

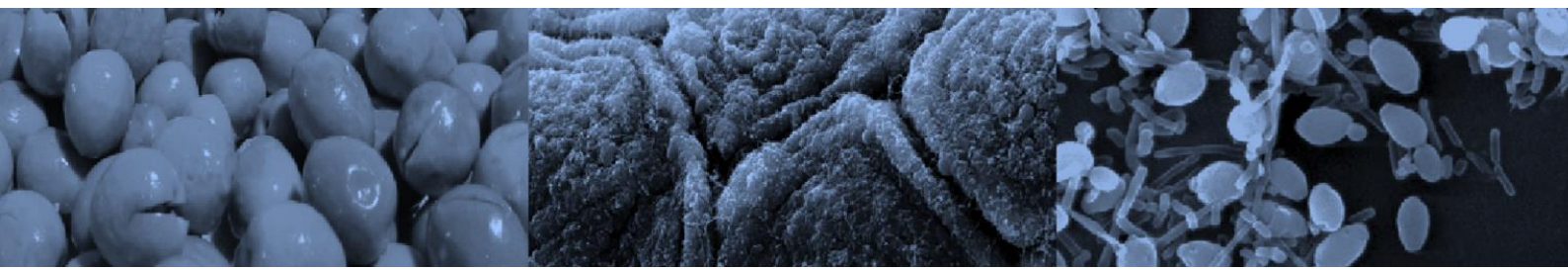
Oleica Starter[®] Advance

INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO / DATA SHEET

Oleica (www.oleica.es) es una marca registrada de la empresa de base tecnológica TAFIQS in FOODs (Technological Applications for Improvement of the Quality and Safety in Foods). La tecnología licenciada en este producto pertenece a la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Oleica (www.oleica.es) is a trademark from the start-up TAFIQS in FOODs (Technological Applications for Improvement of the Quality and Safety in Foods). The technology licenced in this product belongs to the Spanish Research National Council (CSIC).

Idioma/Language	Página/Page
Español	2
English	14



ESPAÑOL



INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO

Oleica Starter[®] Advance

1. Fermentaciones de aceitunas de mesa y otros vegetales

La aceituna de mesa es un vegetal con una gran tradición en la cultura y dieta de muchos países mediterráneos, aunque su producción ya se está extendiendo a otros lugares del mundo donde el clima permite el cultivo del olivo (*Olea europea* var. *sativa*). A lo largo de la historia, muchos vegetales, y entre ellos la aceituna de mesa, han sido conservados por fermentación. En general, el proceso de fermentación de vegetales consiste principalmente en la colocación del mismo en salmuera (agua con sal), lo que permite la conservación de la materia prima durante largos periodos de tiempo debido a la combinación del efecto de la sal y el bajo pH originado por la producción de ácido láctico por los microorganismos. Al mismo tiempo se dota al producto final de unas adecuadas características sensoriales y nutricionales. Diferentes grupos microbianos están presentes durante el proceso de fermentación, influyendo en gran medida sobre la calidad y seguridad microbiológica del producto final. Entre ellos, las bacterias lácticas son las más relevantes por su capacidad de producir ácido láctico a partir de los azúcares presentes en el vegetal y la producción de otros compuestos (bacteriocinas) que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados y competidores.

2. Principales tipos de alteraciones

Son muchos los factores (cantidad y tipo de materia fermentable, pH, concentración de sal, temperatura, presencia de compuestos inhibidores, ácidos orgánicos, interacciones entre microorganismos, etc.) que pueden intervenir en el proceso fermentativo produciendo una desviación del proceso habitual y ocasionando problemas de calidad o seguridad alimentaria. Si no se controla de una manera estricta y se dirige el proceso fermentativo adecuadamente, puede ocurrir que se desarrollen ciertas especies de *Clostridium*, *Propionibacterias*, bacillus gram negativos y *Enterobacterias* que alteren o ponga en riesgo la seguridad del producto final. Entre los principales tipos de alteraciones de origen microbiano que ocurren en aceitunas de mesa podemos destacar:



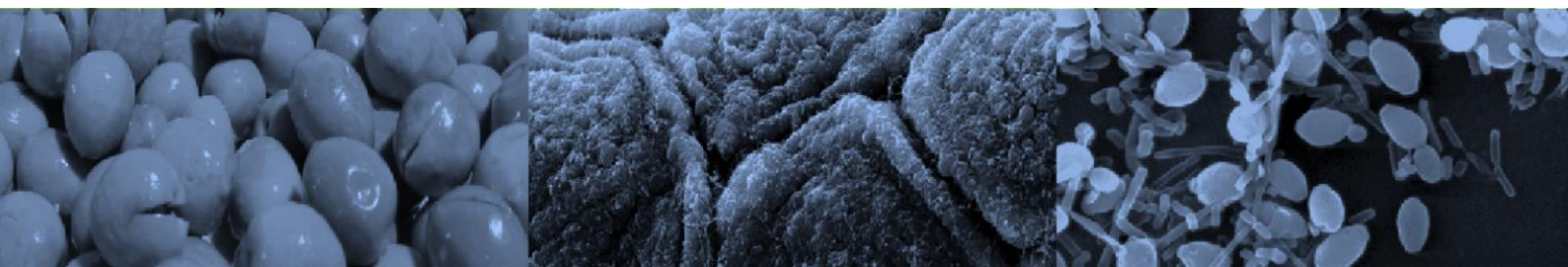
- Alambrado
- Zapatería
- Fermentaciones pútridas o butíricas
- Ablandamiento del fruto
- Formación de puntos blancos
- Formación de vejigas

3. Ventajas de la aplicación de cultivos iniciadores

Para mejorar la fermentación y obtener un producto más homogéneo y controlado, diversos autores han aconsejado la utilización de *cultivos iniciadores*, los cuales actúan como un *seguro tecnológico* disminuyendo el riesgo de sufrir alteraciones. Un cultivo iniciador se define como una preparación de microorganismos vivos, inoos, que se añade al alimento con la intención de acelerar o mejorar el proceso fermentativo y evitar desviaciones del mismo para obtener el producto deseado. Los cultivos iniciadores se utilizan para la preparación de una gran cantidad de alimentos como el vino, cerveza, productos lácteos, etc., donde existe un amplio catálogo disponible de los mismos, pero su uso no está generalizado en vegetales fermentados. De manera inconsciente, la utilización de cultivos iniciadores se remonta al origen de la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas mediante la técnica del pie de cuba. Entre las principales ventajas de la aplicación de cultivos iniciadores en aceitunas de mesa y otros vegetales fermentados podemos destacar:

- Reducen el riesgo de sufrir alteraciones
- Menor necesidad de correcciones evitando desviaciones del proceso
- Conservación más segura
- Uniformizan la calidad del producto final (sabor, aroma, apariencia) y la estandarización de producciones.
- Aceleran la fermentación y reducen el tiempo para la obtención del producto fermentado.
- Impiden o controlan el desarrollo de patógenos y alterantes
- Mejora del perfil organoléptico.

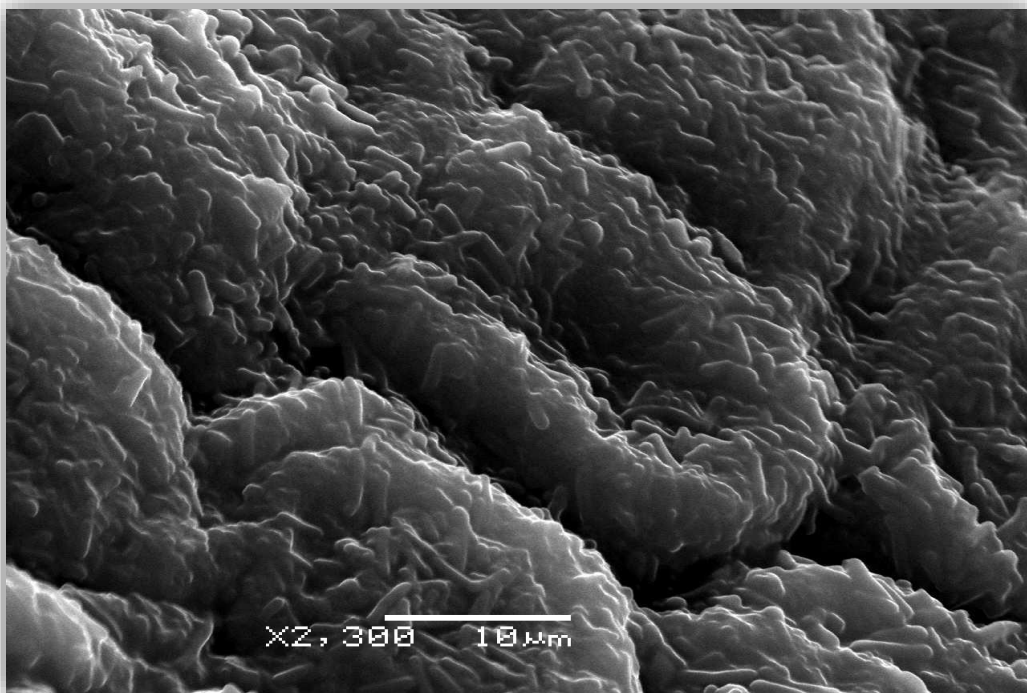
La actual tendencia es hacia el desarrollo de *cultivos iniciadores multifuncionales*, es decir, que además de estas propiedades tecnológicas, puedan dotar al producto final de un mayor valor funcional al tener también propiedades con *potencial probiótico*.



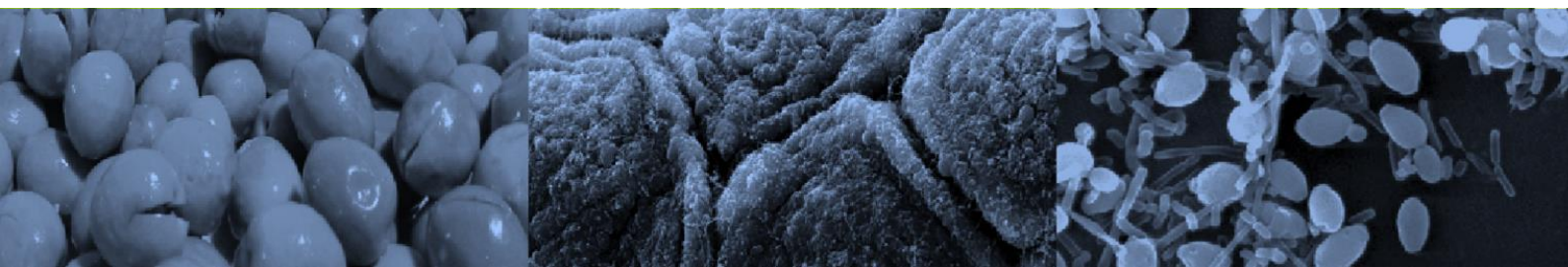
4. Formación de biofilms

Durante muchos años, los investigadores han centrado su atención en el estudio de la microbiología que estaba presente en las salmueras de fermentación. Sin embargo, los estudios más recientes muestran que sobre la epidermis de las aceitunas se forman comunidades complejas de microorganismos (bacterias lácticas y levaduras) que producen una matriz de exopolisacáridos (EPS) que los rodea y protege a los microorganismos de las adversas condiciones ambientales que se dan durante el proceso fermentativo (bajos pH, alta concentración de sal y presencia de compuestos inhibidores). Estas estructuras se conocen con el nombre de biofilms (o biopelículas), y gracias a ellas la aceituna de mesa puede transportar una elevada cantidad de microorganismos hasta el consumidor final.

En los biofilms los microorganismos se comunican entre ellos mediante procesos de quorum-sensing regulando de esta manera su actividad. No todos los microorganismos tienen la misma capacidad para formar estas biopelículas. Los EPS producidos por los microorganismos durante la formación del biofilm también pueden tener propiedades funcionales.



Microscopía electrónica de barrido mostrando la formación de biofilms por bacterias lácticas y levaduras sobre la superficie de las aceitunas de mesa



5. Especificación del producto

OleicaStarter Advance está formado por un triple inóculo de un cultivo liofilizado de tres cepas (LPG1, 13B4 y 119) de bacterias lácticas de la especie homo-fermentativa *Lactobacillus pentosus*. Estos microorganismos fueron aislados de la epidermis de fermentaciones de aceitunas de mesa por lo que se consideran microorganismos GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la EFSA. Tienen su aplicación durante el proceso de elaboración de aceitunas de mesa y otros vegetales fermentados. La utilización de tres cepas hace que el cultivo sea más robusto, flexible, y pueda trabajar en un mayor número de procesos/condiciones frente a otros cultivos formados por un solo microorganismo.

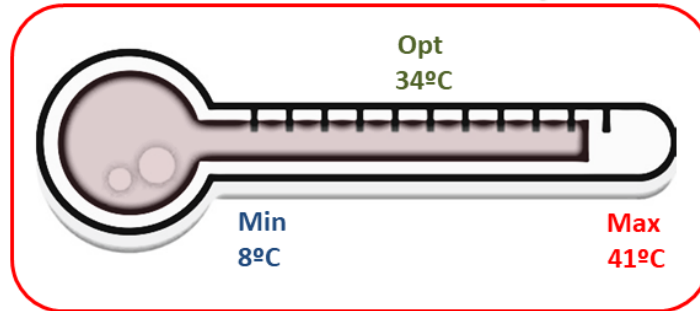
Microorganismos	<i>L. pentosus</i> LPG1, 13B4 y 119
Origen	Autóctonos de fermentaciones de aceitunas de mesa
Número de células por sobre	>10 ¹² UFC
Productos de fermentación	Ácido Láctico
Requerimiento de Oxígeno	Micro-Aerófilo
Uso	Un sobre por 10 toneladas de producto
Vida de mercado	12 meses a -18°C 6 meses en refrigeración (≤4°C)

La selección del cultivo mixto **OleicaStarter Advance** ha sido llevada a cabo tras una década de rigurosos estudios científicos y validaciones a escala industrial por científicos del Instituto de la Grasa (Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en base a su elevada capacidad de adhesión a la superficie del fruto, junto con otros microorganismos beneficiosos para la fermentación de aceitunas (Consultar: León-Romero 2014, Tesis doctoral, Universidad de Sevilla; León-Romero y col 2016, Appl Environ Microbiol 82, 689-695; Rodríguez Gómez y col. 2017, Frontiers Microbiol, Vol 8. Art 915 Pag 1-15). Esta alta capacidad de colonización de la superficie de los frutos está mediada por la producción de EPS que convierte a la aceituna de mesa es un excelente vehículo de microorganismos beneficiosos hasta el consumidor final (>10 millones de células por gramo), al mismo tiempo que impide la colonización de los frutos por microorganismos patógenos o alterantes mediante un mecanismo de exclusión. Además, los EPS producidos por las bacterias lácticas que conforman el inóculo han mostrado una gran capacidad para impedir la adhesión de patógenos como *E. coli* ETC K88 a líneas celulares mediante un proceso de bloqueo de la fimbria del patógeno.

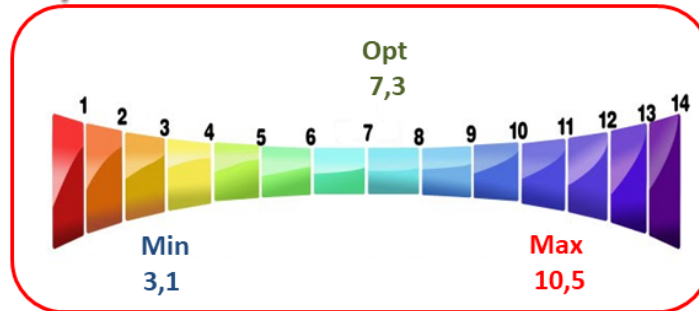


Rangos de crecimiento del cultivo iniciador OleicaStarter Advance

Temperatura



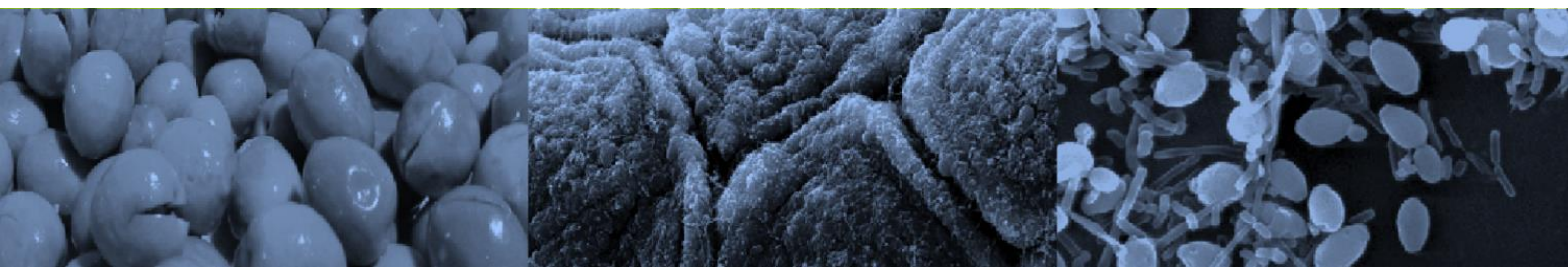
pH

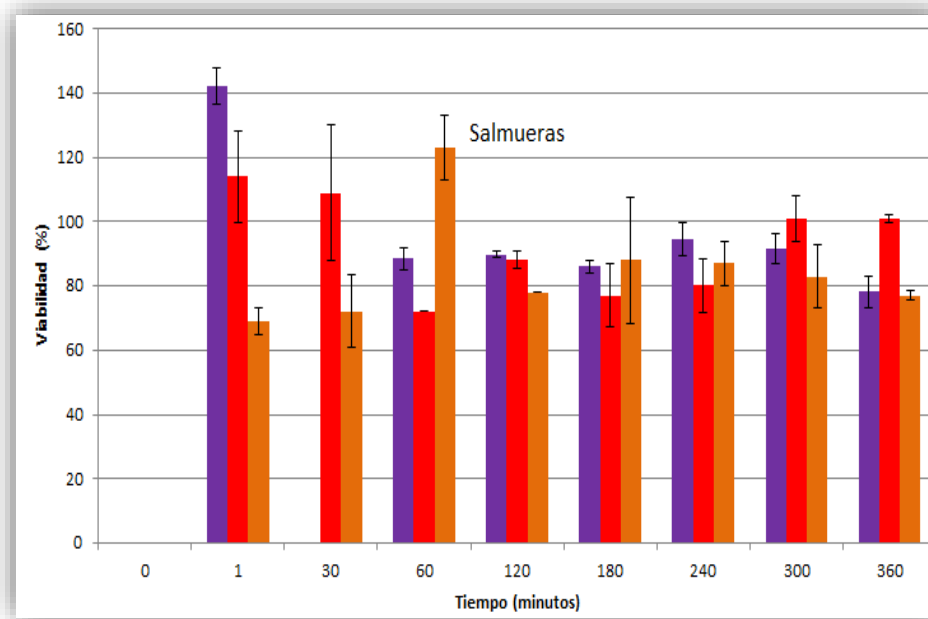
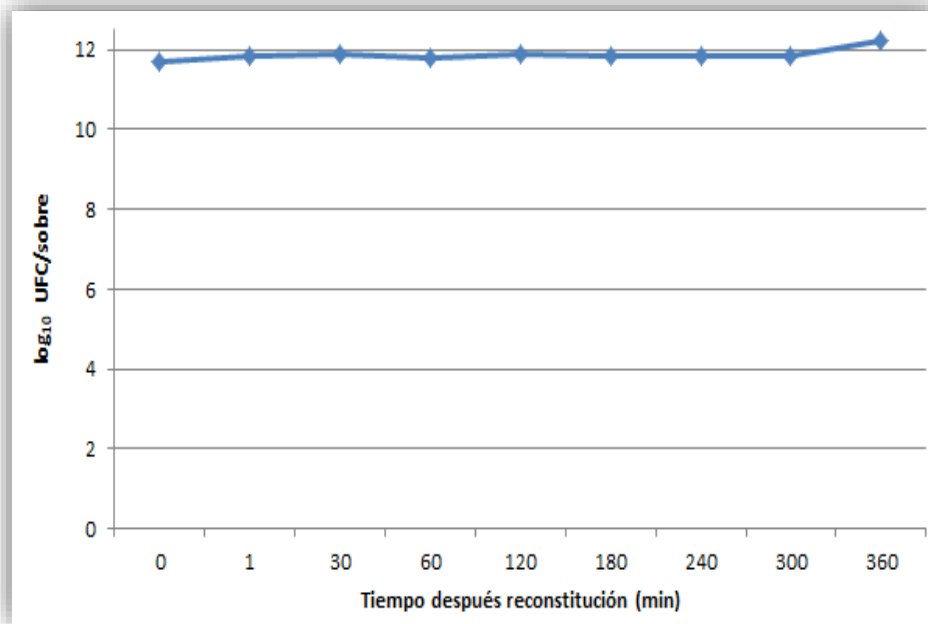


Sal

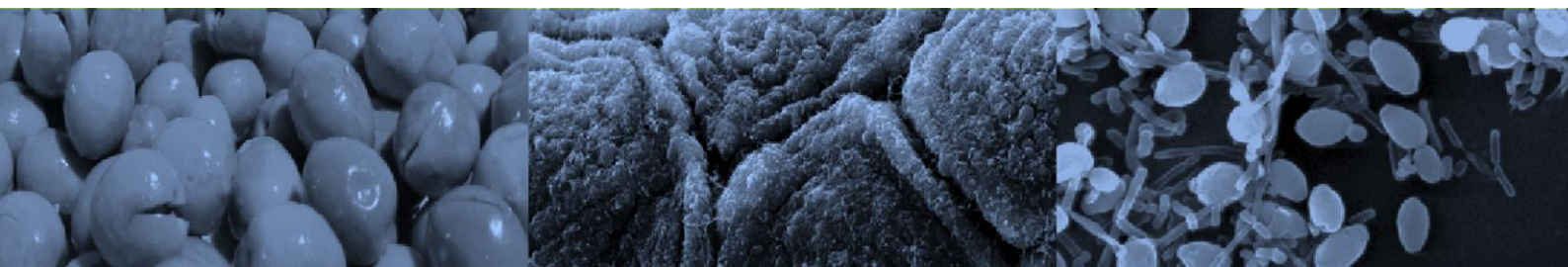


El cultivo puede ser reconstituido directamente en la salmuera de fermentación (ver ficha técnica del producto para determinar las condiciones óptimas), y presenta una elevada viabilidad durante un periodo de tiempo que supera las 6 horas, lo cual facilita las labores de manejo e inoculación en la industria. *No necesita de adiciones posteriores de nutrientes para facilitar su crecimiento.*

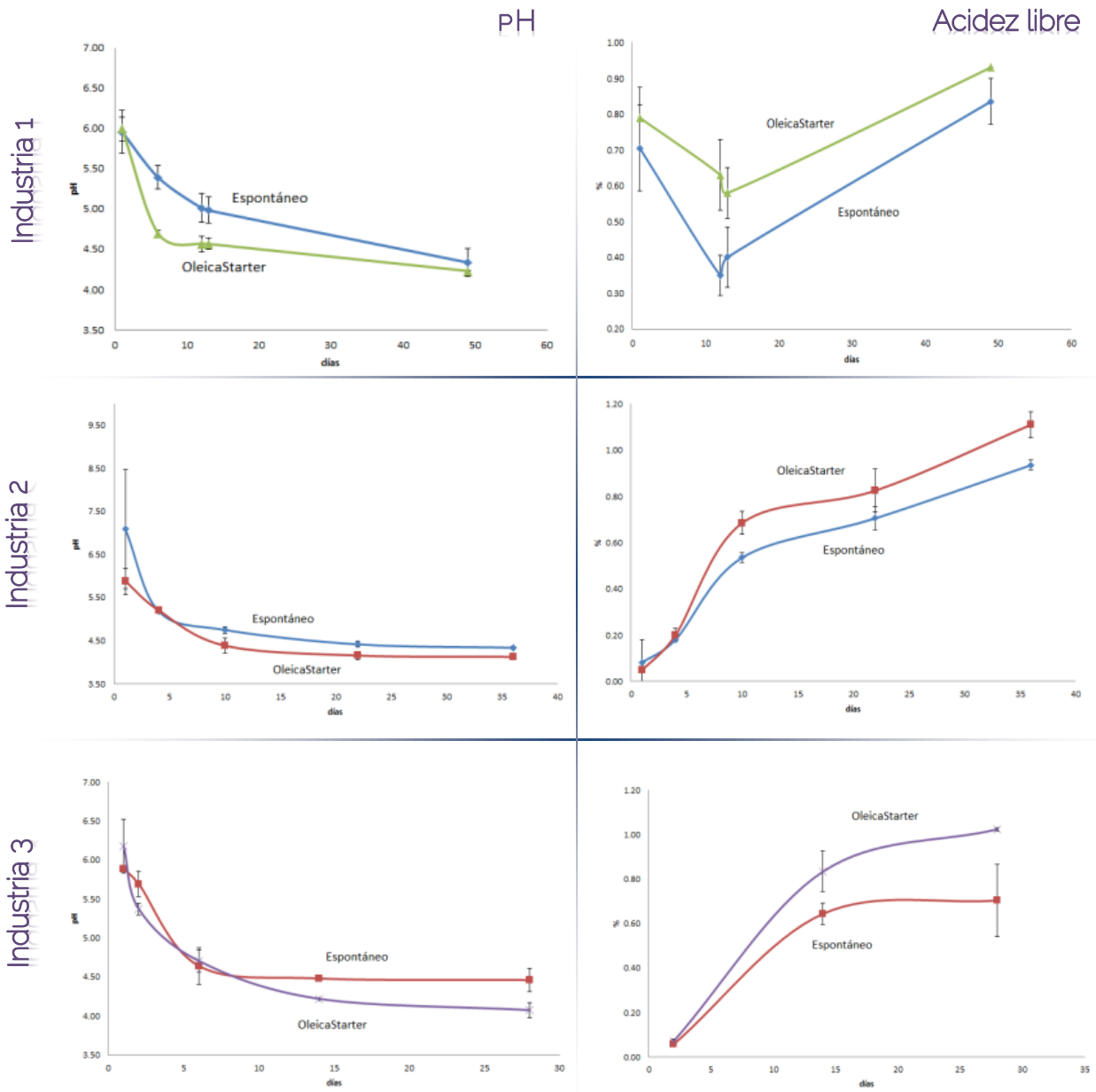




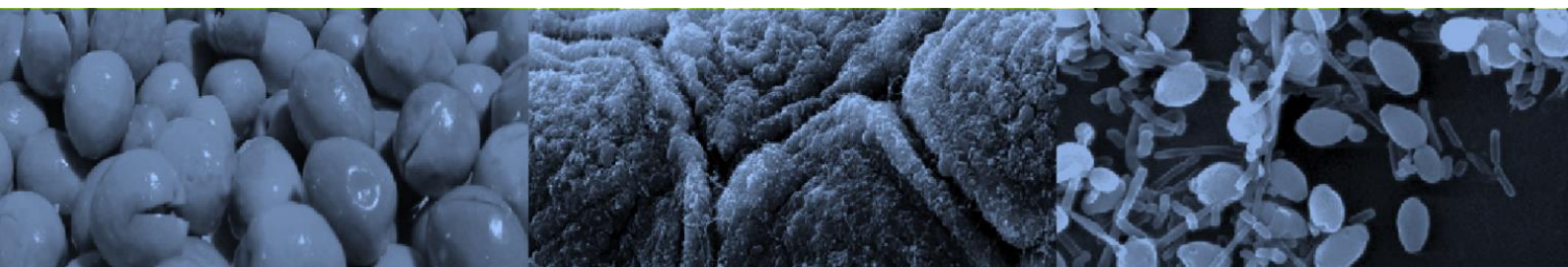
Supervivencia del inóculo OleicaStarter Advance en diferentes medios de reconstitución entre los que se incluyen las salmueras de aceitunas.



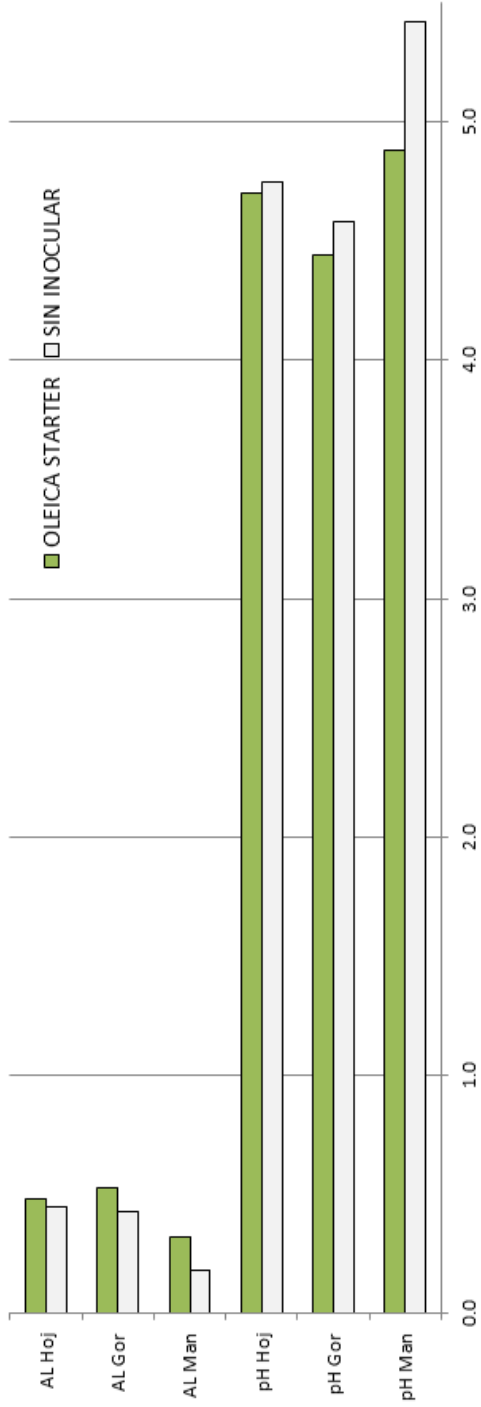
Estudios realizados a nivel industrial en 2 campañas diferentes (17/18 y 18/19) sobre un total de 30 fermentadores de Manzanilla, Gordal y Hojiblanca de 10 toneladas en 3 industrias diferentes que elaboran aceituna de mesa, demuestran que en todos los casos se mejora la producción de acidez libre, se produce una bajada más rápida del pH de los fermentadores, los frutos presentan un menor amargor (debido a la actividad esterasa y β -glucosidasa de las cepas), al mismo tiempo que se reducen/eliminan los costes del tratamiento de los fermentadores durante las 2-3 primeras semanas de fermentación (personal, adición de ácidos, medios nutritivos de crecimiento, etc.) hasta en 10 veces. El porcentaje de imposición de las cepas durante el proceso de fermentación fue de hasta un 80% en biofilms de Gordal y 100% en Manzanilla (determinado por rep-PCR GTG₅).



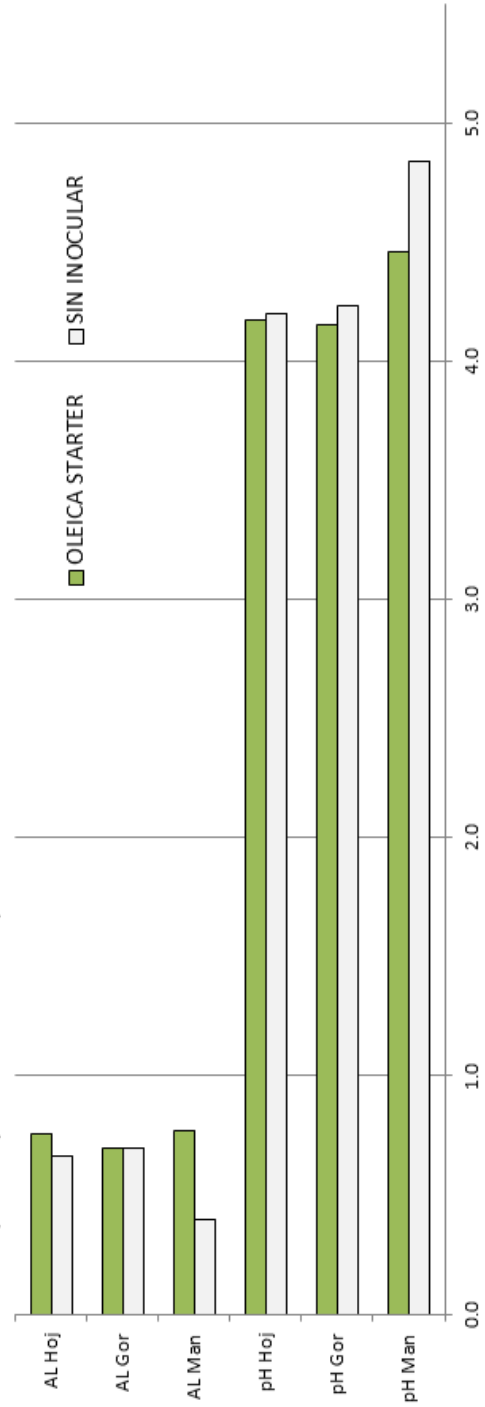
Ensayos industriales llevados a cabo en la campaña 2017/2018



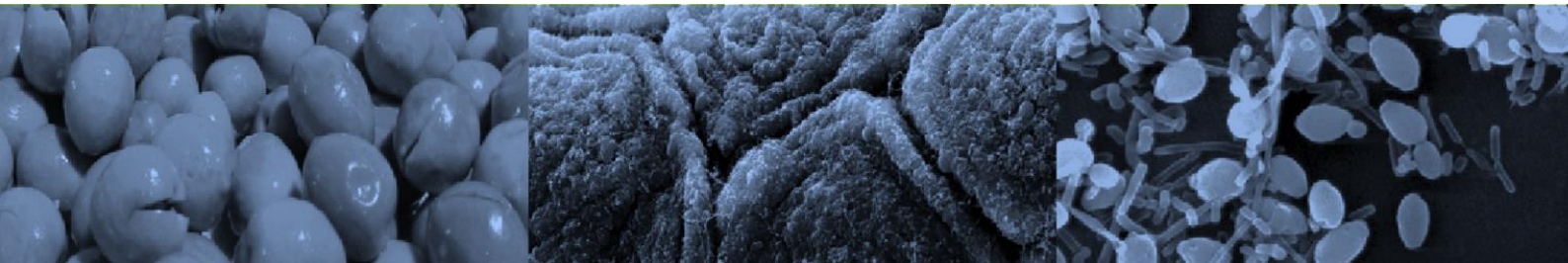
Inicio fermentación (1 mes). n=9 fermentadores procedentes de 3 industrias



Final fermentación (3 meses). n=9 fermentadores procedentes de 3 industrias



Ensayos industriales llevados a cabo en la campaña 2018/2019



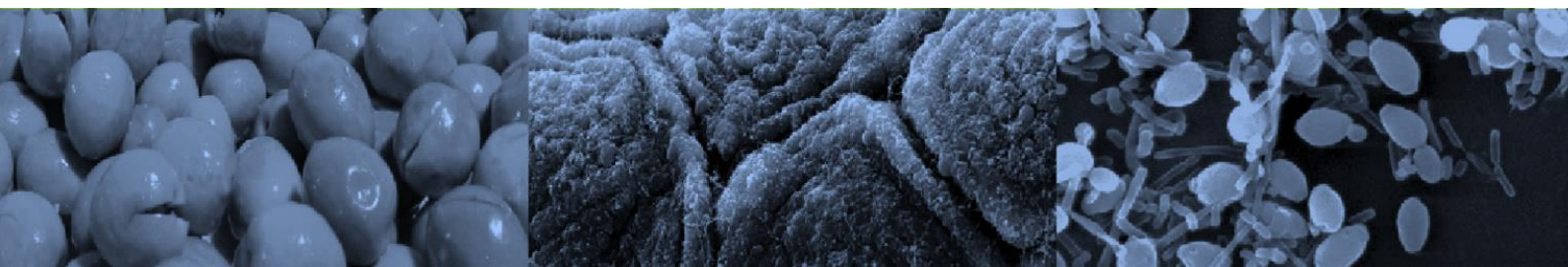
Además de las excelentes características tecnológicas antes mencionadas, **OleicaStarter Advance** presenta unas importantes propiedades potencialmente probióticas determinadas *in vitro* y en modelos animales *in vivo*, entre las que destacan:

Actividad Probiótica	13B4	119	LPG1
Formación Biofilms	Si ($>10^7$ ufc/g)	Si ($>10^7$ ufc/g)	Si ($>10^7$ ufc/g)
Resistencia a digestión humana*	Si Log ₁₀ inicial= 8,70 Log ₁₀ final= 3,08	Si Log ₁₀ inicial= 9,14 Log ₁₀ final=2,35	Si Log ₁₀ inicial=10,46 Log ₁₀ final=7,94
Adhesión a líneas celulares humanas*	Si 25,37%	Si 23,26%	Si 0,74%
Resistencia fenotípica antibióticos*	No	No	No
Actividad frente patógenos* (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>)	Si	Si	Si
Reducción niveles colesterol*	27,5%	27,6%	25,31%
Reducción proliferación de células tumorales*	Nd	Nd	21,10%
Actividad anti-inflamatoria**	Nd	Nd	Si

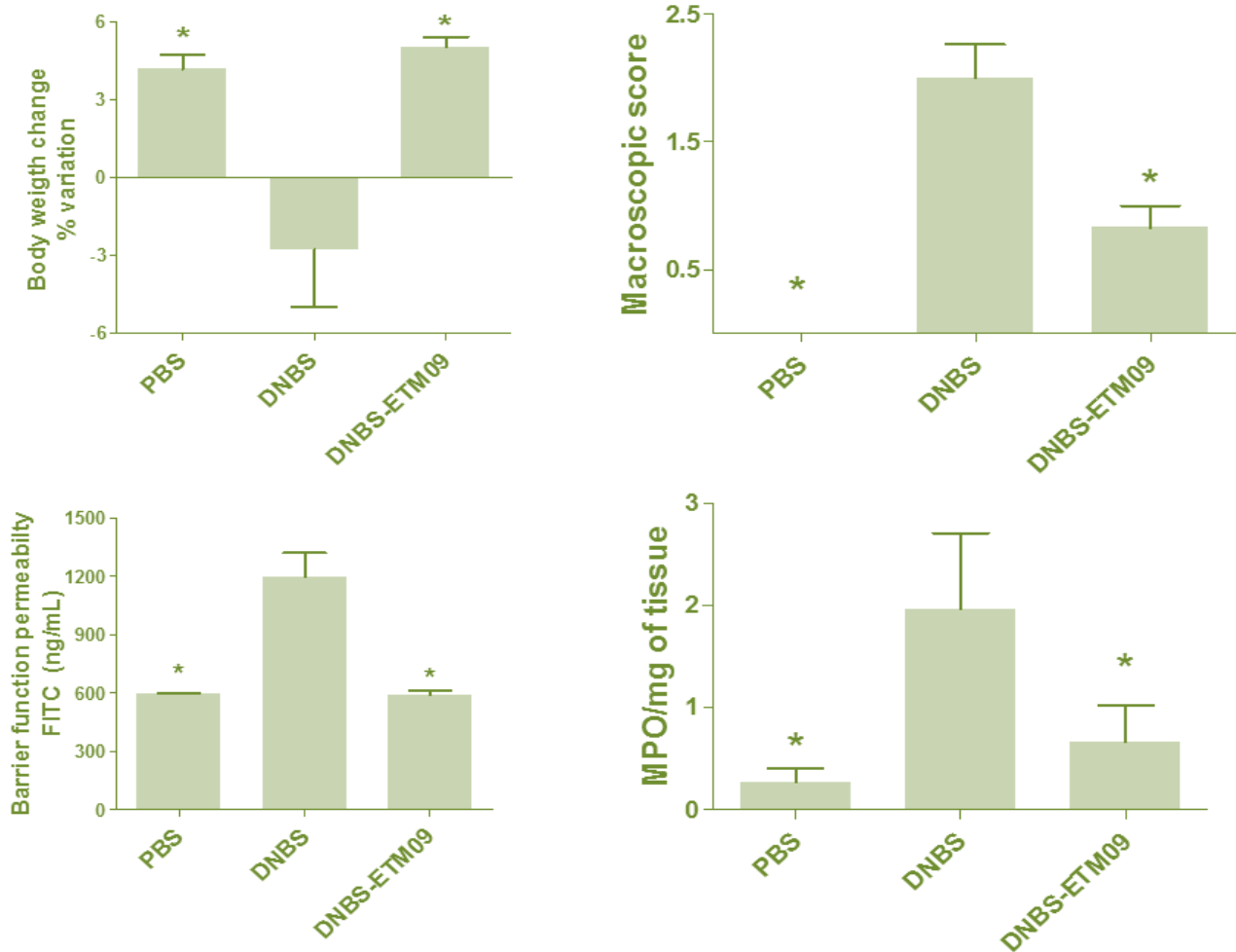
* Estudios llevados a cabo *in vitro*

** Estudios llevados a cabo en modelos animales *in vivo*

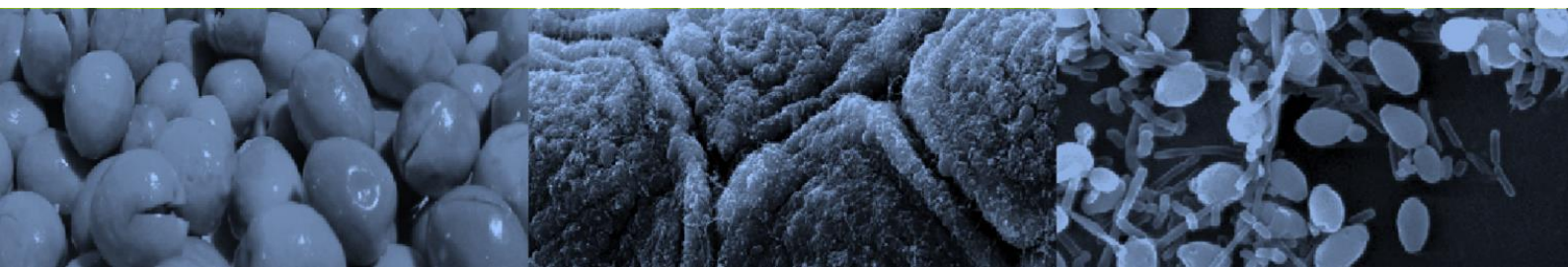
Nd. No determinado



En concreto, la cepa LPG1 presenta las siguientes características anti-inflamatorias en modelos animales *in vivo*:

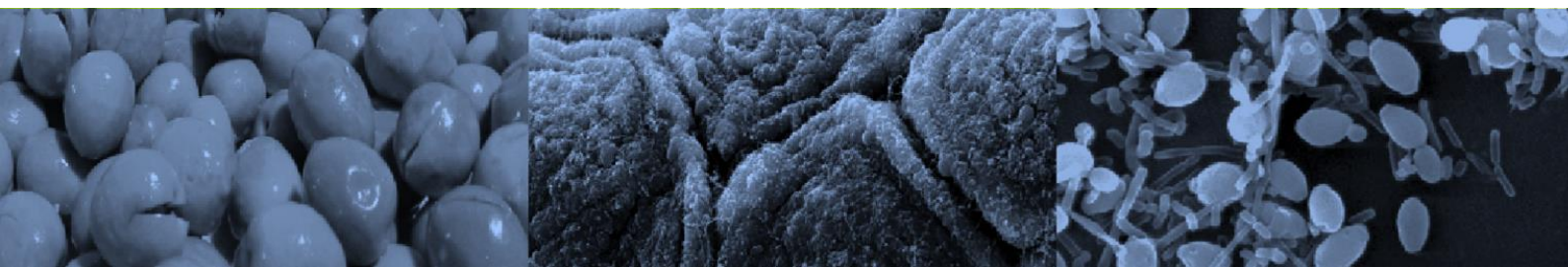


Efecto de *L. pentosus* LPG1 en modelo murino con colitis inducida por DNBS. La adición de LPG1 evita la pérdida de peso y los daños de los tejidos celulares. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. El asterisco indica diferencias significativas comparadas con el grupo control (DNBS). ($P < 0,05$)



6. Servicio de atención

OleicaStarter Advance está respaldado por un completo servicio de atención al cliente y equipo técnico altamente especializado en el estudio de fermentaciones vegetales y específicamente en aceitunas de mesa, compuesto por profesionales formados en el Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla) que le ayudarán a que su proceso de fermentación sea todo un éxito.



ENGLISH



DATA SHEET

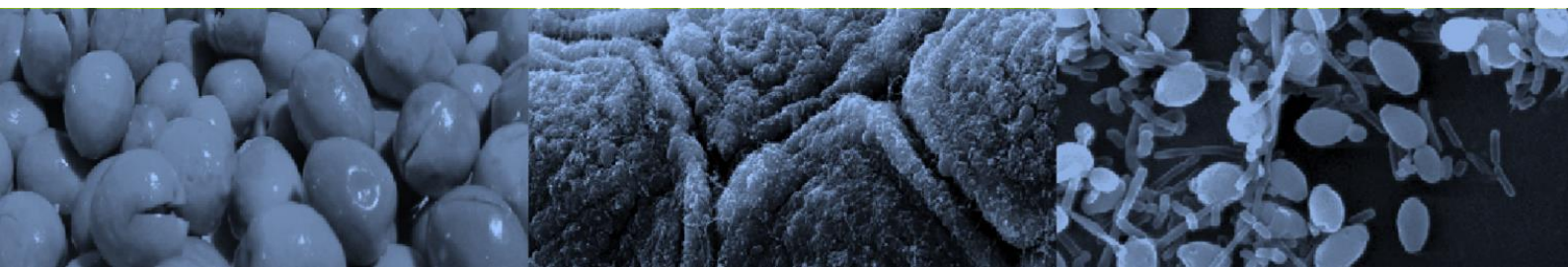
Oleica Starter[®] Advance

1. Fermentations of table olives and other vegetables

Table olives are fermented vegetables with an unquestionable tradition in the human diet of Mediterranean countries, although its production is already spreading nowadays to other climatic regions worldwide where the cultivation of the olive tree can be achieved (*Olea europea* var. *sativa*). Many vegetables, including table olives, have been historically preserved by microbial fermentation. The vegetables fermentation process consists mainly on the placement of the product in brine (water with added salt), which allows the preservation of the raw material for long periods of time due to the combination of high salt concentrations and low pH originated by the production of lactic acid. At the same time, the increase in the production of chemical metabolites during fermentation improves the sensory and nutritional characteristics of final fermented products. Different microbial groups are involved in the development of such characteristics. Among them, lactic acid bacteria are the most relevant for their ability to produce lactic acid from the sugars present in the raw vegetable together with the production of side compounds (bacteriocins) that inhibit the growth of undesired and competing microorganisms.

2. Main types of spoilage

There are many factors (quantity and type of fermentable sugars, pH, salt concentration, temperature, presence of inhibitory compounds, organic acids, interactions between microorganisms, etc.) that can intervene in the fermentation process thus, causing a deviation from the normal process which may lead to quality and safety problems. If the fermentation process is not strictly controlled and properly directed, the development of certain species of *Clostridium*, *Propionibacterium*, Gram-negative *Bacillus* and *Enterobacteriaceae* may occur which can alter or jeopardize the safety of the final product. Among the main types of microbial spoilage occurring in table olives, we can highlight:



- Gas pockets
- “Alambrado”
- “Zapatería”
- Putrid or butyric fermentations
- Softening of the fruit
- White dot formation
- Bladder formation

3. Advantages of the application of starter cultures

To improve fermentation and to produce a more homogeneous and controlled product, several authors recommend the use of starter cultures, which act as a technological insurance reducing the risk of suffering alterations. A starter culture is defined as a preparation of live, innocuous microorganisms, which is added to a food product with the aim of accelerating or improving the fermentation process, avoiding undesired deviations, to obtain a standardized quality product. Starter cultures are used for the preparation of a number of fermented foods such as wine, beer, dairy products, etc., where there is a varied catalog, however, its use is not so popular in fermented vegetables. Unconsciously, the use of starter cultures goes back to the origin of the elaboration of fermented foods and beverages through the technique of use a mother pre-ferment portion of the food/beverage. The application of starter cultures in table olives and other fermented vegetables has several advantages such as:

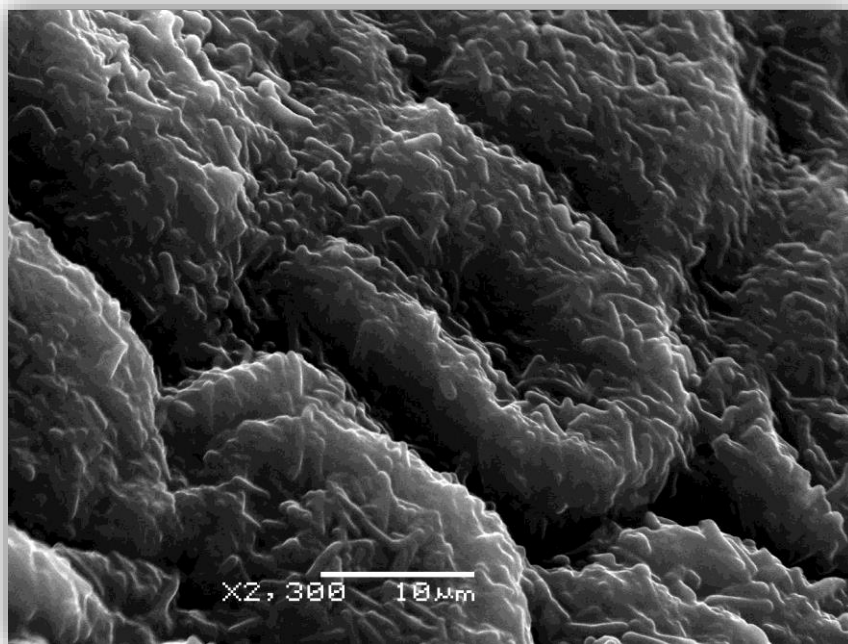
- Risk reduction of product spoilage.
- Lesser need for corrections avoiding process deviations.
- Safer preservation.
- Uniform the final product sensory quality (taste, aroma, appearance) and improvement standardization of productions.
- Acceleration of fermentation and time reduction to obtain the fermented product.
- Prevention and control the development of pathogens and spoilers.
- Improvement of the organoleptic profile.

The current trend is towards the development of multifunctional starter cultures, that is, in addition to these technological properties, they can endow the final product with a greater functional value by also having properties with probiotic potential.

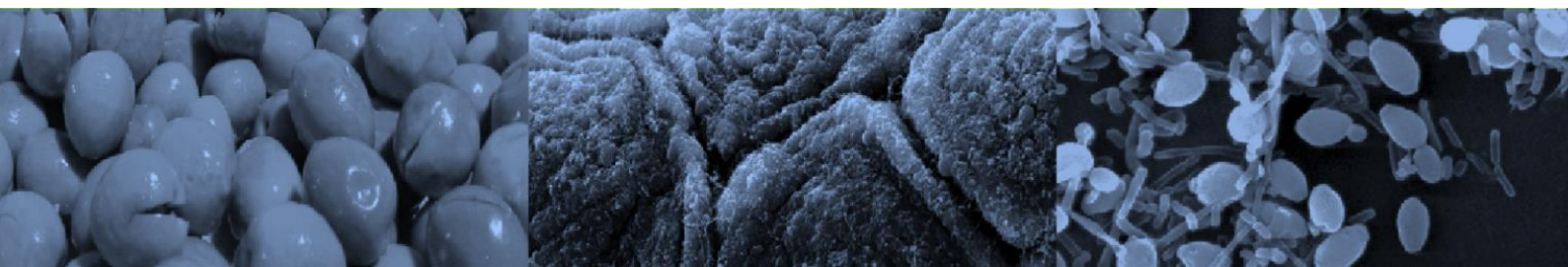


4. Biofilm formation

The study of microbiota present in fermentation brines has gained attention of researchers for many years. However, the most recent studies show that complex communities of microorganisms (lactic acid bacteria and yeasts) are formed on the epidermis of olives producing an exopolysaccharide matrix (EPS) that surrounds and protects the microorganisms from adverse environmental conditions. These structures are known as biofilms, and their presence in table olives allow them to carry a high microbial load to the final consumer. In biofilms, microorganisms communicate through quorum-sensing regulatory processes. However, only a selected group of microbial species have the ability to form such biofilms.



Scanning electron microscopy showing the biofilms formation by the lactic acid bacteria on the surface of table olives



5. Specification of the product

OleicaStarter Advance consists of a lyophilized mixed culture of three strains (LPG1, 13B4 and 119) of lactic acid bacteria of *Lactobacillus pentosus* homo-fermentative species. Both microorganisms have been isolated from the epidermis of table olives fermentation so that they are considered GRAS (Generally Recognized as Safe) microorganisms to be applied during the table olives processing as well as other fermented vegetables. The use of three strains mixture makes the culture more robust, with an improved flexibility being able to work in a wider number of processes/conditions against single strain cultures.

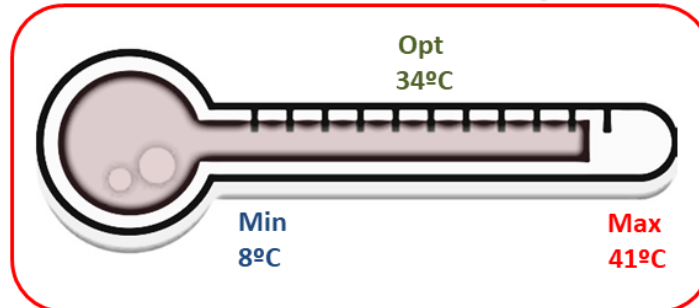
Microorganismos	<i>L. pentosus</i> LPG1, 13B4 y 119
Origin	Autochthonous of table olive fermentations, isolated from biofilms
Numbers of cells above	>10 ¹² UFC
Fermentation Products	Lactic Acid
Oxygen Requirement	Micro-Aerofils
Use	An envelope for 10 tons of product
Market Life	12 months to -18 ° C 6 months in refrigeration (≤4 ° C)

The selection of the mixed culture **OleicaStarter Advance** has been carried out after a decade of rigorous scientific studies and validations on an industrial scale by scientists of the Instituto de la Grasa (Spanish Research Council) based on its high adhesion capacity to the fruit surface together with other beneficial microorganisms involved in olives fermentation (Publications available at: - León-Romero 2014, Doctoral thesis, University of Seville, León-Romero et al 2016, Appl Environ Microbiol 82, 689-695, Rodríguez Gómez et al. , Frontiers Microbiol, Vol 8. Art 915 Pag 1-15). This high adhesion capacity is mediated by the production of EPS that become table olives in a great carrier of beneficial microorganisms to the final consumer (> 10 million cells per gram). At the same time biofilms prevent the colonization of the fruits by pathogenic or spoilage microorganisms by an exclusion mechanism. In addition, the EPS produced by these lactic bacteria prevent the adhesion of *E. coli* ETC K88 to cell lines through a process of blocking the fimbria of the food-borne pathogen.

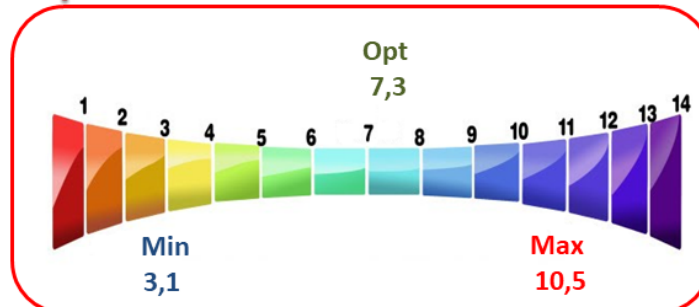


Environmental growth conditions for the OleicaStarter *Advance* culture

Temperatura



pH

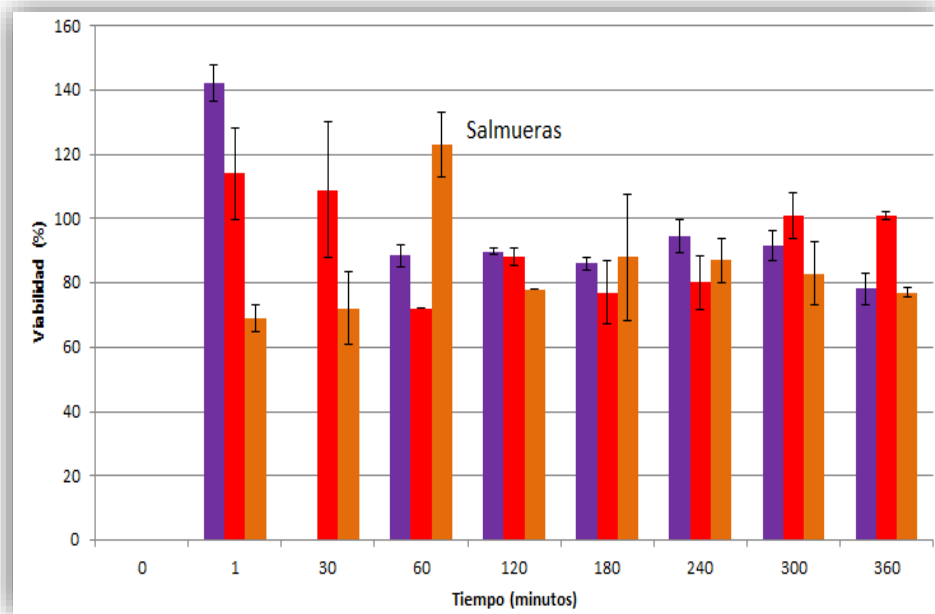
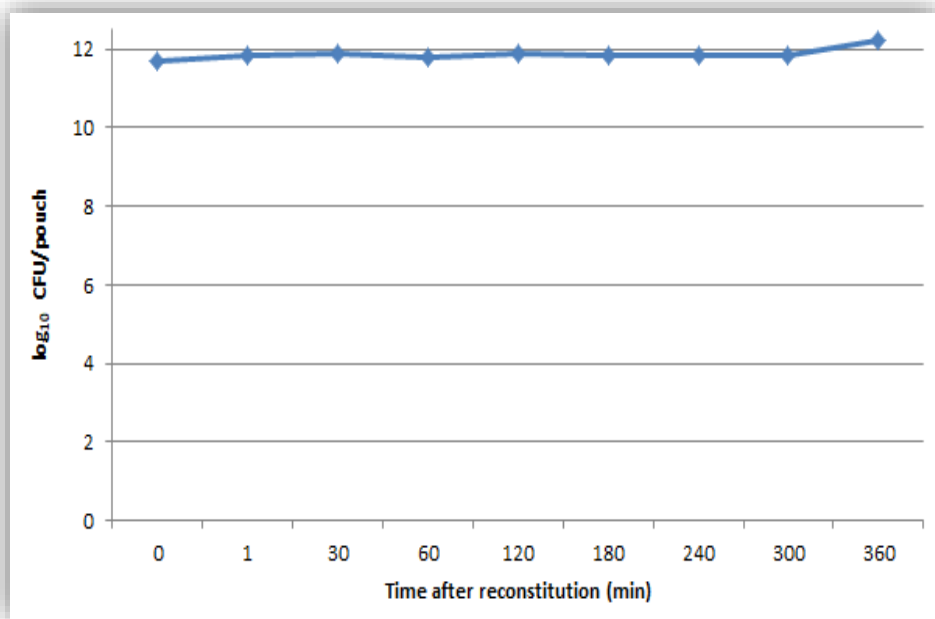


Sal

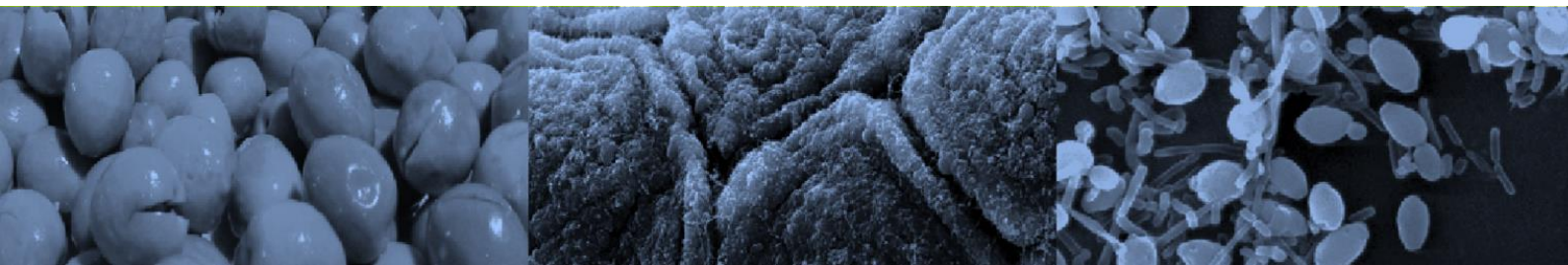


The culture can be directly reconstituted in the own fermentation brine (please consult technical data of the product to determine the optimal conditions). Besides, the culture presents a high viability during a period of time that exceeds 6 hours, thus making easier its handling and inoculation in the industry. The culture does not require additional nutrients to facilitate its growth.

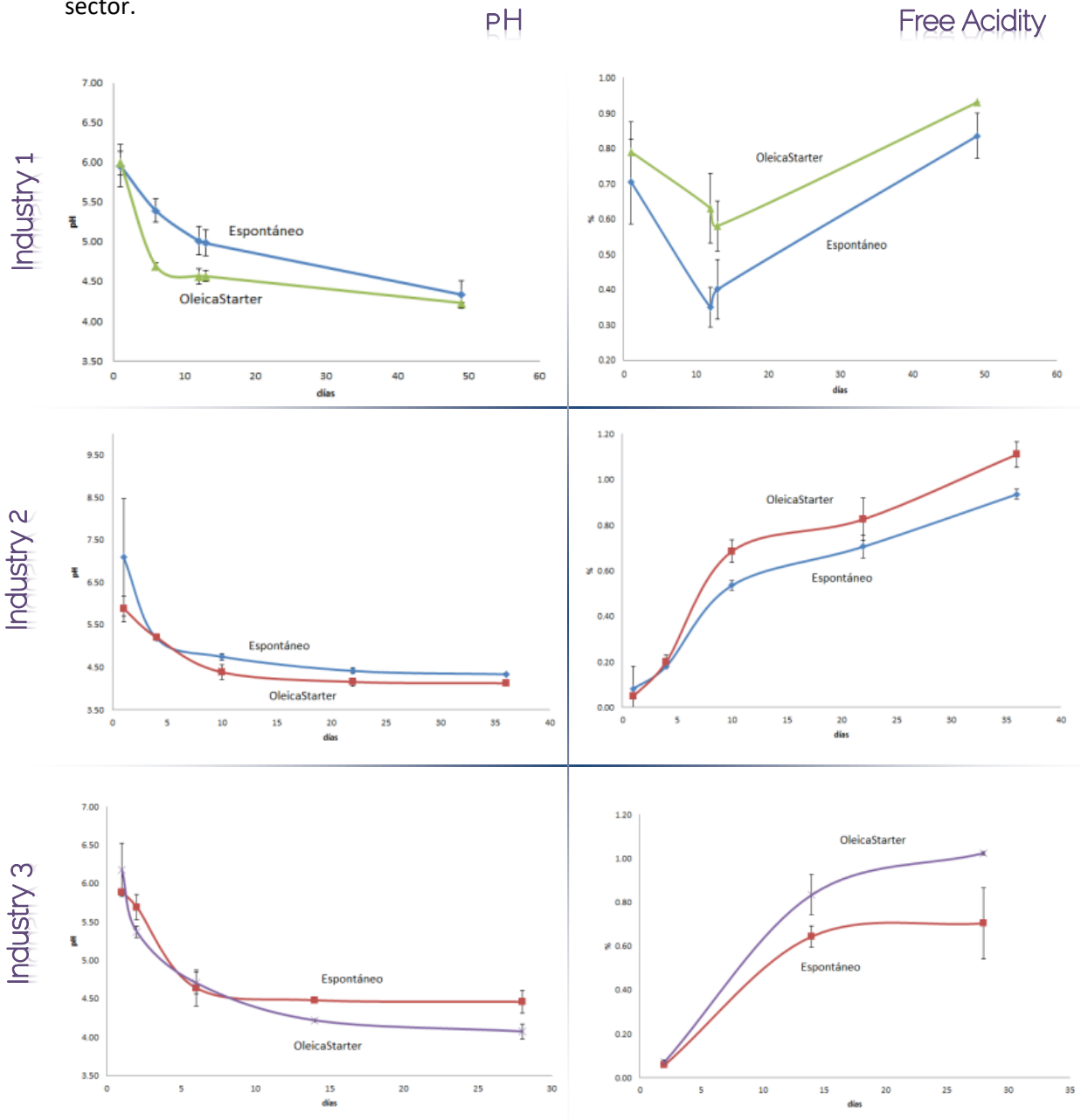




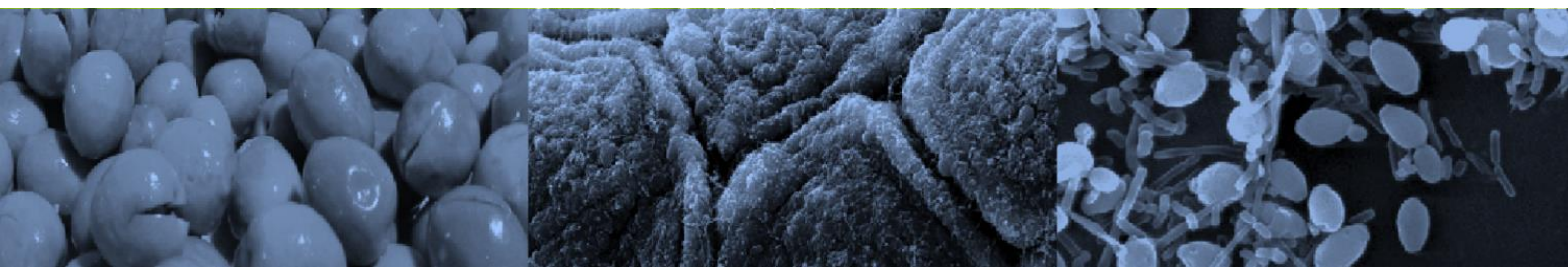
Survival of the Oleica Starter Advance inoculum in different reconstitution media where the olive brines are also included.



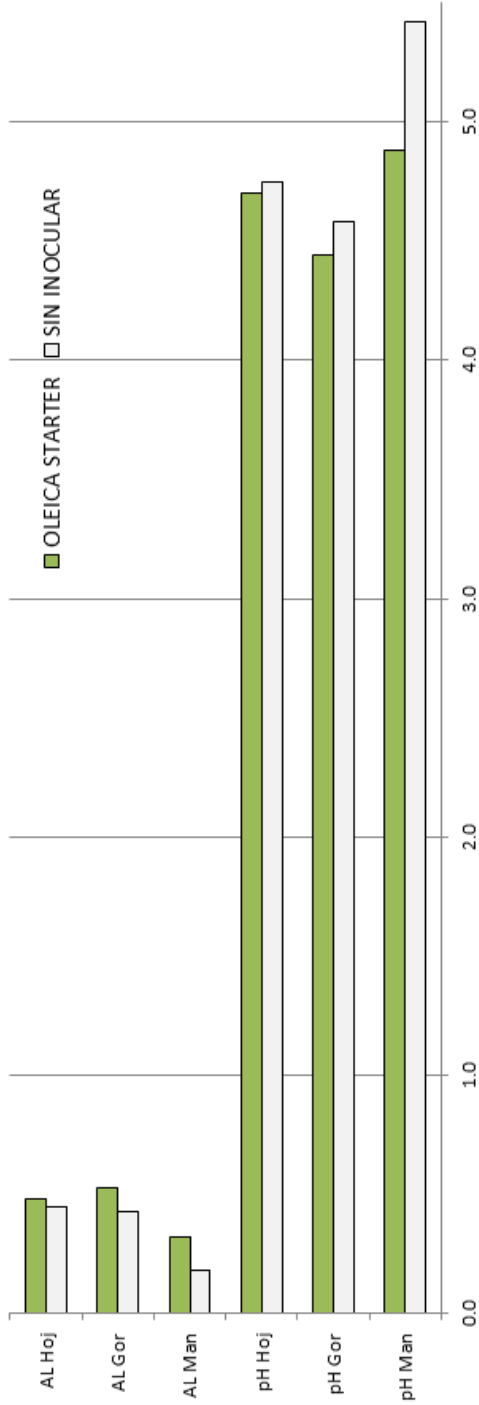
Previous studies carried out at industrial level in two different seasons (2017/2018, 2018/2019) with a total of 30 fermenters of 10 tons in 3 different industries producing Spanish table olives with Manzanilla, Gordal and Hojiblanca fruits, showed that in all cases the production of free acidity improved, since there is a faster pH dropping of the fermenters. Likewise, the treatment cost of the fermenters was reduced/eliminated during the first 2-3 weeks of fermentation (personnel, addition of acids, nutritive growth media, etc.) up to 10 times in comparison with the traditional fermentation process, as well as the bitterness of the fruits is reduced in a greater extent. The percentage of imposition of the strains in Biofilm during the process was 80% for Gordal and 100% for Manzanilla (determined by rep-PCR GTG₅). This fact differentiates **OleicaStarter Advance** from other cultures commonly used in the table olive sector.



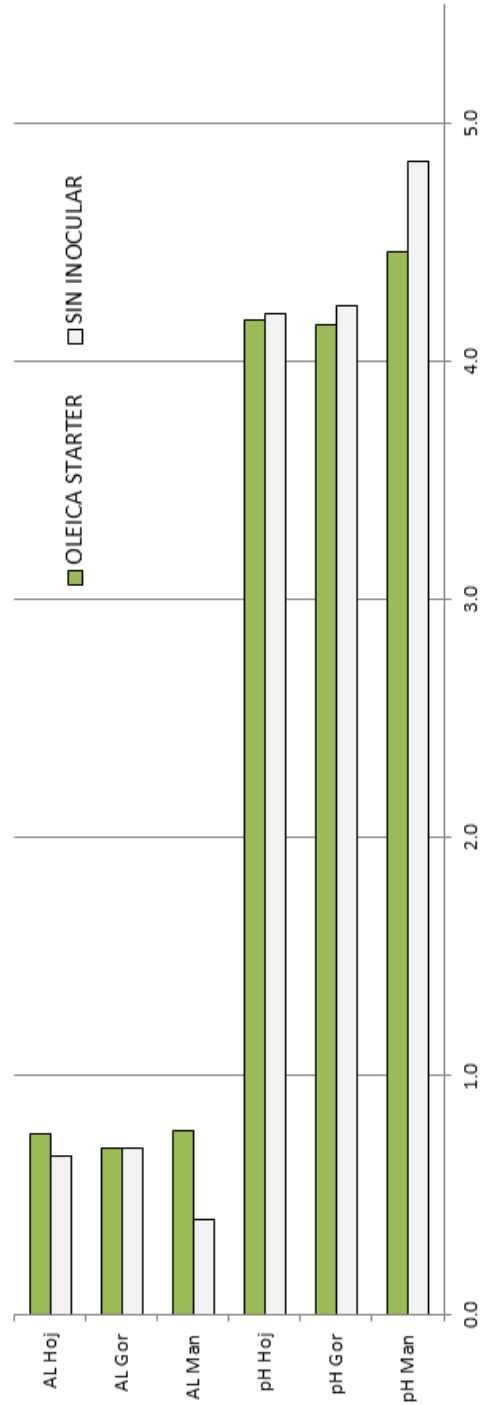
Industrial Trials carried out in the 2017/2018 campaign



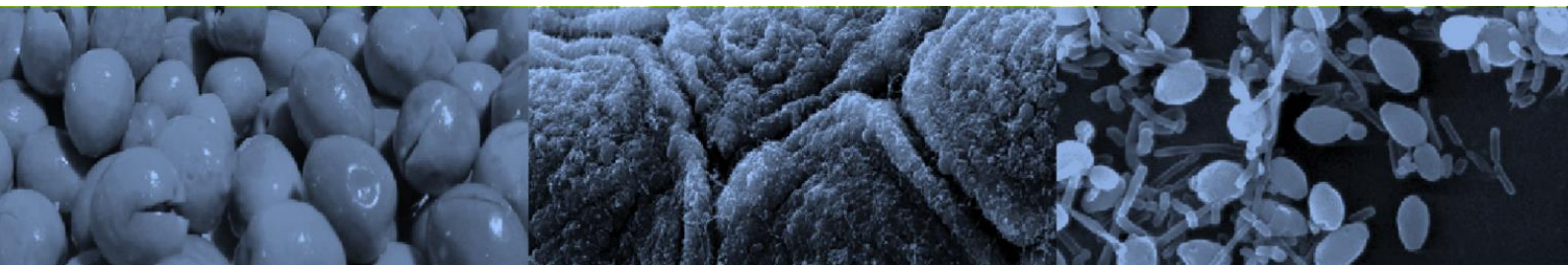
Home fermentation (1 month). n = 9 fermenters from 3 Industries



Final fermentation (1 month). n = 9 fermenters from 3 Industries



Industrial Trials carried out in the 2018/2019 campaign



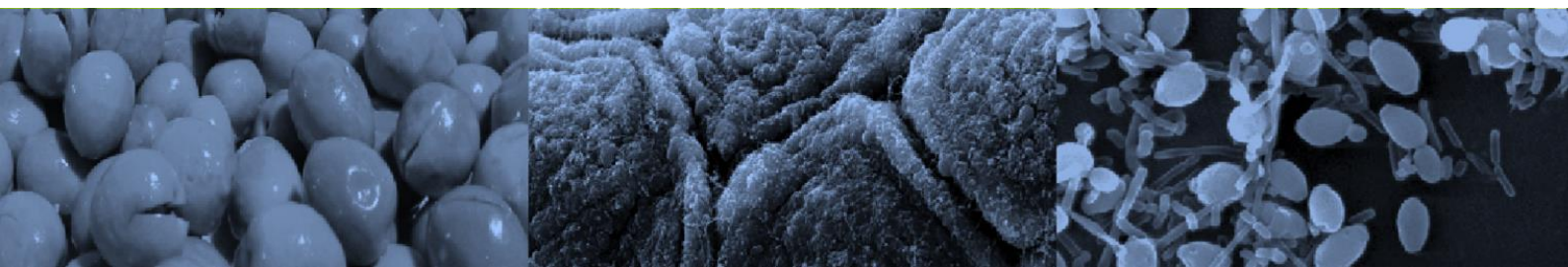
In Addition to the excellent technological features mentioned above, **OleicaStarter Advance** has important potentially probiotic properties determined by the *in vitro* and *in vivo*, among which they emphasize:

Probiotic Activity	13B4	119	LPG1
Biofilm Formation	Yes ($>10^7$ cfu/g)	Yes ($>10^7$ cfu/g)	Yes ($>10^7$ cfu/g)
Resistance to human digestion *	Yes Log ₁₀ initial= 8,70 Log ₁₀ final= 3,08	Yes Log ₁₀ initial= 9,14 Log ₁₀ final=2,35	Yes Log ₁₀ initial=10,46 Log ₁₀ final=7,94
Adherence to human cell lines *	Yes 25,37%	Yes 23,26%	Yes 0,74%
Phenotypic Resistance Antibiotics *	No	No	No
Activity against Pathogens * (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>)	Yes	Yes	Yes
Reducción niveles colesterol*	27,5%	27,6%	25,31%
Tumor cell Proliferation Reduction *	Nd	Nd	21,10%
Anti-Inflammatory Activity **	Nd	Nd	Yes

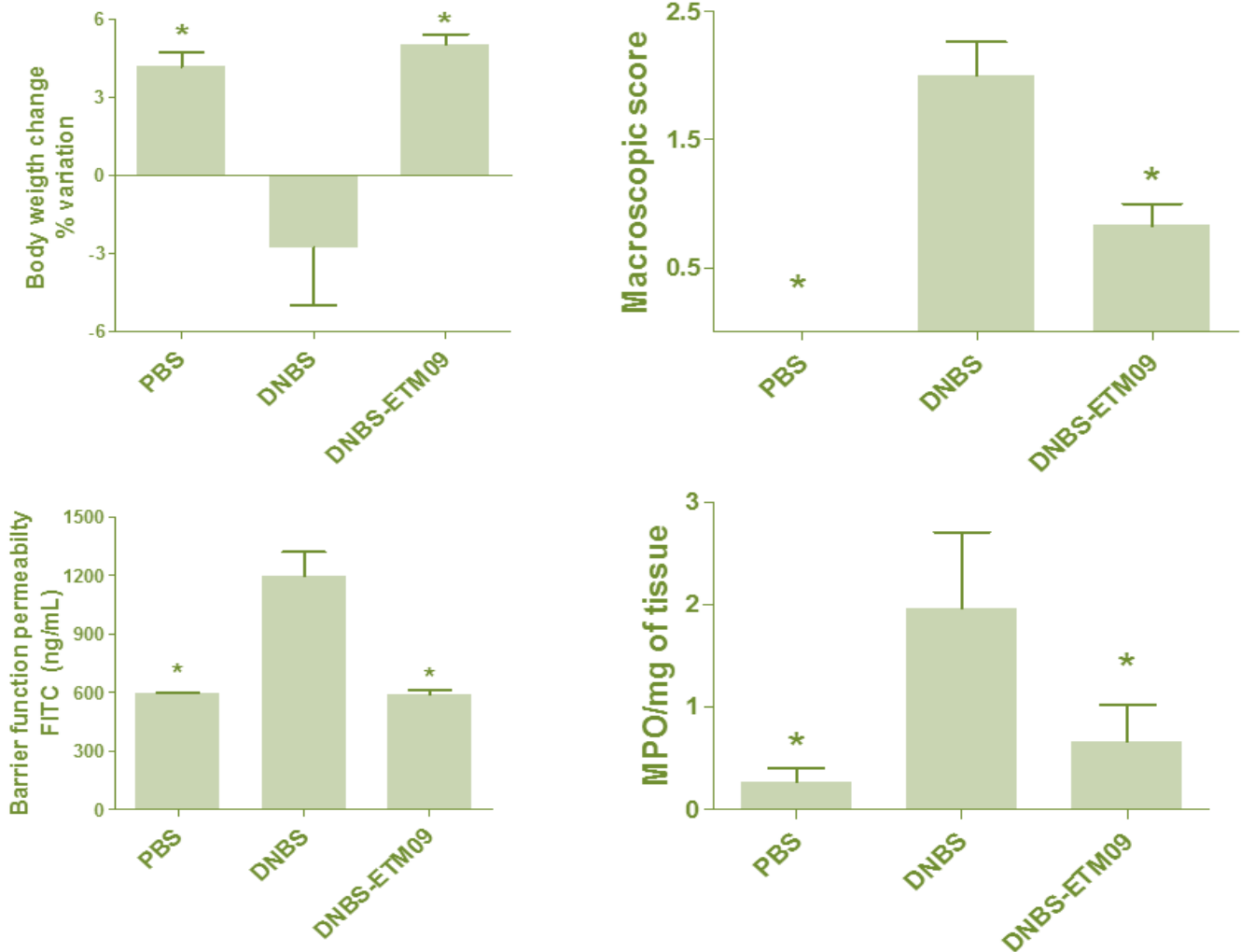
* Studies carried out *in vitro*

** Studies carried out in animal models *in vivo*

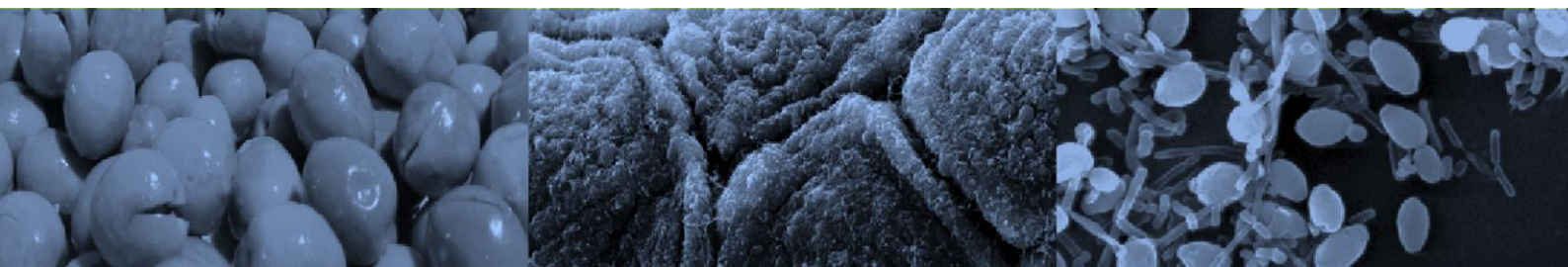
Nd. Not determined



In particular, the LPG1 strain presents the following anti-inflammatory characteristics in animal models *in vivo*:



Effect of L. pentosus LPG1 in murine model with colitis induced by DNBS. Adding LPG1 avoids weight loss and tissue damage Cell. Mouse weight. The results are expressed as mean \pm standard deviation. The asterisk indicates significant differences compared to the control group (DNBS). ($P < 0.05$).



6. Customer service

OleicaStarter Advance is supported by a specialized customer service. Our technical team has a broad experience in the study of vegetables fermentation and specifically in the table olive sector. The staff members have been all trained at the Instituto de la Grasa (CSIC, Seville) so that they can aid stakeholders to make their fermentation process trustworthy and successful.

