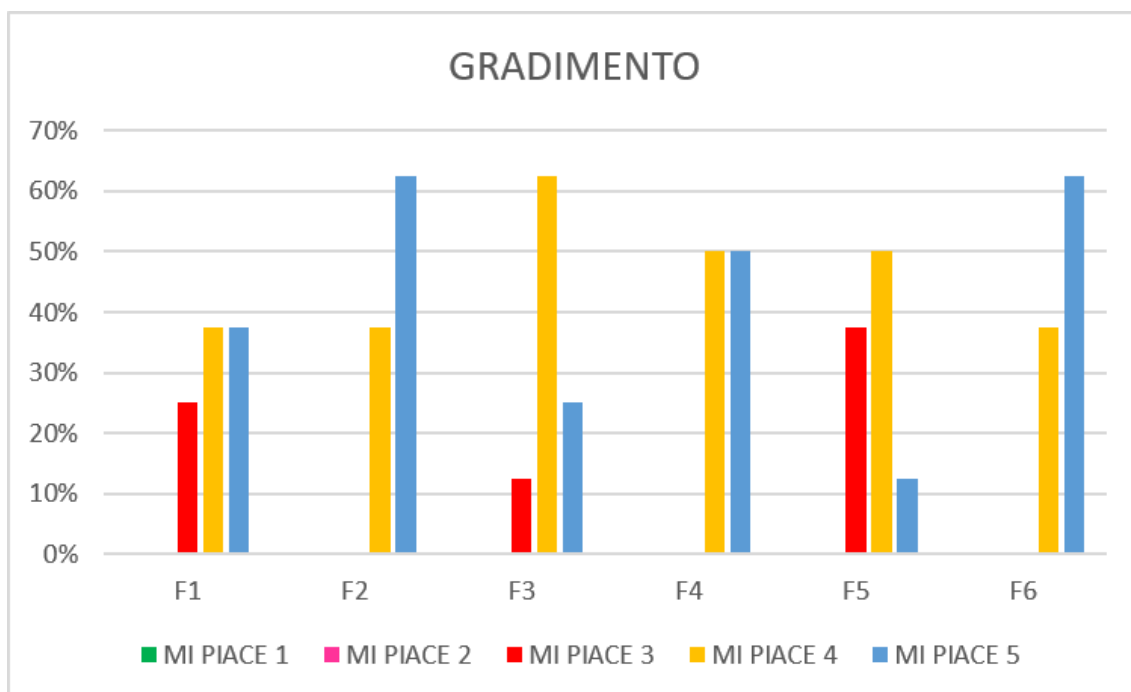


Fig. 5.10 – Grafico di gradimento dei campioni testati

5.3.4 Analisi texturale

I parametri analizzati con test TPA al Texture Analyser sono:

- hardness (durezza, indica la forza necessaria per comprimere o rompere un alimento al primo morso);
- fracturability (fratturabilità o friabilità, è la tendenza di un prodotto a rompersi, sbriciolarsi o frantumarsi quando viene sottoposto a una forza);
- adhesiveness (adesività, indica la forza necessaria per vincere le forze di attrazione tra la superficie di un materiale e un'altra superficie, es. il palato, i denti, o una sonda meccanica. Nei test alimentari misura quanto un prodotto risulta "appiccicoso" e difficile da staccare o deglutire);
- springiness (elasticità o ritorno elastico, si riferisce alla velocità e alla misura in cui un alimento o un materiale ritorna alla sua forma originale dopo essere stato compresso e rilasciato. Nell'analisi della texture, è un indicatore chiave della freschezza, della gommosità e della qualità strutturale);

- cohesiveness (coesività, misura la forza dei legami interni di un prodotto e rappresenta la capacità di un materiale di mantenere la propria forma e integrità e resistere alle deformazioni prima di rompersi durante la masticazione);
- gumminess (gommosità, indica la resistenza che un alimento oppone alla masticazione, misurando lo sforzo necessario per ridurlo in poltiglia prima di deglutire. Questa proprietà fisica è definita scientificamente dal calcolo matematico: $\text{Gommosità} = \text{Durezza} \times \text{Coesività}$);
- chewiness (masticabilità, descrive lo sforzo o l'energia necessaria per trasformare un cibo solido in un bolo pronto per essere deglutito. È il risultato combinato delle proprietà durezza, coesività, elasticità);
- resilience (resilienza, misura la capacità di un alimento di riprendere la sua forma originaria dopo essere stato parzialmente compresso dai denti).

In figura 5.11 viene mostrato un esempio di grafico TPA, dove è possibile osservare i due picchi che simulano il doppio morso durante la masticazione.

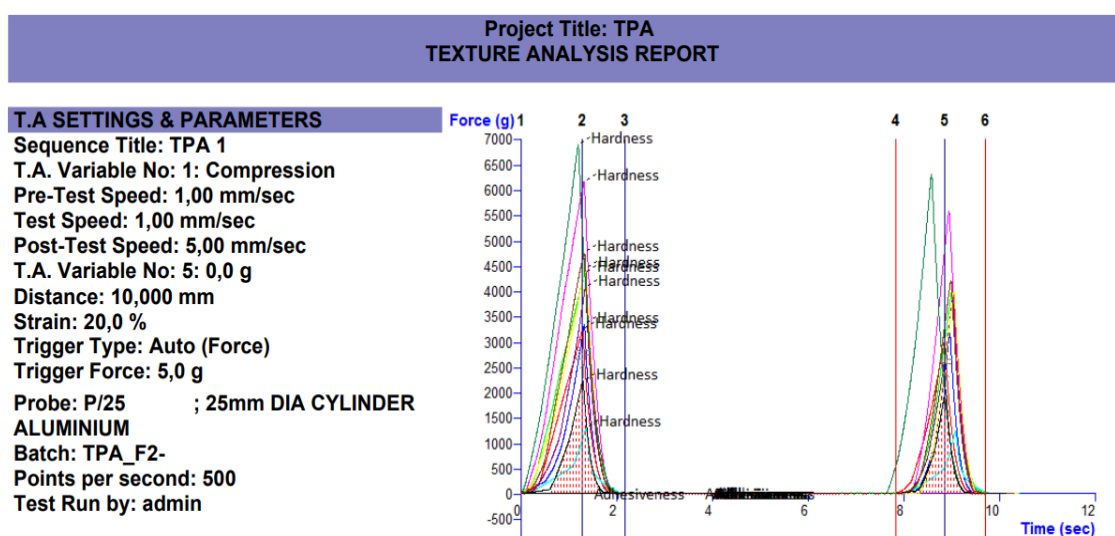


Fig. 5.11- – Esempio di grafico ottenuto da test TPA con Texture Analyser.

Ogni variabile strumentale e ogni attributo sensoriale inerente alla componente texturale, sono stati messi in correlazione ottenendo correlazioni di Speraman, mostrate in figura 5.12; tale scelta di analisi statistica è sembrata essere la più prudente dal momento che il panel è tipicamente “ordinale” e che la numerosità del campione è esigua.

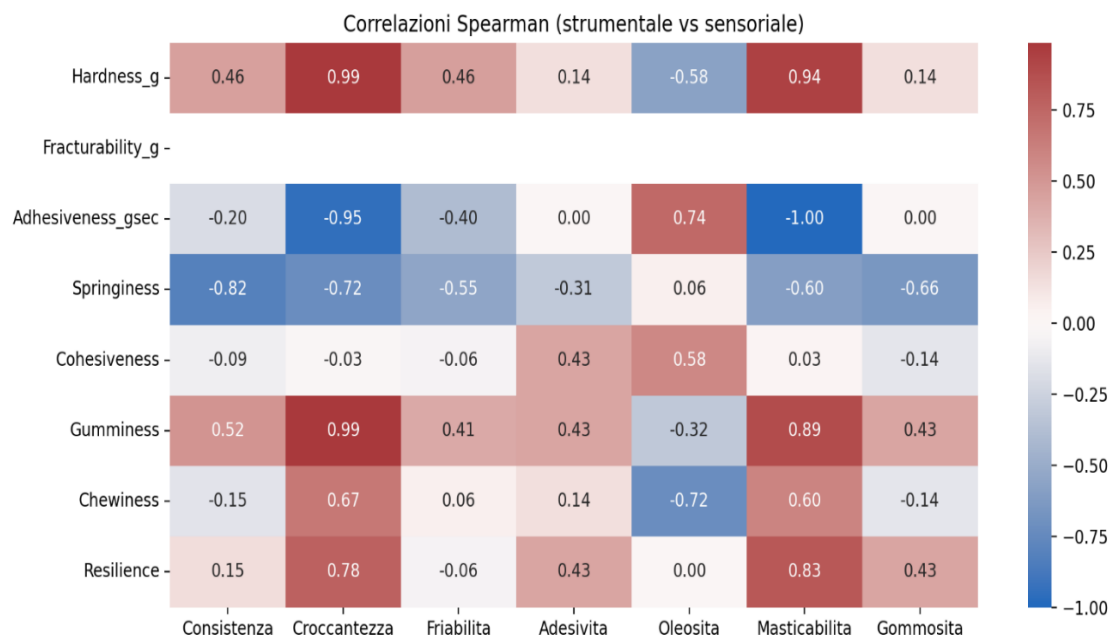


Fig. 5.12 - Correlazioni di Spearman tra parametri texturali ottenuti da analisi sensoriale e analisi strumentale.

Con tutti i campioni disponibili, emergono relazioni molto forti soprattutto con il parametro Croccantezza:

- Croccantezza vs Hardness: $\rho \approx 0.986$, $p \approx 0.00031$, $n=6$
- Croccantezza vs Gumminess: $\rho \approx 0.986$, $p \approx 0.00031$, $n=6$
- Croccantezza vs Chewiness: $\rho \approx 0.986$, $p \approx 0.00031$, $n=6$

Questo significa che quando aumentano Hardness/Gumminess/Chewiness misurati strumentalmente, aumenta in modo molto consistente anche la Croccantezza percepita dal panel. Questo è coerente (almeno come direzione) con l'idea che prodotti più "resistenti/energetici" al morso vengano percepiti più croccanti.

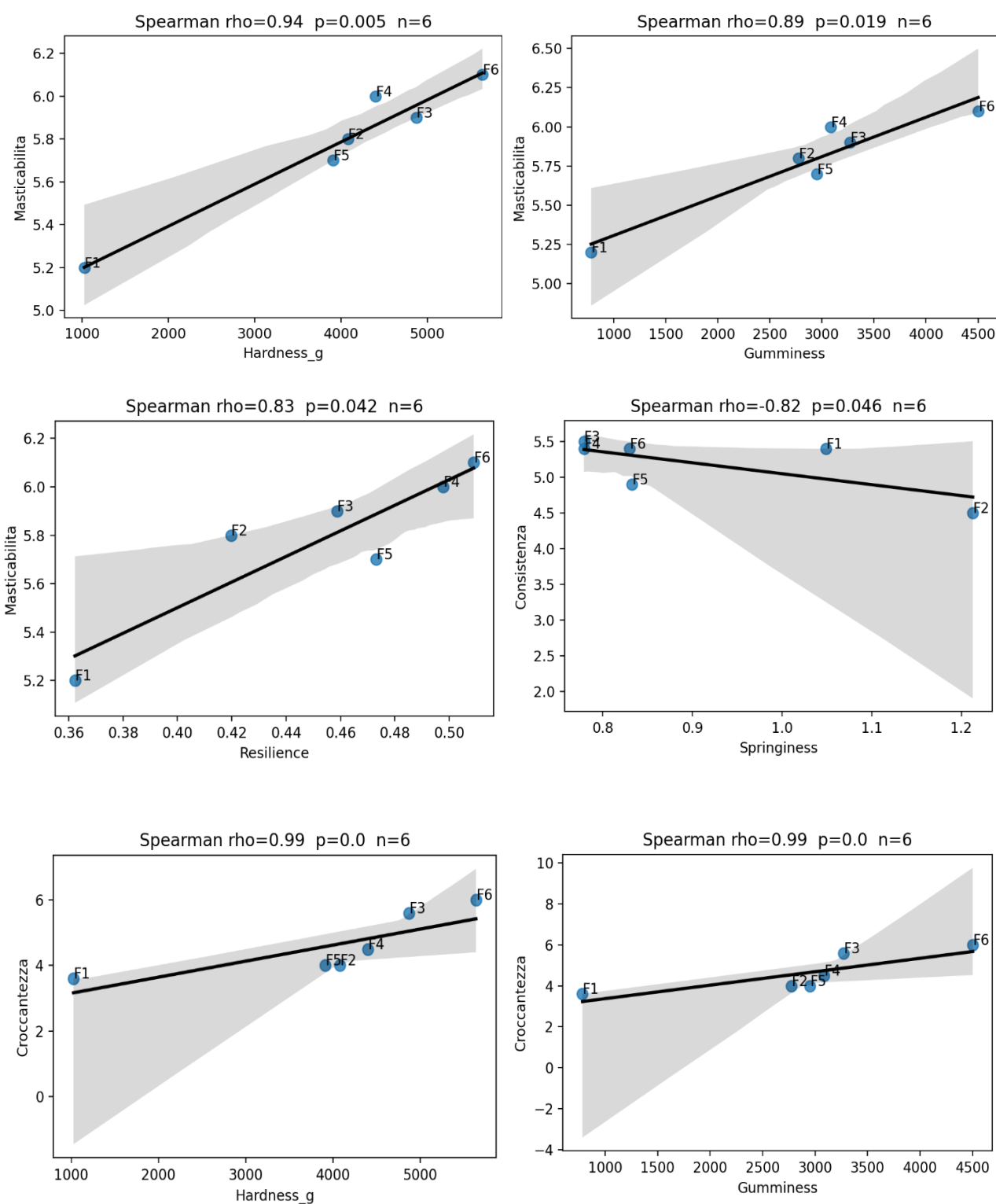


Fig. 5.13 – Scatter con retta di regressione dei parametri texturali

Sono stati tracciati gli scatter con retta di regressione (con le etichette F1, F2, F3, F4, F5, F6), così da vedere immediatamente se il trend fosse trainato da un solo campione o se fosse generale (figura 5.13). È emerso che il trend è molto pulito.

Nel complesso, i risultati indicano una buona corrispondenza tra misure strumentali e percezione sensoriale, suggerendo che i parametri misurati dallo strumento riescono a descrivere efficacemente ciò che viene percepito dagli assaggiatori.

È stata osservata una forte correlazione positiva tra hardness strumentale e masticabilità sensoriale ($\rho = 0.94$; $p = 0.005$), indicando che i campioni caratterizzati da maggiore resistenza alla compressione risultano percepiti come più masticabili dal panel.

È la correlazione positiva più forte tra quelle osservate. Ciò significa che i campioni che richiedono una maggiore forza di compressione vengono percepiti come più impegnativi da masticare. Il parametro Hardness appare quindi un eccellente predittore della masticabilità sensoriale.

Una correlazione forte e significativa è emersa tra la gumminess e la masticabilità sensoriale ($\rho = 0.89$; $p = 0.019$), mostrando una forte associazione positiva ed evidenziando come l'aumento dell'energia richiesta per la deformazione del prodotto sia percepito dal panel come maggiore impegno masticatorio. Dal punto di vista tecnologico è un risultato atteso, poiché la gumminess rappresenta l'energia necessaria per disintegrare un alimento semisolido fino alla deglutizione.

Una correlazione positiva significativa è risultata anche tra Resilience e Masticabilità (Spearman $\rho = 0.83$, $p = 0.042$), indicando che i prodotti che recuperano più rapidamente la forma dopo la deformazione vengono percepiti come maggiormente masticabili. L'associazione è leggermente meno forte rispetto alla precedente (Hardness e Gumminess), ma resta statisticamente significativa.

Una correlazione negativa significativa molto interessante è emersa tra Springiness e Consistenza (Spearman $\rho = -0.82$, $p = 0.046$), indicando che all'aumentare dell'elasticità (springiness) diminuisce la percezione di consistenza da parte del panel. Ciò suggerisce che i giudici associano una maggiore consistenza a strutture più compatte e meno elastiche, mentre alimenti più elastici vengono percepiti come meno consistenti.

Una correlazione quasi perfetta è stata osservata tra Hardness e Croccantezza sensoriale ($\rho = 0.99$; $p < 0.001$), evidenziando una sostanziale sovrapposizione tra la misura strumentale e la percezione del panel, cioè la durezza misurata strumentalmente coincide

quasi completamente con la percezione di croccantezza del panel. Dal punto di vista applicativo, Hardness potrebbe essere utilizzato come indicatore oggettivo della croccantezza.

Infine, la Gumminess ha mostrato una correlazione quasi perfetta con la Croccantezza sensoriale ($p = 0.99$; $p < 0.001$), suggerendo che la struttura meccanica del prodotto contribuisce in modo determinante alla percezione della croccantezza, perché all'aumentare della gommosità aumenta la croccantezza percepita.

Questo risultato potrebbe dipendere dal fatto che i campioni più croccanti sono anche quelli con una struttura più compatta e resistente, generando valori elevati sia di hardness sia di gumminess.

5.4. Discussione e conclusioni

L'obiettivo del presente studio è stato quello di sviluppare uno snack innovativo a partire da una preparazione tradizionale abruzzese, la *pizzella*, arricchendola con paté di olive monocultivar allo scopo di migliorarne il profilo nutrizionale e nutraceutico senza comprometterne l'accettabilità sensoriale.

I risultati ottenuti dimostrano come l'impiego del paté di olive rappresenti una strategia efficace per la realizzazione di alimenti funzionali caratterizzati da un buon equilibrio tra qualità organolettica e valore nutrizionale.

Numerosi studi recenti hanno proposto l'impiego di sottoprodotti dell'olivicoltura nello sviluppo di alimenti funzionali [30, 31]; tuttavia, pochi lavori descrivono un percorso sperimentale completo che integri la selezione microbiologica della materia prima, la sua caratterizzazione chimica e sensoriale e la successiva progettazione del prodotto finale. In tale prospettiva, il presente lavoro assume un carattere multidisciplinare, poiché le conoscenze acquisite nei diversi studi sono state progressivamente integrate nella realizzazione dello snack innovativo. Il prototipo sviluppato dimostra come la valorizzazione del paté di olive possa tradursi non solo in un incremento del valore economico dei sottoprodotti dell'olivicoltura, ma anche nella progettazione di alimenti ad elevato valore nutrizionale e funzionale, in linea con le più recenti strategie europee orientate alla sostenibilità delle filiere agroalimentari e all'economia circolare.

Il contenuto di composti fenolici rilevato nei pat  di olive evidenzia un'interessante variabilit  tra le diverse cultivar, confermando come il patrimonio fenolico sia fortemente influenzato sia dal genotipo sia dal processo di trasformazione. Tali risultati risultano coerenti con quanto riportato da Charoenprasert e Mitchell [32], i quali evidenziano come la concentrazione dei principali composti fenolici delle olive da tavola dipenda dall'interazione tra cultivar, stadio di maturazione e tecnologia di trasformazione. In particolare, i processi di fermentazione naturale consentono generalmente una migliore conservazione della frazione fenolica rispetto ai trattamenti alcalini, che determinano un'importante diffusione dei composti fenolici nella salamoia e una conseguente riduzione del contenuto finale nel prodotto.

La maggiore concentrazione fenolica osservata nelle cultivar Itrana e Leccino conferma quanto descritto da Conte et al. [33], secondo cui le olive fermentate naturalmente mantengono concentrazioni pi  elevate di idrossitirosolo, tirosolo e derivati secoiridoidici rispetto ai prodotti ottenuti mediante deamarizzazione alcalina. Tale aspetto riveste particolare interesse nutrizionale, poich  l'idrossitirosolo e i suoi derivati rappresentano i principali composti bioattivi cui sono attribuite le propriet  antiossidanti e antinfiammatorie tipiche delle olive e dell'olio extravergine di oliva.

L'ipotesi formulata all'inizio dello studio pu  pertanto ritenersi sostanzialmente confermata. I risultati ottenuti suggeriscono infatti che alcune tipologie di pat  di olive siano in grado di apportare quantit  di composti fenolici comparabili a quelle richieste per il riconoscimento dell'health claim previsto dal Regolamento (UE) n. 432/2012, relativo alla protezione delle lipoproteine LDL dal danno ossidativo. Pur essendo tale claim attualmente autorizzato esclusivamente per l'olio di oliva, le evidenze emerse indicano che alcuni prodotti derivati dalle olive da tavola potrebbero rappresentare una fonte altrettanto significativa di composti fenolici bioattivi. Sebbene tale osservazione non consenta di estendere automaticamente il claim ad altre matrici alimentari, essa costituisce un razionale scientifico per promuovere ulteriori studi finalizzati a valutarne l'applicabilit  anche ai pat  di olive.

Questa interpretazione risulta coerente con le osservazioni di alcuni autori [34, 35] secondo cui, rispetto all'olio extravergine di oliva, le olive da tavola hanno ricevuto storicamente una minore attenzione nella ricerca nutrizionale, nonostante rappresentino una fonte significativa di composti fenolici bioattivi e alcune cultivar siano in grado di con-

servarne concentrazioni rilevanti anche dopo la trasformazione industriale, in particolare quando sottoposte a fermentazione naturale o a processi tecnologici meno drastici. Analogamente, Kiritsakis et al. [36] hanno sottolineato come le olive da tavola rappresentino una delle principali fonti alimentari di idrossitirosolo nella dieta mediterranea, suggerendo la necessità di rivalutare il loro ruolo nell'ambito degli alimenti funzionali.

È tuttavia opportuno interpretare tali risultati con cautela. Il Regolamento (UE) n. 432/2012 [37] basa infatti l'autorizzazione del claim non soltanto sulla quantità totale di polifenoli presenti nell'alimento, ma anche sull'effettiva disponibilità biologica dei composti attivi. Nel presente studio è stata determinata esclusivamente la concentrazione dei composti fenolici, senza considerare i processi di digestione, assorbimento e metabolismo che ne condizionano l'attività biologica nell'organismo. Come evidenziato dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) nel parere scientifico che ha portato all'approvazione del claim, l'effetto fisiologico è attribuibile principalmente all'idrossitirosolo e ai suoi derivati, purché questi siano assunti in quantità adeguata e risultino biodisponibili a livello sistemico.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che la bioaccessibilità dei composti fenolici è influenzata non solo dalla loro struttura chimica, ma anche dalle interazioni con la matrice alimentare. Proteine, polisaccaridi, fibre e lipidi possono infatti modificare il rilascio dei polifenoli durante la digestione gastrointestinale e, di conseguenza, la quota effettivamente disponibile per l'assorbimento intestinale [38, 39, 40]. Di conseguenza, prodotti caratterizzati da un analogo contenuto fenolico possono determinare differenti livelli di assorbimento e, quindi, differenti effetti biologici. Alla luce di tali considerazioni, la sola quantificazione dei polifenoli, pur rappresentando un prerequisito essenziale, non può essere considerata sufficiente per dimostrare il potenziale salutistico di una matrice alimentare complessa come il paté di olive.

In questa prospettiva, i risultati ottenuti costituiscono una solida base per futuri approfondimenti. Sarà infatti necessario integrare la caratterizzazione chimica con studi di digestione in vitro, prove di bioaccessibilità e biodisponibilità e, successivamente, studi clinici nell'uomo, al fine di verificare se i composti fenolici presenti nei paté di olive mantengano la propria attività biologica dopo l'assunzione. Solo attraverso questo percorso sarà possibile valutare l'eventuale estensione del claim salutistico oggi riconosciuto all'olio extravergine di oliva anche ai prodotti derivati dalle olive da tavola.

Per quanto riguarda l'analisi nutrizionale delle *pizzelle*, uno dei risultati più significativi è costituito dal contenuto fenolico totale. Il campione F3 ha mostrato il valore più elevato, raggiungendo 414 mg/kg, nettamente superiore rispetto agli altri campioni. Questo dato suggerisce che la formulazione contenente il 20% di paté di cultivar Tonda di Cagliari rappresenti il miglior compromesso tra arricchimento fenolico e caratteristiche tecnologiche del prodotto. I polifenoli dell'oliva sono ampiamente riconosciuti per le loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e cardioprotettive. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha riconosciuto il ruolo protettivo dei polifenoli dell'olio d'oliva nei confronti dello stress ossidativo delle lipoproteine plasmatiche [41].

Anche il contenuto di fibra alimentare merita attenzione. I campioni F4, F5 e F6 superano il limite di 3 g/100 g previsto dal Regolamento (CE) 1924/2006 per l'utilizzo del claim nutrizionale "fonte di fibre". Questo risultato aumenta l'interesse applicativo del prodotto, poiché la fibra alimentare è associata a numerosi benefici metabolici e gastrointestinali, inclusa la modulazione della glicemia postprandiale e del microbiota intestinale [42].

Particolarmente favorevole risulta inoltre il basso contenuto di zuccheri semplici, inferiore a 1 g/100 g in tutti i campioni esaminati. Tale caratteristica differenzia positivamente questi snack rispetto a numerosi prodotti commerciali analoghi e potrebbe rappresentare un elemento di interesse per consumatori orientati verso alimenti a ridotto impatto glicemico.

Un limite importante di questa prova è stato rappresentato dalla numerosità campionaria molto ridotta; pertanto, nonostante la significatività statistica, i risultati dovrebbero essere confermati su un numero maggiore di campioni. Tuttavia, l'entità molto elevata dei coefficienti di correlazione suggerisce che le associazioni osservate siano verosimilmente reali e tecnologicamente rilevanti.

La determinazione dei composti fenolici in matrici alimentari complesse richiede procedure estrattive e metodi cromatografici specificamente ottimizzati; pertanto, è auspicabile un'implementazione dello studio che preveda un approfondimento dei singoli composti fenolici. Futuri studi potrebbero approfondire la presenza di molecole bioattive specifiche, quali idrossitirosolo, tirosolo e derivati dell'oleuropeina, al fine di definire con maggiore precisione il valore nutraceutico del prodotto.

L'analisi sensoriale delle *pizzelle* ha evidenziato innanzitutto l'assenza di difetti percepibili in tutti i campioni esaminati, indicando che l'introduzione del paté nell'impasto non ha determinato la comparsa di note aromatiche indesiderate né fenomeni di irrancimento.

Questo aspetto assume particolare rilevanza considerando che i prodotti derivati dall'oliva possono talvolta sviluppare sentori ossidativi in seguito ai processi di trasformazione e conservazione. L'assenza del difetto di rancido suggerisce pertanto una buona qualità delle materie prime impiegate e un adeguato controllo del processo produttivo.

L'aumento progressivo della percentuale di paté ha determinato modificazioni percepibili delle caratteristiche organolettiche. In particolare, i campioni contenenti percentuali più elevate di paté hanno mostrato un incremento delle sensazioni di amaro e salato. Tale risultato appare coerente con la composizione chimica delle olive e dei loro derivati, notoriamente ricchi di composti fenolici responsabili delle note amare e di componenti saline derivanti dai processi di conservazione delle olive da tavola. Diversi autori hanno evidenziato come i fenoli dell'oliva, in particolare oleuropeina e derivati, siano strettamente correlati alla percezione dell'amaro e contribuiscano in maniera significativa all'identità sensoriale dei prodotti olivicoli [43].

Particolarmente interessante risulta il fatto che i campioni maggiormente graditi siano stati F2 e F6, caratterizzati rispettivamente da una bassa e da un'elevata percentuale di paté. Questo risultato suggerisce che il gradimento non dipenda esclusivamente dalla quantità di paté aggiunta, ma anche dalle caratteristiche sensoriali proprie della cultivar utilizzata. Infatti, il campione F6, ottenuto con paté di cultivar Itrana nera, ha mostrato la più elevata percezione del paté pur mantenendo un elevato livello di accettabilità. Ciò conferma quanto riportato in letteratura, per cui la cultivar rappresenta uno dei principali fattori responsabili delle differenze sensoriali dei prodotti derivati dall'oliva, influenzando il contenuto di composti aromatici, fenolici e volatili [44, 45]. Pertanto, emerge che le olive e i loro derivati rappresentino una fonte importante di composti bioattivi, tra cui polifenoli, fibre alimentari e acidi grassi monoinsaturi, che contribuiscono sia alle proprietà nutraceutiche sia alle caratteristiche sensoriali dei prodotti alimentari che ne derivano [45, 46].

Un altro aspetto rilevante riguarda la relazione osservata tra contenuto di paté e caratteristiche strutturali del prodotto. L'aumento della percentuale di paté è stato asso-

ciato ad una maggiore consistenza e croccantezza percepite dal panel. Questo dato appare particolarmente interessante poiché dimostra come l'arricchimento con ingredienti funzionali non abbia determinato un peggioramento della texture, fenomeno frequentemente osservato nello sviluppo di nuovi alimenti salutistici. La consistenza rappresenta infatti uno dei principali determinanti dell'accettabilità dei prodotti da forno e snack, spesso più influente persino delle caratteristiche aromatiche [47].

Nel complesso emerge una forte concordanza tra analisi strumentale e valutazione sensoriale. Tutte le correlazioni risultano statisticamente significative ($p < 0.05$) e i coefficienti di Spearman sono elevati ($|\rho| = 0.82\text{--}0.99$).

I parametri Hardness e Gumminess sono quelli che mostrano la maggiore capacità predittiva delle caratteristiche sensoriali, in particolare della masticabilità e della croccantezza. La Resilience contribuisce anch'essa alla percezione della masticabilità, mentre la Springiness sembra influenzare inversamente la consistenza percepita.

Dal punto di vista nutrizionale, l'inserimento del paté di olive ha consentito di ottenere prodotti con caratteristiche favorevoli. I valori lipidici riscontrati risultano superiori rispetto al campione di controllo, ma la qualità dei grassi presenti appare particolarmente interessante. I campioni mostrano infatti una prevalenza di acidi grassi monoinsaturi rispetto agli acidi grassi saturi. Tale profilo lipidico è tipico dell'oliva e dell'olio extravergine di oliva ed è ampiamente associato a benefici cardiovascolari nell'ambito del modello alimentare mediterraneo. Numerosi studi epidemiologici e clinici hanno dimostrato che l'assunzione regolare di acidi grassi monoinsaturi contribuisce alla riduzione del rischio cardiovascolare e al miglioramento del profilo lipidico plasmatico [48].

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano la fattibilità tecnologica della produzione di una *pizzella* salata arricchita con paté di olive, caratterizzata da elevata accettabilità sensoriale, buon profilo nutrizionale e significativo contenuto di composti bioattivi.

In particolare, la formulazione F3 appare quella maggiormente promettente sotto il profilo nutraceutico, mentre le formulazioni F2 e F6 risultano le più apprezzate dal punto di vista sensoriale.

In conclusione, lo sviluppo di prodotti del tipo della *pizzella* arricchita con pat  di olive potrebbe contribuire alla valorizzazione delle produzioni olivicole italiane e alla diffusione di snack funzionali coerenti con i principi della dieta mediterranea.

Il principale elemento di originalit  del presente lavoro risiede nell'aver sviluppato un percorso di ricerca progressivo e integrato, nel quale ogni attivit  sperimentale ha contribuito alla costruzione delle conoscenze necessarie alla fase successiva. Lo studio della fermentazione ha migliorato la comprensione dei processi di deamarizzazione; la valorizzazione del pat  DMF ha ampliato le potenzialit  dei sottoprodotti dell'industria olearia; la caratterizzazione sensoriale e nutraceutica del pat  ha consentito di definire criteri oggettivi per la selezione della materia prima; infine, tali evidenze sono confluite nella progettazione e realizzazione di uno snack innovativo ad elevato valore nutrizionale e funzionale. L'intero progetto dimostra come un approccio multidisciplinare possa trasformare un sottoprodotto agroalimentare in un ingrediente ad alto valore aggiunto, con potenziali applicazioni sia nell'industria alimentare sia nell'ambito della nutrizione funzionale.

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 5

- 1- Hasler C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges. *J Nutr* 2002; 132(12):3772-81.
- 2- Arshad Z, Shahid S, Hasnain A, Yaseen E, Rahimi M. Functional Foods Enriched With Bioactive Compounds: Therapeutic Potential and Technological Innovations. *Food Sci Nutr*. 2025 Oct 7;13(10):e71024.
- 3- De Felice, S.L. The nutraceutical revolution: fueling a powerful, new international market. Harvard University Advanced Management Program in Biomedical Research and Development, 1989. Como, Italy
- 4- Puri V, Nagpal M, Singh I, Singh M, Dhingra GA, Huanbutta K, Dheer D, Sharma A, Sangnim T. A Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients*. 2022; 14(21):4637.
- 5- Faienza MF, Giardinelli S, Annicchiarico A, Chiarito M, Barile B, Corbo F, Brunetti G. Nutraceuticals and Functional Foods: A Comprehensive Review of Their Role in Bone Health. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25, 11: 5873.
- 6- Debri RP, De Lorenzo A, Conte R, Peluso G. Functional Foods as Vehicles for Bioactive Compounds: Chemical and Nutritional Perspectives on Health and Disease Prevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 2026; 27(5):2293.
- 7- Fetriyuna F, Purwestri RC, Jati IRAP, Setiawan B, Huda S, Wirawan NN, Andoyo R. Ready-to-use therapeutic/supplementary foods from local food resources: Technology accessibility, program effectiveness, and sustainability, a review. *Heliyon*. 2023 Nov 19; 9(12): e22478.
- 8- Boğa T, Topaloğlu Günan K, Çakmak Kavsara S, Berber D, Aktürk Gümüştay Ö. Development and Characterization of High-Nutrient Biscuits for Disaster Situations Targeting At-Risk Groups. *Int J Food Sci*. 2025 Dec 11; 2025:8042259.
- 9- Seaquist ER, Anderson J, Childs B, Cryer P, Dagogo-Jack S, Fish L, Heller SR, Rodriguez H, Rosenzweig J, Vigersky R. Hypoglycemia and diabetes: a report of

- a workgroup of the American Diabetes Association and the Endocrine Society. *Diabetes Care*. 2013 May;36(5):1384-95.
- 10- American Diabetes Association. (2024). Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*, 47(Suppl. 1).
 - 11- Bigliardi B., Galati F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2013. Vol 31, Issue 2, 118-129.
 - 12- Young H., Fellows P., Mitchell J. Development of a high energy biscuit for use as a food supplement in disaster relief. *International Journal of Food Science & Technology* 1986; 20(6):689 – 695.
 - 13- Institute of Medicine (US) Subcommittee on Technical Specifications for a High-Energy Emergency Relief Ration. High-Energy, Nutrient-Dense Emergency Relief Food Product. Washington (DC): National Academies Press (US); 2002.
 - 14- Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*. 1999;81(4): S1-S27.
 - 15- Lanza, B.; Bacceli, M.; Di Marco, S.; Simone, N.; Di Loreto, G.; Flamminii, F.; Mollica, A.; Cichelli, A. A new culture medium rich in phenols used for screening bitter degrading strains of Lactic Acid Bacteria to employ in table olive production. *Molecules* 2024. 29, 2236 2.
 - 16- Elenco prodotti PAT aggiornato al 6/02/2026: <https://www.masaf.gov.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/24151>
 - 17- Hernández-López I, Alamprese C, Cappa C, Prieto-Santiago V, Abadias M, Aguiló-Aguayo I. Effect of Spirulina in Bread Formulated with Wheat Flours of Different Alveograph Strength. *Foods*. 2023; 12(20):3724.
 - 18- Atudorei D, Atudorei O, Codină GG. The Impact of Germinated Chickpea Flour Addition on Dough Rheology and Bread Quality. *Plants*. 2022; 11(9):1225.
 - 19- Dabija, A., Codină, G.G., & Fradinho, P. Effect of yellow pea flour addition on wheat flour dough and bread quality. *Romanian Biotechnological Letters*, 2017. 22(5):12888-12897.
 - 20- Mohammed I., Ahmed A.R., Senge B. Dough rheology and bread quality of wheat–chickpea flour blends. *Industrial Crops and Products*, 2012. Volume 36, Issue 1,196-202.

- 21- Guiné RPF, Florença SG. Development and Characterisation of Functional Bakery Products. *Physchem.* 2024; 4(3):234-257.
- 22- Deepak Kumar Koli, Shalini Gaur Rudra, Arpan Bhowmik, Sunil Pabbi. Nutritional, Functional, Textural and Sensory Evaluation of Spirulina Enriched Green Pasta: A Potential Dietary and Health Supplement. *Foods* 2022, 11(7), 979
- 23- Santos, T.D.; de Freitas, B.C.B.; Moreira, J.B.; Zanfonato, K.; Costa, J.A.V. Development of powdered food with the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population. *Innov. Food Sci. Emerg.* 2016, 37, 216–220
- 24- Lucas, B.F.; de Moraes, M.G.; Santos, T.D.; Costa, J.A.V. Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2018, 90, 270–276
- 25- Lanza B., Bacceli M., Simone N. Development of a specific lexicon to describe sensory and textural characteristics of olive paté. *Appl. Sci.* 2023, 13
- 26- Regolamento (CE) N. 1924/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari, *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, consultabile online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1924>
- 27- Tabelle di composizione degli alimenti CREA, consultabili online: <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali>
- 28- Metodo analisi sensoriale olive da tavola - COI/OT/MO No 1/Rev.3/2021
- 29- Guinard J-X. Sensory and consumer testing with children, in: *Trends in Food Science and Technology* 2001, 11, pp. 273–283
- 30- Ronca CL, Marques SS, Ritieni A, Giménez-Martínez R, Barreiros L, Segundo MA. Olive Oil Waste as a Source of Functional Food Ingredients: Assessing Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in Olive Leaves. *Foods*. 2024 Jan 6;13(2):189.
- 31- Foti P, Pino A, Romeo FV, Vaccalluzzo A, Caggia C, Randazzo CL. Olive Pomace and Pâté Olive Cake as Suitable Ingredients for Food and Feed. *Microorganisms*. 2022 Jan 21;10(2):237.
- 32- Charoenprasert, S., & Mitchell, A. E. Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 60, 7081–7095.

- 33- Conte P, Fadda C, Del Caro A, Urgeghe PP, Piga A. Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods*. 2020; 9(4):514.
- 34- Rocha, J., Borges, N., & Pinho, O. Table olives and health: a review. *Journal of Nutritional Science*, 2020. 2: 9: e57.
- 35- Lanza B, Ninfali P. Antioxidants in Extra Virgin Olive Oil and Table Olives: Connections between Agriculture and Processing for Health Choices. *Antioxidants* (Basel), 2020 Jan 2; 9(1):41.
- 36- Kiritsakis AK, Kiritsakis KA, Tsitsipas CK. A review of the evolution in the research of antioxidants in olives and olive oil during the last four decades. *Journal of Food Bioactives*, 2020, 11: 31-56.
- 37- Regolamento (UE) N. 432/2012 della Commissione del 16 maggio 2012, relativo alla compilazione di un elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*. Consultabile online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0432>
- 38- Sęczyk Ł, Gawlik-Dziki U, Świeca M. Influence of Phenolic-Food Matrix Interactions on In Vitro Bioaccessibility of Selected Phenolic Compounds and Nutrients Digestibility in Fortified White Bean Paste. *Antioxidants*. 2021; 10(11):1825.
- 39- Melini V, Melini F, Acquistucci R. Phenolic Compounds and Bioaccessibility Thereof in Functional Pasta. *Antioxidants*. 2020; 9(4):343.
- 40- Pınarlı, B., Karlığa S., Ozkan G., Capanoglu E. Interaction of phenolics with food matrix: In vitro and in vivo approaches. *Nutrition and Metabolism*, 2020. 13(1-2):1-11.
- 41- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil polyphenols. *EFSA Journal*. 2011; 9(4):2033.
- 42- Slavin JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrients*. 2013;5(4):1417-1435.
- 43- Servili M, Sordini B, Esposto S, Stefania Urbani, Gianluca Veneziani, Ilona Di Maio, Roberto Selvaggini, Agnese Taticchi. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*. 2014; 3:1-23.

- 44- Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*. 2004;1054(1-2):113-127.
- 45- Boskou D. Olive and Olive Oil Bioactive Constituents. AOCS Press; 2015.
- 46- Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012; 13:3291-3340.
- 47- Szczesniak, A.S. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 2002, 13(4), 215-225.
- 48- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil. *New England Journal of Medicine*. 2018; 378: e34.

CAPITOLO 6

Conclusioni generali

6. Conclusioni generali

Il presente lavoro di dottorato si è sviluppato lungo un percorso multidisciplinare finalizzato alla valorizzazione delle olive da tavola e dei loro derivati, con particolare attenzione ai prodotti e sottoprodotti della filiera olivicola caratterizzati da elevato contenuto di composti bioattivi. L'intero progetto di ricerca è stato concepito in risposta a problematiche di crescente rilevanza globale, legate alla sostenibilità dei sistemi alimentari, alla necessità di individuare nuove fonti nutrizionali ad elevato valore funzionale e alla crescente domanda di alimenti in grado di coniugare qualità nutrizionale, sostenibilità ambientale e accettabilità sensoriale.

In questo contesto, il comparto olivicolo rappresenta un sistema produttivo di straordinario interesse strategico. Le olive da tavola e i loro derivati costituiscono infatti matrici alimentari naturalmente ricche di composti fenolici, acidi grassi monoinsaturi, fibre alimentari e microrganismi potenzialmente benefici, caratteristiche che ne supportano il ruolo all'interno della Dieta Mediterranea e ne giustificano la crescente attenzione da parte della comunità scientifica. Parallelamente, l'introduzione di tecnologie innovative di estrazione dell'olio ha determinato la disponibilità di nuove matrici secondarie, spesso considerate sottoprodotti, ma caratterizzate da un patrimonio biochimico di elevato interesse nutraceutico e tecnologico.

L'obiettivo generale della ricerca è stato quello di verificare la possibilità di trasformare tali matrici in ingredienti funzionali destinati allo sviluppo di nuovi alimenti ad elevato valore aggiunto, fino alla realizzazione di un prototipo innovativo in formato snack. Per raggiungere tale finalità è stato necessario affrontare una serie di problematiche specifiche riguardanti la comprensione dei processi di deamarizzazione, la selezione microbiologica di ceppi funzionali, la caratterizzazione chimica e sensoriale dei paté di oliva e, infine, la progettazione e validazione di una nuova formulazione alimentare.

I risultati ottenuti confermano innanzitutto come la gestione microbiologica dei processi di fermentazione rappresenti un elemento determinante per il miglioramento qualitativo delle olive da tavola. Lo studio condotto in ambiente industriale ha evidenziato come la fermentazione non possa essere considerata un fenomeno standardizzato, ma

debba essere interpretata come un ecosistema complesso nel quale numerosi fattori chimici, microbiologici e tecnologici interagiscono dinamicamente. L'impiego di colture starter selezionate ha mostrato la concreta possibilità di orientare il processo fermentativo, migliorando il controllo delle trasformazioni biochimiche e contribuendo alla riduzione dei rischi produttivi. Tali evidenze assumono particolare rilevanza per il settore industriale, poiché dimostrano come l'applicazione di strategie microbiologiche mirate possa incrementare la riproducibilità del processo e la qualità del prodotto finale.

Un secondo risultato di particolare interesse riguarda la caratterizzazione del paté DMF derivante dai moderni sistemi di estrazione multifase. I dati ottenuti confermano che questa matrice non può essere considerata un semplice sottoprodotto della filiera olearia, bensì una risorsa ricca di composti fenolici, sostanza organica, fibra alimentare e frazioni lipidiche di elevata qualità nutrizionale. La presenza di concentrazioni particolarmente elevate di biofenoli evidenzia il notevole potenziale di valorizzazione del paté DMF nell'ambito dell'economia circolare applicata al settore agroalimentare. La possibilità di recuperare e reimpiegare tali componenti bioattive consente infatti di trasformare una problematica gestionale in un'opportunità industriale e commerciale.

In tale prospettiva si inserisce lo sviluppo dell'Olive Juice Broth (OJB), probabilmente uno dei risultati più innovativi dell'intero progetto. La realizzazione di un terreno di coltura ottenuto direttamente da una matrice derivata dalle olive ha consentito di riprodurre in modo più realistico le condizioni selettive presenti durante la fermentazione delle olive da tavola. Lo screening dei ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum* ha permesso di identificare microrganismi particolarmente adattati all'ambiente fenolico dell'oliva e capaci di accelerare i processi di degradazione dei composti responsabili dell'amaro. In particolare, la selezione del ceppo B51 ha dimostrato la possibilità di ridurre i tempi di deamarizzazione e di incrementare la formazione di composti quali idrossitirosolo e tirosolo, noti per le loro proprietà biologiche e antiossidanti.

Questi risultati assumono una duplice valenza. Da un lato, contribuiscono all'avanzamento delle conoscenze scientifiche sui meccanismi microbiologici coinvolti nella trasformazione delle olive da tavola; dall'altro, offrono strumenti immediatamente trasferibili alle imprese del settore, favorendo lo sviluppo di processi più efficienti, controllabili e sostenibili. Il terreno OJB rappresenta inoltre una piattaforma potenzialmente utilizza-

bile per ulteriori attività di selezione microbiologica e per lo sviluppo di starter funzionali destinati a differenti applicazioni agroalimentari.

Un ulteriore contributo originale della ricerca è rappresentato dalla definizione di un lessico descrittivo e dalla validazione di una scheda di profilo sensoriale specificamente dedicata al paté di olive. Nonostante la crescente diffusione commerciale di questo prodotto, la letteratura scientifica non disponeva infatti di strumenti standardizzati per la sua caratterizzazione sensoriale. La metodologia sviluppata nel corso del progetto ha consentito di colmare questa lacuna, fornendo un approccio riproducibile e scientificamente validato per la descrizione delle caratteristiche organolettiche del prodotto.

L'integrazione tra analisi sensoriale e valutazione strumentale della texture ha permesso di correlare le percezioni degli assaggiatori con parametri fisici misurabili, aumentando l'affidabilità e la robustezza delle valutazioni. Tale risultato assume particolare importanza non solo sul piano scientifico, ma anche per le aziende produttrici, che possono disporre ora di uno strumento utile per il controllo qualità, lo sviluppo di nuovi prodotti e la definizione di standard commerciali condivisi.

La caratterizzazione fenolica dei paté commerciali ha ulteriormente confermato l'elevato valore nutraceutico di tali prodotti. I livelli di idrossitirosolo e dei composti correlati osservati nei campioni analizzati risultano compatibili con i requisiti previsti dalla normativa europea relativa all'health claim associato ai polifenoli dell'olio di oliva. Questo risultato apre prospettive estremamente interessanti per la valorizzazione commerciale del paté di olive, consentendo di considerarlo non soltanto come un prodotto gastronomico, ma come un vero e proprio alimento funzionale. In un mercato sempre più orientato verso prodotti salutistici e ad elevata densità nutrizionale, tale evidenza potrebbe rappresentare un importante elemento distintivo e competitivo.

Il punto di convergenza dell'intero percorso di ricerca è stato rappresentato dalla realizzazione del prototipo alimentare innovativo in formato snack. La formulazione sviluppata dimostra concretamente come sia possibile trasformare le conoscenze generate nei diversi ambiti di studio in un prodotto reale, caratterizzato da proprietà nutrizionali, sensoriali e funzionali particolarmente favorevoli. L'utilizzo del paté di olive come ingrediente principale ha consentito di ottenere uno snack ad elevato contenuto di composti bioattivi, in grado di differenziarsi nettamente dai prodotti tradizionalmente presenti sul mercato.

Dal punto di vista concettuale, il prototipo sviluppato supera la logica del semplice recupero di una materia prima, configurandosi come un esempio di innovazione alimentare orientata alla sostenibilità. Il prodotto finale integra, infatti, i principi dell'economia circolare, della valorizzazione dei sottoprodotti agroalimentari, della nutrizione funzionale e della tradizione gastronomica mediterranea, dimostrando come tali elementi possano convergere in una proposta alimentare moderna e potenzialmente competitiva.

- *Prospettive future di ricerca*

I risultati complessivi ottenuti consentono quindi di affermare che le olive da tavola, i paté commerciali e il paté DMF rappresentano matrici ad elevato potenziale per lo sviluppo di nuovi ingredienti e nuovi alimenti funzionali. L'approccio adottato ha evidenziato come l'integrazione tra microbiologia, tecnologia alimentare, chimica degli alimenti, analisi sensoriale e nutraceutica costituisca una strategia efficace per la valorizzazione delle risorse della filiera olivicola.

Per quanto riguarda le prospettive future, numerosi aspetti meritano ulteriori approfondimenti. Sarà innanzitutto opportuno ampliare gli studi relativi alla biodisponibilità dei composti fenolici presenti nei paté di olive e nei prodotti derivati, al fine di confermare in vivo gli effetti salutistici ipotizzati sulla base delle evidenze analitiche disponibili. Analogamente, l'eventuale caratterizzazione funzionale dei ceppi batterici selezionati potrebbe consentire di sviluppare nuove generazioni di alimenti fermentati con proprietà probiotiche documentate.

Ulteriori attività di ricerca potrebbero riguardare l'ottimizzazione tecnologica del prodotto sviluppato, lo studio della shelf-life, la valutazione della stabilità dei composti bioattivi durante la conservazione e l'analisi dell'accettabilità presso differenti categorie di consumatori. Particolare interesse rivestono inoltre le possibili applicazioni del paté DMF come ingrediente funzionale in altre formulazioni alimentari, incluse quelle destinate a specifiche popolazioni o a contesti emergenziali.

Dal punto di vista del trasferimento tecnologico, i risultati ottenuti appaiono già maturi per una possibile applicazione industriale. La disponibilità di procedure per il controllo delle fermentazioni, di starter selezionati, di strumenti di caratterizzazione senso-

riale e di una formulazione innovativa validata costituisce una base concreta per la realizzazione di nuovi prodotti destinati al mercato. In tale scenario, la collaborazione tra enti di ricerca, industria alimentare e settore olivicolo potrà favorire la trasformazione delle evidenze scientifiche generate in opportunità economiche e occupazionali per il territorio.

In conclusione, questa tesi dimostra come la valorizzazione integrata delle olive da tavola e dei loro derivati possa rappresentare una risposta concreta alle sfide contemporanee della sostenibilità alimentare. Attraverso l'applicazione di approcci scientifici innovativi è stato possibile trasformare matrici tradizionali e sottoprodotti della filiera in risorse ad elevato valore aggiunto, aprendo nuove prospettive per la produzione di alimenti funzionali, sostenibili e coerenti con i principi della Dieta Mediterranea. I risultati ottenuti non solo ampliano le conoscenze disponibili nel settore, ma pongono le basi per future applicazioni industriali capaci di coniugare innovazione, salute e sostenibilità.

Il principale elemento di originalità del presente lavoro risiede nell'aver sviluppato un percorso di ricerca progressivo e integrato, nel quale ogni attività sperimentale ha contribuito alla costruzione delle conoscenze necessarie alla fase successiva. Lo studio della fermentazione ha migliorato la comprensione dei processi di deamarizzazione; la valorizzazione del paté DMF ha ampliato le potenzialità dei sottoprodotti dell'industria olearia; la caratterizzazione sensoriale e nutraceutica del paté disponibile in commercio ha consentito di definire criteri oggettivi per la selezione della materia prima; infine, tali evidenze sono confluite nella progettazione e realizzazione di uno snack innovativo ad elevato valore nutrizionale e funzionale. L'intero progetto dimostra come un approccio multidisciplinare possa trasformare un sottoprodotto agroalimentare in un ingrediente ad alto valore aggiunto, con potenziali applicazioni sia nell'industria alimentare sia nell'ambito della nutrizione funzionale.

Da questo lavoro di ricerca sono scaturite le seguenti pubblicazioni su riviste internazionali con IF, nazionali divulgative e comunicazioni a Congressi:

1. Simone N., Di Loreto G., Bacceli M., Di Marco S., Cellini M., Vecchiotti G., Lanza B. Spontaneous and Controlled Fermentation Tests in Industrial Table Olives Production. *Appl. Sci.* **2023**, Volume 13, Issue 16, 9455
2. AA.VV. Atti del convegno, Risultati finali del Progetto DEAOLIVA, **2023**, a cura di Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G., Simone N., ISBN: 9788833852751
3. Bacceli M., Simone N., Lanza B. Caratterizzazione sensoriale di olive e paté del commercio, in Atti del convegno, Risultati finali del Progetto DEAOLIVA, **2023**, 147-164, ISBN: 9788833852751
4. Lanza B., Bacceli M., Simone N. Development of a specific lexicon to describe sensory and textural characteristics of olive paté. *Appl. Sci.* **2023**, 13
5. Relazione a convegno: “Caratterizzazione sensoriale di olive e paté del commercio” - 25 maggio c/o sede CREA-IT di Pescara per Convegno “Risultati finali del Progetto Deaoliva
6. Lanza B., Bacceli M., Di Marco S., Simone N., Di Loreto G., Flamminii F., Mollica A., Cichelli A. A New Culture Medium Rich in Phenols Used for Screening Bitter Degrading Strains of Lactic Acid Bacteria to Employ in Table Olive Production. *Molecules* 2024, Vol. 29, Issue 10, 2236.
7. Poster: Bacceli M., Lanza B., Di Loreto G., Cichelli A. Caratterizzazione nutra-
ceutica e sensoriale di paté di olive destinati allo sviluppo di un alimento innova-
tivo con finalità di soccorso. VIII Convegno Nazionale SISS, Società Italiana di
Scienze Sensoriali – Alghero (SS), 22-24 maggio 2024
8. Poster: Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Proposta di applicazione di claim sa-
lutistico “I polifenoli dell’olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi
ematici dallo stress ossidativo” anche per le olive da tavola e i paté di olive. VI
Convegno Nazionale dell’Olivo ed Olio. Ascoli Piceno 13-15 novembre 2024
9. Lanza B., Bacceli M., Di Loreto G. Valorizzazione di un prodotto secondario: il
paté. *Olivo e Olio – Speciale olive da tavola* 2024, 42, 42-46.
10. Abstract book – VIII Convegno Nazionale SISS, Società Italiana di Scienze Sen-
soriali. 2024. Pag. 57 - [https://scienzeensoriali.it/event/viii-convegno-nazio-
nale-siss/#detail-content_8684](https://scienzeensoriali.it/event/viii-convegno-nazio-nale-siss/#detail-content_8684)

11. Riassunti dei lavori presentati al VI Convegno Nazionale dell'Olio e dell'Olio -
Ascoli Piceno, 13-15 novembre 2024, Acta Italus Hortus, Pubblicazione della
Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI), Num. 33, pag. 115-
https://www.soihs.it/public/03/08/Acta33_Sessione%205_01.pdf

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sentitamente il Prof. Angelo Cichelli e il Prof. Adriano Mollica per la guida scientifica, la disponibilità e il costante supporto che mi hanno offerto durante il percorso di dottorato. La loro competenza, il rigore metodologico e gli stimoli intellettuali hanno rappresentato un punto di riferimento fondamentale per la realizzazione di questo lavoro di ricerca e per la mia crescita professionale e personale.

Desidero esprimere la mia gratitudine anche alla Prof.ssa Assunta Pandolfi per aver coordinato con competenza, dedizione e professionalità il percorso di dottorato. La sua guida costante, la capacità di creare un ambiente stimolante per la ricerca e l'attenzione rivolta alla crescita dei dottorandi hanno rappresentato un valore inestimabile.

Un ringraziamento speciale va alla mia Tutor, la Dott.ssa Barbara Lanza, che in questi anni è stata per me una guida preziosa, maestra capace di trasmettere conoscenze e passione per la ricerca, ma anche una compagna di viaggio sempre presente. La sua disponibilità, il suo sostegno e la fiducia che ha riposto in me hanno contribuito in modo significativo alla mia crescita personale e scientifica.

Desidero rivolgere un sincero ringraziamento all'ex-Direttore del CREA-IT di Pescara, il Dott. Paolo Menesatti, per il sostegno accordatomi attraverso la borsa di dottorato, e all'Ente CREA per avermi offerto questa preziosa opportunità di formazione e crescita.

Un sentito ringraziamento va a tutti gli assaggiatori del Panel di assaggio del CREA-IT di Pescara, che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi. La loro disponibilità, la curiosità e il sincero interesse dimostrati durante le attività sperimentali sono stati fondamentali per il raggiungimento degli obiettivi della ricerca. Desidero inoltre ringraziarli per i preziosi consigli e le osservazioni condivise, che hanno rappresentato un importante valore aggiunto per questo lavoro.