



**Università di Pisa  
Scuola Superiore Sant'Anna**



**Scuola Superiore  
Sant'Anna**  
di Studi Universitari e di Perfezionamento

**Corso di Dottorato Congiunto in  
SCIENZA DELLE PRODUZIONI VEGETALI**

**Tesi di Dottorato di Ricerca**

**L'UTILIZZO DELLA NEVE CARBONICA  
NELLA PRODUZIONE  
DI OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA**

**Autore:  
Chiara Sanmartin**

**Relatore  
Chiar.mo Prof. Gianpaolo Andrich    SSD AGR15**

**XXIV CICLO DI DOTTORATO  
ANNI ACCADEMICI 2009-2011**

*Ai miei genitori*

# INDICE

I.	RIASSUNTO	6
II.	ABSTRACT	8
1.	INTRODUZIONE	10
	1.1. L'olio extravergine di oliva	10
	1.2. Importanza economica e produzione di olio di oliva	12
	1.3. L'Olivo	15
	1.4. La drupa	16
	1.5. La composizione chimica dell'olio di oliva	21
	1.5.1. La frazione saponificabile	21
	1.5.2. La frazione insaponificabile	23
	1.6. Le caratteristiche organolettiche dell'olio	28
	1.7. Alterazioni dell'olio di oliva	32
	1.7.1. La scissione idrolitica	32
	1.7.2. Irrancidimento ossidativo	33
	1.7.3. Irrancidimento chetonico	34
	1.8. Tecnologia estrattiva	35
	1.8.1. Operazioni preliminari: defogliazione, lavaggio delle olive e loro eventuale denocciolatura	35
	1.8.2. Frangitura o molitura delle olive	36
	1.8.3. Gramolatura della pasta	39
	1.8.4. Separazione dell'olio	41
	1.8.5. Conservazione dell'olio di oliva	44
2.	SCOPO DELLA TESI	46

3. MATERIALI E METODI	48
3.1. Le prove di frangitura delle olive	48
3.1.1. Il frantoio impiegato	48
3.1.2. Il criogeno impiegato: l'anidride carbonica solida.	50
3.1.3. Messa a punto impianto e scelta variabili processo.	52
3.1.4. Variabili operative adottate nella conduzione di una generica prova	54
3.1.5. Prelievo e stoccaggio dei campioni	54
3.2. Valutazione dell'efficacia della tecnologia proposta	55
3.2.1. Determinazione della resa di processo	55
3.2.2. Analisi carpologiche delle olive impiegate	57
3.2.3. Determinazione dell'umidità di olive, paste e sanse	58
3.2.4. Determinazione del contenuto in olio in olive tal quali, paste e sanse	58
3.2.5. Determinazione dell'acidità dell'olio	60
3.2.6. Determinazione del numero di perossidi dell'olio	61
3.2.7. Determinazione dei parametri spettrofotometrici	61
3.2.8. Estrazione della componente fenolica e determinazione del contenuto in fenoli totali dell'olio.	62
3.2.9. Determinazione del contenuto in clorofilla	63
3.2.10. Determinazione del contenuto in carotenoidi	63
3.2.11. Determinazione contenuto in tocoferoli	63
3.2.12. Determinazione dell'indice di amaro	63
3.2.13. Determinazione contenuto acqua residua negli oli	63
3.3. Elaborazione statistica dei dati raccolti	64
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	65
4.1. L'eterogeneità della materia prima	65
4.2. Prove di estrazione condotte operando in presenza o in assenza del criogeno e utilizzando frutti raccolti da olivi appartenenti a cultivar diverse.	66

4.3. Prove di estrazione condotte operando in presenza o in assenza del criogeno e utilizzando frutti raccolti da olivi appartenenti a cultivar diverse e conservati in aria a 7°C.	72
4.4. La resa di estrazione e la qualità dell'olio estratto al variare del rapporto in peso criogeno/olive lavorate	78
4.5. Rese di estrazione e qualità degli oli estratti al variare dell'indice di maturazione raggiunto dalle olive utilizzate e operando o meno in presenza del criogeno.	83
4.6. Effetto indotto dall'impiego del criogeno sulla resa di estrazione	90
4.7. Qualità dell'olio e tecnologia estrattiva utilizzata	93
4.8. Applicazioni e potenzialità della tecnologia analizzata	97
5. BIBLIOGRAFIA	99
6. RINGRAZIAMENTI	105

## I. RIASSUNTO

Lo scopo del presente lavoro di tesi è l'individuazione di un sistema estrattivo innovativo in grado di valorizzare le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche dell'olio vergine di oliva.

L'addizione diretta dell'anidride carbonica allo stato solido alle olive prima della frangitura, al fine di promuoverne la criomacerazione, costituisce l'operazione fondamentale che caratterizza questo nuovo sistema di estrazione.

L'impiego della neve carbonica come criogeno ha già trovato interessanti applicazioni in campo alimentare in generale e nel settore enologico più in particolare. Infatti, la  $CO_{2,s}$ , che a pressione atmosferica tende a sublimare per portarsi in fase aeriforme alla temperatura a  $-78^{\circ}C$ , induce il passaggio dallo stato liquido a quello solido dell'acqua presente all'interno delle cellule delle olive poste direttamente a contatto con questo criogeno. Poiché il volume occupato dalla stessa quantità di acqua allo stato solido risulta superiore a quello inizialmente occupato allo stato liquido, si assisterà ad una perdita della struttura compartimentale cellulare dovuta al così detto crash cellulare, e alla conseguente fuoriuscita dei prodotti in queste contenute facilitandone così la diffusione in fase liquida che si arricchirà in metaboliti cellulari in genere e in olio di estrazione in particolare.

La  $CO_2$  gassosa, che esibisce un valore di densità superiore a quella dell'aria ( $\delta CO_{2,g} / \delta a_{ria} = 1.5$ ), tende a permanere al di sopra della pasta di olive in lavorazione, creando così uno strato gassoso inerte in grado di proteggerla dall'ossigeno dell'atmosfera circostante. Diverrebbe così possibile modulare opportunamente non solo i tempi di gramolatura ma anche quelli della sua eventuale esposizione ad una ossigenazione controllata così da poter accumulare all'interno dell'olio estratto i desiderati quantitativi in prodotti ossigenati a valenza aromatica.

Una prima consistente parte dell'attività sperimentale connessa a questo lavoro di tesi, è stata dedicata a definire il protocollo sperimentale più

idoneo e ad apportare le necessarie modifiche al microfrantoio commerciale utilizzato (Oliomio Baby® -Toscana Enologica Mori), al fine di consentire l'aggiunta della CO<sub>2(s)</sub> nel corso della lavorazione delle olive.

L'aggiunta di CO<sub>2,s</sub> appare in grado di migliorare la resa estrattiva (+1%), un valore che appare influenzato da una molteplicità di variabili, tra cui il grado di maturazione raggiunto dalle olive, il loro contenuto in acqua, il tempo e le modalità di conservazione adottate, il rapporto tra peso criogeno/peso olive lavorate. Questo risultato costituisce un evidente e immediato vantaggio commerciale per i produttori, che vedrebbero così accresciuta la loro remunerazione a parità della quantità di olive conferite all'impianto di estrazione.

L'innovativa tecnologia estrattiva proposta, consente, inoltre, di ottenere un olio extravergine di oliva più ricco in vitamina E (+7%) e quindi in componenti bioattivi in grado di accrescerne la qualità nutrizionale e ad incrementarne il potere antiossidante e quindi la vita commerciale.

Inoltre l'olio estratto operando in presenza del criogeno, tenderebbe ad arricchirsi di quei componenti aromatici tipici della materia prima utilizzata e quindi propri della cultivar di oliva lavorata ma variabili in funzione della zona di produzione e più in particolare delle condizioni pedo-climatiche che ne hanno contraddistinto l'andamento della maturazione nell'annata esaminata. L'olio così prodotto, verrebbe ad essere più strettamente legato alla materia prima utilizzata, alla tipologia di olive lavorate e alla loro zona di produzione, da divenire un prodotto tipico contraddistinto da chiare ed inconfondibili caratteristiche organolettiche facilmente riconoscibile e identificabile dal consumatore che potrebbe divenire disponibile a sostenere un prezzo superiore pur di assicurarsi un prodotto qualitativamente più valido.

## II. ABSTRACT

The aim of this PhD thesis is the individuation of an innovative extraction technology, able to improve the nutritional and organoleptic characteristics of virgin olive oil.

The pre-milling addition of solid carbon dioxide  $\text{CO}_{2(s)}$  (carbonic snow) directly to the olives, promoting the olive cryomaceration, is the operation which marks this new extraction system.

The carbonic snow is largely used as cryogen in food technology, especially in the enological area.

Indeed after the contact between the  $\text{CO}_{2(s)}$  (sublimation point:  $T=-78.5^{\circ}\text{C}$ ;  $P=1\text{atm}$ ) and the olives, the cellular water inside the fruits freezes.

After freezing, water has a bigger volume, so the endomembrane system of the olive cells collapses (cellular crash) while the cellular contents can spill out, enriching the liquid phase with cellular metabolites and oil.

The gaseous  $\text{CO}_2$  has a higher density compared with the air ( $\delta\text{CO}_{2,g}/\delta\text{air} = 1.5$ ), so it forms a gaseous inert layer on the surface of the olive paste, protecting it from the oxygen of the surrounding atmosphere.

This gaseous inert layer allows to modulate the malaxation time and to manage the olive paste exposition to oxygen, improving the aromatic profile of extracted oil.

The first part of this research activity was spent planning the best experimental protocol and conveniently modifying the micro-milling (Oliomio Baby® -Toscana Enologica Mori), to allow the addition of the  $\text{CO}_{2(s)}$  during the olive processing.

The addition of the  $\text{CO}_{2(s)}$  seems to improve the extraction yield (+1%), a parameter which depends on many variables: ripeness degree and water content of the olives, time and conditions adopted during their storage, ratio between cryogen and olives (w/w). This result leads to an evident and immediate advantage for the olive producers, who could obtain a higher payment for the same amount of olives brought to the extraction plant.



This innovative technology allows to extract an extravirgin olive oil richer in Vitamin E (+7%) and bioactive components able to increase the oil antioxidant activity and so both its nutritional value and its shelf-life.

Besides the cryo-extracted oil should be richer in the aromatic substances that are typical of the raw material but are also linked to the production area and obviously to the pedoclimatic conditions.

As a consequence, the cryo-extracted oil should be more linked to its production area and therefore easily recognizable by the consumer.

Thanks to the organoleptic and nutritional profile of this oil, the consumer could be minded to pay a higher price for this typical product.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 L'olio extravergine di oliva

Secondo il Regolamento CEE n. 2568/91 e successive modificazioni e integrazioni *“L'olio di oliva vergine è ottenuto dal frutto dell'olivo soltanto mediante processi meccanici o fisici, in condizioni che non causino alterazioni dell'olio, senza subire alcun trattamento diverso da lavaggio, decantazione, centrifugazione e filtrazione.*

*L'olio extravergine in particolare deve esibire, alla valutazione organolettica effettuata da un panel di esperti degustatori, una mediana del difetto pari a zero ed una mediana del fruttato superiore a zero.*

*Deve avere un'acidità libera (espressa come grammi di acido oleico su 100 g di olio) inferiore a 0.8 ed avere le altre caratteristiche conformi a quelle previste per questa categoria” (Regolamento CEE N. 2568/91 s.m.i.).*

In tabella 1.1 sono riportati i criteri di qualità per l'olio di oliva extravergine, così come definiti nell'Allegato I del Regolamento CEE 2568/91 e s.m.i. , in particolare acidità %, indici spettrofotometrici e valutazione organolettica.

A quanto sopra si aggiungono un cospicuo numero di ulteriori parametri analitici (composizione sterolica, alcoli alifatici, e triterpenici, cere, composizione acidica e gliceridica, etc.) atti a validare la genuinità dell'olio; aspetto quello della genuinità sicuramente basilare, ma non esaustivo nei riguardi della tutela di un prodotto che vede nelle caratteristiche salutistiche e sensoriali i principali punti di forza per la sua affermazione sui mercati mondiali (Servili et al., 2009).

**TABELLA 1.1. - CARATTERISTICHE DELL'OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA (Allegato I del Regolamento CEE 2568/91 e s.m.i)**

Acidità (%) <sup>(*)</sup>	≤ 0.8
Numero dei perossidi meq O <sub>2</sub> /kg <sup>(*)</sup>	≤20
Cere mg/kg	≤250
2-gliceril monopalmitato (%) se % acido palmitico totale ≤ 14%	≤0.9
Stigmastadiene mg/kg	≤0.10
Differenza ECN42 HPLC e ECN42 (calcolo teorico)	≤0.2
K232 *	≤2.50
K270 *	≤0.22
ΔK *	≤0.01
Valutazione organolettica mediana del difetto Md <sup>(*)</sup>	Md=0
Valutazione organolettica mediana del fruttato Mf <sup>(*)</sup>	Mf >0
COMPOSIZIONE ACIDICA	
Miristico %	≤0.05
Linolenico %	≤1.0
Arachidico %	≤0.6
Eicosenoico %	≤ 0.4
Beenico %	≤0.2
Lignocerico %	≤0.2
Somma degli isomeri transoleici %	≤ 0.05
Somma degli isomeri translinoleici + translinolenici %	≤0.05
COMPOSIZIONE IN STEROLI	
Colesterolo %	≤0.5
Brassicasterolo %	≤0.1
Campesterolo %	≤4.0
Stigmasterolo %	< Campesterolo
Betasitosterolo %	≥ 93.0
Delta-7-stigmasterolo %	≤0.5
Steroli totali mg/kg	≥1000
Eritrodiole e uvaolo %	≤4.5

*(\*) l'inosservanza di uno solo di questi vincoli comporta la variazione della categoria merceologica*

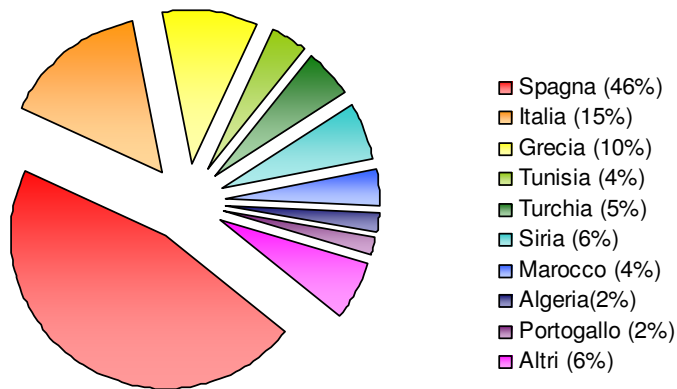
## 1.2 Importanza economica e produzione di olio di oliva

L'area colturale dell'olivo si sviluppa dal 30° al 45° parallelo di latitudine Nord, in una fascia a clima temperato, detta appunto “*regione dell'olivo*”, ed in particolare nella regione del Mediterraneo, dove si concentra circa il 94% del totale della produzione mondiale di olio. In questa area sono compresi paesi come l'Italia, il sud della Spagna e della Francia, la Grecia e alcuni Paesi mediorientali che si affacciano sul Mediterraneo orientale, tuttavia attualmente l'olivo è coltivato anche nelle regioni temperato-calde dell'America, dell'Africa e dell'Australia (figura 1.1. ),



**FIGURA 1.1** - DIFFUSIONE GEOGRAFICA DELL'OLIVO: ZONE OLIVICOLE E LIMITI DI CULTURA.

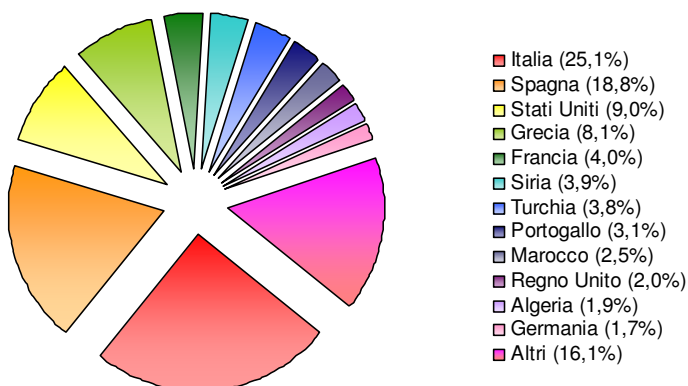
Come evidenziato dal diagramma riportato in figura 1.2 , le nazioni più meridionali della UE si assicurano la stragrande maggioranza di questa produzione, che in totale ammonta a circa 300000 t.



**FIGURA 1.2** - I MAGGIORI PAESI PRODUTTORI DI OLIO DI OLIVA E LA LORO PERCENTUALE CAPACITÀ PRODUTTIVA NELL'ANNATA 2010/2011 (CONSIGLIO OLEICOLO INTERNAZIONALE, 2011)

L'Italia si colloca dunque dopo la Spagna, al secondo posto tra i paesi produttori di olio di oliva.

Rispetto al numero dei paesi produttori, quello dei paesi consumatori risulta sicuramente più elevato (Figura 1.3), tra questi spicca l'Italia, che assorbe la percentuale maggiore (25.1%), ma sono presenti, con percentuali sempre più crescenti, nazioni come gli Stati Uniti (9%) ed altri paesi del Nord Europa.



**FIGURA 1.3** - I MAGGIORI PAESI CONSUMATORI DI OLIO DI OLIVA E LA LORO PERCENTUALE CAPACITÀ DI ASSORBIMENTO NELL'ANNATA 2010/2011 (CONSIGLIO OLEICOLO INTERNAZIONALE, 2011)

Per quanto riguarda la produzione nazionale (440000 tonnellate di olio d'oliva nel 2010/2011 (secondo i dati riportati nel sito del Consiglio Oleicolo Internazionale), questa non è assolutamente in grado di coprire la richiesta (660 000 tonnellate di olio d'oliva consumato nel 2009/2010), per cui l'Italia è costretta ad importare più del 30% del suo fabbisogno.

La produzione olivicola rappresenta in media circa il 4.2 % del valore complessivo del fatturato dell'agricoltura. Questa percentuale sale al 9.5% in Sicilia, al 33% in Calabria e al 37% in Puglia; queste sono le regioni maggiormente produttive che, complessivamente, raggiungono quasi l'80% della produzione nazionale.

Secondo l'AGEA (Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura), la consistenza attuale del patrimonio olivicolo italiano ammonta a 222.9 milioni di olivi, distribuiti per il 60% in aree collinari, 30% in pianura e 10% in zone montane. Secondo i dati ISMEA (Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare), circa il 60-65% della produzione nazionale di olio di oliva è extravergine.

### 1.3 L'Olivo

L'olivo ha avuto probabilmente origine nella zona sud caucasica (12.000 a.C.) tuttavia si è ambientato molto bene nel bacino del Mediterraneo, in cui sono segnalate ben 1208 cultivar di olivo presenti in 52 nazioni e conservate in 94 collezioni del germoplasma olivicolo (Muzzalupo *et al.*, 2009).

L'olivo coltivato, *Olea europaea sativa*, è un albero sempreverde, il cui frutto, chiamato oliva, è una drupa la cui polpa è ricca di olio e componenti bioattivi.

L'olivo è caratterizzato da una notevole longevità, che può raggiungere qualche centinaio d'anni, tuttavia è soggetto a numerose avversità sia meteoriche (teme essenzialmente il freddo) che di tipo biologico, dovute ad agenti di danno (insetti, in particolare si ricorda la mosca olearia) e di malattia (funghi o batteri).

La mosca olearia (*Bactrocera oleae*, vedi figura 1.4) è un dittero diffuso in tutte le aree di coltivazione dell'olivo e più o meno presente in tutti gli oliveti italiani, pertanto nelle regioni in cui è presente è considerato una delle avversità più importanti a carico dell'olivo, arrivando a condizionare sensibilmente l'entità e la qualità della produzione nella maggior parte dell'areale di coltivazione.



#### CLASSIFICAZIONE

Classe: Insetti

Ordine: Ditteri

Sottordine: Brachiceri sez. Ciclorafi

Famiglia: Tephritidi

Genere: *Bactrocera*

Specie: *B. olea* Gmelin

**FIGURA.1.4** - MOSCA OLEARIA, DI CUI SI RIPORTANO CLASSIFICAZIONE SISTEMATICA E IMMAGINI RELATIVE A DIVERSI STADI VITALI.

Il danno causato dalla mosca è legato essenzialmente all'attività trofica delle larve, che si sviluppano all'interno dell'oliva, nutrendosi della polpa dei frutti, dentro i quali scavano delle gallerie. Le olive bacate possono essere invase da microrganismi che provocano marciumi, con conseguente cascola. Inoltre la mosca dell'olivo è responsabile attraverso le punture di ovodeposizione della trasmissione della rogna dell'olivo (*Pseudomonas savastanoi*).

Dalle olive danneggiate si ricava un olio di scarsa qualità, più acido della norma e con aroma completamente compromesso, per l'odore di muffa che assume (il difetto è denominato *verme*).

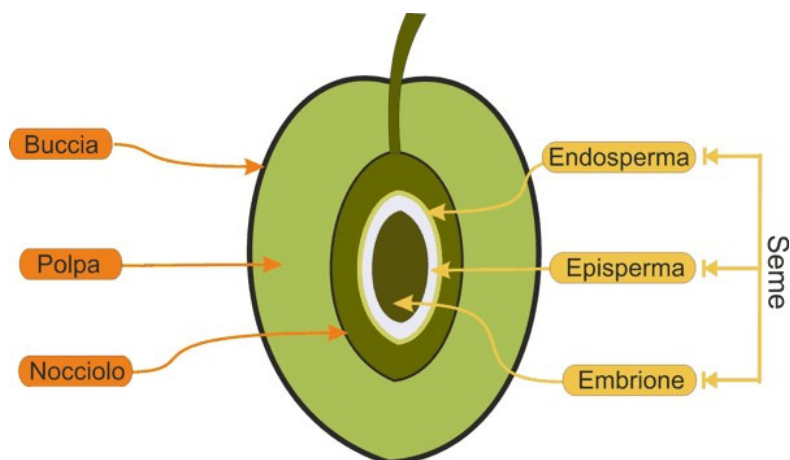
La lotta contro la Mosca dell'olivo è di tipo chimico; tuttavia essa utilizza anche di accorgimenti agronomici e tecniche di lotta biologica che si avvalgono di entomofagi non specifici, inoltre per ridurre i danni degli attacchi autunnali è possibile effettuare una raccolta anticipata delle olive.

## **1.4 La drupa**

Il frutto dell'olivo è una drupa, con i due assi (polare ed equatoriale) di lunghezza variabile. In accordo a quanto illustrato in figura 1.5, l'oliva, che ha un peso compreso fra 2 e 6 grammi, è formata da:

- *Epicarpo*: parte esterna, che costituisce l'1.5-3.5% del peso della drupa;
- *Mesocarpo*: polpa, che ne costituisce il 70-80% in peso;
- *Endocarpo* : *nocciolo*, (15-25% del peso) e mandorla o *seme* (2.5-4.0%) a sua volta costituito da endosperma, episperma ed embrione.





**FIGURA 1.5 - SCHEMA DELLA SEZIONE DELL'OLIVA.**

La composizione percentuale della drupa, della polpa, del nocciolo e del seme è mediamente rappresentata dai costituenti riportati in tabella 1.2

**TABELLA 1.2- COMPOSIZIONE MEDIA PERCENTUALE DEI MACRO-COSTITUENTI DELL'OLIVA**  
(Sciancalepore, 1998)

	<b>Drupa</b>	<b>Polpa</b>	<b>Nocciolo</b>	<b>Seme</b>
<b>Acqua</b>	50.0	59.0	15.0	35.0
<b>Olio</b>	21.0	25.0	0.5	28.0
<b>Sostanze azotate<sup>(*)</sup></b>	1.5	2.0	3.0	8.0
<b>Estratti inazotati</b>	18.0	7.0	38.5	24.0
<b>Fibra grezza</b>	8.0	6.0	40.0	4.0
<b>Ceneri</b>	1.5	1.0	3.0	1.0

(\*) = N x 6.25

Nell'oliva alla maturazione fisiologica, si possono identificare numerosi costituenti, che, da un punto di vista quantitativo, si possono suddividere in principali e secondari: i costituenti principali sono l'acqua e la sostanza grassa (trigliceridi) mentre quelli secondari comprendono fosfatidi, steroli,

cere, acidi organici, glucidi, protidi, sostanze fenoliche, sali minerali, pigmenti, enzimi, vitamine, etc. Mentre i costituenti principali sono localizzati prevalentemente nel mesocarpo e nell'endosperma, quelli secondari abbondano nell'endocarpo e nell'epicarpo. Nel seme è presente circa l'8% di sostanze azotate: questa frazione proteica costituisce la carica enzimatica necessaria per il sostentamento dell'embrione e, quindi, per il possibile successivo sviluppo di una nuova pianta di olivo.

La maturazione dei frutti richiede diversi mesi e la sua durata dipende da molteplici fattori, quali la cultivar, le condizioni pedoclimatiche e le pratiche agronomiche. Durante la maturazione avvengono cambiamenti nella fisiologia del frutto, tra cui un aumento ponderale della drupa, del rapporto polpa/nocciolo nonché importanti variazioni nella composizione chimica, legate ai principali parametri che determinano le caratteristiche qualitative di un olio, la sua composizione acidica, l'accumulo di sostanze fenoliche e aromatiche.

Questi fenomeni decorrono di pari passo con l'invasatura, ossia la variazione del colore assunto dalla drupa che da verde tende ad assumere colorazioni violacee e marrone-nero.

Con il procedere dell'epoca di maturazione si osserva inizialmente un accumulo dei carboidrati nel mesocarpo la cui concentrazione tende a diminuire quando diviene sempre più rilevante la sintesi dei componenti dell'olio che decorre principalmente all'interno dei mitocondri (processo di inoliazione).

Quando l'oliva raggiunge la maturazione fisiologica, l'olio occupa in pratica l'80% dello spazio intracellulare ed è sostanzialmente conservato all'interno di una struttura vacuolare (olio disponibile o libero); la parte rimanente, pari a circa il 15-20% del totale, è invece distribuita nella struttura citoplasmatica (olio legato).

Il primo, facilmente estraibile, è nettamente separato dal contenuto citoplasmatico mediante un sistema di membrane, che ne impedisce l'interazione con gli enzimi cellulari (lipasi). Con il progredire della maturazione tali barriere tendono a degradarsi e gli enzimi possono venire

a contatto con l'olio, accelerandone le cinetiche di inacidimento e quindi anche di irrancidimento.

L'olio viene ad essere meno protetto a causa del decremento delle sostanze ad attività antiossidante (composti fenolici) e quindi più suscettibile ai processi degradativi.

Col progredire della maturazione la drupa tende a disidratarsi per cui apparentemente si arricchisce in olio (incremento della resa "apparente" o percentuale) ma il raggrinzire del frutto porterà alla rottura dei vacuoli che contengono l'olio, favorendone il contatto con gli enzimi degradativi (incremento in acidità).

In realtà anche la quantità assoluta di olio comincia a diminuire, infatti, nella stagione autunnale, a causa del minor apporto di luce solare, l'attività fotosintetica diminuisce mentre la respirazione aerobia tende ad incrementarsi a seguito di una maggiore richiesta energetica (ATP) ciò porta ad una diminuzione della riserva di olio.

Il frutto viene in questa fase esposto ai processi degradativi legati all'azione degli enzimi che portano ad un incremento di acidi grassi liberi (acidità) per azione delle lipasi e al loro successivo irrancidimento enzimatico promosso dalle lipossidasi.

La maturazione delle drupe si colloca in epoche diverse (autunno-inverno in genere) in funzione della cultivar (variabilità genetica) e dell'andamento climatico dell'annata considerata (variabilità ambientale).

La maturazione "tecnologica" si raggiunge quando le drupe accumulano al loro interno la quantità massima di olio. Invece una raccolta anticipata rispetto a quella tecnologica se da un lato porta ad una minore resa in olio, dall'altro fornisce oli più ricchi in fenoli, caratterizzati quindi da sapori più amari, astringenti e piccanti, ma sicuramente più stabili all'ossidazione e quindi più facilmente conservabili.

A ciò si aggiungono anche le modalità di raccolta e di conservazione del frutto che giocano un ruolo tutt'altro che trascurabile nel condizionarne la composizione chimica dell'olio e quindi la resistenza ai processi degradativi.

I sistemi di raccolta, se effettuati in maniera non idonea, sono una delle cause più importanti della produzione di oli scadenti. I danni meccanici (bacchiatura, etc.) che non sempre risultano facilmente evitabili, possono indurre la rottura delle membrane dei vacuoli di olio facilitandone il contatto con gli enzimi, per cui diviene importante limitare il tempo che intercorre fra raccolta e la successiva lavorazione. Generalmente la raccolta manuale sarebbe da preferire per ottenere oli di buona qualità, tuttavia i costi elevati ed i tempi prolungati possono rendere più conveniente il ricorso alla raccolta meccanica.

Il tempo e le modalità di conservazione delle olive sono molto importanti ai fini della qualità organolettica dell'olio prodotto e della sua serbevolezza.

Le olive mantengono la loro attività metabolica (respirazione aerobia) anche in post-raccolta, per cui riducono la riserva in carboidrati e vanno quindi in contro ad una riduzione ponderale accentuata dalla migrazione dell'acqua che per traspirazione si diffonde nell'atmosfera circostante (avvizzimento del frutto). Nel caso in cui questo frutto venisse conservato in carenza di ossigeno perché sepolto all'interno di un cumulo di olive, non potendo promuovere la respirazione aerobia inizierebbe a fermentare (fermentazione alcolica) e quindi ad accumulare al suo interno una serie di metaboliti che vedrebbero nell'etanolo il più rappresentativo. Questi composti sono responsabili del così detto "riscaldamento" un'off-flavour che denuncia un'errata conservazione del prodotto prima della sua successiva lavorazione (estrazione dell'olio).

E' buona norma che il trasporto e lo stoccaggio delle olive non superino i 7 giorni dalla raccolta, quando la temperatura dei frutti non vada oltre i 25°C mentre le olive devono essere mantenute in sottili strati (20-30 cm), all'interno di cassette forate, così da evitarne lo schiacciamento per pressione, in locali asciutti e ben aerati.

In generale (in condizioni ottimali), esiste una relazione lineare (inversamente proporzionale) tra stabilità dell'olio all'invecchiamento accelerato e tempo di conservazione delle olive (*Lercker, 2005*).

## 1.5 La composizione chimica dell'olio di oliva

L'olio d'oliva presenta una composizione chimica complessa ed eterogenea, che è funzione di numerosi fattori, come la zona di produzione, la varietà delle olive, l'andamento stagionale, l'epoca e il sistema di raccolta delle olive, il processo estrattivo impiegato che esercita un ruolo rilevante nel condizionarne la composizione e quindi la conservabilità oltre che la qualità ed il valore merceologico.

L'olio vergine di oliva è costituito da una frazione gliceridica (97.5 - 99.5%), e da una frazione massivamente più ridotta (0.5 - 2.5%), costituita da un gruppo numeroso ed eterogeneo di componenti.

### 1.5.1 La frazione saponificabile

La frazione gliceridica o saponificabile, comprende i costituenti principali dell'olio d'oliva derivanti dall'esterificazione degli acidi grassi con la glicerina (tri-, di-, mono- gliceridi e acidi grassi liberi).

Tra i componenti saponificabili si annoverano anche i *fosfolipidi* (~1%) in cui un gruppo idrossilico della glicerina viene esterificato dall'acido orto fosforico che a sua volta può essere legato ad una molecola di colina (fosfatidilcolina) o una unità di dietanol-ammina (fosfatidiletanolammina) composti che contribuiscono ad incrementare il potere antiossidante di un olio ovvero la sua resistenza ai processi ossidativi. Alla frazione del saponificabile afferiscono anche: le *cere* (miscele complesse di esteri di acidi grassi a lunga catena con alcoli ottenuti dallo loro riduzione che costituiscono il rivestimento protettivo della drupa); gli *sfignolipidi* (ammidi di acidi grassi con basi a lunga catena idrocarburica).

Gli acidi grassi (monocarbossilici a 16-20 atomi di carbonio) presenti nell'olio d'oliva si ritrovano per lo più in forma esterificata (0.2 - 4.0% monogliceridi, 2 - 10% digliceridi, 90 - 95% trigliceridi) mentre sono pochissimi gli acidi grassi liberi.

La composizione acidica (vedi Tabella 1.3) varia con le condizioni climatiche e le pratiche agronomiche adottate ed influenza la conservabilità del prodotto finito, visto che l'irrancidimento ossidativo decorre preferibilmente a carico degli acidi grassi insaturi (*Pagliarini et al., 2000*).

**TABELLA 1.3 - COMPOSIZIONE PERCENTUALE MEDIA DEGLI ACIDI GRASSI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA** (*Sciancalepore, 1998*).

ACIDI GRASSI	%	ACIDI GRASSI	%
miristico (C 14:0)	> 0.1	linoleico (C18:2)	5.0-13.5
palmitico (C 16:0)	7.0-17.0	linolenico (C 18:3)	> 1.5
palmitoleico (C 16:1)	0.3-3.0	arachico (C 20:0)	> 0.7
stearico (C 18:0)	1.5-4.0	behenico (C 22:0)	> 0.3
oleico (C 18:1)	63.0-83.0	lignocerico (C 24:0)	> 0.5

Oltre che in base al numero di atomi di carbonio coinvolti nella loro catena alchilica, gli acidi grassi si distinguono anche sulla base del grado di insaturazione, ovvero del numero di doppi legami eventualmente presenti nella struttura. In particolare nell'olio di oliva si ha un 14% circa di acidi grassi saturi (acidi palmitico, stearico, miristico, etc), un 72% di monoinsaturi (acidi oleico e palmitoleico) mentre il restante 14% è costituito dai polinsaturi (acido linoleico e linolenico) (*Luchetti, 2000*).

La frazione saponificabile favorisce l'assorbimento di vitamine liposolubili, esercita un'azione plastica nella strutturazione delle membrane cellulari, fornisce i precursori necessari alla sintesi delle prostaglandine, termina i radicali liberi ed interviene positivamente nel regolare l'accumulo del colesterolo.

Gli acidi grassi insaturi hanno inoltre un ruolo importantissimo nell'alimentazione, in particolare gli acidi linolenico e linoleico sono *acidi grassi essenziali  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6*, indispensabili per l'accrescimento e la funzionalità dei tessuti dell'uomo, che non è in grado di sintetizzarli e deve quindi assumerli con la dieta.

## 1.5.2 La frazione insaponificabile

Il numero dei costituenti della frazione insaponificabile (0.5 ÷ 2.5%) supera 230, e si diversificano sia per struttura chimica che per caratteristiche nutrizionali e salutistiche. In particolare si possono individuare le seguenti classi di composti:

- IDROCARBURI (50% della frazione insaponificabile) costituiti da un gruppo eterogeneo di composti saturi ed insaturi; tra gli idrocarburi saturi il predominante è il nonacosano, mentre il più importante degli insaturi è lo squalene (300-700 ppm), un terpene con 30 atomi di carbonio e 6 doppi legami, il precursore biosintetico degli steroli.
- TOCOFEROLI presenti in quantità variabili in funzione dei fattori biologici e tecnologici, con una concentrazione media per un olio vergine che si aggira attorno alle 250 ppm.  
Vengono considerati i più importanti agenti antiossidanti naturali delle frazioni lipidiche, poiché prevengono la perossidazione lipidica neutralizzando i radicali liberi ed agiscono preferenzialmente a livello delle membrane cellulari e delle lipoproteine plasmatiche. Nell'olio d'oliva sono presenti le forme  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferolo, con l' $\alpha$ -tocoferolo predominante per cui questo olio appare maggiormente dotato nella forma ( $\alpha$ ) biologicamente più attiva. I tocoferoli costituiscono la vitamina E, nota ovviamente per la sua attività antiossidante al livello delle membrane cellulari e degli organelli, dove questa vitamina viene accumulata. (*Wang and Quinn, 1999*).
- ALCOLI ALIFATICI SUPERIORI, che nell'olio si trovano esterificati con acidi grassi per produrre i componenti cerosi (docosanolo, il tetracosanolo e l'esacosanolo) che ricoprono la superficie del frutto.
- ALCOLI DI- E TRI-TERPENICI, precursori biogenetici degli steroli, sono caratterizzati da strutture complesse, e svolgono un ruolo

biologico fondamentale visto che ostacolano l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale. Tra i di terpenici si possono ricordare il cicloartenolo e il metil-cicloartenolo. Tra i triterpenici, si ritrovano l'uvaolo e l'eritrodiolo, che sono inizialmente presenti nell'epidermide del frutto, per cui il loro successivo tenore nell'olio prodotto dipende dalla metodologia estrattiva adottata. In particolare risulta ricco in questi componenti l'olio di sansa che prevede l'impiego di un solvente organico dove questi composti risultano particolarmente solubili (*Luchetti, 2000*).

- ACIDI TRITERPENICI: gli acidi oleanolico, ursolico e maslinico, presenti sulla buccia della drupa, ne stabilizzano le proprietà fisiche proteggendola dall'attacco di eventuali parassiti.
- STEROLI: compaiono nell'olio d'oliva con una concentrazione variabile tra 0.2÷0.5% (mediamente 1500 ppm) per cui costituiscono la frazione dell'insaponificabile più rappresentativa dopo gli idrocarburi. Sono composti ad alto peso molecolare, con una funzione alcolica la cui sintesi vede come precursore l'acetil-CoA e lo squalene come l'intermedio più rappresentativo. Si ritrovano in parte liberi e in parte esterificati con gli acidi grassi. Lo sterolo più abbondantemente presente nell'olio di oliva (> 90% di questa frazione) è il  $\beta$ -sitosterolo, una percentuale inferiore denuncia l'aggiunta fraudolenta di un altro olio a quello di oliva. Dal punto di vista nutrizionale gli steroli, tra cui spiccano anche il campesterolo, lo stigmasterolo e il  $\Delta$ -5-avenasterolo, promuovono una riduzione nel tenore in lipoproteine a bassa densità (LDL) corresponsabili delle stenosi dei vasi sanguigni e infine delle successive trombosi.
- PIGMENTI: il colore dell'olio vergine di oliva è dovuto alla presenza di particolari pigmenti, quali i carotenoidi e le clorofille. I *carotenoidi*, il cui colore varia tra il giallo e il rosso, sono i precursori della vitamina A (fattori pro-vitaminici). I principali carotenoidi presenti nell'olio di oliva sono l' $\alpha$ -carotene, il  $\beta$ -



carotene, il più rappresentato, e il  $\gamma$ -carotene. Il  $\beta$ -carotene viene trasformato in trans retinolo (vitamina A) nella mucosa intestinale. L'ammontare di carotenoidi presenti in un olio (~100 mg/ 100 g olio) appare inversamente correlato al grado di maturazione raggiunto dalla drupa ed è influenzato da diversi fattori, quali l'ambiente, il sistema di estrazione dell'olio e le modalità adottate durante la sua conservazione.

Il tipico colore verdognolo dell'olio d'oliva è invece dovuto alla presenza di *clorofille*, che si ritrovano associate ai carotenoidi. Nell'olio vergine di oliva sono presenti le clorofille a e b e alcuni prodotti della loro decomposizione come le feofitine. Il tenore di clorofilla presente in un olio viene anch'esso influenzato dal grado di maturazione raggiunto dalla drupa: gli oli ottenuti da olive non ancora invaiate possono contenere fino a 50 mg di clorofilla per kg di olio come evidenziato dal colore verde che tendono ad assumere così da essere denominati verdolini o verdoni. Il tenore normale di clorofilla in oli giovani (1-2 mesi) invece varia 1÷10 mg di clorofilla, mentre negli oli meno giovani (7-8 mesi) può risultare anche del tutto assente.

Mentre i carotenoidi svolgono un'azione antiossidante neutralizzando l'ossigeno singoletto, le clorofille esplicano un'azione pro-ossidante, catalizzandone in presenza di luce la produzione. Risulta quindi essenziale per la stabilità dell'olio raggiungere un giusto rapporto tra pigmenti clorofilliani e carotenoidi. Tutti i pigmenti colorati presenti negli oli di oliva vengono facilmente alterati dalla luce e dal calore, specie se si opera in presenza di metalli, ossigeno e aria.

- VITAMINE: oltre alle vitamine E ed A, nell'olio d'oliva sono presenti anche altre importanti vitamine liposolubili, come la vitamina D ( $D_2$ ) che svolge un ruolo importante nel metabolismo della fissazione del calcio, e la vitamina K, nota per la sua azione antiemorragica, la cui concentrazione aumenta negli oli estratti in presenza delle foglie.

- UBICHINONI: costituiti da un nucleo 2,3-dimetossi-5-metilbenzochinone, con una catena laterale in posizione 6 formata da 6 a 10 unità isopreniche; nell'olio d'oliva si ritrova il coenzima Q10, presente in concentrazioni comprese tra 0÷40 ppm e variabili in funzione dell'epoca di raccolta. Da un punto di vista biochimico, l'ubichinone svolge un ruolo metabolico fondamentale come trasportatore di elettroni.
- SOSTANZE FENOLICHE: A determinare il potere antiossidante di un olio contribuiscono anche le sostanze fenoliche, presenti nell'olio di oliva vergine in quantità estremamente variabili (50-550 ppm) e che si accumulano in fase lipidica nel corso del processo di estrazione meccanica dell'olio a partire dai polifenoli glucosidici presenti nel frutto dell'oliva (*Servili et al., 1999; Montedoro et al; 2001*), con concentrazione variabile tra l'1 e il 3% del peso fresco della polpa (*Garrido et al., 1997*).

Le unità fenoliche, proprio per la loro struttura chimica, non evidenziano un'elevata solubilità nell'olio ma si ritrovano all'interno delle micro-goccioline di acqua disperse in fase lipidica.

Il contenuto in sostanze fenoliche varia in funzione di numerosi fattori come le condizioni climatiche, la cultivar, il grado di maturazione raggiunto dalle drupe, il loro stato fitosanitario, la tecnica di estrazione impiegata, la modalità di conservazione dell'olio adottata.

Le sostanze fenoliche contribuiscono al "bouquet" dell'olio vergine di oliva, visto il loro ruolo come componenti aromatici. Infatti, esse conferiscono all'olio un sapore amaro-piccante facilmente percepibile nei primi mesi di vita di questo prodotto. Con il passare del tempo, questa caratteristica organolettica tende a diminuire con il progredire della separazione dell'acqua disciolta nell'olio.

I composti fenolici presenti nell'olio d'oliva vergine possono essere suddivisi in cinque classi principali:

1. FENILETIL ALCOLI, a struttura semplice quali l'idrossitirosolo (3,4-diidrossifenil etanolo 3,4-DHPEA), noto per la sua spiccata attività antiossidante, e il tirosolo (p-idrossifenil etanolo p-HPEA) (Garrido Fernández Díez e Adamos; 1997; Vasquez Roncero et al.,1974). Le loro concentrazioni sono generalmente limitate nell'olio appena estratto e tendono ad aumentare con il tempo di conservazione (Montedoro et al., 1992), e quindi con il progredire dell'idrolisi dei secoiridoidi quali oleuropeina e ligstroside.

2. ACIDI FENOLICI, derivati dell'acido benzoico, dell'acido cinnamico e dell'acido fenil acetico. A questa classe di composti appartengono l'acido caffeico, vanillico, siringico, *p*-cumarico, *o*-cumarico, protocatechico, sinapico e *p*-idrossibenzoico e sono storicamente i primi composti fenolici ritrovati nell'olio vergine di oliva (Montedoro 1972; Vasquez Roncero., 1978). Tali sostanze legate ad altri composti non fenolici come l'acido elenoico costituiscono i secoiridoidi, strutture complesse presenti nell'oliva, nell'olio vergine e nelle acque di vegetazione.

3. FLAVONOIDI, nell'olio di oliva, si ritrovano alcuni flavonoli, come la luteolina-7-glucoside, la rutina e l'apigenina, e anche degli antociani, come la cianidina e la delphinidina glucoside (Urbani, 2006).

4. SECOIRIDOIDI, che a differenza dei più diffusi fenil-acidi, fenil-alcoli e flavonoidi, risultano presenti esclusivamente nelle piante appartenenti alla famiglia delle oleaceae, e quindi anche nell'*Olea europea*.

I secoiridoidi dell'olio di oliva sono caratterizzati dalla presenza di acido elenico e dei suoi derivati (oleuropeina, ligstroside, dimetiloleuropeina, verbascoside e nüzhenide (Urbani, 2006).

Mentre nella drupa e nelle acque di vegetazione si ritrovano elevate concentrazioni della forma glicosidica di questi componenti, le quantità della sola forma agliconica disciolte nell'olio risultano considerevolmente più limitate. Nell'olio, infatti, si trasferirà sola la frazione che avendo perso per di idrolisi ( $\beta$ -

glucosidasi) l'unità glucidica, risulterà meno polare e quindi più affine all'olio.

5. LIGNANI, come pinoresinolo e 1-acetossipinoresinolo, sostanze fenoliche dotate di un elevato potere antiossidante e quindi ad attività anticarcinogenica.

## **1.6 Le caratteristiche organolettiche dell'olio**

Tutti i composti presenti nell'olio contribuiscono in misura diversa a determinare le sue caratteristiche organolettiche. Queste proprietà vengono valutate anche mediante analisi chimico-fisiche e strumentali, ma soprattutto tramite analisi sensoriale condotta da un panel, costituito da assaggiatori selezionati e adeguatamente addestrati (*Reg. CEE 2568/91 s.m.i.*).

L'aroma degli oli di oliva viene attualmente addebitato a più di 180 specie molecolari; sono composti a basso peso molecolare (<300Da) che sono presenti in fase vapore a T ambiente e una volta raggiunto l'epitelio olfattivo si legano ai recettori per scatenare le sensazioni odorose. Affinché le molecole volatili possano raggiungere i loro recettori devono evidenziare un grado di liposolubilità sufficiente a permetterne l'interazione con le strutture lipoproteiche, devono possedere inoltre anche una parziale idrosolubilità per poter interagire con il vapor d'acqua che le veicola fino alla membrana olfattiva.

La frazione volatile dell'olio vergine di oliva, è costituita per l'80% da aldeidi (trans-2-esenale, cis-3-esenale, esanale), da alcoli a 6 atomi di carbonio (trans-2-esenolo, cis-3-esenolo, esanolo) e dai loro acetilesteri (trans-2-esenilacetato, cis-3-esenilacetato, esilacetato).

Il 70-80% dei composti volatili vengono rilasciati nel corso della frangitura ma la loro produzione continua nel corso della gramolatura (20-30%).

Agli enzimi presenti nel frutto viene addebitata lo sviluppo degli aromi gradevoli mentre l'ossidazione chimica e l'attività enzimatica legata alla

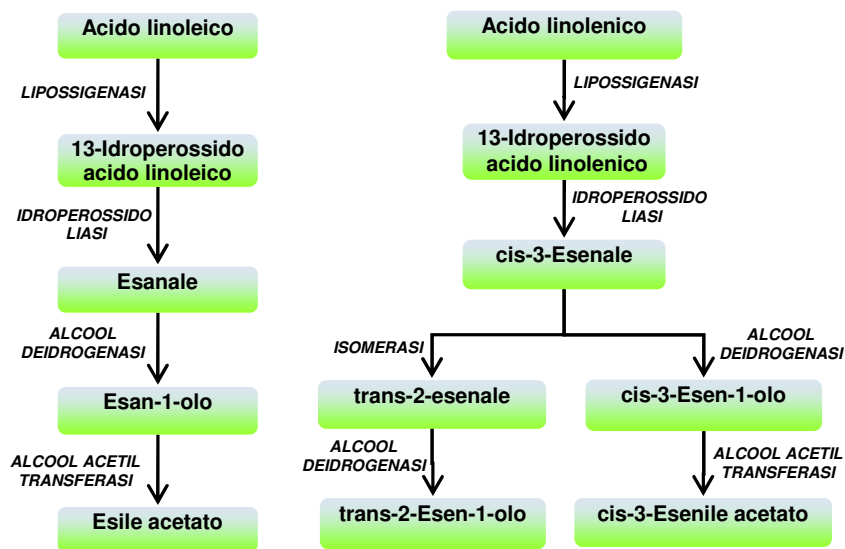
presenza di microrganismi, portano alla formazione di quelli sgradevoli (figura 1.6).



**FIGURA 1.6** - VIE CHIMICHE E BIOCHIMICHE COINVOLTE NELLA FORMAZIONE DEI COMPOSTI VOLATILI DELL'OLIO D'OLIVA; LA DIMENSIONE DELLE FRECCE DÀ UN'IDEA DELL'IMPORTANZA DI OGNI PATHWAY (Angerosa et al., 2004).

Le vie enzimatiche endogene possono coinvolgere substrati diversi, acidi grassi, amminoacidi e zuccheri semplici (mono e disaccaridi).

Nell'olio la via della lipossigenasi che utilizza come substrato gli acidi grassi prodotti dall'idrolisi enzimatica dei trigliceridi (lipasi), rappresenta il principale processo di produzione dei composti aromatici e in particolare di aldeidi ed alcoli a 6 atomi di carbonio derivanti dalla degradazione della degli acidi polinsaturi linolenico e linoleico in ambiente aerobio per azione concertata della lipossigenasi, perossidasi ed alcol deidrogenasi (figura 1.7).



**FIGURA 1.7** - PRODUZIONE DEI COMPOSTI VOLATILI C<sub>6</sub> ATTRAVERSO LA VIA (CASCATA) DELLA LIPOSSIGENASI.

Le lipossigenasi agiscono sugli acidi grassi polinsaturi (acido linoleico e linolenico) e in particolare sulla loro unità 1-cis-4-cis-pentadienica, producendo idroperossidi, che tendono o ad accumularsi all'interno dell'olio o vanno incontro ad un processo di frammentazione promosso dalla idroperossidoliasi che porta alla formazione di aldeidi a 6 atomi di carbonio. L'esanale prodotta a carico dell'acido linoleico, può essere ridotta ad esanolo (alcol deidrogenasi) e quindi convertita in esile acetato dall'alcol acetil transferasi.

L'evoluzione dei 13-idroperossidi dell'acido linolenico si presenta più complessa. La loro frammentazione ad opera delle idroperossido liasi produce cis-3-esenale, che, in parte, è ridotto rapidamente a cis-3-esen-1-olo, per intervento delle alcol deidrogenasi, e successivamente trasformato enzimaticamente nel suo corrispondente estere, e quindi in massima parte isomerizzato al più stabile trans-2-esenale, successivamente ridotto grazie all'attività catalitica delle alcol deidrogenasi all'alcole corrispondente.

I composti aromatici volatili a sei atomi di carbonio sono responsabili delle cosiddette sensazioni "verdi" e cioè del fruttato verde e delle sensazioni

reminescenti la foglia, l'erba tagliata di fresco, frutti ed ortaggi verdi (*Olias et al., 1993*). In particolare, la concentrazione di questi composti, gioca positivamente o negativamente nella produzione delle diverse sensazioni verdi; così, per esempio, l'esanale (che ha un ruolo essenziale nella formazione della maggior parte degli attributi verdi) presenta una correlazione positiva con la sensazione di dolce, e negativa con le sensazioni di erba e foglia, alle quali contribuiscono, rispettivamente e in modo positivo e determinante, il trans-2-esenale e l'1-penten-3-one insieme ai composti fenolici; d'altra parte l'esanale influenza negativamente gli attributi di amaro e di piccante, che sono invece correlati positivamente con il contenuto, oltre che delle sostanze fenoliche, di 1-penten-3-one e di cis-3-esen-1-olo, che sembrano avere quindi un effetto sinergico nella produzione di tali attributi (*Angerosa et al., 2000*).

I trigliceridi sono responsabili delle caratteristiche di "untuosità" e di "scorrevolezza" dell'olio ma risultano del tutto insapori e quindi quasi ininfluenti da un punto di vista organolettico. Sono, infatti, i componenti minori e tra questi i composti fenolici ad assumere un particolare rilievo, in quanto responsabili della sensazione dell'amaro tipica di molti oli di oliva.

L'intensità dell'amaro e del piccante evidenziate da un olio vergine sono state correlate con le concentrazioni assunte dai composti fenolici derivanti dall'idrolisi dell'oleuropeina e del ligstroside (due secoiridoidi), che risultando parzialmente liposolubili, si trasferiscono nell'olio durante il processo di estrazione. Questo trasferimento viene ad essere facilitato dall'azione degli enzimi glicosidasici che favorendo il distacco della frazione lipofila dalla componente zuccherina, ne accentuano l'apolarità.

L'attività delle esterasi invece libera idrossitirosolo dall'oleuropeina e tirosolo dal ligstroside, promuovendo la rottura dei legami esterei che li legava all'acido elenoico.

Sembra che le esterasi catalizzino anche la formazione della deacetossioleuropeina-aglicone e della deacetossiligstroside-aglicone, composti la cui concentrazione unita a quella assunta dall'aglicone dell'oleuropeina, appaiono strettamente correlate con l'intensità di

amaro percepita dai degustatori. L'attributo di piccante sarebbe invece ricollegabile al deacetossiligstroside aglicone (*Gutierrez-Rosales et al., 2003; Andrewes et al., 2003*).

## **1.7 Alterazioni dell'olio di oliva**

I principali processi degradativi a carico della frazione lipidica sono:

- la scissione idrolitica (enzimatica o chimica);
- l'irrancidimento chimico (autossidazione dei lipidi);
- l'irrancidimento chetonico (processo enzimatico).

### **1.7.1 La scissione idrolitica**

Le lipasi sono le principali responsabili della scissione idrolitica dei gliceridi visto che il processo chimico decorrendo con cinetica molto più lenta richiede tempi estremamente lunghi. Questa alterazione rappresenta la prima fase del processo di deterioramento della qualità di un olio. L'enzima, inizialmente compartimento ed isolato all'interno delle cellule integre dell'oliva, tende a mescolarsi con l'olio quando a seguito della frangitura, la compartimentazione cellulare viene meno per cui substrati ed enzimi vengono posti a contatto.

Il distacco degli acidi grassi dal trigliceride promosso dalle lipasi, procede in accordo ad un meccanismo di reazione che prevede l'allontanamento di un solo acido grasso per volta. La concentrazione degli acidi grassi così liberati, costituisce l'acidità libera dell'olio, ovvero il contenuto percentuale di acidi grassi liberi, espressi come acido oleico rispetto alla totalità di olio prodotto..

Nelle olive meccanicamente danneggiate, contraddistinte da elevato grado di maturazione, attaccate dalla mosca dell'olivo o raccolte impiegando tecniche poco rispettose della loro integrità, l'attività della lipasi risulta particolarmente elevata. Anche la tecnologia estrattiva



adottata ne condizionerà l'acidità, infatti questa tenderà a crescere, a parità delle altre variabili di processo, con il tempo di estrazione.

### **1.7.2 Irrancidimento ossidativo**

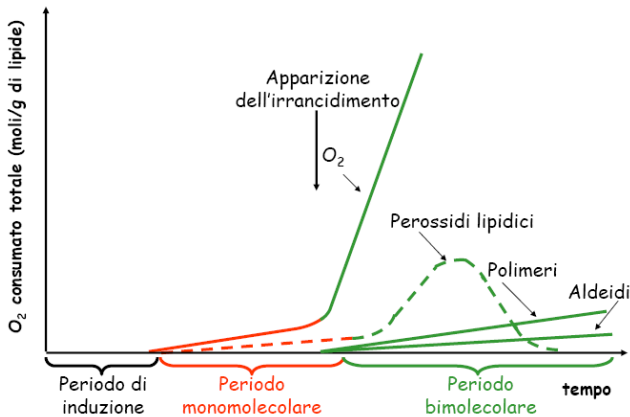
E' un fenomeno molto complesso che vede interagire l'ossigeno atmosferico con gli acidi grassi prodotti dalle lipasi, per dar vita ad un processo auto catalitico: "l'autossidazione dei lipidi".

L'autossidazione di un olio di oliva si può instaurare a partire delle prime fasi connesse alla lavorazione di questi frutti, per decorre prevalentemente nel corso della sua conservazione.

Trattandosi di un processo ossidativo, sarebbe sufficiente operare in assenza di questo gas per impedirne il decorso. Ma sono sufficienti tracce di ossigeno per promuoverne un rapido sviluppo.

Questa alterazione è favorita dal possibile concorso di alcuni fattori ambientali, fra cui l'esposizione alla luce e al calore, la presenza di perossidi, il contatto o la presenza di alcuni metalli (ferro, rame, nichel), la presenza dell'enzima lipossidasi. Un ruolo fondamentale è svolto dalla presenza nell'alimento, di composti che rallentano la fase di iniziazione (antiossidanti, come i tocoferoli) o la favoriscono (pro-ossidanti, come la clorofilla).

Da un punto di vista cinetico il processo si articola in tre fasi (figura 1.8), caratterizzate da una diversa richiesta di ossigeno.



**FIGURA 1.8** - FENOMENO DELL'IRRANCIDIMENTO OSSIDATIVO E RELATIVE FASI DEL PROCESSO.

Nella fase di iniziazione o induzione, connessa allo sviluppo delle prime forme radicaliche, non si ha assorbimento di ossigeno che decorre nella seconda per produrre i perossidi lipidici, e divenire esponenziale quando la decomposizione di queste specie perossidiche porta alla produzione auto catalitica di quantità crescenti di specie radicaliche e quindi di nuovi idroperossidi in una logica di crescita esponenziale non più facilmente controllabile.

### 1.7.3 Irrancidimento chetonico

Si tratta di processo alterativo promosso dai batteri, lieviti e muffe che sono in grado di produrre gli enzimi necessari alla sua realizzazione. Solo nei frutti mal conservati e quindi esposti all'attacco di questi microrganismi si possono accumulare i metaboliti responsabili di questa alterazione degli oli.

## **1.8 Tecnologia estrattiva**

Come da regolamento (*Reg CEE 2568/91 s.m.i.*) la produzione di olio vergine di oliva prevede una “estrazione meccanica a freddo”.

In generale a quella di estrazione si antepongono le operazioni di defogliazione, lavaggio, eventuale denocciolatura, frangitura, gramolazione della pasta.

### **1.8.1 Operazioni preliminari: defogliazione, lavaggio delle olive e loro eventuale denocciolatura**

Queste fasi preliminari sono comuni a tutti gli schemi di lavorazione delle olive. Queste operazioni vengono effettuate da macchine automatiche provviste di un sistema di aspirazione per l'allontanamento delle foglie e di una vasca a circolazione forzata per il lavaggio delle olive. Mentre la rimozione dei corpi estranei eventualmente presenti (terra, residui solidi minerali o vegetali) ha lo scopo di preservare le apparecchiature dotate da strutture mobili (frangitori, decanter e centrifughe), l'allontanamento delle foglie evita che l'olio si arricchisca di sentori di erba appena tagliata e di sapori amari, legati alla presenza di trans-2-esenale (*Di Giovacchino, 2000*).

Tra queste operazioni preliminari rientra anche l'eventuale denocciolatura dei frutti, che prevede l'eliminazione della mandorla, al fine di limitare l'attività delle polifenolossidasi in questa prevalentemente localizzate, che risultano responsabili della degradazione dei fenoli subito dall'olio nel corso della sua estrazione (*Servili et al., 2006*). Tale pratica consente quindi di ottenere oli ad alto tenore in sostanze fenoliche, quindi con un profilo aromatico più complesso, con un maggior valore nutrizionale salutistico e una shelf life più protratta nel tempo (*Ranalli et al., 2009*).

## 1.8.2 Frangitura o molitura delle olive

Le goccioline di olio, della grandezza di pochi micron di diametro, sono localizzate nelle cellule della polpa del frutto integro e più in particolare all'interno del vacuolo. La frantumazione dei frutti rappresenta quindi un passaggio obbligatorio per dilacerare le cellule oleifere permettendo la fuoriuscita dell'olio e quindi la formazione di una fase oleosa più coesa facilmente separabile dall'acqua presente nei frutti.

Nel corso della frangitura con la rottura delle cellule oleifere e della membrana lipoproteica che lo riveste, l'olio fuoriesce dal vacuolo e si disperde nel succo cellulare sotto forma di goccioline di piccolo diametro che, essendo in parte legate alla struttura colloidale del citoplasma, vengono trattenute nella parte solida dell'impasto all'interno di canalicoli e sacche. Le interazioni tra l'acqua di vegetazione e l'olio (sia quello originariamente disperso nel citoplasma che in parte anche quello proveniente dai vacuoli) portano alla formazione di emulsioni.

Le dimensioni raggiunte dai frammenti di polpa e nocciolo, a seguito della frangitura, condizionano non solo il rendimento dell'estrazione ma anche le caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche dell'olio prodotto. Una pasta costituita da particelle di grandi dimensioni determina una minor resa ed una più bassa estrazione delle componenti fenoliche e dei pigmenti clorofilliani, viceversa una pasta formata da particelle troppo piccole interferisce negativamente sulla resa per effetto dei fenomeni di colloidismo, che determinano la formazione di emulsioni e rendono più difficoltose le successive fasi estrattive. In generale si considera ottimale una frangitura che porti alla liberazione di frammenti solidi (nocciolo) pari a 2÷3 mm.

La frangitura promuove anche lo scambio di componenti minori e l'attivazione di processi enzimatici con la possibile conseguente neoformazione di alcuni composti caratteristici dell'olio di oliva (acidi grassi liberi, perossidi, composti volatili, agliconi dei glucosidi, etc).

La distribuzione dei componenti minori decorre in base alla loro diversa affinità per le fasi coinvolte, per cui con il procedere del tempo il rapporto

delle concentrazioni assunte da ogni componente nelle fasi tende ad un valore costante. Questa costante prende il nome di coefficiente di ripartizione e dipende solo dalla temperatura, mentre i valori delle singole concentrazioni possono variare anche sostanzialmente in funzione delle condizioni operative adottate (addizione di acqua nella fase di separazione del mosto oleoso).

Nell'olio di oliva immagazzinato nel vacuolo delle cellule oleifere, sono presenti modesti quantitativi di composti volatili (derivanti dal metabolismo degli acidi grassi o dalla conversione di alcuni aminoacidi), la cui produzione diviene significativa in seguito all'attivazione di una serie di reazioni enzimatiche che si instaura quando la perdita della compartimentazione cellulare, promuove il contatto tra enzimi e substrati. La sintesi di questi componenti pregiati è strettamente dipendente dalla distruzione cellulare della drupa e si instaura, quindi, durante la fase di frangitura per proseguire nel corso della gramolatura, ma decorre comunque come conseguenza di qualsiasi altro evento meccanico traumatico (ferite, ammaccature, riscaldamento, raggrinzimento, sovraturazione, etc).

Normalmente i sistemi di frangitura vengono distinti in funzione della forza applicata e del suo conseguente effetto. La violenza dell'apparato utilizzato nella frangitura induce una produzione più o meno spinta di micro-goccioline che, assumendo valori sempre più ridotti richiederanno tempi di gramolazione sempre più prolungati per unirsi fra di loro fino a raggiungere dimensioni tali da essere estratte dalla pasta (>0.03 mm) (Martinez Moreno et al., 1957).

La rottura più o meno decisa della mandorla, con la conseguente liberazione nell'impasto del patrimonio enzimatico in questa racchiuso, risulta essere direttamente proporzionale alla forza dirompente applicata durante la frangitura.

La violenza del sistema di frangitura adottato, e quindi il risultante effetto di emulsione, tendono ad aumentare al diminuire dei tempi di attuazione: *molino a molazze < frangitore a rulli < frangitore a dischi < frangitore a coltelli < frangitore a martelli mobili < frangitore a martelli fissi.*

Tra i sistemi di frangitura, i più diffusi sono

- SISTEMA TRADIZIONALE A MOLAZZE, costituito da una vasca con basamento in granito, provvista di un'apertura per lo scarico della pasta di olive e al cui interno si muovono in senso rotatorio delle ruote in pietra (le molazze appunto), variabili sia nel peso (2÷4 t) che nel numero (2÷4). Si tratta di un sistema sicuramente poco violento, generalmente abbinato al sistema di estrazione tradizionale a presse, ma utilizzato anche nei processi estrattivi continui, per ottenere oli con caratteristiche organolettiche armoniche ed equilibrate. Tuttavia il costo elevato, l'ampio spazio occupato e la discontinuità arrecata all'intero processo rappresentano dei grossi limiti di questa modalità estrattiva.
- MOLITORE CONTINUO A RULLI, costituito da una coppia di rulli in pietra controrotanti, a cui può far seguito un finitore a dischi. Produce oli armonici, per via di una minore estrazione di sostanze amare rispetto al frangitore a martelli; presenta un'elevata capacità lavorativa unita ad una riduzione delle emulsioni; l'ingombro è limitato, come anche i costi, tuttavia un grosso limite è costituito dalla forte usura e dalle frequenti rotture dovute alla presenza di corpi estranei.
- MULINO A MARTELLI, fissi o snodati, di solito è presente negli impianti continui di lavorazione delle olive e prevede che le olive vengano schiacciate contro una griglia forata fissa o rotante. Questo sistema produce una violenta frangitura, che comporta, soprattutto nei modelli più vecchi, lo sminuzzamento delle goccioline di olio e la formazione di emulsioni, richiedendo tempi lunghi di gramolatura per far coalescere le gocce d'olio fino a superare il valore minimo della misura di soglia per poter defluire dalla pasta nel separatore. A fronte di una maggiore estrazione di fenoli e pigmenti clorofilliani, legata alla violenta molitura, si rilevano nell'olio caratteri organolettici marcati con sentori più elevati di amaro. Inoltre, lo sminuzzamento e il forte calore prodotto dal mulino (12-15°C in più rispetto alla T ambiente) provocano un incremento delle velocità delle reazioni enzimatiche, tra l'altro attive per tempi più lunghi.
- FRANGITORI A DISCHI DENTATI, fragili in presenza di corpi estranei, operano una frangitura ottimale, grazie all'assenza di emulsioni, garantita

da velocità di rotazione entro i 1400 rpm, e alla buona estrazione di fenoli e clorofille.

- FRANGITORE A COLTELLI, di recente introduzione sul mercato delle macchine olearie, riesce a frangere selettivamente le parti costitutive della drupa, operando un'efficiente degradazione della polpa ed una ridotta azione frangente sia sulla buccia che sulla mandorla.

Prove di confronto tra frangitori a martelli, coltelli e frangitori a basso numero di giri hanno evidenziato un effetto interessante sia nella riduzione delle note di amaro che nella esaltazione delle caratteristiche aromatiche degli oli vergini di oliva. Per contro, i frangitori a basso numero di giri così come i frangitori a coltelli riducono l'estrazione delle clorofille dalla buccia ed il conseguente rilascio del colore verde nell'olio, si ottengono quindi oli da un lato più armonici a livello sensoriale e meno amari, ma più poveri di colore rispetto a quelli ottenibili con un frangitore a martelli.

Concludendo i vantaggi dei frangitori più moderni rispetto ai tradizionali mulini a molazze risiedono in un modesto ingombro, un ridotto capitale da investire, un'alta capacità lavorativa conseguente all'operazione in continuo, nella rottura di un elevato numero di cellule oleifere, in un'elevata concentrazione di clorofilla e di fenoli, che conferiscono una maggiore stabilità ossidativa.

Per contro i frangitori in pietra presentano i vantaggi di una frantumazione dei frutti a bassa temperatura, un tempo quasi nullo di gramolatura per una ridotta formazione di emulsioni, l'assenza di costi per usura delle parti rotanti ad alta velocità, l'assenza di cessioni di metalli pro-ossidanti e la formazione di un flavour più equilibrato caratterizzato da più intense note olfattive e da più attenuate sensazioni di amaro e piccante (*Angerosa, 2005*).

### **1.8.3 Gramolatura della pasta**

La fase di gramolatura favorisce l'estrazione dell'olio, inducendo la coalescenza delle gocce di olio prodotte dalla frangitura, attraverso un

lento e continuo rimescolamento delle paste provenienti dalla frangitura delle olive, avente lo scopo di rompere l'emulsione olio-acqua prodottasi durante la frantumazione dei frutti e favorire la riunione delle goccioline d'olio in gocce di diametro maggiore.

I gramolatori sono generalmente costituiti da vasche rivestite di acciaio inox, dotate di camicia riscaldante e agitatore metallico longitudinale o verticale, munito di palette inclinate, che consente il lento rimescolamento della pasta e l'avanzamento della stessa.

La gramolatura è inoltre indispensabile per la genesi degli aromi caratteristici degli oli di oliva, che in condizioni ottimali saranno in grado di condizionarne la valutazione organolettica (*Angerosa et al., 2001; Angerosa, 2002*). Infatti, il ciclo della lipossigenasi porta ad un incremento della formazione di diversi componenti volatili, in proporzioni quantitative particolari (*Olias et al., 1993; Lercker et al., 1999; Servili e Montedoro, 2002; Servili et al., 2003*). Tuttavia, i meccanismi perossidativi iniziali sono in grado di promuovere una serie di trasformazioni chimiche di tipo ossidativo collaterale, tra cui la distruzione dei composti fenolici più labili (*Servili et al., 1994; 1999; 2003*).

È dunque nel corso della gramolatura che, in virtù delle attività enzimatiche e dei fenomeni di ripartizione, il flavour dell'olio prende il suo assetto definitivo.

Da una parte si ottiene un "affinamento" delle caratteristiche organolettiche, con diminuzione del gusto amaro, piccante ed astringente, dall'altra si riduce il patrimonio degli antiossidanti contenuti nell'olio.

Olive ricche in composti fenolici possono subire una gramolazione più prolungata, in quanto residuerà una carica fenolica sufficiente ad assicurare una valida conservazione dell'olio, mentre olive povere in composti fenolici antiossidanti sono destinate alla produzione di oli più instabili nel tempo.

In altre parole, esisterà un tempo ottimale di gramolazione della pasta la cui entità varierà anche in funzione del tipo di frangitura adottata, così da produrre con elevate rese oli più stabili e quindi più facilmente conservabili.



È stato osservato come, aumentando il tempo di gramolatura, la resa in olio (percentuale di olio estratto rispetto alla quantità inizialmente presente nel frutto) tenda ad aumentare fino al raggiungimento di un valore limite che risulta inferiore alla totalità dell'olio potenzialmente estraibile, ma determinato dal sistema di estrazione adottato. Il prolungamento del tempo di gramolazione induce di contro una diminuzione nel contenuto di antiossidanti, che si traduce in una riduzione della stabilità ossidativa dell'olio estratto (*Di Giovacchino et al., 2002*).

Un altro parametro che gioca un ruolo determinante della fase di gramolatura è la temperatura, infatti utilizzando valori più contenuti (18-20°C) si conseguono rese di estrazione poco soddisfacenti, e gli oli estratti risultano poveri in componenti fenolici. Con il crescere della temperatura (22-28°) si incrementa sia la resa di estrazione che l'attività degli enzimi responsabili dello sviluppo del flavour. Superando queste temperature ottimali (massimo 35°C) diventano significativi i processi ossidativi e quindi l'accumulo dei composti da questi prodotti nell'olio estratto mentre diminuisce il tenore in componenti fenolici (*Gallina Toschi et al., 2004*).

#### **1.8.4 Separazione dell'olio**

Nel corso di questa fase si induce la separazione della frazione oleosa dalle acque di vegetazione e dalla sansa (frazione solida).

L'efficienza di questo processo viene condizionata principalmente dalla quantità d'acqua non costitutiva presente nel frutto, dalla durata del processo e dalla temperatura operativa adottata (*Di Giovacchino et al., 1994; 2002*). La scelta dell'apparecchiatura più idonea risulta fortemente condizionata dalla necessità di ridurre i tempi di contatto olio-acqua e quindi gli effetti indotti dalle reazioni enzimatiche.

Le diverse tecnologie estrattive adottabili possono essere identificate in funzione del principio fisico impiegato per promuovere questa separazione: impiego della pressione, l'utilizzo delle diverse velocità di percolamento e la separazione per centrifugazione.

Il SISTEMA A PRESSIONE: la pasta di olive pressata, tende a ridurre il proprio volume espellendo la sua fase liquida, il mosto oleoso (un liquido disomogeneo costituito da olio e acqua di vegetazione).

Una pressa, generalmente idraulica, esercita la pressione necessaria (fino a 400 atm) perché la pasta di olive, precedentemente posta su superfici drenanti (fiscoli) inframmezzate da dischi metallici, venga separata dal mosto oleoso. Si ha quindi la ritenzione della fase solida (sansa) e il drenaggio della fase liquida (mosto oleoso), operazione dove l'azione drenante del nocciolino presente nella pasta può giocare un ruolo rilevante.

Il mosto oleoso viene quindi convogliato ad un separatore centrifugo verticale che divide l'olio dall'acqua, e dalle impurezze e mucillagini in questa disciolte.

I limiti di questa tecnologia sono essenzialmente legati alla discontinuità del sistema e all'impossibilità di realizzare una completa pulizia delle superfici drenanti (fiscoli), con le possibili conseguenze che ciò può indurre sulla qualità sensoriale del prodotto finito.

IL PERCOLAMENTO (SISTEMA SINOLEA). Poiché la tensione interfacciale tra l'olio ed una lamina di acciaio è inferiore rispetto a quella che si instaura tra la stessa lamina e l'acqua, la superficie metallica immersa nella pasta tenderà a ricoprirsi di uno strato oleoso che può essere così separato dalle acque di vegetazione.

Questo sistema consente di recuperare fino al 60-70% dell'olio potenzialmente estraibile, pertanto viene di norma accoppiato ad un processo estrattivo per pressione o alla centrifugazione così da recuperare la cospicua quantità di olio residuo (30-40%).

Questo sistema richiede tempi di granulazione molto lunghi e talvolta temperature elevate, in quanto la tensione interfacciale dipende sia dalla temperatura che dalla dimensione delle goccioline di olio nella pasta.

L'elevata superficie di contatto olio-lamine promuove l'evaporazione dei componenti volatili responsabili del flavour degli oli riducendone l'intensità.

LA CENTRIFUGAZIONE sfrutta la diversa forza di gravità che si esercita su liquidi immiscibili e contraddistinti da differenti valori di densità. La pasta e quindi i suoi tre macrocomponenti quando vengono sottoposti ad una accelerazione centrifuga maggiore di 3000-3500 volte quella di gravità, tendono a separarsi rapidamente: i solidi si stratificheranno sulle pareti del separatore centrifugo seguiti dalle acque di vegetazione mentre l'olio, la fase contraddistinta dal minore densità, occuperà lo strato più interno.

L'estrattore (decanter) è costituito da un tamburo conico ad asse orizzontale all'interno del quale si trova un cilindro provvisto di lamine elicoidali, che ruota ad una velocità leggermente inferiore a quella del tamburo.

La leggera differenza tra le velocità del tamburo e del cilindro spinge la sansa da una parte della centrifuga, mentre l'olio e l'acqua si dirigeranno nel verso opposto.

Alcune "vie d'uscita", dette sfioratori o ugelli, opportunamente posizionate permetteranno il recupero dell'olio separato dall'acqua di vegetazione. Usualmente la separazione tra le due fasi liquide viene affinata e completata all'interno di centrifughe verticali a scarico automatico.

Mentre i primi decanter immessi in commercio erano TRIFASICI e portavano alla separazione/produzione di: olio, acque di vegetazione e fase solida (sansa). Una tecnologia che oltre a richiedere tempi elevati di gramolatura necessita dell'aggiunta di notevoli quantitativi (peso acqua aggiunta pari a circa a quello delle olive lavorate) di acqua per la fluidificazione delle paste di oliva. Un'aggiunta che dilava la componente fenolica impoverendone l'olio, un effetto particolarmente grave in prodotti poco dotati di componenti antiossidanti.

Si è quindi pensato di aggiungere le acque di vegetazione derivanti da precedenti estrazioni. Ma queste oltre che di elevati quantitativi di fenoli residui risultavano ricche nei prodotti della loro ossidazione particolarmente disponibili a trasferirsi in fase oleosa. L'aumento di tali componenti nell'olio diminuisce la stabilità futura dell'olio stesso ed è responsabile di possibili alterazioni organolettiche poco apprezzate dal consumatore.

Successivamente sono stati introdotti i decanter BIFASICI, che separano l'olio dall'acqua di vegetazione e dalla sansa, che vengono scaricate insieme.

Impiegando i decanter bifasici non è necessario diluire con acqua la pasta in uscita dalla gramola e questo riduce il volume dei sottoprodotti di lavorazione. Inoltre le sansa umide vengono inviate direttamente al sansificio unitamente alle acque di vegetazione che non rappresentano più un refluo dal problematico smaltimento. L'olio in uscita dal decanter bifasico risulta più ricco in sostanze fenoliche e quindi dotato di un maggior potere antiossidante.

Sistemi più moderni, detti "A DUE FASI E MEZZO", portano alla separazione delle tre frazioni e richiedono l'addizione di quantità ridotte di acqua variabili in funzione delle caratteristiche esibite dalla pasta di olive lavorata.

La fase di separazione vera e propria incide quindi relativamente sulla composizione del flavour degli oli, fatta eccezione per quelli prodotti utilizzando il decanter a tre fasi.

Nell'olio separato dalle acque di vegetazione vengono inattivate le trasformazioni enzimatiche e i processi diffusionali che regolano la ripartizione dei diversi costituenti tra le fasi coinvolte.

### **1.8.5 Conservazione dell'olio di oliva**

Al fine di preservarne le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche, l'olio ottenuto deve essere adeguatamente conservato, evitando che possa assumere odori sgradevoli o che vada incontro a processi degradativi (irrancidimento).

Il deterioramento di questo prodotto può essere indotto dalle seguenti tre cause principali:

1. *contatto con materiali inadeguati*, contenitori metallici o materiali deteriorabili per cui viene conservato in vetro o in acciaio inossidabile;

2. *contatto prolungato con impurità acquose*, che tendono a separarsi dalla fase lipidica per depositarsi sul fondo dei contenitori impiegati nella conservazione di un olio. Questi sedimenti sono costituiti essenzialmente dalle acque di vegetazione residue e contengono zuccheri, enzimi e sostanze proteiche. Nella fase acquosa così formatasi possono instaurarsi delle fermentazioni che portano alla formazione di componenti responsabili di particolari difetti olfattivi, con sentori di fango e putrido. Per evitare questo tipo di problematica si rende necessario travasare o filtrare l'olio per separarlo rapidamente da tale sedimento.
3. *ossidazione*, che non può essere completamente evitata, ma è possibile ritardarla adottando alcune particolari precauzioni: ridurre al minimo il volume di serbatoio occupato dall'aria, l'utilizzo di chiusure che assicurino elevato grado di ermeticità, evitare l'esposizione alla luce del prodotto finito.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è l'individuazione di un sistema estrattivo innovativo in grado di valorizzare le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche dell'olio vergine di oliva.

L'addizione diretta dell'anidride carbonica allo stato solido alle olive prima della frangitura al fine di promuoverne la criomacerazione, costituisce l'operazione fondamentale che caratterizza questo nuovo sistema di estrazione.

L'impiego dei criogeni in generale e della neve carbonica più in particolare, ha già trovato interessanti applicazioni in campo alimentare. In cantina l'anidride carbonica solida ( $\text{CO}_{2,s}$ ) viene addizionata all'uva per promuoverne la macerazione pre-fermentativa a freddo (criomacerazione), allo scopo di ottenere vini più strutturati, colorati e ricchi in componenti aromatici (*Zinnai et al., 2007*).

Nell'ambito delle diverse matrici lipidiche potenzialmente impiegabili per la produzione di oli alimentari, l'oliva, essendo un frutto, risulta particolarmente ricco in acqua e quindi potenzialmente sensibile alla criomacerazione.

Infatti, la  $\text{CO}_{2,s}$ , che a pressione atmosferica tende a sublimare per portarsi in fase aeriforme alla temperatura a  $-78^\circ\text{C}$ , induce il passaggio dallo stato liquido a quello solido dell'acqua presente all'interno delle cellule delle olive poste direttamente a contatto con questo criogeno.

Poiché il volume occupato dalla stessa quantità di acqua allo stato solido risulta superiore a quello inizialmente occupato allo stato liquido, si assisterà ad una perdita della struttura compartimentale cellulare dovuta al così detto crash cellulare, e alla conseguente fuoriuscita dei prodotti in queste contenute facilitandone così la diffusione in fase liquida che si arricchirà in metaboliti cellulari in genere e in olio di estrazione in particolare.

Tra tutti i possibili criogeni impiegabili ( $\text{N}_{2,l}$ ,  $\text{He}_l$ ,  $\text{Ar}_{l}$ , ecc.) la  $\text{CO}_{2,s}$ , grazie ai valori assunti dai suoi parametri chimico-fisici, offre notevoli

vantaggi operativi. Inoltre è atossica, non infiammabile, facilmente disponibile ad un costo relativamente contenuto (circa 1 €/kg).

La CO<sub>2</sub> gassosa, che esibisce un valore di densità superiore a quella dell'aria ( $\delta_{CO_2,g} / \delta_{aria} = 1.5$ ), tende a permanere al di sopra della pasta di olive in lavorazione, creando così uno strato gassoso inerte in grado di proteggerla dall'ossigeno dell'atmosfera circostante. Appare così possibile pensare di poter opportunamente modulare non solo i tempi di gramolatura ma anche quelli della sua eventuale esposizione ad una ossigenazione controllata che permettano di accumulare all'interno dell'olio estratto i desiderati quantitativi in prodotti ossigenati a valenza aromatica.

Il prodotto finito si dovrebbe così arricchire di quei componenti aromatici tipici della materia prima utilizzata e quindi propri della cultivar di oliva lavorata ma variabili in funzione della zona di produzione e più in particolare delle condizioni pedo-climatiche che hanno contraddistinto l'andamento della maturazione nell'annata esaminata. L'olio estratto operando in presenza di questo criogeno verrebbe ad essere più strettamente legato alla materia prima utilizzata, alla tipologia di olive lavorate e alla zona della loro produzione, si otterrebbe così un prodotto tipico contraddistinto da chiare ed inconfondibili caratteristiche organolettiche facilmente riconoscibile e identificabile dal consumatore che potrebbe divenire così disponibile a sostenere un prezzo superiore pur di assicurarsi un prodotto qualitativamente valido.

Nel corso dell'attività sperimentale è stato valutato l'effetto indotto dall'addizione di anidride carbonica solida alle olive da inviare alla frangitura, per determinare sia la resa estrattiva (quantità di olio prodotto rispetto al peso delle olive lavorate) che la qualità del prodotto finito.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Le prove di frangitura delle olive

Le prove di frangitura delle olive, connesse al presente lavoro di ricerca, sono state condotte presso la cantina sperimentale sita in via Vecchia di Marina 3 – San Piero a Grado (PI).

##### 3.1.1. Il frantoio impiegato

La ricerca è stata condotta utilizzando un microfrantoio commerciale (Oliomio Baby® -Toscana Enologica Mori), opportunamente modificato per consentire l'aggiunta della  $CO_{2(s)}$  nel corso della lavorazione delle olive (Figura 3.1).

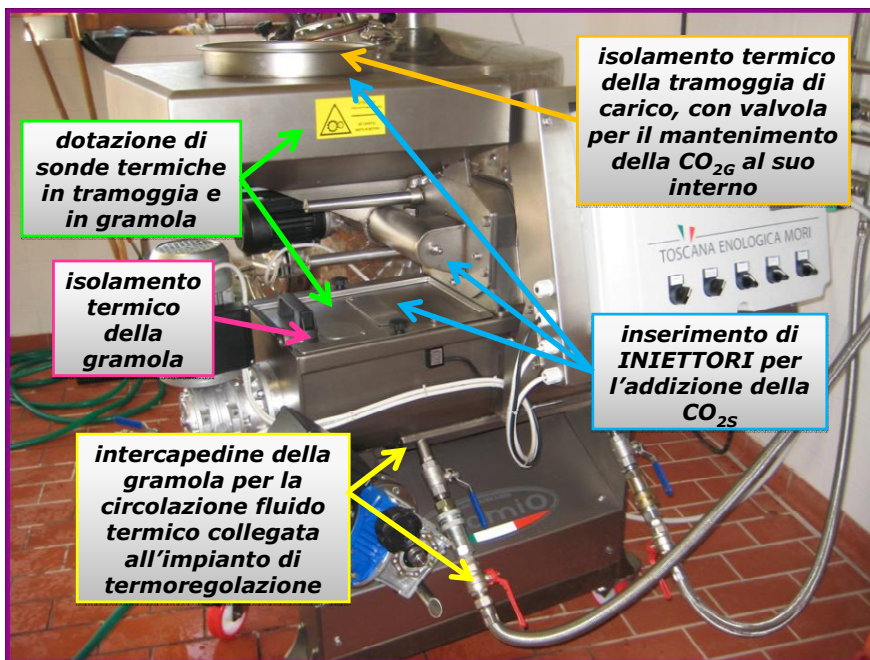


FIGURA 3.1- MICROFRANTOIO OLIO MIO BABY® (TOSCANA ENOLOGICA MORI) UTILIZZATO



*PER LA SPERIMENTAZIONE OPPORTUNAMENTE MODIFICATO SULLE BASE DELLE INDICAZIONI EMERSE DURANTE LE PROVE PRELIMINARI RESESI NECESSARIE PER LA MESSA A PUNTO DELL'IMPIANTO DI ESTRAZIONE CONGIUNTAMENTE CON IL RESPONSABILE TECNICO DELLA DITTA PRODUTTRICE*

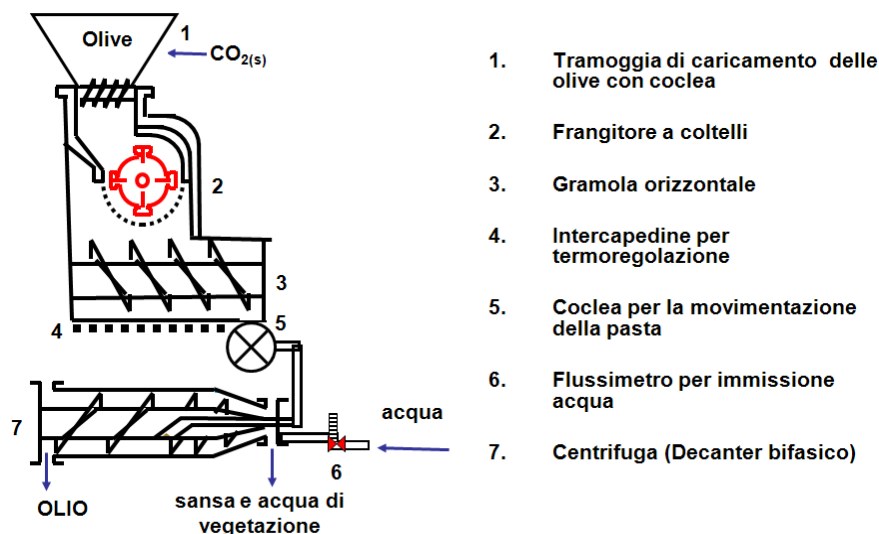
Il funzionamento del microfrantoio può essere così schematizzato: le olive, opportunamente defogliate e lavate, vengono versate nella tramoggia di ricevimento, dove una coclea alimenta il frangitore, che è dotato di griglia fissa e girante a coltelli incavi. La pasta prodotta cade nella gramola sottostante, dove un apposito agitatore a forma elicoidale provvede alla sua miscelazione.

La temperatura raggiunta dalla pasta viene mantenuta nel range desiderato attraverso un sistema termoregolante, costituito da un sensore termico posto all'interno della pasta e connesso con uno scambiatore di calore.

La pasta viene quindi inviata al decanter bifasico mediante una pompa munita di motovariatore, che ne determina la velocità di flusso.

Il decanter bifasico (4200 rpm) promuove la separazione dell'olio dalle sanse umide.

Per favorire la separazione delle due fasi può essere utile aggiungere all'interno del decanter una certa quantità d'acqua, il cui flusso può essere opportunamente regolato mediante l'utilizzo di un flussimetro.



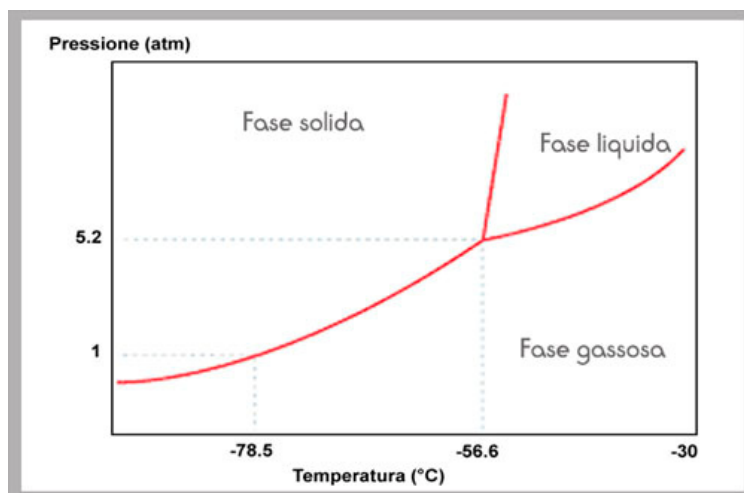
**FIGURA 3.2 - SCHEMA DEL FRANTOIO UTILIZZATO.**

### 3.1.2. Il criogeno impiegato: l'anidride carbonica solida.

In virtù delle caratteristiche che la contraddistinguono e, in particolare, di atossicità, ridotta reattività, costo contenuto e facilità di reperimento, l'anidride carbonica allo stato solido o liquido, rappresenta uno dei criogeni più frequentemente impiegati in campo alimentare.

L'anidride carbonica solida  $CO_{2,s}$ , comunemente denominata ghiaccio secco, ha un elevato potere refrigerante, pari a 150 kcal/kg (quasi il doppio rispetto a quello del ghiaccio di acqua) e per questo ha la capacità di mantenere basse temperature, assorbendo il calore dall'ambiente esterno. Inoltre a pressione atmosferica, passa direttamente allo stato aeriforme senza passare attraverso la fase liquida (ecco perché si parla di *ghiaccio secco*) pertanto non rilascia residui di umidità sui prodotti con cui è stata a contatto.

Come evidenziato dal diagramma di stato (figura 3.3.), l'anidride carbonica può esistere, a pressione ambiente allo stato solido ( $\text{CO}_{2,s}$  = neve carbonica) alla temperatura di  $-78.5^\circ\text{C}$ .



**FIGURA 3.3.:** DIAGRAMMA DI STATO DELLA  $\text{CO}_2$

Le forme più comuni con cui si presenta il ghiaccio secco sono: mattonelle, tavolette, pastiglie, pellets.

Nel corso della sperimentazione è stata usata anidride carbonica solida in pellet, con diametro di 10 mm, acquistata presso la Sol S.p.a., Via di Nugolaio, Pisa.

Il criogeno veniva disposto a strati tra le olive, direttamente nella tramoggia di caricamento, dove, dopo un accurato rimescolamento, veniva lasciata agire per 10-15 minuti, al fine di raffreddare i frutti e determinare il crash cellulare. Una volta raggiunto il grado di raffreddamento desiderato, si procedeva con le fasi di frangitura, gramolatura e separazione delle fasi.

### **3.1.3. Messa a punto impianto e scelta variabili di processo.**

L'attività preliminare connessa con l'adozione dei cambiamenti necessari a rendere l'apparato sperimentale utilizzato idoneo all'utilizzo della neve carbonica durante l'estrazione ha richiesto un tempo considerevole.

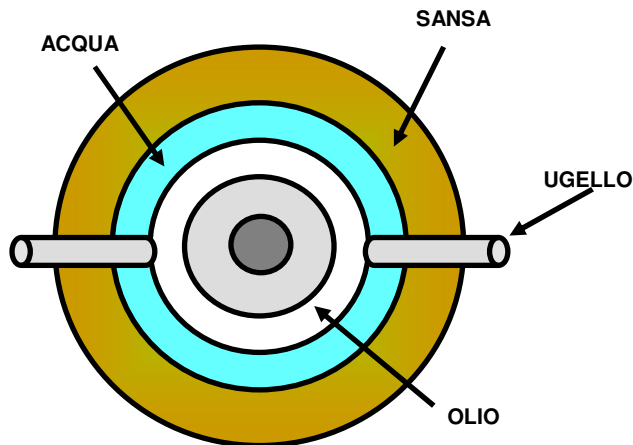
La gestione e l'uso del criogeno, il sistema di termoregolazione delle varie fasi di processo, l'individuazione di un efficiente sistema di monitoraggio delle principali variabili operative sono state accuratamente esaminate per ottenere un efficiente impianto di estrazione.

La qualità dell'olio ottenuto infatti viene ad essere determinata dai valori assunti da alcuni parametri di processo che devono essere quindi opportunamente regolati per incrementarla, come:

- la quantità di criogeno eventualmente aggiunta alle olive lavorate;
- la fase di lavorazione in cui viene eventualmente effettuata l'aggiunta del criogeno (pre frangitura e/o gramolatura);
- i tempi e le temperature di gramolazione;
- il flusso di alimentazione del gramolato al decanter;
- la quantità di acqua eventualmente addizionata tramite il flussimetro all'interno del decanter per permettere una migliore separazione dell'olio dalle sanse umide.
- il posizionamento degli ugelli di prelievo dell'olio all'interno del decanter e quindi il suo grado di separazione dalle altre fasi coinvolte.

Il decanter si basa sul principio della forza centrifuga: la pasta immessa all'interno del decanter, che ruota a una velocità di circa 4200 giri/min, si separa nelle singole fasi (sansa, acqua e olio) sulla base della loro densità.

La fuoriuscita dell'olio avviene previa regolazione degli ugelli, situati sul tamburo esterno, il cui scopo è quello di effettuare il pescaggio dell'olio al giusto livello. Un'adeguata regolazione degli ugelli, permette di raccogliere l'olio separato dalle altre componenti determinandone il grado di purezza (Fig.3.4).



**FIGURA 3.4** - SEZIONE DEL DECANTER CENTRIFUGO, CHE MOSTRA COME DURANTE L'ESTRAZIONE SI DIFFERENZIANO TRE FASI SULLA BASE DELLA LORO DENSITÀ. PER QUESTO MOTIVO IL POSIZIONAMENTO DEGLI UGELLI ALL'INTERNO DEL TAMBURINO DIVENTA FONDAMENTALE NEL DETERMINARE IL GRADO DI PUREZZA DI UN OLIO

Per poter valutare il reale effetto legato unicamente all'aggiunta del criogeno, sono stati valutati i numerosi fattori che concorrono a caratterizzare un processo estrattivo:

- L'elevato numero di variabili coinvolte nelle diverse fasi operative (temperatura, tempi, quantità di acqua, etc.)
- La disomogeneità della materia prima, legata a fattori genetici, agronomici, ambientali e tecnologici
- Il limitato periodo di disponibilità delle olive fresche, un prodotto caratterizzato da una notevole deperibilità

Tenendo conto delle problematiche poste dalla sperimentazione, allo scopo di rendere confrontabili i risultati ottenuti operando in presenza o in assenza del criogeno per ogni ciclo di estrazione, sono stati resi omogenei i lotti di olive destinati alla trasformazione.

Le olive utilizzate nel corso dell'attività sperimentale appartenevano a differenti cultivars (Coratina, Correggiolo, Frantoio, Itrana, Leccino) in blend o no, provenivano da differenti oliveti e venivano raccolte a diversi gradi di maturazione.

### 3.1.4. Variabili operative adottate nella conduzione di una generica prova

In tabella sono riportate le principali variabili operative adottate per la conduzione di una generica prova sperimentale, condotta utilizzando o meno il criogeno durante la frangitura.

**TABELLA 3.2.** PARAMETRI OPERATIVI ADOTTATI PER PORTARE AVANTI UNA GENERICA PROVA ESTRATTIVA AGGIUNGENDO O MENO LA CO<sub>2,s</sub>.

		CC	SC
CO <sub>2,s</sub> /olive	(w/w)	0.1÷0.2	0
Temperatura olive	(°C)	~ -2	11.5
Temperatura pasta	(°C)	~24	~24
Tempo gramolatura	(s)	2400	2400
Tempo estrazione	(s)	4900	4300
Acqua aggiunta/olive lavorate	%	8.5	9.3

### 3.1.5. Prelievo e stoccaggio dei campioni

Per ogni prova di estrazione sono stati prelevati i seguenti campioni:

- olive
- pasta
- sansa
- olio.

Il campionamento delle olive veniva effettuato dopo aver omogeneizzato i frutti, per poi effettuare la caratterizzazione.

I prelievi della pasta e della sansa sono stati effettuati in doppio, dopo accurata miscelazione della massa, in modo da avere un campione il più possibile rappresentativo.

I campioni sono stati quindi conservati in contenitori ermetici e alla temperatura di -20°C fino al momento della caratterizzazione chimica.

Un'aliquota di olio, destinata alle determinazioni chimiche, veniva conservata in provettini codati di vetro, al riparo dalla luce e in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) alla temperatura di -20 °C

La restante parte dell'olio estratto veniva invece conservata al buio, in bottiglie di vetro scuro, riempite fino all'orlo per ridurre al minimo lo spazio di testa e quindi il contatto con l'ossigeno.

## **3.2. Valutazione dell'efficacia della tecnologia proposta**

La resa di processo e la qualità dell'olio estratto sono gli indici che meglio caratterizzano e qualificano una tecnologia estrattiva, tali parametri sono strettamente connessi e dipendono l'uno dall'altro.

### **3.2.1. Determinazione della resa di processo**

Per poter valutare l'effetto indotto dall'addizione della neve carbonica alle olive durante le fasi della loro frangitura, si è reso necessario calcolare la resa del processo.

Gli effetti indotti dalla materia prima, (legati a cultivar, indice di maturazione, contenuto d'acqua, tempo e condizioni adottate durante lo stoccaggio delle olive) e dalla quantità di criogeno addizionato sia sulla resa estrattiva che sulla qualità dell'olio estratto sono stati confrontati con i risultati ottenuti lavorando la stessa materia prima e utilizzando condizioni operative (temperatura e tempo gramolatura, velocità di alimentazione pasta nel decanter) del tutto analoghe ma in assenza del criogeno. È stato inoltre valutato se e come l'addizione del criogeno portasse ad ottenere risultati diversificati operando con olive contraddistinte da diversi gradi di maturazione, da un diverso contenuto in acqua, da diverse epoche di raccolta ma provenienti dallo stesso oliveto. L'effetto indotto dal rapporto peso di criogeno addizionato per chilogrammo di olive lavorate è stato valutato utilizzando la stessa materia prima frigo conservata in cella

(in aria alla temperatura di 7°C) nelle condizioni più idonee a mantenerne il più invariate possibile le caratteristiche composizionali ed organolettiche.

L'efficacia dell'estrazione è stata espressa quindi come resa estrattiva:

**Resa estrattiva = kg olio estratto/kg olive lavorate**

Viste le differenze composizionali delle olive, legate sia alla varietà che all'indice di maturazione da queste esibito, la resa del processo è stata espressa anche come estraibilità, ovvero rapportando il quantitativo di olio estratto all'olio effettivamente presente nelle olive frante, in modo da svincolarsi dalla variabilità delle olive legata al contenuto in acqua dei frutti. L'estraibilità è stata così calcolata:

**kg olio estratto/kg frutti franti x % olio olive**

Per poter valutare nella maniera più precisa possibile la resa del processo, era necessario essere certi di raccogliere tutto l'olio estratto dalle olive, evitando che una parte residuasse all'interno dell'impianto.

Al termine di ogni estrazione, quindi, per non perdere parte del prodotto, venivano iniettati volumi crescenti di acqua all'interno del decanter tramite il flussimetro, finché nel liquido in uscita era presente dell'olio.

In questo modo era possibile quindi verificare il bilancio di materia, che veniva così calcolato:

**Olio caricato con le olive (kg frutti franti x % olio olive)**

=

**Olio scaricato con le sanse (kg sanse ottenute x %olio sanse)**

+

**olio estratto**

Tra una prova estrattiva e l'altra, per evitare che i residui di olio e sanse delle frangiture precedenti potessero in qualche modo contaminare i



risultati delle prove sperimentali, il frantoio veniva accuratamente lavato con idropulitrice e quindi asciugato prima di procedere.

### **3.2.2. Analisi carpologiche delle olive impiegate**

Le analisi carpologiche sulle olive sono state effettuate determinando l'indice di maturazione previa valutazione dell'indice colorimetrico.

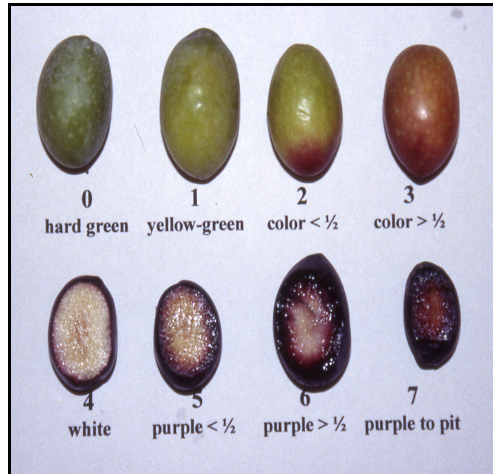
L'indice colorimetrico (*Uceda e Frias, 1975*) è un indice composito che si calcola classificando le olive di un campione in classi in funzione della colorazione superficiale e della polpa. L'indice di maturazione (IM) si ottiene calcolando su un campione di 100 olive il numero di olive in ogni classe e applicando la seguente formula:

$$IM = \frac{(A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3 + E \cdot 4 + F \cdot 5 + G \cdot 6 + H \cdot 7)}{100}$$

Le lettere indicano il numero di olive per ciascuna classe.

Le classi (Figura 3.5) sono:

- 0 = epicarpo di colore verde intenso;
- 1 = epicarpo di colore giallo-verde;
- 2 = epicarpo verde con tracce di arrossamento nella parte distale del frutto e che coprono un quarto della superficie (inizio dell'invasatura);
- 3 = epicarpo rossiccio o imbrunito per più di metà della superficie (fine dell'invasatura);
- 4 = epicarpo nero e polpa chiara;
- 5 = epicarpo nero e polpa imbrunita per meno della metà della profondità;
- 6 = epicarpo nero e polpa imbrunita per più della metà della profondità ma senza arrivare al nocciolo (endocarpo);
- 7 = epicarpo nero e polpa imbrunita fino all'endocarpo.



**FIGURA 3.5** - LE OLIVE VENGONO SUDDIVISE IN 7 CLASSI A SECONDA DEL LORO INDICE COLORIMETRICO (Uceda e Frias, 1975).

### 3.2.3. Determinazione dell'umidità di olive, paste e sanse

Il campione (30 g) viene essiccato in stufa (105 °C), quindi le sostanze non volatili vengono determinate gravimetricamente.

L'umidità percentuale è data da:

$$\text{umidità \%} = 100 - [(P_1 - P) / g] \cdot 100$$

dove:

P = peso della capsula vuota

P<sub>1</sub> = peso della capsula con il materiale essiccato

g = peso iniziale del materiale fresco

### 3.2.4. Determinazione del contenuto in olio in olive tal quali, paste e sanse

Per contenuto in olio in olive tal quali, paste e sanse si intendono i grammi di olio presenti in 100 grammi di campione di olive, paste e sanse.

Per determinare il contenuto in olio è stato utilizzato un estrattore automatico SER 148 SOLVENT EXTRACTION UNIT VELP® SCIENTIFICA, che prevede di mettere in contatto un solvente puro, mediante distillazione, con la miscela da estrarre.

La procedura prevede di essiccare fino a peso costante campioni, vessel con ebollitori e contenitori porosi (ditali di cellulosa).

Il materiale da estrarre (3-10g), viene introdotto in un ditale di cellulosa da estrazione, pesato accuratamente prima e dopo l'aggiunta del campione, questo viene poi inserito nel fermaditale, utilizzando sempre dei guanti per evitare contaminazioni.

Nella prima fase (IMMERSION – 60 MINUTI) il contenitore poroso col campione viene immerso direttamente nel solvente in ebollizione (70 mL di n-esano, introdotti nei vessel prepesati con gli ebollitori), nella seconda (WASHING – 60 MINUTI) il contenitore col campione viene rimosso dal solvente e lavato a ricadere. L'ultima fase (RECOVER – 30 MINUTI) permette di recuperare, grazie ad una pompa ad aria gran parte del solvente utilizzato già distillato. Infine sia i ditali che i vessel di estrazione vengono essiccati in stufa fino a peso costante per valutare il quantitativo di sostanza grassa estratta.

L'operazione veniva ripetuta due volte sugli stessi ditali per essere certi di raccogliere tutta la sostanza grassa presente.

### *Espressione dei risultati*

Il valore del contenuto in olio del campione si ricava dalla formula:

$$\text{olio \%} = [(P_1 - P) / g] \cdot 100$$

dove:

P = peso del vessel vuoto

P<sub>1</sub> = peso del vessel con olio

g = peso del campione di partenza

Il risultato ottenuto viene quindi confrontato col valore del contenuto in olio ricavato sulla base del calo peso del ditale di estrazione e così calcolato:

$$\text{olio \%} = [(P_{di} - P_{df}) / g] \cdot 100$$

dove:

$P_{di}$  = peso del ditale + peso del campione prima dell'estrazione

$P_{df}$  = peso del ditale + peso del campione dopo l'estrazione

$g$  = peso del campione di partenza

### 3.2.5. Determinazione dell'acidità dell'olio

L'olio in esame è stato disciolto in una miscela alcol etilico 95% ed etere etilico, in proporzione 1:2, e quindi titolato, fino al viraggio della fenolfaleina (soluzione etanolica 1%) utilizzata come indicatore, con una soluzione di NaOH 0.1 N (Reg. CEE 2568/91 sm.i.).

#### *Espressione dei risultati*

L'acidità, espressa come % in massa di acido oleico, è data da:

$$\text{acidità} = V \cdot c \cdot M / 1000 \cdot 100 / m = V \cdot c \cdot M / (10 \cdot m)$$

dove:

$V$  = volume (mL) della soluzione di NaOH usata

$c$  = concentrazione (moli/L) della soluzione di NaOH usata

$M$  = peso molare dell'acido adottato per l'espressione del risultato (acido oleico:  $PM = 282$  g/mole)

$m$  = peso (g) olio

### 3.2.6. Determinazione del numero di perossidi dell'olio

La determinazione è stata effettuata mediante titolazione con soluzione di tiosolfato di sodio 0,1 N fino a scomparsa del colore blu-viola dell'indicatore salda d'amido (*Reg. CEE 2568/91 e s.m.i.*).

#### *Espressione dei risultati*

Il valore del numero di perossidi, espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per Kg, è dato da:

$$\text{numero di perossidi} = [(V \cdot T)/m] \cdot 1000$$

dove:

V = volume (mL) della soluzione a titolo noto di tiosolfato di sodio utilizzata nell'analisi

T = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio utilizzata

m = massa (g) della sostanza da analizzare

### 3.2.7. Determinazione dei parametri spettrofotometrici

L'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva (*Reg. CEE 2568/91 e s.m.i.*) prevede la determinazione dell'estinzione specifica di una soluzione di olio in isotano 1:100, alle lunghezze d'onda di 232 e 270 nm e la determinazione del  $\Delta K$  inteso come:

$$\Delta K = K_m - (K_{m-4} + K_{m+4}) / 2$$

in cui  $K_m$  è l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda m, lunghezza d'onda di massimo assorbimento intorno a 270 nm.

### 3.2.8. Estrazione della componente fenolica e determinazione del contenuto in fenoli totali dell'olio

La normativa vigente non prevede limiti relativi al contenuto in composti fenolici.

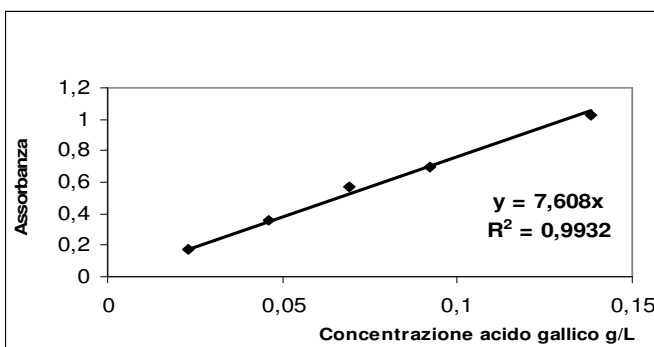
#### Estrazione della componente fenolica dall'olio

Si procede per estrazioni successive: 10 g di olio sono dissolti in 10 mL di metanolo/acqua (80:20, V/V) e posti in agitazione per almeno 3 minuti (Vortex), cui seguono 3 minuti di attesa; l'emulsione viene poi centrifugata (4000 r.p.m., 15 minuti): il surnatante (frazione idro-metanolica) viene recuperato e posto in una provetta con tappo a vite, mentre il subnatante (frazione oleosa) subisce la medesima procedura per altre due volte. La soluzione estratta viene quindi raffreddata e filtrata per eliminare gli eventuali residui di olio.

#### Determinazione del contenuto in polifenoli totali dell'olio

La concentrazione dei fenoli totali degli estratti metanolici è stata valutata con il reagente di Folin-Ciocalteu.

Il valore delle assorbanze ottenute è convertito in g/L di acido gallico utilizzando la  $\epsilon$  specifica calcolata sulla base di una retta di taratura realizzata operando con soluzioni a concentrazione nota di acido gallico (Figura 3.6) e sfruttando la legge di Lambert-Beer.



**FIGURA 3.6** - RETTA DI TARATURA REALIZZATA UTILIZZANDO SOLUZIONI A CONCENTRAZIONE COMPRESA TRA 0,02 E 0,15 g/L DI ACIDO GALLICO. LA EPSILON SPECIFICA DETERMINATA ERA PARI A 7,608 g/L.

### **3.2.9. Determinazione del contenuto in clorofilla**

Il contenuto di clorofilla, espresso come ppm di Feofitina a è stato determinato secondo la metodica IUPAC 1995 (Pokorny et al., 1995) misurando nel range 630-710 nm.l'assorbanza del campione diluito 1:10 in isotano.

### **3.2.10. Determinazione del contenuto in carotenoidi**

Il contenuto di carotenoidi, espresso come ppm di luteina è stato determinato secondo il lavoro di Minguez-Mosquera et al,1991 IUPAC misurando l'assorbanza del campione diluito 1:10 in isotano con spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 470 nm

### **3.2.11. Determinazione contenuto in tocoferoli**

La determinazione dei tocoferoli è stata effettuata tramite HPLC secondo la metodica descritta da Pocklington WD, Dieffenbacher A, (1988).

### **3.2.12. Determinazione dell'indice di amaro**

L'indice di amaro, che ha un rapporto con il contenuto in oleuropeina, è stato determinato secondo la metodica descritta da Gutierrez Rosales et al. (1991) misurando con spettrofotometro l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di 225 nm.

L'indice di amaro è quindi dato dalla seguente relazione:

$$\text{Indice amaro} = 13,33 \times K_{225} - 0.837$$

### **3.2.13. Determinazione contenuto acqua residua negli oli**

L'acqua residua presente negli oli estratti è stata valutata utilizzando un titolatore Karl Fisher per la determinazione coulometrica di precisione del contenuto di acqua.

### 3.3. Elaborazione statistica dei dati raccolti

Al fine di valutare la significatività statistica dei dati sperimentali raccolti, tutte le determinazioni analitiche sono state condotte in doppio.

L'intervallo di confidenza dei dati è stato calcolato utilizzando un livello di significatività  $p=0.05$ ; per somme o rapporti, affetti da un errore statistico più complesso, l'intervallo di confidenza è stato calcolato impiegando le seguenti formule per la propagazione degli errori:

- $(A \pm a) + (B \pm b) = C \pm (a+b)$
- $(A \pm a)/(B \pm b) = C \pm [(A/B^2) * b + (1/B) * a]$

Allo scopo di normalizzarne la distribuzione, i dati espressi in percentuale sono stati sottoposti prima dell'analisi a trasformazione angolare, mediante arcoseno:

- $\varphi = \arcsen \sqrt{p/100}$

dove :

$\varphi$  = dato trasformato espresso in radianti (-1;1)

$p$  = dato percentuale da trasformare

e poi ritrasformati per la presentazione dei dati.

Sui dati relativi ad ogni determinazione è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) con l'ausilio di un apposito software (CoStat, Cohort 6.0), utilizzando il test di Tukey e l'analisi ad una via completamente randomizzata, con livello di significatività =0.05.



## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **4.1. L'eterogeneità della materia prima**

Dopo una prima fase spesa a definire il protocollo sperimentale più idoneo e ad individuare le condizioni operative più adatte alla sua realizzazione, i risultati sperimentali ottenuti ed in particolare i valori relativi alla resa di estrazione e ai principali parametri qualitativi dell'olio prodotto operando in presenza del criogeno, sono stati confrontati con quelli raccolti utilizzando la stessa materia prima e le stesse condizioni sperimentali ma senza aggiungere il criogeno.

Le olive risultano afflitte da processi degradativi tali da determinarne un rapido degrado e da complicarne notevolmente la conservazione, anche adottando tecnologie che prevedano di mantenere sotto controllo non solo la temperatura ma anche la composizione gassosa dell'atmosfera di conservazione (frigoconservazione in atmosfere controllate).

Inoltre, spesso negli oliveti sono presenti piante appartenenti a più cultivar diverse, i cui frutti tendono a raggiungere la maturazione in tempi diversificati. I campioni di olive raccolti in epoche diverse non solo saranno contraddistinti da differenti gradi di maturazioni ma spesso anche da composizioni eterogenee, visto che nei campioni raccolti prevarranno i frutti delle cultivar più prossime alla maturazione rispetto a quelli significativamente più distanti da questo evento.

Alla luce di queste considerazioni, appare evidente come le olive appartenenti a cultivar precoci siano massimamente rappresentate nei primi campioni raccolti, mentre quelle tardive tendano a prevalere negli ultimi.

## 4.2. Prove di estrazione condotte operando in presenza o in assenza del criogeno e utilizzando frutti raccolti da olivi appartenenti a cultivar diverse.

Poiché i frutti provenivano dallo stesso oliveto, dove erano presenti piante appartenenti a cultivar diverse (Leccino, Frantoio e Correggiolo), sono stati raccolti campioni eterogenei che permettevano di effettuare un valido confronto solo utilizzando olive raccolte alla stessa data. Ai frutti opportunamente rimescolati per assicurarne l'omogeneizzazione, veniva addizionata o meno la neve carbonica, il criogeno impiegato nel corso di questa sperimentazione.

In Tabella 4.1. vengono riportati l'indice di maturazione, il tenore in H<sub>2</sub>O, il residuo secco disoleato e il contenuto in olio dei due lotti (A1 e A2) di olive, che sono state frante addizionando o meno il criogeno.

**TABELLA 4.1** - *INDICE DI MATURAZIONE, TENORE IDRICO, RESIDUO SECCO DISOLEATO, CONTENUTO IN OLIO E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA (p=0.05) DELLE PARTITE DI OLIVE APPARTENENTI ALLE CULTIVAR FRANTOIO, LECCINO E CORREGGIOLO, PROVENIENTI DALLO STESSO OLIVETO MA RACCOLTE IN EPOCHE DIFFERENTI*

<b>Lotto e data raccolta</b>	<b>Data di estrazione</b>	<b>IM (0÷7)</b>	<b>Umidità %</b>	<b>Sostanza grassa %</b>	<b>Residuo secco disoleato %</b>
A1 11/11/09	16/11/09	3.81	52.10±0.20	16.33±0.38	31.57±0.58
A2 09/12/09	14/12/09	5.14	48.21±0.31	24.17±0.36	27.62±0.67

Le olive appartenenti al primo lotto (A1) ed estratte il 16/11/09 esibivano un indice di maturazione pari a 3.81 (in una scala variabile nell'intervallo 0÷7) inferiore rispetto a quello presentato dalle olive utilizzate successivamente (14/12/2009 = 5.14). Queste prime olive (lotto A1) si presentavano infatti meno invaiate di quelle raccolte successivamente e,

come evidenziato in tabella, esibivano una minor percentuale in olio (16.33 % in peso rispetto al 24.17% del lotto A2) ed un maggior contenuto in acqua (52.10 % in peso rispetto al 48.21 del lotto A2).

Al fine di facilitare la separazione della frazione lipidica dalle sanse umide è stata addizionata dell'acqua all'interno del decanter. Aggiunta che è risultata inferiore nelle prove condotte in presenza del criogeno rispetto a quelle effettuate in sua assenza (tab. 4.2).

**TABELLA 4.2 - PARAMETRI OPERATIVI ADOTTATI, RESE IN OLIO, CARATTERISTICHE CHIMICHE E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ) DEGLI OLI ESTRATTI OPERANDO IN PRESENZA (CC) O MENO (SC) DELLA NEVE CARBONICA**

<b>Lotto e data frangitura</b>	<b>A1 – 16/11/09</b>		<b>A2 – 14/12/09</b>	
	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>
<b>CO<sub>2(s)</sub> aggiunta (kg di criogeno/kg di olive)</b>	0	0.13	0	0.13
<b>Temperatura olive (°C)</b>	12.4	-1.6	8.0	-0.9
<b>Temperatura pasta gramolata (°C)</b>	26.8	25.5	24.2	24.5
<b>tempo di gramolatura (s)</b>	2400	2400	2400	2400
<b>tempo di estrazione (s)</b>	3900	4200	4290	5760
<b>acqua aggiunta (kg)</b>	6.2	5.7	5.8	5.5
<b>resa in olio (kg di olio/kg di olive)</b>	0.132	0.163	0.146	0.152
<b>acidità dell'olio estratto (%acido oleico)</b>	0.18±0.01	0.19±0.01	0.61±0.03	0.68±0.06
<b>numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/kg di olio)</b>	7.44±0.30	7.45±0.10	8.22±0.50	8.19±0.30
<b>K<sub>232</sub></b>	1.57±0.10	1.64±0.10	1.62±0.12	1.60±0.15
<b>K<sub>270</sub></b>	0.13±0.01	0.15±0.02	0.14±0.01	0.16±0.02
<b>ΔK</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Indice di amaro</b>	6.03±0.04	5.42±0.04	6.13±0.01	5.16±0.01
<b>Carotenoidi (ppm luteina)</b>	5.9±0.3	5.2±0.2	4.8±0.2	5.0±0.3
<b>Clorofille (ppm feofitina)</b>	10.4±0.5	6.9±0.3	3.3±0.2	2.9±0.1

Al fine di esprimere mediante l'utilizzo di un unico parametro IPDR (Incremento Percentuale Della Resa) l'eventuale variazione riscontrata nella quantità di olio raccolto a seguito dell'addizione del criogeno, la resa ottenuta operando con il criogeno (RCC) è stata confrontata con quella trovata operando in sua assenza (RSC), utilizzando l'algoritmo di calcolo seguente:

$$\mathbf{[ (RCC - RSC) / RSC ] \times 100}$$

La quantità di olio estratto aggiungendo neve carbonica alle olive del lotto A1, sembra essere più elevata, come evidenziato dal valore assunto dall'incremento percentuale della resa (IPDR), rispetto a quella ottenuta in sua assenza:

$$\mathbf{IPDR = [(0.163 - 0.132)/0.132] \times 100 = 23.5\%}$$

incremento che sembra ridursi all'aumentare dell'indice di maturazione dei frutti utilizzati, anche se la mancanza di omogeneità compositiva che caratterizza questi campioni tende a complicare notevolmente l'interpretazione dei risultati ottenuti.

In particolare, la resa in olio della prova A2 è risultata pari a 0.152 kg di olio estratto/kg di olive lavorate impiegando il criogeno, un valore superiore a quello ottenuto nella frangitura condotta in assenza della neve carbonica (0.146 kg di olio estratto/kg di olive lavorate), con un incremento nell' IPDR pari al 4.11 %, inferiore a quello che intercorre tra le due prove A1 condotte in presenza ed in assenza del criogeno.

Anche se il confronto tra campioni di olive provenienti dallo stesso oliveto in cui sono presenti più cultivar di olivi potrebbe probabilmente risentire di una diversa composizione percentuale dei campioni raccolti in epoche diverse, l'addizione della CO<sub>2,s</sub> sembrerebbe in grado di indurre effetti più evidenti se viene addizionata a frutti meno maturi e quindi caratterizzati da un maggiore contenuto in acqua.

È proprio il congelamento dell'acqua presente nei frutti, che va ad occupare un volume superiore a quello utilizzato in fase liquida, a determinare il crash cellulare che favorisce il trasferimento in fase liquida dei componenti cellulari e quindi anche dell'olio, pertanto quanto maggiore sarà il contenuto in acqua nelle olive lavorate tanto più elevata risulterà l'efficacia dimostrata da questo sistema di estrazione.

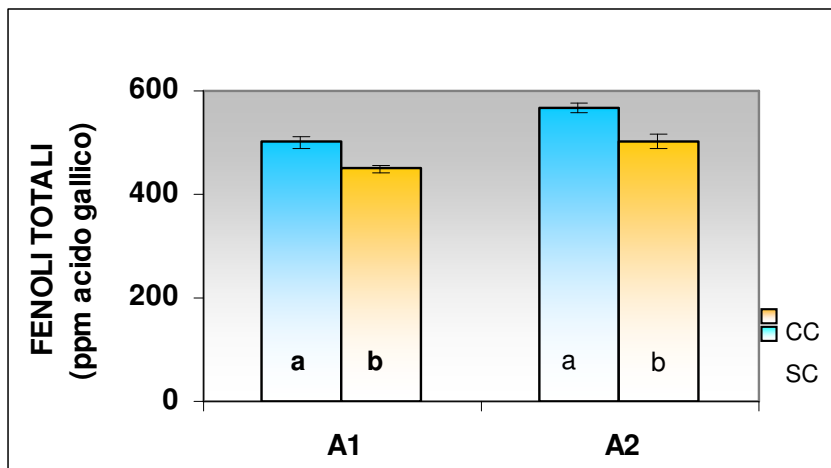
La composizione chimica e le caratteristiche principali degli oli estratti non presentano particolari variazioni imputabili all'impiego del criogeno.

L'acidità dell'olio estratto ed il numero di perossidi tendono ad aumentare con l'epoca di raccolta dei frutti, consentendo comunque di ottenere in entrambi i casi dei prodotti classificabili come extravergini, in quanto esibiscono valori di acidità inferiori a 0.8.

Anche i valori degli indici spettrofotometrici ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ,  $\Delta K$ ) risultano essere sempre conformi con quanto prescritto dal Reg. CEE 2568/91 e s.m.i., confermando così l'efficienza del microfrantoio utilizzato, ed in particolare del suo sistema di smaltimento del calore, che permette di ottenere durante tutto il processo estrattivo, un buon controllo della temperatura.

Alla luce di queste considerazioni assumono particolare rilievo gli eventuali incrementi apportati alle rese di estrazione o agli indici qualitativi dalla tecnica estrattiva proposta.

Gli istogrammi della Figura 4.1 riportano le concentrazioni di fenoli totali presenti negli oli estratti da olive raccolte e frante in date diverse, aggiungendo o meno neve carbonica ai frutti lavorati.



**FIGURA 4.1** - CONCENTRAZIONI IN FENOLI TOTALI (ppm DI ACIDO GALLICO) PRESENTI NEGLI OLI OTTENUTI OPERANDO IN PRESENZA (CC) O IN ASSENZA (SC) DEL CRIOGENO.

LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p = 0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

Nelle due prove analizzate (A1 e A2) è possibile evidenziare l'esistenza di una significativa differenza (+ ~ 11%) nel contenuto in fenoli totali a favore dell'olio estratto in presenza del criogeno, differenza che non sembra risentire della diversa epoca di raccolta dei frutti utilizzati (A1 ~ A2). Questo risultato sembrerebbe completamente in linea con quanto atteso visto che il crash cellulare indotto dall'utilizzo del criogeno dovrebbe favorire l'estrazione dei componenti cellulari favorendone il trasferimento nell'olio.

### 4.3. Prove di estrazione condotte operando in presenza o in assenza del criogeno e utilizzando frutti raccolti da olivi appartenenti a cultivar diverse e conservati in aria a 7°C.

Al fine di evidenziare l'eventuale effetto indotto sulla resa e sulla qualità degli oli estratti dal tempo e dalle condizioni operative adottate nella conservazione della materia prima, nel corso della campagna successiva (2010) sono state raccolte due partite di olive (A3 e A4) che provenivano dallo stesso oliveto dove le cultivar Frantoio, Leccino e Correggiolo coesistono.

I frutti, dopo essere stati preliminarmente sottoposti ad una omogeneizzazione meccanica, vennero conservati all'aria all'interno di una cella termo-condizionata in grado di mantenere la temperatura a  $7 \pm 1$  °C, e quindi franti dopo circa 5 e 15 giorni di conservazione, operando in presenza od in assenza del criogeno.

In Tabella 4.3 vengono riportati l'indice di maturazione, il tenore in H<sub>2</sub>O, il residuo secco disoleato e il contenuto in olio dei due lotti di olive considerati.

**TABELLA 4.3-** INDICE DI MATURAZIONE, TENORE IDRICO, RESIDUO SECCO DISOLEATO, CONTENUTO IN OLIO E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ), RELATIVI ALLE PARTITE DI OLIVE UTILIZZATE

Lotto e data raccolta	Data di estrazione	IM (0÷7)	Umidità %	Sostanza grassa %	Residuo secco disoleato %
A3 08/11/10	12/11/10 22/11/10	3.01	57.13±0.69	14.21±0.69	28.66±1.38
A4 04/12/10	09/12/10 20/12/10	3.59	53.55±0.55	19.03±2.04	27.42±2.59



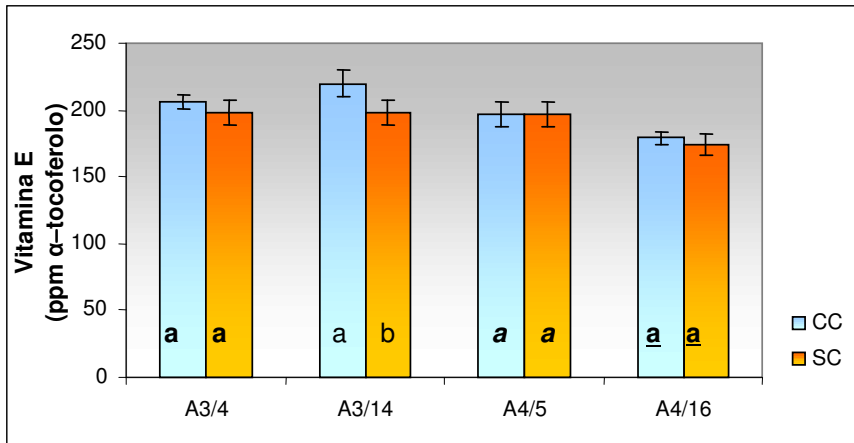
Pur essendo trascorso circa un mese (26 giorni) le olive del lotto A4 presentavano un indice di maturazione (3.59) di poco superiore a quello (3.01) che caratterizzava il lotto precedente A3, mentre in un arco di tempo del tutto paragonabile (28 giorni) che si andava a collocare pressappoco nello stesso periodo dell'anno (11/11 ÷ 9/12 nel 2009 e 8/11 ÷ 4/12 nel 2010), l'indice di maturazione delle olive (IM) passava dal 3.81 al 5.14. Questi dati tendono ad evidenziare come l'andamento stagionale del 2009 abbia favorito in modo più marcato la maturazione dei frutti di quanto abbia fatto nell'anno successivo (2010).

**TABELLA 4.4-** PARAMETRI OPERATIVI ADOTTATI, RESE IN OLIO, CARATTERISTICHE CHIMICHE E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ) DEGLI OLI ESTRATTI OPERANDO IN PRESENZA (CC) O MENO (SC) DELLA NEVE CARBONICA

<b>Lotto olive e data di frangitura</b>	<b>A3 12/11/10</b>		<b>A3 22/11/10</b>		<b>A4 09/12/10</b>		<b>A4 20/12/10</b>	
	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>
<b>CO<sub>2(s)</sub> aggiunta (kg criogeno /kg olive)</b>	0	0.19	0	0.19	0	0.17	0	0.17
<b>Temperatura olive (°C)</b>	18.0	-9.0	12.0	-3.8	9.0	-1.3	7.0	-3
<b>Temperatura pasta gramolata (°C)</b>	23.3	22.8	23.0	23.6	23.0	23.0	23.0	23.0
<b>tempo gramolatura (s)</b>	2700	2700	2700	2400	2400	2400	2400	2400
<b>tempo estrazione (s)</b>	4440	5100	4200	4500	4200	5220	4200	4920
<b>acqua aggiunta (kg)</b>	4.0	0	5.8	2.4	5.2	4.9	5.4	4.4
<b>resa in olio % (kg di olio/kg di olive)</b>	10.97	12.16	12.06	12.78	15.73	15.50	14.23	16.00
<b>acidità dell'olio estratto (%acido oleico)</b>	0.63±0.02	0.36±0.01	0.75±0.02	0.67±0.04	0.25±0.01	0.26±0.01	0.54±0.01	0.55±0.01
<b>numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/kg di olio)</b>	6.53±0.01	4.82±0.58	6.52±0.34	7.86±0.52	7.51±0.74	9.36±0.42	6.80±0.57	7.14±0.38
<b>K<sub>232</sub></b>	1.44±0.22	1.37±0.15	1.27±0.07	1.26±0.05	1.91±0.17	1.33±0.02	1.04±0.14	1.78±0.12
<b>K<sub>270</sub></b>	0.10±0.03	0.07±0.01	0.12±0.03	0.10±0.01	0.14±0.01	0.11±0.02	0.11±0.01	0.17±0.03
<b>ΔK</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Indice di amaro</b>	3.34±0.01	4.38±0.01	2.33±0.02	2.16±0.05	3.62±0.05	1.93±0.01	2.13±0.01	1.62±0.01
<b>Carotenoidi (ppm luteina)</b>	7.9±0.3	6.1±0.4	9.2±0.5	7.8±0.4	6.2±0.2	5.7±0.3	6.0±0.2	6.2±0.2
<b>Clorofille (ppm feofitina)</b>	17.0±0.6	9.3±0.5	18.8±0.7	11.8±0.5	10.2±0.4	7.3±0.3	8.5±0.4	8.2±0.3

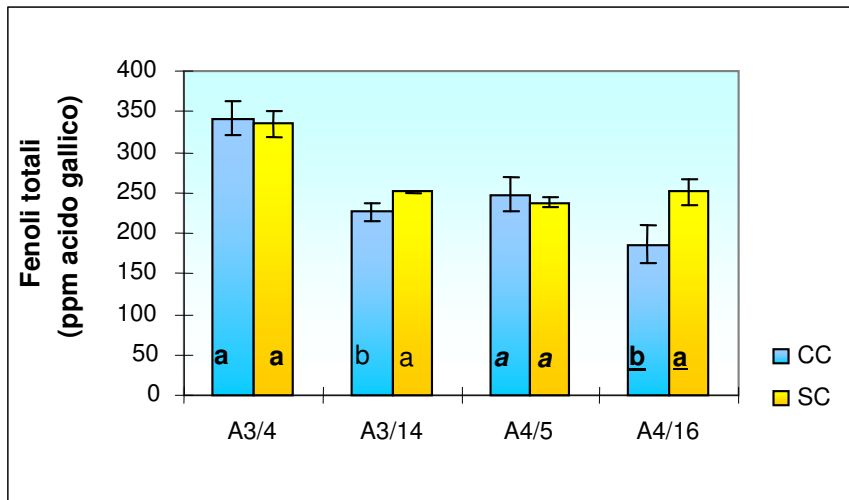
La resa di estrazione non sembra variare al variare del tempo di conservazione delle olive, incrementandosi di 1.09 kg di olio estratto/kg di olive lavorate passando per il lotto A3 da 4 a 14 giorni di permanenza in cella quando si utilizza la tecnologia tradizionale, mentre questo incremento si riduce a 0.62 kg di olio estratto/kg di olive lavorate se si impiega il criogeno. Poiché la resa in olio utilizzando il criogeno sembra comunque superiore a quella ottenuta in sua assenza, visto che l'IPDR dopo 4 giorni è pari a 10.85% mentre quello valutato dopo 14 giorni diviene pari a 5.97%. Il tempo di conservazione tende ad incrementare la resa di estrazione perché, se da un lato l'inevitabile disidratazione dei frutti ne fa diminuire il peso e quindi incrementa il valore della resa, dall'altro la maggior disorganizzazione cellulare indotta nelle olive ne diminuisce la resistenza all'estrazione favorendone di conseguenza la resa. Questo incremento sembra diminuire utilizzando il criogeno, visto che il crash cellulare induce una perdita nella resistenza offerta dai frutti alla diffusione dell'olio. Queste considerazioni sembrerebbero trovare conferma nei dati trovati per il lotto A4, dove la resa di estrazione sembra addirittura diminuire con il tempo di conservazione quando si utilizza la tecnologia tradizionale di estrazione, per tornare a crescere quando il criogeno viene addizionato alle olive lavorate.

Per quanto riguarda i parametri connessi alla qualità degli oli estratti, sono stati valutati gli andamenti relativi all'accumulo dei tocoferoli (Vit.E) e dei componenti fenolici. La vitamina E (fig 4.2) sembra accumularsi maggiormente negli oli estratti operando in presenza del criogeno mentre appaiono discordanti gli andamenti in funzione del tempo di conservazione. Infatti se per il lotto A3 la loro concentrazione sembrerebbe incrementarsi leggermente con il tempo di conservazione, per il lotto A4 gli andamenti appaiono del tutto opposti.



**FIGURA 4.2** - ANDAMENTO DEL CONTENUTO IN VITAMINA E (ppm di  $\alpha$ -TOCOFEROLO) AL VARIARE DEL LOTTO DI OLIVE UTILIZZATO (A3 E A4), DEL TEMPO DI CONSERVAZIONE (4 E 14 GIORNI PER IL LOTTO A3 E 5 E 16 GIORNI PER IL LOTTO A4) E DELL'EVENTUALE IMPIEGO DEL CRIOGENO NEL PROCESSO DI ESTRAZIONE. LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p=0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

I valori relativi all'evoluzione andamenti delle concentrazioni dei fenoli totali (fig.4.3) appaiono del tutto altalenanti, per cui risulta impossibile individuare dei plausibili andamenti.



**FIGURA 4.3** - ANDAMENTO DEL CONTENUTO IN FENOLI TOTALI (ppm DI ACIDO GALLICO) AL VARIARE DEL LOTTO DI OLIVE UTILIZZATO (A3 E A4), DEL TEMPO DI CONSERVAZIONE (4 E 14 GIORNI PER IL LOTTO A3 E 5 E 16 GIORNI PER IL LOTTO A4) E DELL'EVENTUALE IMPIEGO DEL CRIOGENO NEL PROCESSO DI ESTRAZIONE. LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p = 0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

#### 4.4. La resa di estrazione e la qualità dell'olio estratto al variare del rapporto in peso criogeno/olive lavorate

Nel periodo compreso fra aprile e maggio 2010, sono state condotte prove di estrazione utilizzando olive appartenenti alla sola cultivar Itrana, raccolte nello stesso giorno e provenienti dal medesimo oliveto.

Anche in questo caso i frutti sono stati preliminarmente mescolati per assicurarne l'omogeneità.

Le olive sono state quindi frigo-conservate in cella all'aria e alla temperatura di  $7 \pm 1$  °C fino al momento della frangitura.

Per valutare l'effetto del dosaggio del criogeno sulla resa e sulla qualità dell'olio ottenuto, le olive defogliate e lavate sono state addizionate con differenti quantità di neve carbonica (0, 3.0; 4.5; 6.0 kg CO<sub>2(s)</sub> per 30 kg di olive) prima di procedere all'estrazione dell'olio.

La tabella 4.5 riporta le principali caratteristiche delle olive utilizzate, mentre i parametri operativi adottati, le rese estrattive e alcune caratteristiche degli oli estratti operando in presenza o meno del criogeno, sono disponibili in tabella 4.6.

**TABELLA 4.5** - *INDICE DI MATURAZIONE, TENORE IDRICO, RESIDUO SECCO DISOLEATO, CONTENUTO IN OLIO E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ) DELLE OLIVE DELLA CULTIVAR ITRANA UTILIZZATE*

<b>Lotto e data raccolta</b>	<b>Data prove</b>	<b>IM (0÷7)</b>	<b>Umidità %</b>	<b>Sostanza grassa %</b>	<b>Residuo secco disoleato %</b>
I 16/04/10	28/04/10	4.65	59.51±0.37	16.23±0.39	24.26±0.76
	03/05/10				
	04/05/10				
	05/05/10				

Le olive, che presentavano un indice di maturazione pari a 4.65, erano caratterizzate da un contenuto in olio di circa il 16% mentre quello in acqua era pari al 60% circa.

In accordo con quanto facilmente prevedibile visto il meccanismo con cui opera il criogeno, la quantità di olio estratto tende a crescere all'aumentare della quantità di neve carbonica aggiunta per unità di peso delle olive utilizzate come materia prima. È particolarmente rilevante la resa in olio relativa alla frangitura eseguita 05/05/10. Infatti, le olive che erano state sottoposte al più prolungato periodo di frigo-conservazione (19 giorni, 7°C), grazie all'elevata quantità di criogeno impiegato in estrazione (0.20 kg per kg di olive), hanno evidenziato una resa di estrazione in olio significativamente più elevata di quanto conseguibile operando in presenza di un rapporto in peso criogeno/olive lavorate più contenuto.

Come era logico attendersi, sia l'acidità che il numero di perossidi degli oli estratti tendono ad incrementare all'aumentare del tempo di conservazione dei frutti lavorati. Per cui mentre l'olio ottenuto nel corso dalle prime tre frangiture è classificabile come extravergine (valore di acidità libera < 0.8), gli ultimi due prodotti estratti presentavano un'acidità superiore al limite stabilito per gli extravergini pur rientrando in quello previsto per i vergini.

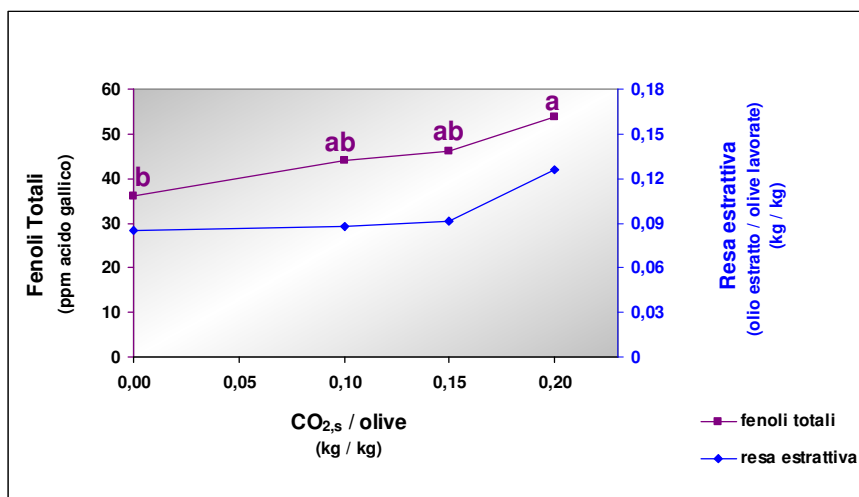
**TABELLA 4.6 - PARAMETRI OPERATIVI, RESE DI OLIO E CARATTERISTICHE CHIMICHE DEGLI OLI ESTRATTI OPERANDO CON QUANTITATIVI CRESCENTI DI ANIDRIDE CARBONICA SOLIDA (0; 0.10; 0.15; 0.20 KG DI CO<sub>2(s)</sub> / KG DI OLIVE).**

	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>CC</b>	<b>CC</b>
<b>Data di frangitura</b>	<b>28/04/10</b>	<b>03/05/10</b>	<b>04/05/10</b>	<b>05/05/10</b>
<b>CO<sub>2(s)</sub> aggiunta (kg di criogeno/kg di olive)</b>	0.0	0.10	0.15	0.20
<b>temperatura (°C) olive</b>	13.9	-0.6	-0.6	-1.0
<b>temperatura (°C) pasta gramolata</b>	24.8	24.4	24.0	24.5
<b>tempo gramolatura (s)</b>	2400	2400	2400	2400
<b>tempo estrazione (s)</b>	3600	4800	5100	5880
<b>acqua aggiunta (kg)</b>	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>resa in olio % (kg di olio/kg di olive)</b>	8.6	8.8	9.2	12.6
<b>acidità dell'olio estratto (%acido oleico)</b>	0.37±0.01	0.53±0.01	1.64±0.02	1.65±0.01
<b>numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/kg di olio)</b>	10.93±0.64	11.08±1.74	10.55±1.50	10.17±2.41
<b>K<sub>232</sub></b>	2.46±0.25	2.52±0.10	2.00±0.02	1.67±0.15
<b>K<sub>270</sub></b>	0.14±0.02	0.04±0.00	0.07±0.01	0.12±0.02
<b>ΔK</b>	0.00±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	-0.08±0.15
<b>Indice di amaro</b>	-0.04±0.01	-0.02±0.01	-0.02±0.01	-0.19±0.01
<b>Carotenoidi (ppm luteina)</b>	2.4±0.1	2.3±0.2	2.8±0.1	2.8±0.2
<b>Clorofille (ppm feofitina)</b>	1.2±0.1	1.1±0.2	2.3±0.2	1.8±0.3



I risultati ottenuti sembrerebbero confermare come un incremento della quantità di CO<sub>2(s)</sub> addizionata per unità di peso di olive lavorate, possa facilitare l'estrazione dell'olio agevolandone la separazione dalle sanse umide.

In Figura 4.4 vengono riportati gli andamenti della resa di estrazione e della quantità di fenoli estratti in funzione del rapporto in peso tra la quantità di criogeno impiegata e il peso delle olive lavorate. Anche se il numero dei valori sperimentali raccolto appare veramente contenuto e i dati appaiono affetti da una notevole variabilità sperimentale, è possibile affermare che sia la resa di estrazione che la quantità di fenoli estratti tendano ad aumentare al crescere dell'ammontare di criogeno impiegato.

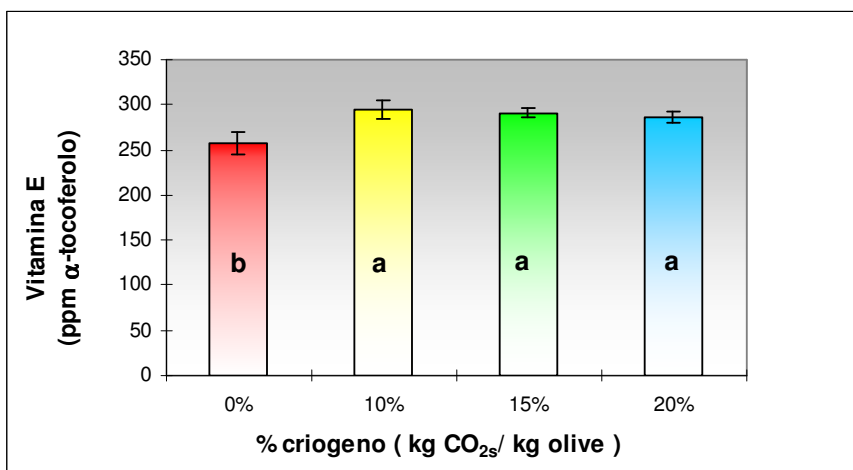


**FIGURA 4.4** - CONTENUTO FENOLICO ( ppm ACIDO GALLICO) PRESENTE NEGLI OLI ESTRATTI E RESE ESTRATTIVE (kg OLIO ESTRATTO/ kg OLIVE LAVORATE) AL VARIARE DELLA QUANTITÀ DI NEVE CARBONICA ADDIZIONATA ALLE OLIVE PROCESSATE ( 0; 0.10; 0.15; 0.20 kg CRIOGENO / kg OLIVE LAVORATE). LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p=0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

Appare evidente come il rapporto tra la quantità di criogeno addizionato per unità di peso di olive lavorate, non possa aumentare all'infinito, visto

che anche i costi connessi al consumo del criogeno tenderebbero ad incrementarsi fino a divenire insostenibili. Inoltre si accrescerebbe anche la richiesta delle calorie necessarie per portare la pasta in gramolatura ad una temperatura idonea a promuovere la coalescenza delle micro goccioline di olio estratto e quindi la separazione dell'olio dai reflui di lavorazione.

Un incremento del rapporto ponderale criogeno impiegato/olive lavorate favorisce anche l'accumulo della Vitamina E (tocoferoli) negli oli di estrazione (figura 4.5). In questo caso al crash cellulare indotto dalle basse temperature raggiunte dal sistema olive lavorate criogeno addizionato si aggiunge lo sviluppo di una atmosfera arricchita in CO<sub>2</sub> che tende a permanere sulla pasta in gramolatura preservandola unitamente ai suoi componenti più sensibili tra cui i tocoferoli, da possibili fenomeni ossidativi.



**FIGURA 4.5** -ANDAMENTO DELLA CONCENTRAZIONE DI VITAMINA E (ppm DI α-TOCOFEROLO) PRESENTE NEGLI OLI ESTRATTI AL VARIARE DELLA QUANTITÀ DI NEVE CARBONICA ADDIZIONATA ALLE OLIVE PROCESSATE (0; 010; 0.15; 0.20 kg DI CRIOGENO / kg OLIVE LAVORATE). LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p=0.05$ ), CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

#### 4.5. Rese di estrazione e qualità degli oli estratti al variare dell'indice di maturazione raggiunto dalle olive utilizzate e operando o meno in presenza del criogeno.

Per valutare l'effetto del criogeno in funzione dello stato di maturazione raggiunto dai frutti estratti, sono stati utilizzati tre lotti di olive appartenenti alla cultivar Coratina e provenienti dal medesimo oliveto ma contraddistinti da indici di maturazione diversi (tab. 4.7).

**TABELLA 4.7** - *INDICE DI MATURAZIONE, TENORE IDRICO, RESIDUO SECCO DISOLEATO, CONTENUTO IN OLIO E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ) RELATIVI ALLE TRE PARTITE DI OLIVE CORATINA, RACCOLTE NELLO STESSO OLIVETO MA A DIFFERENTI STADI DI MATURAZIONE*

<b>Lotto e data raccolta</b>	<b>Data prove</b>	<b>IM (0÷7)</b>	<b>Umidità %</b>	<b>Sostanza grassa %</b>	<b>Residuo secco disoleato %</b>
C1 15/11	19/11	2.62	61.37±0.03	18.31±0.23	22.25±0.26
C2 29/11	03/12	2.83	55.85±0.95	19.41±0.23	27.74±1.18
C3 13/12	17/12	4.19	53.21±0.01	23.54±0.01	23.25±0.02

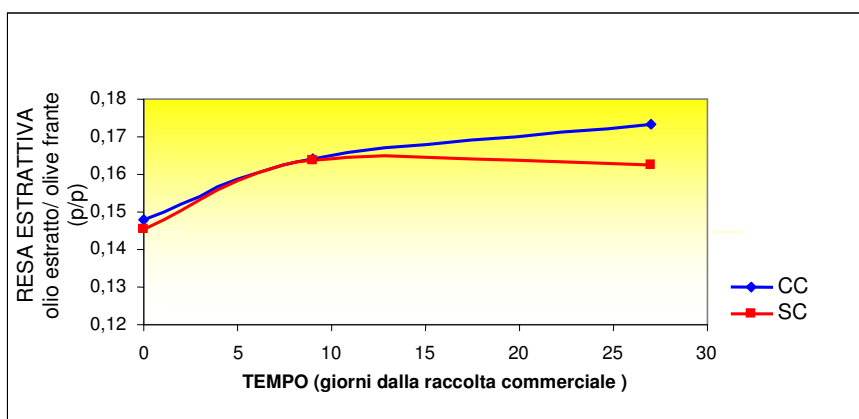
La quantità di CO<sub>2,s</sub> addizionata per unità di peso delle olive utilizzate, le rese di estrazione ottenute (kg di olio estratto per unità di peso delle olive frante) e altri parametri correlati alla qualità degli oli estratti sono riportate in Tabella 4.8 per essere confrontati con gli analoghi dati ottenuti adottando le medesime condizioni sperimentali ma operando in assenza del criogeno.

**TABELLA 4.8-** PARAMETRI OPERATIVI ADOTTATI, RESE IN OLIO, CARATTERISTICHE CHIMICHE E RELATIVI INTERVALLI DI CONFIDENZA ( $p=0.05$ ) DEGLI OLI ESTRATTI OPERANDO IN PRESENZA (CC) O MENO (SC) DELLA NEVE CARBONICA

<b>Lotto olive e data frangitura</b>	<b>C1 19/11/10</b>		<b>C2 03/12/10</b>		<b>C3 17/12/10</b>	
	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>	<b>SC</b>	<b>CC</b>
<b>CO<sub>2(s)</sub> aggiunta (kg di criogeno/kg di olive)</b>	0.00	0.20	0.00	0.20	0.00	0.20
<b>Temperatura (°C) olive</b>	12.0	-0.2	13.2	-5.3	8.5	-2.7
<b>Temperatura (°C) pasta gramolata</b>	23.0	24.95	24.7	23.3	23.0	23.0
<b>tempo gramolatura (s)</b>	2400	2400	2400	2400	2400	2400
<b>tempo estrazione (s)</b>	5040	4200	5040	4980	4320	4440
<b>acqua aggiunta (kg)</b>	1.11	1.56	1.75	1.61	2.99	1.61
<b>resa in olio % (kg di olio/kg di olive)</b>	14.53	14.80	15.02	16.37	16.23	17.33
<b>acidità dell'olio estratto (%acido oleico)</b>	0.21±0.02	0.26±0.01	0.22±0.02	0.21±0.04	0.32±0.01	0.29±0.01
<b>numero di perossidi (meq O<sub>2</sub>/kg di olio)</b>	9.06±0.10	9.25±0.70	9.13±0.58	8.90±1.22	6.52±0.68	5.29±0.12
<b>K<sub>232</sub></b>	1.69±0.13	1.54±0.14	1.66±0.23	1.59±0.09	1.60±0.14	1.34±0.07
<b>K<sub>270</sub></b>	0.15±0.01	0.13±0.04	0.15±0.03	0.13±0.02	0.12±0.01	0.10±0.02
<b>ΔK</b>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<b>Indice di amaro</b>	7.41±0.02	5.70±0.04	8.78±0.07	7.03±0.01	7.76±0.02	6.16±0.02
<b>Carotenoidi (ppm luteina)</b>	4.4±0.2	3.3±0.2	3.4±0.2	3.2±0.2	2.8±0.2	2.8±0.3
<b>Clorofille (ppm feofitina)</b>	4.4±0.3	3.6±0.2	4.4±0.3	3.3±0.2	3.4±0.3	3.1±0.2

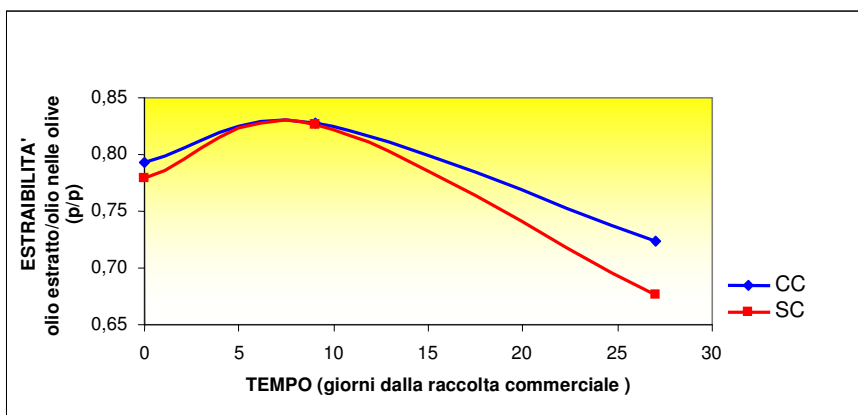
Come appare facilmente deducibile dai dati riportati in tabella 4.8, l'aggiunta del criogeno alle olive sembra favorire l'estrazione dell'olio per cui le rese assumono valori apparentemente più elevati operando in presenza del criogeno.

L'incremento nella resa si può riscontrare non solo quando questa viene calcolata come rapporto tra il peso dell'olio estratto e quello delle olive lavorate (Fig. 4.6), ma anche quando si valuta l'estraibilità, ovvero il rapporto tra la quantità di olio estratto rispetto a quello inizialmente presente nelle olive utilizzate (Fig. 4.7).



**FIGURA 4.6** - ANDAMENTO DELLE RESE DI ESTRAZIONE (KG DI OLIO ESTRATTO/KG DI OLIVE LAVORATE) OPERANDO IN PRESENZA (CC) E IN ASSENZA (SC) DEL CRIOGENO AL VARIARE DELLA DATA DI RACCOLTA DELLE OLIVE (GIORNI DALL'EFFETTIVA DATA DELLA RACCOLTA COMMERCIALE - 15 NOVEMBRE 2010).

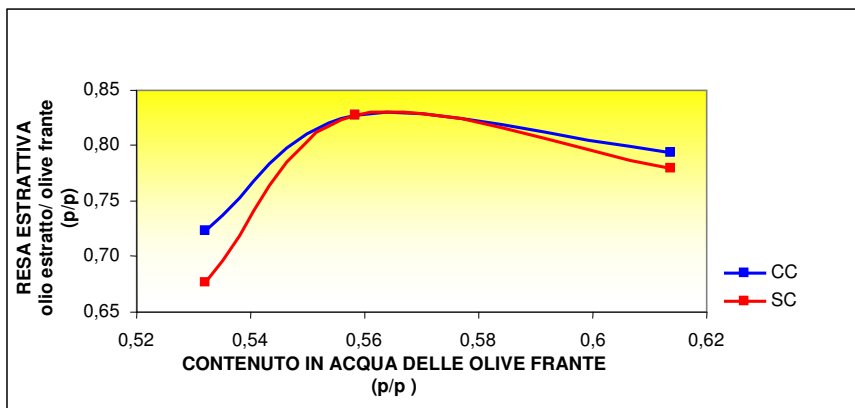
Mentre la resa (Fig. 4.6) sembra crescere con il tempo di maturazione dei frutti utilizzati, l'estraibilità, ovvero l'olio estratto sul totale di quello potenzialmente estraibile, sembra diminuire (Fig 4.7).



**FIGURE 4.7** - *ANDAMENTO DELL'ESTRAIBILITÀ (kg DI OLIO ESTRATTO/ kg DI OLIO POTENZIALMENTE ESTRAIBILE) OPERANDO IN PRESENZA (CC) E IN ASSENZA (SC) DEL CRIOGENO, AL VARIARE DELLA DATA DI RACCOLTA DELLE OLIVE (GIORNI DALL'EFFETTIVA DATA DELLA RACCOLTA COMMERCIALE - 15 NOVEMBRE 2010).*

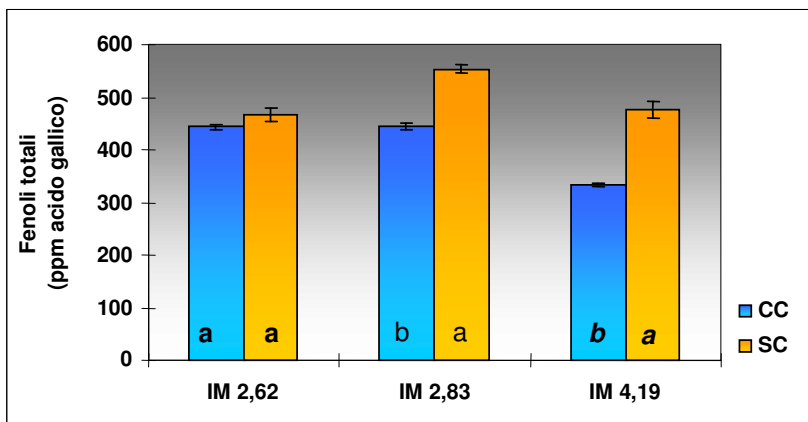
Questo potrebbe essere legato alla cinetica di accumulo delle sostanze grasse all'interno delle cellule dell'oliva, che cresce significativamente con il tempo di maturazione, perciò la quantità totale di olio estratto dalla stessa quantità di frutti caratterizzati da un maggiore indice di maturazione aumenta a causa della maggiore quantità di olio che si è accumulata all'interno del frutto con il decorrere della maturazione. Al contrario l'estraibilità (olio estratto/olio contenuto nelle olive) tende a diminuire visto che con la maturazione decresce anche la quantità d'acqua presente nei frutti, di conseguenza diviene più difficile la diffusione dell'olio nella fase liquida e quindi ne diminuisce l'estrazione (Fig. 4.7).

Infatti il contenuto in acqua dei frutti, che decresce nel corso del processo di maturazione (Tab 4.7) appare direttamente correlato all'estraibilità (Fig 4.8) non solo quando l'estrazione viene condotta in presenza del criogeno, ma anche quando viene impiegata la tecnologia tradizionale di separazione.



**FIGURA 4.8** - ANDAMENTO DELLE RESE DI ESTRAZIONE (kg DI OLIO ESTRATTO PER kg DI OLIVE LAVORATE) NELLE PROVE CONDOTTE IN PRESENZA (CC) E IN ASSENZA (SC) DEL CRIOGENO, IN FUNZIONE DEL CONTENUTO IN ACQUA DELLE OLIVE FRANTE (p/p)

Come già precedentemente ricordato, il diretto contatto tra criogeno ed olive induce un parziale congelamento dell'acqua cellulare che incrementa quindi il suo volume (volume  $H_2O_{(s)}$  > volume  $H_2O_{(l)}$ ). Un fenomeno che causa la lacerazione delle membrane cellulari (crash cellulare) e la conseguente diffusione dell'olio nella fase liquida. Per cui la resa estrattiva risulterà tanto più elevata quanto maggiore sarà il contenuto in acqua dei frutti lavorati, ma sono proprio le olive più immature ad essere caratterizzate da un maggiore contenuto in acqua. Per quanto riguarda invece i parametri connessi alla qualità, in figura 4.9 vengono riportati i contenuti in fenoli totali presenti negli oli estratti operando o meno in presenza del criogeno utilizzando tre lotti di olive, caratterizzati da un diverso indice di maturazione.



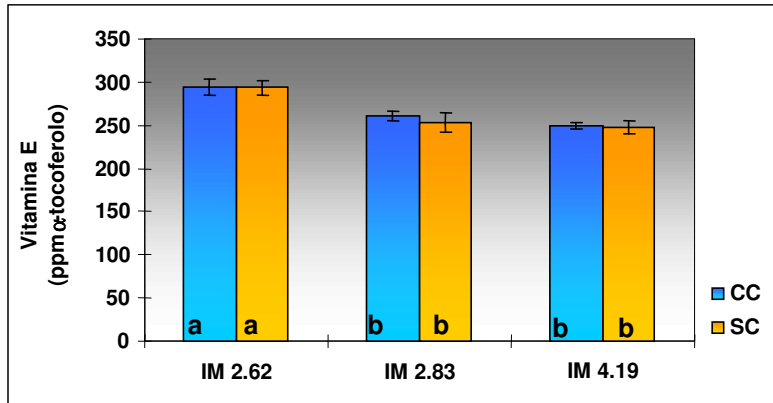
**FIGURA 4.9** - ANDAMENTO DEL CONTENUTO IN FENOLI TOTALI (ppm DI ACIDO GALLICO) AL VARIARE DELL'INDICE DI MATURAZIONE DEL LOTTO DI OLIVE UTILIZZATO (C1=2.62; C2=2.83 E C3=4.19 ) E DELL'EVENTUALE IMPIEGO DEL CRIOGENO NEL PROCESSO DI ESTRAZIONE. LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p=0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO.

Come facilmente deducibile osservando gli istogrammi proposti, il contenuto in fenoli totali è risultato sempre inferiore negli oli estratti operando in presenza del criogeno rispetto a quelli ottenuti in sua assenza. Un dato che appare in netto contrasto con quanto riportato in precedenza e che non trova una facile interpretazione.

Per quanto concerne invece la vitamina E (tocoferoli), non è possibile individuare, in questo caso, un chiaro effetto del criogeno visto che negli oli estratti se ne ritrovano quantitativi del tutto paragonabili a prescindere dall'eventuale impiego del criogeno.

Sulla base degli istogrammi riportati in figura 4.10, è possibile sottolinearne una diminuzione statisticamente significativa con il progredire della maturazione.





**FIGURA 4.10** - ANDAMENTO DEL CONTENUTO IN VITAMINA E (ppm DI  $\alpha$ -TOCOFEROLO) AL VARIARE DELL'INDICE DI MATURAZIONE DEL LOTTO DI OLIVE UTILIZZATO (C1=2.62; C2=2.83 E C3=4.19) E DELL'EVENTUALE IMPIEGO DEL CRIOGENO NEL PROCESSO DI ESTRAZIONE.

LETTERE DIVERSE SOTTOLINEANO L'ESISTENZA DI DIFFERENZE STATISTICAMENTE SIGNIFICATIVE ( $p=0.05$ ) CHE VENGONO A MANCARE QUANDO LE LETTERE COINCIDONO. L'ANALISI DELLA VARIANZA IN QUESTO CASO È STATA CONDOTTA SU TUTTE E TRE LE SERIE DI CAMPIONI CONTEMPORANEAMENTE.

#### **4.6. Effetto indotto dall'impiego del criogeno sulla resa di estrazione**

Al fine di evidenziare l'effetto indotto dall'impiego del criogeno sulla resa di estrazione vengono riportate in tabella 4.9 le rese in olio ottenute operando in presenza o meno del criogeno. Spesso queste determinazioni sono state condotte utilizzando lotti di olive che diversificandosi dagli altri per più di un parametro (simultanea variazione della cultivar, delle caratteristiche pedo-climatiche, dell'indice di maturazione, ecc.) non potevano essere utilmente raffrontati con quelli proposti in precedenza. Ma anche in questi casi i valori analitici relativi agli indici di qualità sono risultati sempre largamente superiori a quelli previsti per un olio extravergine di oliva. Ancora una volta viene sottolineato come l'apparato estrattivo utilizzato permetta di ottenere sempre e comunque degli oli di elevata qualità a prescindere dall'impiego o meno del criogeno, ovviamente se la qualità della materia prima lavorata sia tale da permettere di raggiungere questo risultato.

In tabella vengono riportati gli incrementi percentuali della resa ( $(RCC - RSC)/RSC \times 100$ ) calcolati sulla base delle differenze che intercorrono tra le rese ottenute utilizzando la stessa materia prima e quindi olive raccolte alla stessa data, conservate per lo stesso periodo nelle medesime condizioni operative (temperatura e composizione gassosa dell'atmosfera di conservazione) dopo aver proceduto preventivamente ad una omogeneizzazione meccanica al fine di uniformarne la distribuzione nelle due prove di estrazione con (RCC = resa con criogeno) e senza (RSC = resa senza criogeno) addizione del criogeno.

**TABELLA 4.9 - RESA ESTRATTIVA (KG OLIO ESTRATTO/KG OLIVE FRANTE %) DELLE PROVE DI ESTRAZIONE UTILIZZANDO LO STESSO LOTTO DI OLIVE E OPERANDO IN PRESENZA (RCC) O IN ASSENZA (RSC) DEL CRIOGENO E RELATIVO INCREMENTO PERCENTUALE (  $IPDR = (RCC - RSC / RSC \times 100)$  ). L'ANALISI STATISTICA È STATA CONDOTTA PREVIA TRASFORMAZIONE IN  $\arcsen \sqrt{p/100}$  ANGOLARE DEI DATI.**

<b>Prova</b>	<b>RCC</b>	<b>RSC</b>	<b>IPDR</b>
<b>1</b>	16.3	13.2	23.5%
<b>2</b>	15.2	14.6	4.1%
<b>3</b>	12.2	11.0	10.9%
<b>4</b>	13.0	11.8	10.2%
<b>5</b>	15.5	15.7	-1.3%
<b>6</b>	16.0	14.2	12.7%
<b>7</b>	8.8	8.5	3.5%
<b>8</b>	9.2	8.5	8.2%
<b>9</b>	12.6	8.5	48.2%
<b>10</b>	12.0	12.8	-6.2%
<b>11</b>	15.8	15.2	4.0%
<b>12</b>	14.8	14.5	2.2%
<b>13</b>	16.4	15.0	9.3%
<b>14</b>	17.3	16.2	6.8%
$\sum_{i=1}^{N=n. \text{ prove}} = \frac{IPDR_i}{N} \pm i.c. = 9.3 \pm 1.9$			

con :

$IPDR_i$  = incremento percentuale della resa

N = numero totale prove di estrazione (14)

i.c. = intervallo di confidenza ( $p=0.05$ )

Tranne che per le prove 5 e 10, i valori delle rese di estrazione appaiono superiori operando in presenza del criogeno piuttosto che in sua assenza, quindi le loro differenze tendono ad assumere valori maggiori di zero.

Poiché la media di queste differenze supera il corrispondente valore dell'intervallo di confidenza ( $p=0.05$ ), è possibile affermare, con il 99.5% di affidabilità, che la resa di estrazione in olio risulta statisticamente superiore operando in presenza del criogeno rispetto a quella ottenibile conducendo l'estrazione in sua assenza.

$$\Delta_{\text{medio}} \pm \text{i.c.} = \sum_{i=1}^N (RCC_i - RSC_i/N) \pm \text{i.c.} = + 1.1 \pm 0.7$$

con :

*RCC<sub>i</sub>* = resa estrattiva con criogeno

*RSC<sub>i</sub>* = resa estrattiva senza criogeno

*N* = numero totale prove di estrazione (14)

*i.c.* = intervallo di confidenza ( $p=0.05$ )

Per cui se impiegando la tecnologia di estrazione tradizionale fosse possibile estrarre 12.8 kg di olio (RSC medio) da un quintale di olive, l'impiego del criogeno permetterebbe di ricavare 13.9 kg, con un incremento percentuale di circa il 9%.

$$\eta = (13.9 - 12.8)/12.8 \times 100 \sim 9\%$$

Pur trattandosi di un dato certamente significativo, l'incremento nella resa di estrazione appare determinato, come già riportato in precedenza, dal grado di maturazione raggiunto dalle olive, dal loro contenuto in acqua, dal tempo e dalle modalità di conservazione adottate, dal rapporto tra peso di criogeno/peso olive.

#### **4.7. Qualità dell'olio e tecnologia estrattiva utilizzata**

Come già precedentemente ricordato e come viene evidenziato dai valori relativi ai principali parametri qualitativi (acidità libera, numero perossidi e indici spettrofotometrici, ecc.), in ogni serie di estrazioni, sono sempre stati ottenuti oli di elevata qualità, a prescindere dalla tecnologia estrattiva impiegata (addizione o meno del criogeno).

Infatti i valori ottenuti nel corso di questa attività sperimentale appaiono migliori non solo di quelli stabiliti per l'olio extravergine (Reg. 2568 /91 e s.m.i.), ma anche di quelli prescritti dai disciplinari adottati per codificare alcuni oli DOP.

Questo sembra attestare come l'apparato sperimentale utilizzato consenta di produrre oli di elevata qualità anche operando in assenza del criogeno, pertanto ogni miglioramento qualitativo dovuto all'utilizzo del criogeno tende ad assumere particolare significato dato che il confronto viene condotto con un olio di elevata qualità ottenuto utilizzando lo stesso apparato sperimentale ma senza l'ausilio del criogeno.

Accanto ai parametri sopra citati, sono stati determinati altri parametri composizionali, come il contenuto in fenoli totali, in vitamina E, in carotenoidi e in clorofille

In particolare in tabella 4.10 vengono riportati i contenuti in fenoli totali, espressi come ppm di acido gallico, presenti negli oli estratti utilizzando partite di olive diverse, e operando in presenza ed in assenza del criogeno.

Al fine di rendere confrontabili i dati ottenuti si è proceduto in modo del tutto analogo a quanto già riportato in precedenza per le rese di estrazione.

Le differenze riscontrate nei valori, operando in presenza e in assenza del criogeno sono state elaborate statisticamente al fine di determinarne la media e il relativo intervallo di confidenza (Tab. 4.10).

**TABELLA 4.10** - CONTENUTO IN FENOLI TOTALI (ppm ACIDO GALLICO) PRESENTE NEGLI OLI ESTRATTI UTILIZZANDO LO STESSO LOTTO DI OLIVE E OPERANDO IN PRESENZA (FTCC) O IN ASSENZA (FTSC) DEL CRIOGENO E RELATIVO INCREMENTO PERCENTUALE ( $IPFT = FTCC - FTSC / FTSC \times 100$ ). L'ANALISI STATISTICA È STATA CONDOTTA PREVIA TRASFORMAZIONE ANGOLARE DEI DATI

<b>Prova</b>	<b>FTCC</b>	<b>FTSC</b>	<b>IPFT</b>
1	502	450	11.6%
2	556	501	11.0%
3	341	335	1.8%
4	227	251	-9.6%
5	248	238	4.2%
6	186	251	-25.9%
7	44	36	22.2%
8	46	36	27.8%
9	54	36	50.0%
10	557	498	11.9%
11	537	428	25.5%
12	443	466	-4.9%
13	445	553	-19.5%
14	333	475	-29.9%

*N=n. prove*

$$\sum_{i=1}^N = \frac{IPFT_i \pm i.c.}{N} =$$

**5.1 ± 10.6**

con :

*IPFT<sub>i</sub>* = incremento percentuale fenoli totali

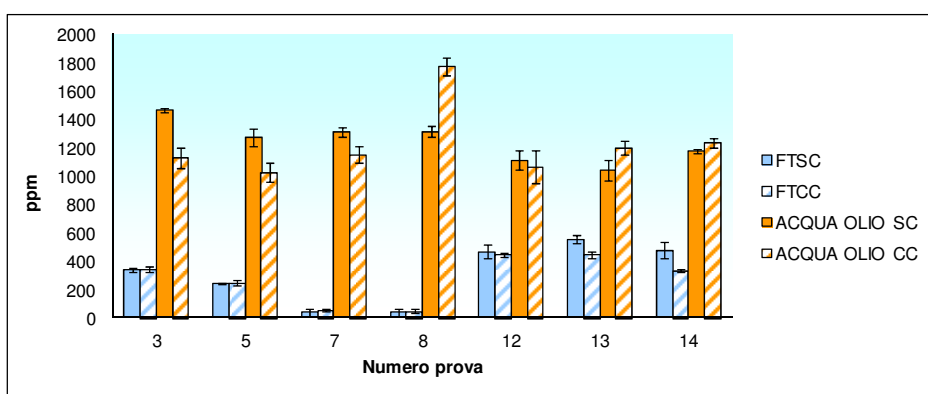
*N* = numero totale prove di estrazione (14)

*i.c.* = intervallo di confidenza (p=0.05)

I dati analitici ottenuti non appaiono in grado di evidenziare un chiaro effetto ascrivibile all'impiego del criogeno sul contenuto in fenoli totali. I valori di concentrazione ottenuti evidenziano un comportamento

altalenante, per cui il valore medio ottenuto dopo trasformazione angolare della differenza percentuale nel contenuto fenolico, operando in presenza o in assenza del criogeno, si presenta inferiore rispetto al suo intervallo di confidenza.

Al fine di trovare una possibile interpretazione logica alla distribuzione dei dati sperimentali e tenendo conto che una frazione dei fenoli dell'oliva è idrosolubile, è stato determinato il contenuto di acqua residua presente in alcuni degli oli ottenuti nel corso di questa sperimentazione (fig. 4.10)



**FIGURA 4.10** - ANDAMENTO DEL CONTENUTO IN FENOLI TOTALI (FT, ESPRESSI COME ppm DI ACIDO GALLICO) E ACQUA RESIDUA (ACQUA OLIO) AL VARIARE DELL'IMPIEGO DEL CRIOGENO (CC) O MENO (SC) NEL PROCESSO DI ESTRAZIONE.

Accanto a prove dove ad un maggiore contenuto di acqua nell'olio estratto operando in presenza del criogeno fa riscontro un maggior contenuto di fenoli totali (FTCC), ce ne sono altre dove la situazione appare completamente invertita. Per cui è possibile concludere che il contenuto in acqua dell'olio non appare facilmente e direttamente correlabile alla carica fenolica in questo presente.

In tabella 4.11 vengono riportati i dati relativi al contenuto in Vitamina E, seguendo lo stesso schema adottato in precedenza per le rese e per i fenoli totali.

**TABELLA 4.11** - CONTENUTO IN VITAMINA E (ppm  $\alpha$ -TOCOFEROLO) PRESENTE NEGLI OLI ESTRATTI UTILIZZANDO LO STESSO LOTTO DI OLIVE E OPERANDO IN PRESENZA (VECC) O IN ASSENZA (VESC) DEL CRIOGENO E RELATIVO INCREMENTO PERCENTUALE (IPVE =  $\frac{VECC_i - VESC_i}{VESC_i} \times 100$ ). L'ANALISI STATISTICA È STATA CONDOTTA PREVIA TRASFORMAZIONE ANGOLARE DEI DATI.

<b>Prova</b>	<b>VECC</b>	<b>VESC</b>	<b>IPVE</b>
<b>3</b>	206	198	4.0%
<b>4</b>	220	198	11.1%
<b>5</b>	197	189	4.2%
<b>6</b>	179	174	2.9%
<b>7</b>	294	257	14.4%
<b>8</b>	291	257	11.3%
<b>9</b>	286	257	13.3%
<b>10</b>	255	221	15.4%
<b>11</b>	135	125	8.0%
<b>12</b>	294	294	0.0%
<b>13</b>	261	253	3.2%
<b>14</b>	249	248	0.4%

$$\sum_{i=1}^{N=n. \text{ prove}} = \frac{(IPVE_i)}{N} \pm i.c. = 5.95 \pm 0.55$$

con :

$IPVE_i$  = incremento percentuale in vitamina E

$N$  = numero totale prove di estrazione (12)

$i.c.$  = intervallo di confidenza ( $p=0.05$ )

Come già osservato in precedenza, l'estraibilità della vitamina E sembra aumentare utilizzando la neve carbonica, con un incremento medio percentuale di circa il 6%, che si dimostra superiore al connesso intervallo di confidenza e quindi statisticamente significativo.



Per i contenuti in carotenoidi e in clorofilla non sono state riscontrate invece differenze statisticamente significative.

#### **4.8. Applicazioni e potenzialità della tecnologia analizzata**

L'aggiunta di CO<sub>2,s</sub> appare in grado di migliorare la resa estrattiva (+1%), un valore che appare influenzato da una molteplicità di variabili, tra cui il grado di maturazione raggiunto dalle olive, il loro contenuto in acqua, il tempo e le modalità di conservazione adottate, il rapporto tra peso criogeno/peso olive lavorate.

Poiché la resa di estrazione tende ad incrementarsi con l'incrementare del tenore idrico delle olive, potrebbe divenire opportuno lavorare olive a contenuto idrico superiore e quindi raccolte più precocemente, così da ridurre anche l'incidenza dei danni provocati dalla *Bactrocera oleae* (mosca dell'olivo) che causa non solo una perdita in prodotto vendibile (fino a - 60%), ma determina anche uno scadimento qualitativo dell'olio e in particolare di quello proveniente dalle regioni meridionali, dove più massicciamente incide l'attacco della mosca.

L'incremento della resa di estrazione inoltre comporta un evidente e immediato vantaggio commerciale per i produttori, che vedono così accresciuta la loro remunerazione a fronte della stessa quantità di olive conferite all'impianto di estrazione.

La tecnologia estrattiva consente di ottenere un olio extravergine di oliva più ricco in vitamina E (+6%) e quindi in componenti bioattivi, che vede accresciuta la sua qualità nutrizionale e le sue proprietà nutraceutiche, oltre a possedere un maggior potere antiossidante, che ne dovrebbe prolungare la shelf-life.

Grazie all'elevato tenore in componenti bioattivi, questo prodotto appare inoltre in grado di esprimere un più stretto legame con il proprio territorio di produzione, divenendo così più facilmente identificabile da parte dei consumatori che potrebbero essere disposti a sostenere anche un prezzo

più elevato, pur di assicurarsi un prodotto contraddistinto da una maggiore qualità e tipicità.

Questa tecnologia appare potenzialmente passibile di ulteriori miglioramenti, ottimizzando ad esempio lo sviluppo dei tempi e delle temperature in fase di gramolazione, così da arricchire il prodotto in composti ad attività aromatica e biologica.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Andrewes P, Busch JLHC, Joode T., Groenewegen A, Alexandre H. *Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycone as a key contributor to pungency*. J. Agric Food Chem 2003, 51: 1415-1420
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R. *Relationships between "green" odour notes and volatile compounds arising from lipoxygenase pathways*. Food chem. 2000; 68: 283-287.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R. *Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils*. Food chem. 2001; 72: 19-28.
- Angerosa F. *Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002; 104: 639-660.
- Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro GF. *Volatile compounds in virgine olive oils: occurrence and their relationship with the quality*. J Chromatogr. A, 2004, 1054: 17-31
- Angerosa F. *L'attuale lavorazione delle olive: pregi e difetti delle varie tecniche*. Olio d'oliva, all'origine della qualità, 2005; 14-24
- Di Giovacchino L., Solinas M., Miccoli M. *Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. 1994; 71: 1189-1194.
- Di Giovacchino L., *Technological Aspects*, Handbook of olive oil. Analyses and properties – Harwood J.L., Aparicio R., An Aspen Publication, 2000
- Di Giovacchino L., Sestili S., Di Vincenzo D. (2002) *Influence of olive processing on virgin olive oil quality*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2002; 104: 587-601.
- Di Giovacchino L., Costantini N., Ferrante M., Serraiocco A. *Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields*

*and chemical and organoleptical characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving.* Grasas y aceites. 2002; 53: 179-186.

- Gallina Toschi T., Biguzzi B., Cerretani L., Bendini A., Rotondi A., Lercker G. *Effect of crushing time and temperature of malaxation on the oxidative stability of a monovarietal extravirgin olive oil, obtained by different industrial processing systems.* Progress in nutrition 2004, 6: 132-138
- Garrido Fernández Díez M.J., Adamos M.R. *Table olives.* Hapman & Hall, London UK 1997, 67-109
- Gutiérrez-Rosales F., Perdiguero S., Gutiérrez R., Olias J.M. *Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil.* J Am Oil Chem Soc; 1992; 69(4): 394-395
- Gutierrez Rosales F., Rios J.J., Gòmes Rey L., *Main Polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. structural confirmation by on line hplc electrospray ionization mass spectrometry.* J Agric. Food Chem 2003; 51: 6021 – 6025
- Lercker G., Frega N., Bocci F., Mozzon M. *Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils: influence of the kneading of olive paste.* Grasas y Aceites. 1999; 50: 26-29.
- Lercker G. *Dalle olive all'olio: un viaggio alla scoperta del più nobile dei condimenti.* Ed. Filograf (FC) 2005.
- Luchetti F., *Introduction,* Handbook of olive oil. Analyses and properties – Harwood J.L., Aparicio R., An Aspen Publication, 2000; 0 1-16.
- Martinez Moreno J.M., Gomez Herrera C., Janer del Valle C. (1957) *Estudios fisicoquimicos sobre las pastas de aceitunas molidas. IV. Las gotas de aceite.* Grasas y Aceites. 1957; 8: 112-120.
- Minguez-Mosquera, M.I., L. Rejano-Navarro, B. Gandul-Rojas, A.H. Sanchez-Gomez and J. Garrido-Fernandez,. *Color-pigment correlation in virgin olive oil.* J. Am. Oil Chem. Soc., 1991; 68:

332-336.

- Montedoro, G.F., *I costituenti fenolici presenti negli oli vergini di oliva*, Sci. Tecnol. Alimenti, 1972; 2:177-186.
- Montedoro G.F., Baldioli M., Servili M., *I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*. Giornale Ital. di Nutriz. Clin.e Prev. 1992; 1: 19-3.
- Montedoro GF., Servili M., Selvaggini R., Begliomini A.L., Taticchi A., *“Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: the importance of the endogenous enzymes”*. ISHS Acta Horticulturae 586: IV International Symposium on Olive Growing, 2001
- Muzzalupo I., Stefanizzi F., Bucci C., Pellegrino M., Godino G., Perri E., *Il germoplasma olivicolo del CRA-OLI: caratterizzazione molecolare mediante marcatori micro satellite*. Acta Italus Hortus I convegno nazionale dell'olivo e dell'olio Portici 10/2009, 1:138-140
- Olias J.M., Pérez A.G., Rios J.J., Sanz L.C. *Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes*. J. Agric. Food Chem. 1993; 41: 2368-2373.
- Pagliarini E., Giovanelli G., Bruno Z. *Predictive study on Tuscan extravirgin olive oil stability under several commercial conditions*. J. Agric. Food Chem. 2000; 48: 1354-1361.
- Pocklington WD, Dieffenbacher A, *Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography*. Pure & appl. chem. 1988; 60(6):877
- Pokorny J., Kalinova L., Dysseler P., *Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oil*. Pure Appl Chem., 1995; 67, 1781-1787
- Ranalli A., Marchegiani V., Pardi D., Contento S., Pardi D., Girardi F., Kotti F. *Evaluation of Functional Phytochemicals in Destoned Virgin Olive Oil* Food Bioprocess Technol. 2009; 2:322–327

- Reg CEE 2568/91 della Commissione, dell'11 luglio 1991, relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti e s.m.i.
- Sciancalepore V. *Industrie agrarie (olearia, enologica, lattiero-casearia)*. 1998, UTET, Torino.
- Servili M., Baldioli M., Montedoro G. *Phenolic composition of virgin olive oil in relationship to some chemical and physical aspects of malaxation*. Acta Hortic. 1994; 356: 331-336.
- Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro G. *Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during the oil mechanical extraction process*. Acta Hortic. 1999; 474: 609-619.
- Servili M., Montedoro G.F. *Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality*. Eur.J. Lipid Sci. Technol. 2002; 104: 602-613.
- Servili M, Selvaggini R, Esposito S, Taticchi A, Montedoro GF and 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. 2004,1054:113-127.
- Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro G. *Air exposure time of olive pastes during the extraction process and phenolic and volatile composition of virgin olive oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. 2003; 80: 685-695.
- Servili M., Esposito S., Selvaggini R., Urbani S., Taticchi A., Montedoro GF *Effetto del processo della denocciolatura sulla qualità degli oli vergini di oliva e dei prodotti secondari dell'estrazione meccanica*. Proceedings of workshop "Olio da paste denocciolate. Nuove acquisizioni e prospettive di valorizzazione dell'olio e dei relativi sottoprodotti", 2006, Citta S. Angelo (Pescara-Italy)

- Servili M, Esposito S., Taticchi A., Urbani S., Selvaggini R., Di Maio I., Veneziani G. *Migliorare le proprietà salutistiche e sensoriali dell'olio extravergine: nuovi approcci tecnologici* Acta Italus Hortus Primo convegno Nazionale dell'Olio e dell'Olio Portici (NA) 10/2009 1:249-252)
- Uceda M., Frias L. *Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality.* Proceedings del Segundo Seminario Oleicola Internacional. COI, Cordoba – 1975; 125-128.
- Urbani S., *Valutazione degli antiossidanti dell'olio di oliva mediante iniezione diretta in HPLC con sistema di rivelazione fluorimetrica o spettroscopia di fluorescenza*, Tesi di dottorato, 2006
- Vasquez Roncero A., Graciani Costante E., Maestro Duran R. *Componentes fenolicos de la aceituna. Polifenoles de la pulpa.* Gracias Y Aceites 1974; 25: 269-279
- Vasquez Roncero A., *Les poliphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caracteristiques de l'huile.* Revue Francaise de Corps Grasse 1978, 25: 21-26
- [www.ismea.it](http://www.ismea.it)
- [www.internationaloliveoil.com](http://www.internationaloliveoil.com)
- Wang X, Quinn PJ *Vitamin E and its function in membranes* Prog Lipid Res 1999; 38:309
- Waterman E., Lockwood B. *Active components and clinical applications of olive oil.* Alternative Medicine Review. 2007; 12 (4): 331-342.
- Zinnai A., Venturi F., Calamita Y., Andrich G. *La criomacerazione prefermentativa nella produzione di vini di qualità.* Industria delle bevande. 2007; 209: 227

Ricerca finanziata dal **MIPAAF** (Ministero delle Politiche Agricole,  
Alimentari e Forestali)

I risultati ottenuti sono stati oggetto della richiesta di brevetto:  
n° **RM2010A000617**



## 6. RINGRAZIAMENTI

*Ringrazio i gruppi di ricerca del Prof Fabio Favati, del Prof Giovanni Lercker e della Dott.ssa Susanna Bartolini per la attiva collaborazione nello svolgimento della parte sperimentale del presente lavoro di tesi.*

*Ringrazio inoltre l'azienda Sara Arrigoni - La Spezia per aver collaborato nel corso della sperimentazione*

*Ringrazio infine il Prof Gianpaolo Andrich, la Prof.ssa Angela Zinnai, la Dott.ssa Francesca Venturi e il Dott. Sandro Silvestri del Dip.to di Biologia delle Piante Agrarie, per la disponibilità e i preziosi insegnamenti.*