



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
“ALIMENTAZIONE E NUTRIZIONE UMANA”**

Coordinatore: Prof.ssa Caterina Mammina

**TECNICHE ANALITICHE AVANZATE  
APPLICATE AL CONTROLLO QUALITÀ  
E TRACCIABILITÀ IN CAMPO  
ALIMENTARE**

Dottorando:

*Dott. Sergio Indelicato*

Tutor:

*Chiar.mo Prof.*

*Pasquale Agozzino*

*Triennio 2008 - 2010*



## SOMMARIO

<b>Cap. 1 - Tecniche analitiche avanzate applicate al controllo qualità e tracciabilità in campo alimentare</b>	<b>3</b>
<b>Cap. 2 - Determinazione della cultivar e valutazione dell' invecchiamento di oli di oliva siciliani mediante HPLC-MS e General Discriminant Analysis</b>	
Introduzione	9
Scopo	21
Materiali e metodi	22
Risultati e discussioni	26
Conclusioni	34
<b>Cap. 3 - Studio della componente aromatica e delle proprietà chimico fisiche di cultivar di albicocco precoci, intermedie e tardive</b>	
Introduzione	36
Scopo	43
Materiali e metodi	45
Risultati e discussioni	56
Conclusioni	69
<b>Cap. 4 - Studio della componente aromatica, tramite SPME-GC-MS, di olive verdi da mensa sottoposte a differenti trattamenti irrigui</b>	
Introduzione	71
Scopo	82
Materiali e metodi	83
Risultati e discussioni	90
Conclusioni	97
<b>Cap. 5 - Studio della componente aromatica e delle proprietà chimico fisiche di mele Annurca sottoposte a trattamento in melaio tramite GC-MS ed analisi statistica</b>	
Introduzione	99
Scopo	105
Materiali e metodi	106
Risultati e discussioni	116
Conclusioni	121

<b>Cap. 6 – Caratterizzazione del profilo proteico del latte d’asina</b>	
Introduzione	122
Scopo	127
Materiali e metodi	128
Risultati e discussioni	132
Conclusioni	147
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	149

## 1. **TECNICHE ANALITICHE AVANZATE APPLICATE AL CONTROLLO QUALITÀ E TRACCIABILITÀ IN CAMPO ALIMENTARE**

Nell'ultimo decennio è maturata nel consumatore una maggiore attenzione verso la salubrità degli alimenti e ciò ha indotto la Commissione Europea e, sul piano nazionale, il Ministero della Salute a considerare come priorità strategica il raggiungimento di standard più elevati possibili nella sicurezza alimentare.

Nonostante esistano legislazioni mirate su ogni specifico alimento, il numero di frodi nel campo alimentare è elevatissimo, soprattutto per gli alimenti di maggiore pregio e qualità e quindi di maggior valore economico.

Prodotti ortofrutticoli, vini, formaggi, oli, conserve ed insaccati sono oggetto di adulterazione e falsificazione in tutte le parti del mondo, a scapito di chi opera con serietà nel campo alimentare e, naturalmente, dei consumatori.

Gli alimenti maggiormente falsificati sono, spesso, quelli provenienti da determinate regioni (ad esempio prodotti DOP o IGP) o prodotti con lavorazioni specifiche (ad esempio l'olio extravergine di oliva) che, rispetto ad altri, hanno un valore aggiunto in grado di attrarre la scelta di un numero maggiore di consumatori. Questi fenomeni potrebbero essere contrastati con regolamentazioni più restrittive che però necessitano di un adeguato supporto tecnico-scientifico.

### **1. INNOVATIVE ANALYTICAL TECHNIQUES APPLIED TO QUALITY CONTROL AND TRACEABILITY OF FOOD**

*In the last decade consumers have focused even more attention on the wholesomeness of foods, so that the European Commission and the Italian Department of Health assess the achievement of high quality requirements in food security as a priority.*

*Although lots of regulations about each specific food have been established, several types of food frauds are still possible, mainly relating to fine and expensive foods.*

*Indeed, all around the world, fruit and vegetables, wine, cheeses, olive oils, conserves and sausages are victim of adulterations and falsifications, causing damage to scrupulous sellers and consumers.*

*The most common food falsifications are related to regional foods and products originating in specific regions (marketed as PDO and PGI) or foods obtained by means of particular processing techniques (i.e. extra-virgin olive oil). Indeed these products have a surplus value attracting the consumer's interest. It is indispensable to protect high quality products from the competition of low cost / poor quality ones and this could be obtained by means of more restrictive regulations along with proper objective analytical measurements.*

In questo contesto assume un'importanza notevole il concetto di tracciabilità, che nel settore agroalimentare è da qualche tempo divenuto oggetto di particolare attenzione tra gli imprenditori e i consumatori per le sue connessioni con le problematiche della sicurezza alimentare e dell'origine dei prodotti.

Con il termine tracciabilità si esprime la possibilità di risalire, attraverso i diversi passaggi della filiera produttiva, sino all'origine delle materie prime del prodotto finale. Ciò può avvenire mediante un procedimento di autocertificazione del produttore oppure, in maniera più dispendiosa ma scientificamente più corretta, attraverso la misura di alcuni parametri chimico-fisici che si suppone rimangano invariati durante il processo produttivo.

Nell'ultimo decennio la ricerca in campo agro-alimentare ha fatto notevoli passi in avanti verso lo sviluppo di metodiche di produzione o coltivazione alternative spinte dalle mutevoli esigenze di mercato e da nuove problematiche.

È il caso, ad esempio, delle tecniche di coltivazione che hanno come obiettivo la massimizzazione delle rese frutticole con input idrici ridotti. Ciò assume un'importanza elevata soprattutto se si considera l'attualità del problema del deficit di risorse idriche a livello mondiale. Così la certificazione della qualità dei prodotti ottenuti mediante tecniche innovative consente di stimarne l'accettabilità da parte dei consumatori e di conseguenza la reale possibilità d'applicazione di queste pratiche agricole alle coltivazioni su larga scala anche in zone semiaride, come quelle del bacino del Mediterraneo.

Nell'ottica di un mercato agro-alimentare globale, la selezione di nuove cultivar e lo sviluppo di processi di lavorazione o trasformazione post-raccolta dei prodotti che permettano risparmi di tempo e lavoro devono essere affiancati alla certificazione che i prodotti così ottenuti mantengano gli standard qualitativi elevati richiesti dal consumatore, seppur con costi concorrenziali.

*In this context, the concept of traceability in food processing become very important both for consumers and for entrepreneur, due to its relationships with food security and product origin.*

*The term traceability refers to the recording of all movement of a product and steps within its production process. This is possible either through maker's self-certifications or analytical measurements of chemical –physical attributes, specific of products.*

*In the last years agronomic research is developing new methods of production and farming in order to meet new market requirements or issues.*

*For examples alternative irrigation techniques have been developed in order to get a maximization of agronomic yield with reduced input of water. So, quality assessment of so-produced products is a key step for applicability evaluation of these innovative protocols on a large scale. It is very actual, considering the global lack of water.*

*New cultivars' selection and development of innovative methods of production, allowing saving up money and time, should be coupled with the certification that the consumers qualitative standards requirement are not affected.*

Durante il mio triennio di ricerca mi sono occupato di sviluppare delle metodiche di analisi di matrici agro-alimentari che fossero innovative, semplici e versatili, utili alla caratterizzazione di alimenti dal punto di vista chimico-fisico e organolettico, con particolare interesse a prodotti vegetali tipici della regione Sicilia.

Queste metodiche hanno previsto l'utilizzo di moderne tecniche di analisi quali, ad esempio, la Spettrometria di Massa accoppiata a tecniche separative cromatografiche come la Gas Cromatografia (GC) e la Cromatografia Liquida (LC). I dati strumentali ottenuti sono stati analizzati mediante analisi chemiometrica, un potente mezzo statistico in grado di estrapolare un gran numero di informazioni aggiuntive dai dati analitici, permettendo così l'ottenimento di una visione generale di un “problema” complesso, altrimenti non ottenibile con i classici strumenti di analisi dei dati.

I campi di applicazione sono stati i seguenti:

**1. Determinazione della cultivar e valutazione dell' invecchiamento di oli di oliva siciliani mediante HPLC-MS e Linear Discriminant Analysis**

Mediante HPLC/MS, utilizzando un Q-Tof premier (Waters) dotato di sorgente APCI, sono stati analizzati ottantaquattro campioni di olii di oliva siciliani provenienti dalle 8 diverse cultivars più rappresentate in Sicilia (Biancolilla, Cerasuola, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etna, Ogliadoro Messinese, Brandofino and Tonda Iblea). La preparazione del campione è veramente semplice, infatti i campioni di olio vengono esclusivamente diluiti senza alcuna derivatizzazione chimica. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad una successiva indagine statistica mediante General Discriminant Analysis (GDA) che ha consentito la discriminazione degli oli in base alle cultivar di origine. Inoltre mediante l'analisi della componente trigliceridica degli oli è stato possibile effettuare una discriminazione tra oli freschi e oli invecchiati di un anno.

Pasquale Agozzino, Giuseppe Avellone, David Bongiorno, Leopoldo Ceraulo, Serena Indelicato, Sergio Indelicato and Karoly Vekey. Determination of the cultivar and aging of Sicilian olive oils using HPLC-MS and linear discriminant analysis. *J. Mass. Spectrom.* **2010**, 45: 989–995

*During my PhD I developed innovative, robust, easy and versatile analytical methods in order to characterize and evaluate several foods coming from Sicily, by measuring physical, chemical and olfactory attributes. The developed analytical methods are based on innovative analytical techniques, such as Mass Spectrometry coupled with Gas Chromatography (GC) or Liquid Chromatography (LC) techniques. I analyzed the experimental data by chemometry, a powerful statistical analysis tool, able to get several additional information from raw data, otherwise not obtainable with classical analysis. My application fields are the following:*

**1. Determination of the cultivar and aging of Sicilian olive oils using HPLC-MS and Linear Discriminant Analysis**

*A large number of certified samples (84) of Sicilian olive oils arising from the eight cultivars most represented in Sicily (Biancolilla, Cerasuola, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etna, Ogliadoro Messinese, Brandofino and Tonda Iblea) have been collected and analyzed by HPLC/MS using an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source. The sample preparation is very simple; in fact, the oil samples are diluted without any chemical derivatization. A following statistical data treatment by general discriminant analysis (GDA) allows the determination of the olive oil cultivar. Furthermore, changes in the composition of glyceridic components of the olive oils lead to easy discrimination between fresh oils and 1-year-old samples.*

**2. Studio della componente aromatica e delle proprietà chimico fisiche di cultivar di albicocco precoci, intermedie e tardive**

Per ottenere delle albicocche di buona qualità è necessario che vi sia un corretto bilanciamento nel contenuto zuccherino e nel contenuto in acidi, così come un aroma adeguato. In questo lavoro sono stati valutati, mediante misurazione di proprietà chimico –fisiche e determinazione della componente aromatica, cultivar di albicocco precoci, intermedie e tardive. Mediante analisi multivariata, applicata alla componente aromatica ed alle caratteristiche qualità dei frutti, è stato possibile identificare gruppi costituiti da cultivar simili ed anche determinare una correlazione con il periodo di raccolta del frutto stesso. In base al profilo aromatico delle albicocche, è stato possibile riscontrare differenze tra le diverse cultivar e così, utilizzando la Principal Component Analysis, è stato possibile distinguere le cultivar in 3 diversi raggruppamenti. Nelle albicocche, sfruttando un’attenta analisi della componente aromatica dei frutti, si potrebbe ottenere un potente strumento per la classificazione dei genotipi in base al periodo di raccolta. Inoltre, facendo riferimento alle componenti volatili che contribuiscono maggiormente all’aroma, si potrebbero ricavare dei markers di qualità per selezionare il frutto con la migliore qualità.

Riccardo Lo Bianco, Vittorio Farina, Sergio Indelicato, Felice Filizzola and Pasquale Agozzino. Fruit physical, chemical and aromatic attributes of early, intermediate and late apricot cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **2010**; 90: 1008–1019.

**2. *Fruit physical, chemical and aromatic attributes of early, intermediate and late apricot cultivars***

*In order to reach good fruit quality, apricots require a balance of sugars and acids as well as a strong apricot aroma. In this study, fruit quality of early, intermediate and late apricot cultivars was evaluated by measuring physical, chemical and olfactory attributes. Multivariate analysis of quality and aroma attributes was used to identify groups of similar cultivars and association with ripening season. Physical, chemical and aromatic attributes showed great variation among cultivars but no relation to ripening season. Aromatic profiles (34 volatiles) of fruit tissues indicated qualitative and quantitative differences among cultivars. Linear functions were found to discriminate cultivars by ripening season and Principal Component Analysis was able to group cultivars in three groups. In apricot, detailed analysis of the aromatic profile may represent an efficient tool for classification of genotypes by ripening season, and volatiles with relevant odour contribution may serve as quality markers for selecting towards an extended ripening season of best quality apricots.*



**3. Studio della componente aromatica, tramite SPME-GC-MS, di olive verdi da mensa sottoposte a differenti trattamenti irrigui**

La qualità delle olive da mensa è fortemente influenzata dalle caratteristiche dell'olive, dal periodo di raccolta e dal trattamento tecnologico subito. La qualità delle olive è connessa anche ai trattamenti agronomici subito dall'albero da cui provengono, come ad esempio tecniche di stress idrico. Tra i parametri qualitativi, la componente volatile costituente l'aroma dei frutti influenza decisamente la scelta del consumatore. In questo studio sono state analizzate, durante il periodo di fermentazione, olive della cultivar Nocellara del Belice, provenienti da alberi soggetti a 4 diversi protocolli irrigui. Mediante analisi HS-GC/MS sono stati estratti 49 composti volatili, comprendenti alcoli, esteri, aldeidi, chetoni ed anche acidi. I risultati ottenuti hanno dimostrato come i differenti trattamenti agronomici influenzino la componente aromatica del campione, che mostra peraltro significative variazioni durante il processo di fermentazione.

**4. Studio della componente aromatica di mele Annurca sottoposte a trattamento in melaio tramite GC-MS ed analisi statistica**

Annurca è una cultivar di mele tradizionale che cresce principalmente nel Sud Italia. Dopo diverse selezioni genetiche, al fine di migliorare il colore della buccia dei frutti, sono stati ottenuti due nuovi cloni: Rossa del Sud e Bella del Sud. Secondo i protocolli tradizionali, dopo la raccolta questi frutti richiedono un periodo di esposizione al sole in melaio per ottenere una colorazione della buccia migliore. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'influenza di un periodo post raccolta in melaio più breve sulla qualità e la composizione della componente volatile di 3 diversi cloni di mele Annurca. Per ciascun frutto sono state valutate diverse caratteristiche chimico fisiche e la componente aromatica. I nostri risultati mostrano che trattamenti di 15 giorni in melaio migliorano notevolmente il colore della buccia e la qualità del frutto senza però causare una diminuzione della compattezza della polpa in tutti i cloni.

**3. Investigation on volatile compounds in table olives in response to deficit irrigation techniques, using SPME-GC-MS**

*Table olive quality depends on a number of factors, including fruit characteristics, ripening and processing technologies. Fruits features may depend on agronomic treatments on olive tree, such as deficit irrigation techniques. Volatile organic compounds in the headspace aroma, are responsible for the olive fruit flavour influencing the consumer's preference. In this study, volatile compounds, in Natural-style green olives of the Nocellara del Belice cultivar, coming from trees subjected to different deficit irrigation protocols, were analytically characterized during olives fermentation. Forty-nine compounds, comprising alcohols, aldehydes, ketones, esters as well as acids, were extracted by the Head Space Solid Phase Micro Extraction technique and identified by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Results suggest that different agronomic technologies affect the volatile composition of samples, showing significant variations in the course of fermentation process.*

**4. Investigation on aromatic attributes of sun-exposed 'Annurca' apples using GC-MS and statistical analysis**

*Annurca is an old cultivar mainly grown in Southern Italy. After intensive genetic work, two interesting clones have been selected for better peel coloration, namely Rossa del Sud and Bella del Sud. Harvest and postharvest practices are quite traditional and require a period of sun exposure to get good red peel color. The aim of this work was to test the effect of a shorter postharvest sun exposure (reddening) on fruit quality and extractable volatile composition of three clones of Annurca apple. Fresh weight, diameter, firmness, peel color, soluble solids, pH, titratable acidity, starch index, and volatile compounds were measured on fruits of each tree. Our results show that 15 days of reddening improve fruit peel coloration and internal quality without further decrease in flesh firmness in all clones.*

## **5. Caratterizzazione del profilo proteico del latte d’asina.**

Il latte d’asina è un tipo di latte frequentemente ben tollerato da pazienti affetti da allergia verso il latte vaccino e ciò è probabilmente correlato alla sua composizione proteica. Queste evidenze empiriche, supportate da alcuni *trials* clinici, devono necessariamente essere investigate e meglio comprese. Un’indagine preliminare è stata condotta sulla frazione proteica del latte d’asina di un campione commerciale di latte. Per tali scopi si è ricorso all’indagine RP-HPLC/ESI-MS/MS e all’analisi MALDI-TOF/MS ottenendo una parziale copertura della sequenza aminoacidica delle caseine  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$ .

## **5. Characterization of the protein profile of donkey’s milk**

*Donkey’s milk is often well tolerate by patients affected by cow’s milk protein allergy, probably thanks to its protein composition. This empiric evidence, confirmed by some clinical trials, needs to be better investigated. A preliminary survey on the protein fraction of donkey’s milk was carried out on a commercial milk sample. This has been and analysed by RP-HPLC/ESI-MS/MS and by MALDI-TOF/MS and a partial covering of aminoacidic sequences of  $\alpha_{s1}$  and  $\beta$  casein has been obtained.*

## **2. DETERMINAZIONE DELLA CULTIVAR E VALUTAZIONE DELL' INVECCHIAMENTO DI OLI DI OLIVA SICILIANI MEDIANTE HPLC-MS E GENERAL DISCRIMINANT ANALYSIS**

### **2.1 INTRODUZIONE**

L'olio di oliva è un prodotto ottenuto dalla spremitura della drupa dell'*Olea europaea*; è chimicamente definito come un grasso per la presenza di trigliceridi e di grassi poliinsaturi, ma contiene anche altre sostanze quali vitamine, polifenoli, fitosteroli, clorofilla e carotenoidi.

L'olio di oliva da millenni è protagonista nella tavola mediterranea ed è considerato non solo un semplice condimento, ma un vero e proprio alimento.

La varietà di aromi che esso può avere lo rende utilizzabile in qualunque tipo di cucina.

#### **2.1.1 Storia**

L'albero di ulivo e l'olio ricavato dai suoi frutti hanno accompagnato la storia dell'umanità. Circa 8000 anni fa l'ulivo veniva già coltivato in Medio Oriente e le prime coltivazioni si ebbero molto probabilmente in Siria o Creta. I Fenici in seguito diffusero questa coltivazione su tutte le coste del Mediterraneo, dell'Africa e del Sud Europa. Con i Greci le coltivazioni di ulivo divennero sempre più numerose, ma furono i Romani che provarono a coltivare, in ogni territorio conquistato, questi frutti polivalenti. E furono sempre i Romani che riuscirono ad ottimizzare gli strumenti per la spremitura delle olive e a perfezionare sempre di più le tecniche di conservazione dell'olio.

L'ulivo, i suoi frutti ed i prodotti da esso derivati sono da sempre presenti nella storia degli uomini sia nei riti sacri che nella vita quotidiana: l'olio di oliva, ad esempio, veniva utilizzato non solo per condire gli alimenti, ma anche in campo cosmetico come olio da massaggio e per la pulizia del corpo.

#### **2.1.2 Proprietà nutrizionali**

Se mettiamo a confronto le caratteristiche di vari oli vegetali, l'olio d'oliva mostra la maggiore digeribilità da parte dell'organismo umano, è facilmente assimilabile ed è un ottimo veicolatore di molte sostanze liposolubili come antiossidanti e vitamine, che altrimenti non verrebbero facilmente assorbite.

Caratteristica peculiare dell'olio di oliva è la presenza dell'acido oleico che, avendo la capacità di abbassare la concentrazione delle LDL, rende il colesterolo più solubile e quindi più facilmente eliminabile; effetto inverso ha invece sulle HDL, delle quali aumenta la concentrazione.

In virtù della presenza di elementi nutraceutici, l'olio d'oliva è considerato un alimento salutare in grado di esplicare un'azione protettiva nei confronti di cuore e arterie, prevenire l'aterosclerosi, combattere i radicali liberi e rallentare l'invecchiamento cellulare e perfino un'attività anti-infiammatoria.<sup>1,2,3</sup>

La sua azione benefica è favorita anche dalla presenza di vitamina E, polifenoli, fitosteroli, carotenoidi e sostanze antiossidanti protettive delle cellule.

La presenza di vitamina D permette una buona assunzione del calcio nell'intestino umano e di conseguenza una valida attività contro la decalcificazione ossea negli anziani.

Gli alimenti preparati con olio extra vergine presentano un'eccellente tollerabilità gastrica e intestinale. Esso, infatti, protegge le mucose ed evita gli effetti dell'ipercloridria, riducendo così i rischi di ulcere gastriche e duodenali, esercita un'azione lassativa, più efficace a digiuno, e contribuisce a correggere la stipsi cronica. Stimola inoltre la cistifellea e inibisce la secrezione della bile ed esplica un effetto protettivo contro la formazione di calcoli biliari, grazie all'attivazione del flusso biliare e all'aumento delle lipoproteine di alta densità (HDL).

Da un punto di vista nutrizionale è stato osservato che il consumo abituale di olio di oliva può aiutare a prevenire i tumori soprattutto a carico del colon.<sup>4</sup>

Di grande importanza senza dubbio per i bambini è il grande apporto di acido oleico, presente anche nel latte materno, e il ricco patrimonio in vitamine utili per l'accrescimento corporeo, la formazione delle ossa e la difesa contro le infezioni che lo rendono un alimento perfetto sotto ogni profilo.

### **2.1.3 Caratterizzazione dell'olio d'oliva**

La caratterizzazione dell'olio d'oliva si basa su:

- Caratteristiche organolettiche
- Caratteristiche chimico-fisiche

Le prime, determinate da un *panel test*, riguardano l'aroma, l'odore e il sapore dei vari tipi di olio.

Le seconde permettono di classificare gli oli in base alla composizione, al numero di perossidi, all'acidità e alla concentrazione dei polifenoli e ad altri parametri chimico-fisici.

Le caratteristiche di un olio sono influenzate da diversi fattori quali grado di maturità delle drupe, sistemi di coltivazione, cultivar delle olive dalle quali è prodotto, clima, sistemi di raccolta, modalità di estrazione e di conservazione del prodotto.

#### **2.1.3.1 Caratteristiche organolettiche**

L'analisi organolettica sull'olio d'oliva ha un'importanza rilevante nel giudizio della qualità finale del prodotto per confermare se un olio, che ha qualità chimiche opportune per essere considerato extra-vergine, soddisfi gli stessi requisiti anche dal punto di vista organolettico. Un olio che non sia organoletticamente accettabile, infatti, è declassato ad olio di pregio inferiore. Quest'analisi viene effettuata per mezzo di un tipo particolare di test, il *panel test*, basato sulle capacità di un gruppo di assaggiatori professionisti allenati all'apprezzamento delle caratteristiche olfattivo - gustative degli oli vergini. Essi effettuano una valutazione organolettica che viene impiegata per la classificazione merceologica degli oli.

In particolare, la normativa di riferimento (Allegato XII "Valutazione organolettica dell'olio di oliva vergine" del Reg. CEE n°2568/91) stabilisce la classificazione merceologica dell'olio in:

- **Extra vergine** con una valutazione uguale o superiore a 6,5;
- **Vergine** con una valutazione uguale o superiore a 5,5;
- **Vergine corrente** con una valutazione uguale o superiore a 3,5;
- **Lampante** con una valutazione inferiore a 3,5.

### 2.1.3.2 Caratteristiche chimiche

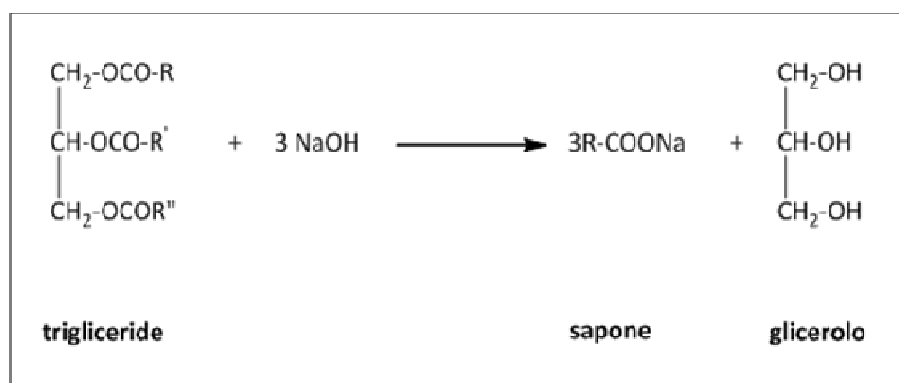
L'olio di oliva è un grasso che a temperatura ambiente (20 °C) si presenta allo stato liquido con una densità di circa 916 g·litro<sup>-1</sup>.<sup>5</sup>

È costituito per il 98-99% da una miscela di gliceridi, detta frazione "saponificabile" e per il rimanente 1-2% da un insieme di composti che rappresentano la frazione "insaponificabile", cioè la parte delle sostanze che non subiscono azione idrolitica se sottoposte all'azione di alcali concentrati. Quest'ultima è costituita da sostanze chimiche appartenenti a diverse classi come alcoli alifatici e triterpenici, steroli, idrocarburi, composti volatili e sostanze antiossidanti.

Un parametro chimico, basilare anche per la classificazione, è l'acidità libera, espressa come acido oleico e determinabile per titolazione, che non deve superare 0,8 per l'extravergine e 2,0 per il vergine.

#### 2.1.3.2.1 Frazione Saponificabile

Della frazione saponificabile fanno parte principalmente i trigliceridi. Questi, trattati a caldo con una base (NaOH o KOH) reagiscono formando i saponi, sali alcalini degli acidi grassi, secondo la reazione riportata in **Figura 1**.



**Figura 1:** Processo di saponificazione di un trigliceride.

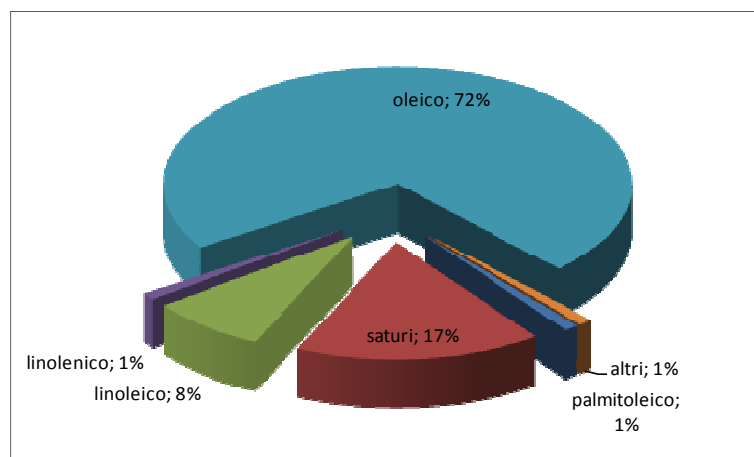
I trigliceridi si differenziano tra di loro per la natura e per il numero degli acidi grassi, uguali o diversi tra loro, che sono legati alla glicerina.

Gli acidi grassi, a loro volta, si distinguono in acidi grassi saturi e insaturi, in base alla presenza o meno di doppi legami, e in acidi grassi mono e polinsaturi, rispetto al numero dei doppi legami.

A temperatura ambiente gli acidi grassi saturi si presentano in forma solida, mentre quelli insaturi in forma liquida.

Se analizziamo la composizione acidica dell’olio d’oliva, solo il 16-17% degli acidi grassi è rappresentato da acidi grassi saturi come l’acido palmitico e l’acido stearico.

La frazione monoinsatura è invece la più abbondante, circa il 73%, ed è rappresentata dagli acidi oleico e palmitoleico (**Figura 2**).

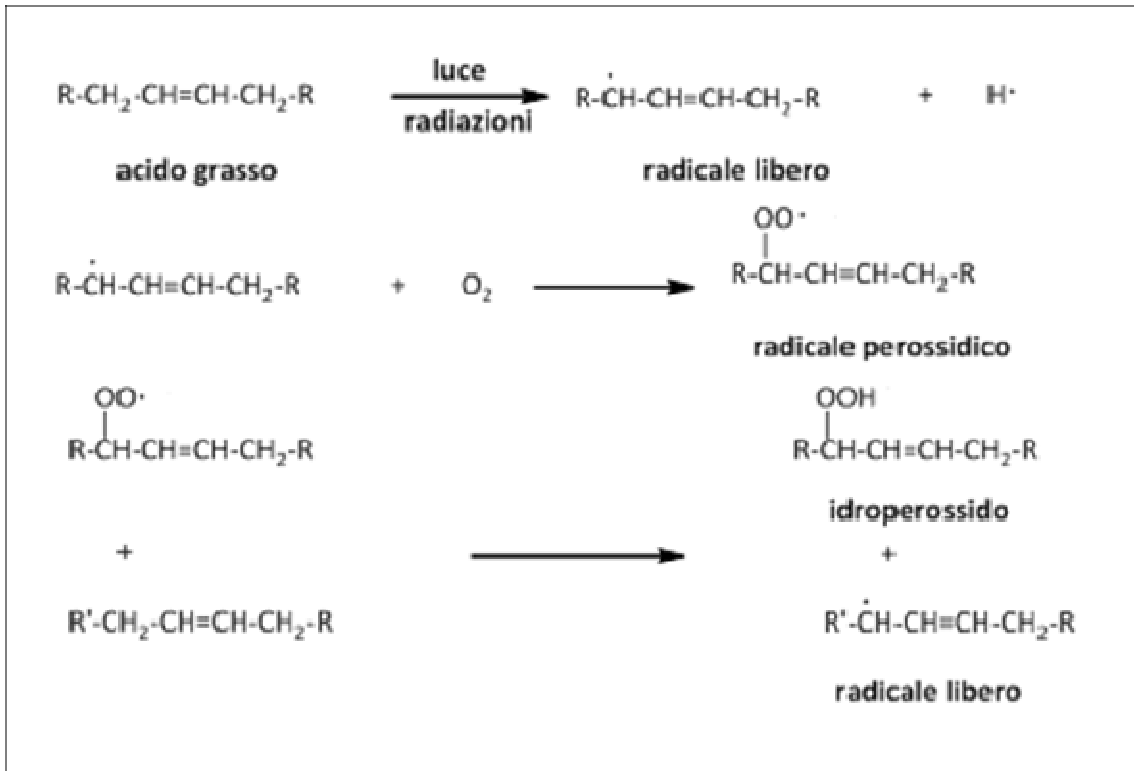


**Figura 2:** Distribuzione degli acidi grassi saturi e insaturi in oli di oliva.

Inoltre, negli oli di oliva sono presenti acidi grassi polinsaturi quali l’acido linoleico e linolenico, appartenenti alla classe degli “acidi grassi essenziali”, che devono essere assunti necessariamente con la dieta in quanto il nostro organismo non è in grado di sintetizzare queste molecole. Sono indispensabili per l’accrescimento e il funzionamento dei tessuti e svolgono svariate funzioni nel nostro organismo.

Quattro sono le caratteristiche essenziali degli acidi grassi presenti nei gliceridi dell’olio d’oliva: hanno un numero pari di atomi di C, presentano doppi legami non coniugati con isomeria cis e mai trans, ed infine quelli insaturi occupano di preferenza la posizione 2 della molecola del glicerolo.

La presenza dei legami insaturi negli acidi grassi, se da una parte conferisce agli oli particolari qualità biologiche, dall’altra li rende però soggetti al processo di irrancidimento<sup>6</sup> (**Figura 3**). Questo fenomeno ossidativo a vari stadi procede con una velocità che è proporzionale al numero dei doppi legami esistenti, ma è contrastato dalla presenza delle sostanze antiossidanti, che quindi permettono all’olio di avere una certa stabilità nel tempo al processo di irrancidimento.



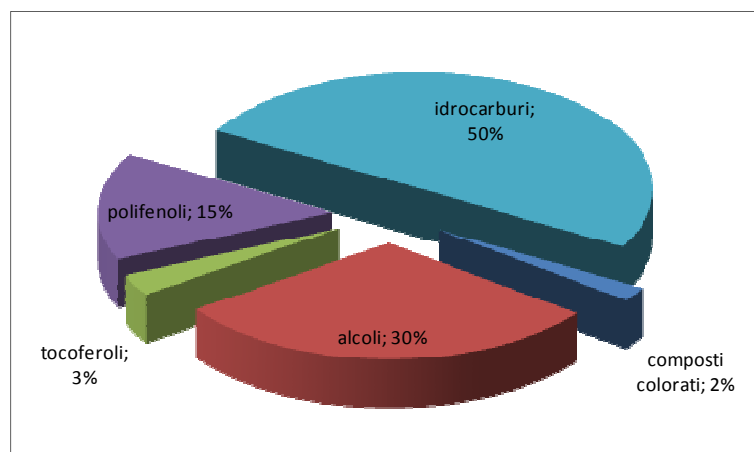
**Figura 3:** Processo di irrancidimento di acidi grassi insaturi.

#### 2.1.3.2.2 Frazione insaponificabile

La frazione insaponificabile in un olio di oliva rappresenta circa l'1-2% del totale ed è costituita da componenti che, seppur definite "minori", sono le principali responsabili delle superiori proprietà organolettiche dell'olio (profumi, odori e sapori) e delle sue proprietà benefiche (ad esempio la capacità antiossidante salutare per l'uomo e per la conservazione dell'olio stesso) (**Figura 4**).

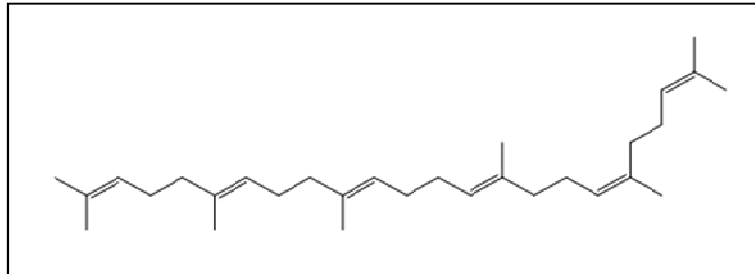
Tra le sostanze maggiormente presenti nella frazione insaponificabile ricordiamo gli idrocarburi, i polifenoli, gli alcoli, gli steroli, i tocoferoli ed i pigmenti colorati.

Sono inoltre presenti altri elementi secondari quali aldeidi, terpeni, esteri e chetoni: questi influenzano la nota aromatica dell'olio e sono coinvolti nella sua valutazione edonistica.



**Figura 4:** Costituenti della frazione insaponificabile.

**Idrocarburi:** rappresentano circa il 50% della frazione insaponificabile. Il maggior rappresentante è lo squalene (**Figura 5**), idrocarburo insaturo che incide sulle proprietà nutrizionali degli oli.

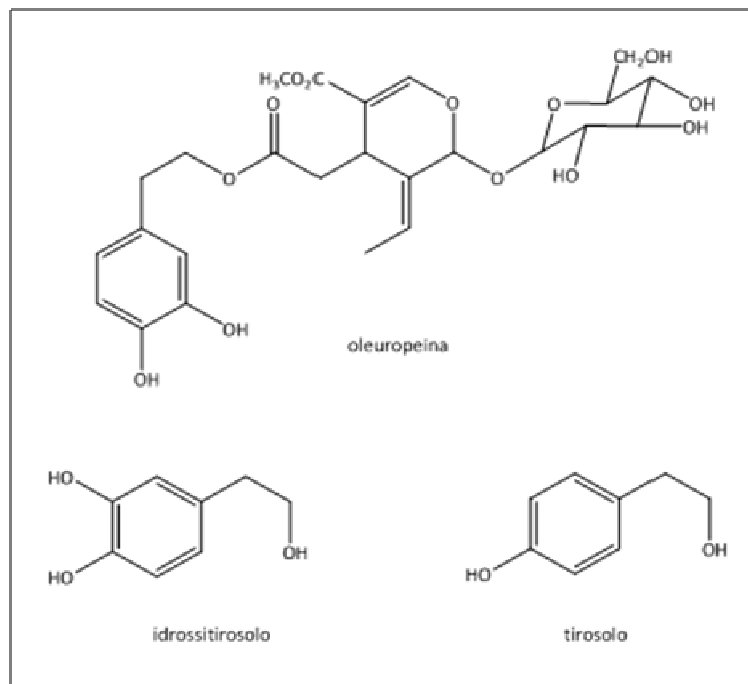


**Figura 5:** Struttura dello squalene.

**Composti fenolici:** rappresentati principalmente da glucosidi ed esteri, i composti fenolici dell'olio d'oliva sono sostanze antiossidanti utili per prevenire l'irrancidimento degli oli nel tempo perché subiscono il processo di ossidazione al posto degli acidi grassi;<sup>4</sup> la loro quantità dipende dalla cultivar e dallo stadio di maturazione al momento della raccolta.

Queste sostanze subiscono, principalmente nei processi di estrazione, attacchi enzimatici che causano una scissione dei polifenoli (**Figura 6**), di cui sono molto più ricche le olive, in molecole più semplici: i fenoli.

La loro presenza è avvertita da un sapore amaro e piccante e da un odore fruttato.

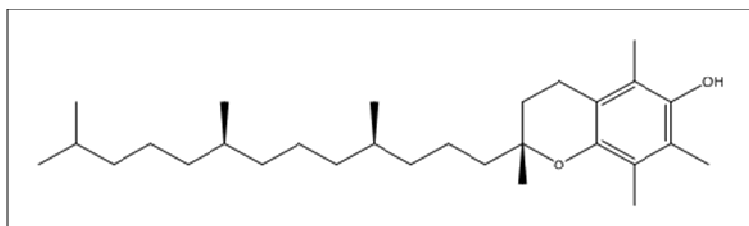


**Figura 6:** Esempi di polifenoli presenti negli oli di oliva.

**Tocoferoli:** sono presenti in forma  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Il 98% della componente tocoferolica è in forma  $\alpha$ .<sup>7</sup> Essa è la forma più attiva biologicamente ed è nota come vitamina E (**Figura 7**).



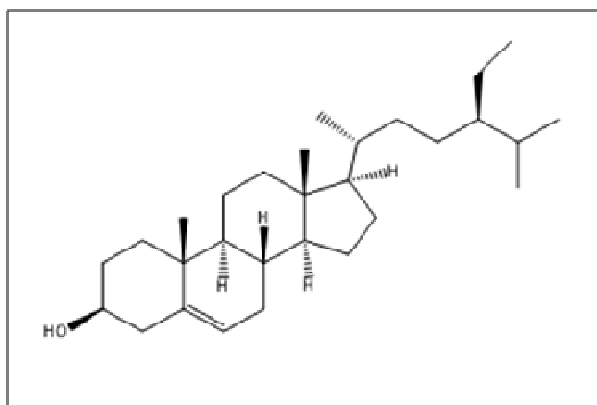
Anche queste sostanze esplicano un'azione antiossidante, utile non solo per la conservazione dell'olio ma anche per la loro azione protettiva nei confronti delle cellule.<sup>4</sup>



**Figura 7:** Struttura della Vitamina E (Tocoferolo forma  $\alpha$ ).

**Steroli:** le piante oleaginose hanno una composizione percentuale della frazione sterolica diversa per ciascuna cultivar.

Nell'olio d'oliva, in cui prevale la frazione del  $\beta$ -sitosterolo, sono stati identificati i seguenti steroli: campesterolo, uvaolo, stigmasterolo, eritrodiole e  $\beta$ -sitosterolo (**Figura 8**).



**Figura 8:** Struttura del beta sitosterolo.

**Pigmenti colorati:** sono i carotenoidi e le clorofille, responsabili delle colorazioni caratteristiche dell'olio d'oliva.

Le clorofille del tipo *a* e del tipo *b* conferiscono agli oli appena estratti un colore verde intenso e il loro contenuto può variare in relazione alla cultivar e allo stadio di maturazione delle olive.

I pigmenti colorati in presenza di luce agiscono sull'olio come pro-ossidanti, mentre al buio, in sinergia con i fenoli, lo proteggono dall'ossidazione.

**Alcoli:** vengono individuati soprattutto alcoli alifatici e triterpenici. Sono delle molecole molto volatili che, a basse temperature, contribuiscono a caratterizzare l'odore di un olio.

#### 2.1.4 Coltivazione dell'olivo in Italia

L'Italia è il secondo produttore in Europa e nel Mondo di olio di oliva, dopo la Spagna, con una produzione nazionale media di oltre 6 milioni di quintali, due terzi dei quali extravergine e con ben 37 denominazioni (DOP) riconosciute dall'Unione Europea.

La produzione di olio di oliva, in Italia, è prerogativa delle regioni centro-meridionali e soprattutto del Sud, in cui mediamente viene prodotto oltre l'85% della produzione nazionale media annua. In

particolare la Puglia è la regione con la maggiore produzione (37%) seguita da Calabria (33%) e Sicilia (9,5%).

Il patrimonio olivicolo italiano è stimato in 150 milioni di piante distribuite su una superficie di 1.165.458 ha e si sviluppa in misura del 64% in collina e del 19% in montagna, mentre in pianura si ha il rimanente 17% della superficie.

#### **2.1.4.1 Coltivazione dell’olivo in Sicilia**

Pur non essendo in assoluto tra le aree olearie più importanti del mondo, la Sicilia è tra le realtà più rilevanti per la qualità e la varietà della sua produzione. E in ciò vanta interessanti punti di forza:

- ricchezza del patrimonio genetico autoctono;
- prevalenza di aziende di produzione e trasformazione a carattere “non industriale”;
- clima favorevole, nonostante la sua variabilità;
- rilevante incidenza delle aziende in agricoltura biologica;
- produzione a denominazione d’origine protetta (DOP);
- organizzazione dei servizi allo sviluppo, per quanto attiene l’assistenza tecnica agli operatori della filiera olearia e le innovative iniziative in tema di sicurezza alimentare e valorizzazione delle caratteristiche organolettiche della produzione.

Essa è probabilmente la regione con il maggior numero di varietà di tutto il bacino del Mediterraneo: studi condotti dal Dipartimento di Colture Arboree dell’Università di Palermo, dai Servizi allo Sviluppo dell’Assessorato Regionale Agricoltura e dall’Ente di Sviluppo Agricolo, compiuti con rilevamenti bio-morfologici e genetici, hanno portato alla discriminazione di 28 cultivar certe.<sup>8</sup>

Il panorama varietale siciliano si caratterizza per la predominanza di otto cultivar (Biancolilla, Cerasuola, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etna, Ogialora Messinese, Santagatese, Tonda Iblea), le quali, assieme, coprono l’80% di tutti gli olivi coltivati in Sicilia. Tra queste cultivar, alcune hanno ampia diffusione nel territorio regionale, altre hanno una presenza circoscritta a particolari aree geografiche talvolta anche molto ristrette (**Figura 9**).

Sono altresì abbastanza significative altre sette cultivar (Brandofino, Crastu, Giarraffa, Minuta, Pidicuddara, Verdello, Zaituna) con diffusione più limitata ma che, nei comprensori di pertinenza, riscontrano ancora un certo favore per alcuni caratteri agronomici.

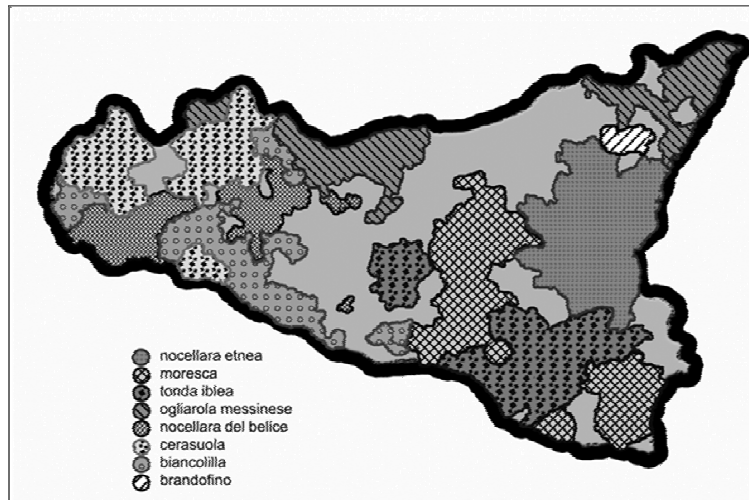


Figura 9: Distribuzione geografica delle principali 8 cultivar siciliane.

### 2.1.5 Frodi e tutela dell'olio d'oliva

L'olio d'oliva è uno dei più importanti prodotti alimentari italiani e rappresenta sicuramente l'olio edibile maggiormente impiegato in tutta l'area del Mediterraneo.<sup>9</sup>

Diversi sono gli oli presenti in commercio ottenuti per semplice spremitura delle olive, e tra questi, l'olio extravergine di oliva è indubbiamente il più pregiato, richiedendo un processo di produzione tramite frangitura, spremitura e centrifugazione condotto a basse temperature e senza alcun trattamento chimico. Gli oli extravergini, inoltre, devono presentare un bassissimo contenuto acidico (fino allo 0,8% di acidi grassi liberi, espresso come acido oleico) e sono sottoposti a *panel tests* per valutarne il gusto e l'aroma tipici dei prodotti più pregiati.

Sia perché parte integrante della dieta mediterranea, sia perché alimento che contiene numerose sostanze protettive per l'organismo, l'olio d'oliva ha ricevuto una particolare attenzione negli ultimi decenni, e diverse norme in sua tutela sono state istituite dall'International Olive Oil Council e dalla Commissione Europea.<sup>10</sup>

Al fine di proteggere i prodotti tipici regionali e per assicurare che soltanto prodotti originari di una specifica regione siano venduti come tali, l'Unione Europea ha istituito due marchi di tutela giuridica della denominazione, la DOP (Denominazione di Origine Protetta) e l'IGP (Indicazione Geografica Protetta) (**Figura 10**). Questi sono attribuiti a quegli alimenti le cui peculiari caratteristiche qualitative dipendono essenzialmente o esclusivamente dal territorio in cui sono prodotti. Gli oli extravergini di oliva siciliani, secondo il Regolamento del Consiglio (CEE) N. 2082/92 del 14 luglio 1992 relativo alle attestazioni di specificità dei prodotti agricoli ed alimentari, sono definiti DOP.

È opportuno sottolineare che i disciplinari di produzione per i marchi di Denominazione di Origine Protetta (DOP) prevedono norme molto restrittive e severe con l'intento di garantire un prodotto di qualità superiore: le varietà di olive usate devono essere autoctone; le olive devono essere prodotte in una zona geografica ben identificata ed in oliveti iscritti in apposito elenco; coltivazione, raccolta e trasformazione in olio devono avvenire attraverso l'utilizzo di tecniche tradizionali e da parte di

aziende o frantoi autorizzati; le analisi effettuate garantiscono le qualità organolettiche e chimico-fisiche tipiche del disciplinare del marchio.



Figura 10: Marchi di qualità IGP e DOP.

Nonostante tutte queste restrizioni attualmente presenti, gli oli extravergini di oliva italiani sono divenuti così redditizi che, ad oggi, le adulterazioni a loro carico sono la prima tipologia di frodi in campo agricolo-alimentare della Comunità Europea.<sup>9</sup>

Esso infatti risulta vittima di diversi tipi di frode:

- **Adulterazione:** le adulterazioni propriamente dette consistono nella sostituzione di una parte di un prodotto con un altro scadente o diverso o di basso costo. Talvolta gli oli extravergini di oliva vengono diluiti con oli di qualità inferiore, ad esempio vergine o vergine lampante o rettificato, o con oli non di oliva (ad esempio con olio di nocciola, la cui composizione chimica ed organolettica è molto simile a quella dell'olio d'oliva e ciò lo rende particolarmente adatto alla adulterazione);
- **Sofisticazione:** esempi tipici di sofisticazione sono l'aggiunta di coloranti o di sostanze aromatizzanti ad oli non di oliva oppure la raffinazione o il trattamento di oli meno pregiati al fine di migliorarne le caratteristiche;
- **Falsificazione:** rientra in questa categoria la vendita di oli vecchi o di miscele di questi come oli freschi;
- **Contraffazione:** esempio tipico di contraffazione è la falsa dichiarazione di origine geografica. A causa di una normativa vigente in materia di etichettatura non molto restrittiva, oli provenienti principalmente da paesi come Spagna, Grecia, Turchia e Tunisia (e non soltanto di qualità extravergine ma anche normale olio d'oliva o olio lampante) possono essere venduti in Italia all'interno di bottiglie che non sempre ne dichiarano la presenza o la tipologia. Il regolamento comunitario 1019/2002 dispone, infatti, che l'indicazione di provenienza è facoltativa, mentre se la percentuale di olio italiano raggiunge il 75%, allora l'olio può essere commercializzato come italiano, sempre che il restante olio provenga da un paese della UE.

Fortunatamente molte delle più comuni adulterazioni o sofisticazioni a carico dell'olio extravergine sono facilmente individuabili attraverso le normali tecniche analitiche utilizzate per monitorarne i parametri chimico-fisici. Quasi tutti i trattamenti cui un olio di scarsa qualità è sottoposto allo scopo di migliorarne le qualità, infatti, lasciano delle tracce nel prodotto finito come alterazioni nei valori caratteristici oppure determinano la scomparsa di sostanze *markers* di un olio di qualità o causano la comparsa di nuove sostanze altrimenti non riscontrabili in un olio di buona qualità.

Un numero dispari di atomi di C nelle catene alchiliche degli acidi grassi, ad esempio, è un segnale di sofisticazione, avendo gli acidi grassi dell'olio soltanto catene con numero pari di atomi di C (C14, C16, C18...). Attraverso un'analisi della componente saponificabile, effettuata ad esempio tramite Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC-MS) dopo opportuno trattamento di derivatizzazione, è possibile individuare il *pattern* in acidi grassi di un olio e di confrontarlo con quelli noti per i vari tipi di oli vegetali.

La presenza di doppi legami coniugati negli acidi grassi polinsaturi, rilevabile attraverso un'analisi UV, è indicativa, invece, di un processo di rettifica: la soda impiegata per deacidificare l'olio agisce sulla struttura dell'acido grasso, provocando lo slittamento dei doppi legami che diventano coniugati. Anche la decolorazione su terre attive di oli lampanti perossidati porta alla formazione di trieni coniugati e la formazione di composti chetonici che causano caratteristici assorbimenti all'UV.

Nella decolorazione con terre acidificate e nei trattamenti termici di deodorazione si formano isomeri di acidi grassi TRANS: una rotazione della molecola intorno a un doppio legame fa diventare la naturale configurazione CIS-CIS una configurazione TRANS-CIS, facendo perdere agli acidi grassi poliinsaturi che la subiscono molte delle loro proprietà benefiche.

Gli acidi grassi insaturi occupano di preferenza la posizione 2 della molecola del glicerolo, quindi la presenza di saturi in posizione 2 è indice di taglio con prodotti esterificati sintetici.

Nel caso di un olio di oliva proveniente dall'estrazione con esano delle sanse, si possono ritrovare nell'olio delle cere (monoesteri di un acido grasso e di un alcool a lunga catena) che il solvente ha estratto dalle bucce delle olive. Ci sono analisi che evidenziano questo tipo di trattamento in un olio di sansa che ha subito pure un processo di decerazione attraverso l'uso di acetone.

L'analisi GC degli steroli permette l'individuazione di frodi dovute anche a oli vegetali provenienti da piante modificate geneticamente: la composizione sterolica è tipica di ogni sostanza grassa, e può rivelarsi utile in quei casi in cui il taglio viene effettuato con piante oleaginose che danno oli di composizione acidica molto vicina a quella dell'olio di oliva, come l'olio di cartamo e di colza.

Lunghe e laboriose sono le metodiche in grado di stimare la freschezza di un olio e di distinguerne un diverso grado di conservazione. In particolare una prevede la determinazione, tramite GC, del rapporto dei diacilgliceridi (DG) 1,2/1,3<sup>30</sup> (dopo estrazione e silanizzazione della frazione gliceridica) ed un'altra prevede l'utilizzo combinato dei dati provenienti da un'analisi della componente volatile per la quantificazione del E-2-esenale ed un'analisi UV per la determinazione di  $K_{232}$  e  $K_{270}$ .<sup>31</sup>

### 2.1.5.1 Caratterizzazione degli oli di oliva e lotta alle frodi

I processi di sofisticazione a cui sono sottoposti gli oli diventano sempre più complessi e di conseguenza sempre più difficili da individuare, per cui, negli ultimi anni moltissimi studi sono stati condotti al fine di caratterizzare e quantificare ciascuna classe di sostanze presenti nell’olio d’oliva e numerosi e differenti approcci diversi sono stati adottati per provare a contrastare il fenomeno delle frodi. Questi includono sia *panel tests* sia metodologie analitiche e possono essere indirizzate o all’analisi delle componenti minori<sup>11,12,13,14,15,16,17</sup> oppure a quella delle frazioni principali o addirittura sull’olio nel suo complesso.<sup>18,19</sup>

- La frazione fenolica viene spesso analizzata tramite spettrofotometria UV-vis dopo specifico trattamento con una soluzione di molibdato di sodio<sup>13,20</sup>, ma anche tramite GC-MS come derivati metilici<sup>4</sup> e Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni accoppiata ad uno spettrometro di massa operante con una sorgente APCI (HPLC-APCI-MS) dopo purificazione mediante estrazione in fase solida;<sup>21</sup>
- I componenti non saponificabili dell’olio sono solitamente prima separati con una cromatografia su strato sottile (TLC) e successivamente analizzati come silil-derivati con GC;<sup>22</sup>
- Diversi metodi utilizzano HPLC e GC per la determinazione di steroli e tocoferoli;<sup>7,22, 23,24,25,26</sup>
- I carotenoidi vengono analizzati con HPLC o TLC con determinazione colorimetrica;<sup>7,27</sup>
- Per l’analisi dei prodotti di ossidazione, oltre ai classici metodi chimici e ai metodi basati su HPLC e GC, sono riportati anche estrazione in fase solida e saponificazione.<sup>27</sup>
- La frazione volatile viene analizzata tramite GC con analizzatori come il Detector ad Ionizzazione di Fiamma(FID) o lo spettrometro di massa (MS).<sup>7,22,28,29</sup>

## 2.2 SCOPO

Durante il mio lavoro di tesi, mi sono occupato di caratterizzare e discriminare oli provenienti dalle cultivar di olive più diffuse sul territorio siciliano, con finalità sia commerciali sia di controllo, nell’ambito di un progetto nato da una collaborazione con l’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana. Inoltre, poiché la qualità dell’olio potrebbe essere influenzata da diversi parametri agronomici e tecnologici,<sup>13,15,38</sup> sono state considerate anche le influenze del periodo di raccolta e della zona altimetrica di coltivazione sulla qualità finale degli oli analizzati.

Essendo la freschezza dell’olio un parametro difficilmente quantificabile se non con metodiche complesse e laboriose,<sup>30,31</sup> ma strettamente connesso con le sue qualità organolettiche e nutrizionali, in questo lavoro abbiamo anche analizzato l’influenza dell’invecchiamento su questo prodotto.

La mia attenzione si è rivolta verso la frazione più abbondante, quella triacilgliceridica. Questi composti possono essere analizzati secondo diversi approcci analitici<sup>32</sup> che vanno dalla GC accoppiata ad analizzatori come il FID o uno spettrometro di massa dopo opportuna derivatizzazione degli stessi per renderli sufficientemente volatili,<sup>33,34,35</sup> alla HPLC-MS,<sup>36</sup> alla Spettrometria di Massa MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*),<sup>37</sup> alla risonanza magnetica nucleare (NMR).<sup>38,39</sup>

In letteratura sono presenti numerosi lavori in cui alle suddette metodiche analitiche sono affiancate tecniche chemiometriche come la *Principal Component Analysis* (PCA)<sup>40,41</sup> o la *Cluster Analysis* (CA)<sup>42</sup> o la *Linear Discriminant Analysis* (LDA).<sup>40,41,43</sup> Un’elaborazione statistica dei dati analitici ottenuti, infatti, è spesso in grado di fornire delle informazioni più dettagliate su caratteristiche degli oli, non altrimenti ottenibili. Così, sulla base del contenuto in TAG (triacilgliceridi) sono state sviluppate, ad esempio, alcune metodiche in grado di effettuare distinzioni tra diversi oli vegetali edibili,<sup>44</sup> o tra oli di oliva di diverso tipo (oli extravergini da oli di minore qualità).<sup>45</sup>

In questo lavoro ho scelto di analizzare i numerosi campioni certificati di olio mediante HPLC-MS, con una metodica semplice e rapida. I dati analitici ottenuti sono stati, in seguito, trattati mediante un approccio chemiometrico attraverso l’uso della *General Discriminant Analysis* (GDA).

## **2.3 SEZIONE SPERIMENTALE**

### **2.3.1 Campioni**

Ottantaquattro campioni certificati di olio extravergine di oliva Siciliani provenienti da otto differenti cultivar (Biancolilla, Cerasuola, Moresca, Nocellara del Belice, Nocellara Etnea, Ogliadora Messinese, Brandofino e Tonda Iblea) ci sono stati forniti dai rispettivi produttori, coinvolti in un progetto di ricerca sulla qualità degli oli locali promosso dall’Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana. Ogni campione era accompagnato da una scheda dettagliata riportante precise informazioni sulla sua origine geografica, sulla cultivar di appartenenza delle olive, sul loro periodo di raccolta ed infine sulla zona altimetrica di coltivazione delle stesse. Le otto cultivar a cui appartengono gli oli analizzati sono sicuramente le più rappresentative nel patrimonio olivicolo siciliano, in quanto, nel complesso, rappresentano circa l’80% della biodiversità degli alberi di olivo coltivati in Sicilia.<sup>8</sup> Le olive sono state raccolte nell’annata del 2007 e, sulla base della loro data di raccolta, sono state suddivise in tre gruppi:

- a) Prima metà di novembre
- b) Seconda metà di novembre
- c) Dicembre

I campioni sono stati inoltre raggruppati sulla base della zona altimetrica di coltivazione delle olive in tre ulteriori gruppi:

- a) 0-150 m sul livello del mare (s.l.m.)
- b) 150-300 m s.l.m.
- c) Maggiore di 300 m s.l.m.

I campioni di olio di oliva sono stati conservati in un ambiente fresco, in assenza di luce ed analizzati entro tre mesi. Questi campioni sono stati considerati nel corso delle indagini come oli “freschi”. Per simulare la tipica conservazione casalinga di un olio, dei duplicati dei campioni “freschi” sono stati conservati in bottiglie ambrate, al buio e a temperatura ambiente, per un anno ed in seguito sono stati analizzati come campioni di olio “invecchiati”.

Uno degli obiettivi del lavoro è stato quello di ottimizzare il processo di preparazione dei campioni in modo da renderlo quanto più semplice possibile, evitando laboriose procedure di estrazione, derivatizzazione e trattamenti preliminari che richiedono molto tempo per essere effettuati.<sup>41</sup>

Il protocollo di preparazione del campione applicato risulta estremamente semplice e veloce: esso consiste in una semplice diluizione del campione di olio in metanolo acidificato con un rapporto di diluizione 1:3000 (0,5 µl di olio sono stati diluiti in 1,5 mL di metanolo allo 0,2 % di acido acetico glaciale).



### 2.3.2 Analisi HPLC-MS

L'analisi HPLC-MS eseguita sui campioni è stata ottimizzata al fine di ottenere una metodica in grado di fornire dati analitici dai quali si potessero estrapolare il massimo delle informazioni, separando e, laddove possibile identificando, il maggior numero di componenti con tempi di analisi non eccessivamente lunghi.

Per separare ed identificare i triacilgliceroli è stato applicato un metodo HPLC di tipo balistico<sup>41</sup> in cui durante l'analisi il cambiamento nella composizione della fase mobile avviene in modo repentino, senza l'utilizzo di rampe di variazione della concentrazione dei due eluenti nella miscela. Le analisi sono state effettuate su un sistema HPLC Alliance 2695 (Waters) equipaggiato di auto-campionatore, *degasser* e camera termostata per la colonna cromatografica, accoppiato con uno spettrometro di massa Q-ToF Premier (Waters) in cui un analizzatore quadrupolare è seguito da uno a tempo di volo.

I triacilgliceroli sono stati separati per mezzo di una colonna cromatografica Thermo beta Basic C-18 (5 cm × 2,1 mm *i.d.*, *particle size* 1,8 µm) termostata a 20 °C.

Volumi di 10 µl di campione diluito sono stati iniettati in duplicato utilizzando un auto campionatore termostato mantenuto a 4 °C. La corsa cromatografica è stata effettuata utilizzando il metodo a gradiente di concentrazione dei due eluenti A (metanolo/acqua, 90/10, v/v% + 0,2% acido acetico) e B (metanolo/n-esano, 90/10, v/v% + 0,2% acido acetico) riportato nella **Tabella 1**.

Tempo (min)	% Solvente A metanolo/acqua, 90/10 + 0,2% acido acetico	% Solvente B metanolo/n-esano, 90/10 + 0,2% acido acetico	Flusso (mL·min <sup>-1</sup> )
<b>0</b>	100	0	0,2
<b>1</b>	100	0	0,2
<b>1,01</b>	0	100	0,2
<b>10</b>	0	100	0,2
<b>12</b>	0	100	0,7
<b>20</b>	0	100	0,7
<b>21</b>	0	100	0,2
<b>31</b>	100	0	0,2

**Tabella 1:** gradiente cromatografico applicato.

Il metodo di massa prevedeva un *range* di massa da 300 a 1000 m/z, con un'accuratezza nella misura della massa di 5 ppm, ottenuta per mezzo della *lockspray*. In questa modalità si infonde durante l'analisi un opportuno calibrante attraverso una sorgente dedicata, e ciò permette un'elevata accuratezza nella rivelazione della massa degli ioni analizzati.

È stata inoltre applicata la modalità *Dynamic Range Enhancement* (DRE), tecnica che permette di mantenere un'elevata sensibilità, evitando al contempo la saturazione del *Multi Channel Plate* (MCP). Con questa tecnica lo strumento opera, infatti, due scansioni reali per ogni scansione completa del *range* di massa indicato. La prima scansione comporta un allontanamento del 90% delle specie ioniche presenti, mentre la seconda scansione implica la trasmissione totale degli ioni. Il *data system* integra le due informazioni ottenute moltiplicando opportunamente per 10 il valore di intensità ottenuto nella

prima scansione, e, verificato che nella seconda scansione gli ioni più abbondanti abbiano un'intensità compatibile con quella prevista, provvede alla generazione di uno spettro corretto in cui eventuali ioni in saturazione vengono evidenziati e vengono rilevati anche gli ioni di minore intensità. Con questo processo si ottiene un *range* dinamico prossimo ai quattro ordini di grandezza che permette contestualmente di apprezzare e quantificare correttamente sia i composti presenti a livello di traccia, sia i composti più abbondanti del campione.

Il secondo stadio del processo di ottimizzazione del metodo ha richiesto la definizione dei parametri relativi alla ionizzazione degli analiti realizzata attraverso la APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e quindi la definizione di un metodo di spettrometria di massa ad elevato *range* dinamico. Un *range* dinamico lineare ampio impedisce, infatti, che eventuali processi di saturazione del segnale riducano o annullino la validità statistica dei componenti principali, senza perdere comunque le informazioni relative alle componenti minori che spesso sono altrettanto caratterizzanti ciascun olio di oliva.

Le condizioni di ionizzazione APCI utilizzate sono le seguenti: modalità di ionizzazione, positiva; corona *probe current*, 4  $\mu\text{A}$ ; corona *voltage*, 3,6 KV; temperatura *probe*, 450,0 °C; *sampling cone*, 19,0 V; *extraction cone*, 4,3 V; *ion guide*, 1,2 V; temperatura della sorgente 90 °C, *cone gas*, N<sub>2</sub>, flusso 50,0 l·h<sup>-1</sup>; gas di desolvatazione, N<sub>2</sub>, flusso 600,0 l·h<sup>-1</sup>.

### 2.3.3 Analisi Statistica

I dati ottenuti dalle analisi HPLC-MS sono stati sottoposti ad un'analisi statistica utilizzando il *software* Statsoft Statistica 7.

Il set di dati è stato dapprima affinato, escludendo tutti quei picchi che non fossero comuni a tutti i campioni. I descrittori numerici inclusi nella matrice di dati finale sono stati in seguito ottenuti attraverso una procedura di normalizzazione dei dati, effettuata dividendo l'altezza dei picchi di ogni composto per la somma dell'altezza dei picchi di tutti i composti considerati. Questa normalizzazione è stata realizzata allo scopo di ridurre le variazioni intrinseche delle altezze dei picchi individuali dovute a imprecisioni nell'introduzione del campione o nella preparazione dello stesso. In questo modo il parametro numerico ottenuto è legato alla “purezza cromatografica percentuale” del prodotto isolato, piuttosto che alla sua quantità assoluta.

Dato il grandissimo numero di variabili di partenza, è stato adottato l'approccio *General Discriminant Analysis* (GDA) per analizzare il set di dati. GDA è un approccio multivariato della *Linear Discriminant Analysis* (LDA)<sup>46,47</sup> appartenente alle cosiddette regressioni statistiche *supervised*. In questo genere di regressione l'operatore conosce a priori gli *n* parametri di discriminazione che verranno sottoposti ad analisi e durante processo di creazione del modello statistico il sistema cerca di ottimizzare un algoritmo in grado di massimizzare le differenze tra i diversi gruppi.

Questo approccio statistico, dato un numero di variabili indipendenti (in questo caso l'espressione di purezza cromatografica di ogni componente), determina la massima varianza tra i gruppi espressi per

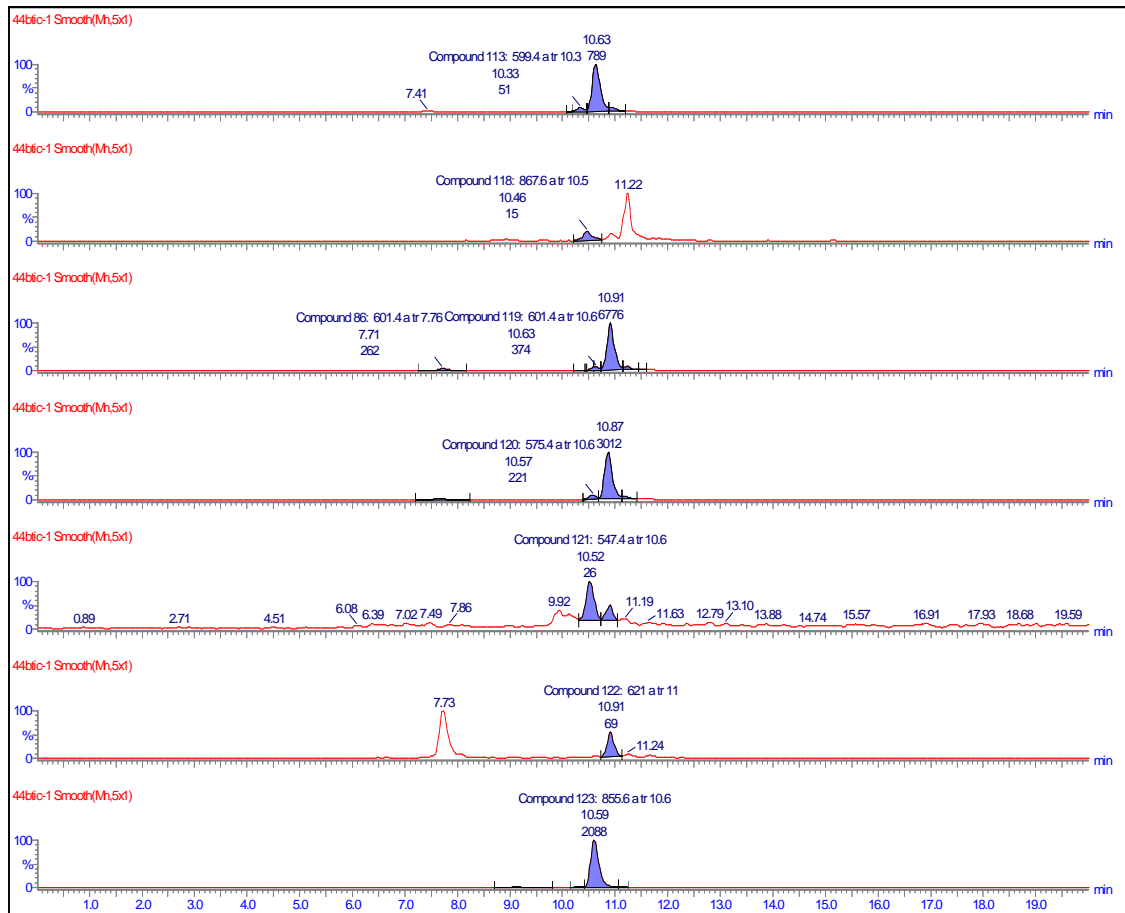
mezzo di  $n$  descrittori categorici (variabili dipendenti). La regressione statistica genera  $n-1$  *canonical roots*, contenenti le coordinate dei campioni (*canonical scores*) in uno spazio  $n-1$  dimensionale. L'efficacia della discriminazione può essere espressa da due fattori: il fattore  $F$  che corrisponde al rapporto tra la varianza tra i gruppi e la varianza entro il gruppo ed il fattore  $p$  che rappresenta la probabilità di una classificazione sbagliata, ed è inversamente proporzionale a  $F$ .

Valori di  $F$  elevati saranno sintomo di una buona segregazione dei gruppi, mentre i valori di  $p$ , indicativi di una buona significatività dell'analisi statistica, dovranno essere minimi e comunque inferiori al valore soglia di 0,05, che corrisponde ad una possibilità di corretta classificazione del 95%. Per discriminare i campioni di olio sulla base dei descrittori categorici come cultivar, zona altimetrica di coltivazione, periodo di raccolta ed età degli oli, è stato utilizzato il metodo di analisi detto *forward stepwise*. Esso consiste nel condurre l'analisi in modo “passo-passo incrementale”, aggiungendo di volta in volta una variabile nel modello statistico e verificando che il potere discriminatorio del modello aumenti.

La robustezza dei metodi statistici sviluppati è stata verificata mediante procedure di “validazione esterna”. Queste procedure analizzano l'accuratezza predittiva del modello statistico quando esso è applicato nella pratica. Nelle procedure di validazione esterna, infatti, i campioni (dei quali comunque si conoscono gli attributi o descrittori categorici) sono suddivisi in due sottoinsiemi, il *training set*, usato per costruire il modello statistico di analisi che in seguito verrà validato mediante in secondo set di dati, il *testing set*. Quest'ultimo è costituito da circa il 10% dei campioni totali, i quali sono esclusi durante la procedura di costruzione del modello statistico ed in esso alla fine sono sottomessi per essere analizzati come *unknown*, campioni incogniti cioè di cui si richiede la classificazione. La correttezza della attribuzione al loro gruppo di appartenenza è normalmente verificata automaticamente dal software, che processando i dati analitici e verificando la varianza mediante le variabili discriminanti attribuisce ad ogni campione incognito la più probabile classificazione. E questa procedura di suddivisione dei campioni può essere effettuata “manualmente” dall'operatore oppure può essere fatta in automatico dal software che è anche in grado di ripeterla per diversi cicli, al fine di avere una maggiore garanzia di robustezza del metodo.



degli analiti nei campioni di olio. Come parametro quantitativo si è scelto l'altezza del picco cromatografico degli ioni estratti corrispondenti ai singoli composti, mentre l'identificazione dei singoli componenti è stata effettuata sulla base del loro rapporto m/z e tempo di ritenzione relativo (r.r.t.) rispetto al picco più abbondante dello spettro, quello con m/z 603,5 al r.t. 11,27 min. (**Figura 12**). L'uso di un tempo di ritenzione relativo ci ha permesso di diminuire sensibilmente la variazione dei tempi di ritenzione, normalmente dovuta a variazioni della fase mobile o a un imperfetto equilibramento della fase stazionaria con l'eluente.



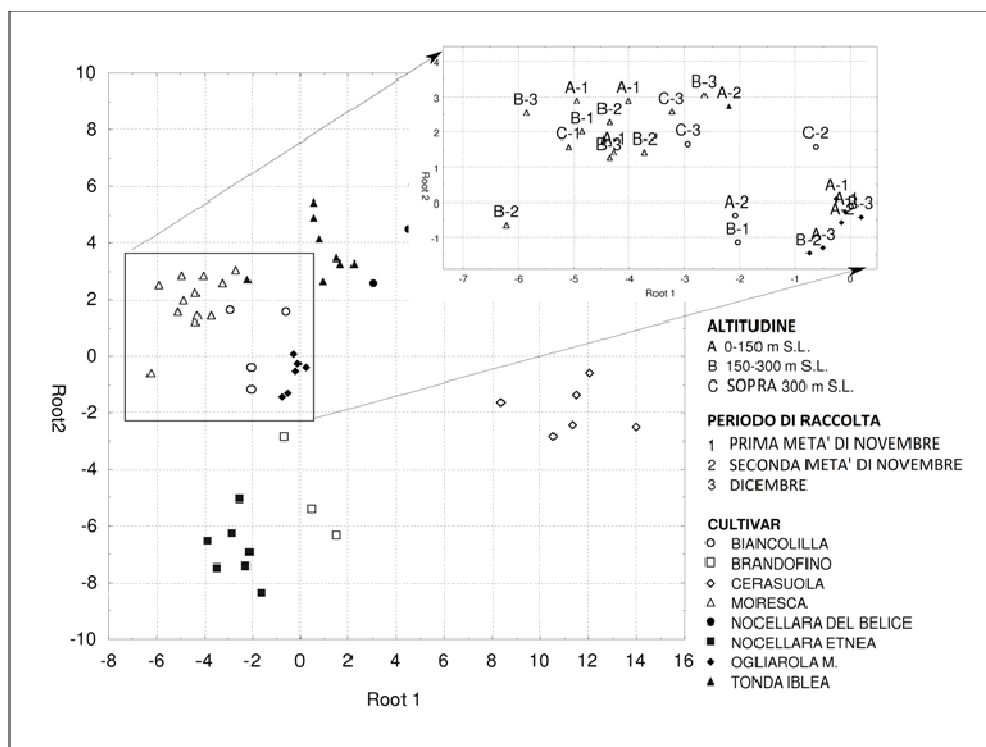
**Figura 12:** Esempio dei tracciati cromatografici relativi ad alcuni componenti minori identificati, mediante analisi scan-by-scan in uno dei campioni di olio di oliva.

I dati analitici così ottenuti sono stati quindi sottoposti ad analisi statistica utilizzando un approccio GDA per provare a discriminare i campioni di olio "freschi" in base alle loro cultivar di appartenenza. Già in un lavoro precedente avevamo ottenuto buoni risultati<sup>41</sup> con un'altra tecnica chemiometrica, l'LDA, con la quale utilizzando un esiguo numero di variabili (sette) eravamo riusciti a discriminare oli extravergini appartenenti a 3 cultivar siciliane. In questo caso però il numero maggiore di cultivar in esame (otto) si traduce in un maggior numero di gradi di libertà del sistema e quindi non ci è stato possibile ripetere una così buona discriminazione con un così esiguo numero di variabili. Per ottenere una buona classificazione, un sotto-set di 50 campioni, puri in composizione varietale (purezza > 90%)

è stato ricavato dagli 84 totali ed è stato analizzato. Il modello statistico è stato ottenuto attraverso una procedura “*stepwise*” che ha permesso di ridurre il numero di variabili finali a 10, evitando così il fenomeno di *overfitting*. In statistica, si parla di *overfitting* (eccessivo adattamento) quando, usando un numero eccessivo di parametri, un modello statistico si adatta ai dati osservati. Un modello insensato e sbagliato, infatti, può adattarsi perfettamente ai dati se è abbastanza complesso rispetto alla quantità di dati disponibili. Un minore numero di variabili richieste garantisce inoltre una maggiore portabilità del metodo su altra strumentazione. In particolare, le variabili selezionate dal metodo sono riportate in **Tabella 2**. Il grafico 2D relativo alla classificazione per cultivar è invece mostrato in **Figura 13**.

Modello	Variabili Discriminanti		
	m/z (MH+)	RT	AG
<i>Oli “freschi”, per cultivar</i>			
	575	10.9	OPo
	617	7.5	AO
	621	8.1	OO
	801	10.2	PoPoPo
	869	10.8	OLMo
	873	11.4	OMaO
	877	10.1	OLnLn
	889	11.7	SOS
	913	11.6	OGO
	913	11.6	OLA

**Tabella 2:** Lista delle variabili discriminanti utilizzate per discriminare le diverse cultivar di oli “freschi”. Abbreviazioni: RT, tempo di ritenzione; AG: acilgliceroli; Palmitoleico (Po), Palmitico (P), Eptadecanoico (Mo), Margarico (Ma), Linolenico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O), Stearico (S), Gadoleico (G), Arachidico (A).



**Figura 13:** Separazione delle cultivar di appartenenza degli oli di oliva “freschi” mediante GDA applicata ai dati analitici ottenuti mediante analisi HPLC-MS. Nell’analisi GDA, 10 variabili (intensità dei picchi) sono state usate per separare 50 campioni di olio di oliva extravergini. La validazione esterna mostra una probabilità di corretta identificazione del 98%.

I risultati finali dimostrano che la discriminazione di oli “freschi” (età inferiore ai tre mesi) in base alle cultivar di appartenenza è possibile. Il modello statistico è in grado di discriminare con una correttezza del 100% sia i campioni di volta in volta impiegati nella costruzione del modello stesso, sia i campioni utilizzati nel processo di validazione esterna. Gli stessi risultati sono stati ottenuti attraverso approcci di sviluppo stepwise backward removal e stepwise forward. Quest’ultima procedura, tuttavia, è stata preferita come approccio allo sviluppo del modello, in quanto ci ha permesso di ridurre il numero finale di variabili discriminanti fino a 10. Questo numero, garantendo un’effettiva discriminazione dei campioni essendo al tempo stesso un’attendibile base per ulteriori future investigazioni, rappresenta per noi un ottimo punto di arrivo. A causa della complessità del problema che implica otto gradi di libertà, non è possibile infatti ridurre il numero di variabili oltre un certo limite senza influenzare la buona segregazione degli analiti.

Anche se non strettamente necessario per l’analisi statistica, tutti i composti discriminanti sono stati identificati sulla base del peso molecolare e tempo di ritenzione, secondo quanto è riportato in letteratura e le strutture ipotizzate sono state confermate tramite il confronto degli spettri di massa con le frammentazioni attese.<sup>36,41</sup> I criteri di discriminazione ottenuti sono soddisfacenti, mostrando un buon rapporto tra varianza tra i gruppi/varianza all’interno dei gruppi ( $F \gg 1$ ) ed un ottimo livello di significatività ( $p < 0,05$ ) (**Tabella 3**).

	Ogliarola Messinese	Biancolilla	Nocellara Etnea	Brandofino	Nocellara Belice	Cerasuola	Moresca	Tonda Iblea
<i>Valori di F</i>								
<b>Ogliarola M.</b>		5,37090	15,05824	7,15830	11,72946	31,28952	15,66790	11,73816
<b>Biancolilla</b>	5,37090		13,46241	6,55594	12,59535	32,08172	8,81772	6,10772
<b>Nocellara Etnea</b>	15,05824	13,46241		4,17832	32,17727	45,10467	27,26901	32,05159
<b>Brandofino</b>	7,15830	6,55594	4,17832		15,79968	19,79485	16,82989	13,04029
<b>Nocellara Belice</b>	11,72946	12,59535	32,17727	15,79968		15,96893	19,80186	5,34270
<b>Cerasuola</b>	31,28952	32,08172	45,10467	19,79485	15,96893		63,21469	34,25231
<b>Moresca</b>	15,66790	8,81772	27,26901	16,82989	19,80186	63,21469		16,16688
<b>Tonda Iblea</b>	11,73816	6,10772	32,05159	13,04029	5,34270	34,25231	16,16688	
<i>Valori di p</i>								
<b>Ogliarola M.</b>		0,000203	0,000000	0,000018	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>Biancolilla</b>	0,000203		0,000000	0,000038	0,000000	0,000000	0,000002	0,000070
<b>Nocellara Etnea</b>	0,000000	0,000000		0,001326	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>Brandofino</b>	0,000018	0,000038	0,001326		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>Nocellara Belice</b>	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000212
<b>Cerasuola</b>	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
<b>Moresca</b>	0,000000	0,000002	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
<b>Tonda Iblea</b>	0,000000	0,000070	0,000000	0,000000	0,000212	0,000000	0,000000	

**Tabella 3:** valori F e p per la discriminazione tra le diverse cultivar di oli “freschi” analizzate utilizzando 10 variabili.

Con gli stessi dati analitici è stata provata la discriminazione dei campioni sulla base del periodo di raccolta (prima metà di novembre; seconda metà di novembre; Dicembre) e della zona altimetrica di coltivazione (0-150 m s.l.m.; 150-300 m s.l.m.; maggiore di 300 m s.l.m.). I risultati di queste analisi

statistiche dimostrano che questi parametri non influenzano la composizione in TAG in modo significativo. Come mostrato nell’inserito della **Figura 13**, infatti, i punti appartenenti alla stessa cultivar ma con differente zona altimetrica di coltivazione o periodo di raccolta si dispongono all’interno dello stesso gruppo vicini gli uni agli altri, non mostrando alcuna distribuzione spaziale dovuta a queste differenti caratteristiche. Questo dimostra che esiste una parziale compensazione per gli effetti del periodo di raccolta o altitudine di coltivazione sul grado di maturazione delle drupe e questo causa un certo livellamento delle differenze nella composizione chimica della frazione triacilgliceridica dovuto a questi effetti.

Un altro obiettivo di questo lavoro era studiare gli stessi campioni già analizzati “freschi”, dopo un anno di conservazione in condizioni controllate (simulando quelle casalinghe) per valutarne i cambiamenti nella composizione triacilgliceridica e per valutare se, sulla base di quest’ultima, fossero ancora presenti delle differenze apprezzabili e tali da rendere possibile una discriminazione degli oli in base alle diverse cultivar.

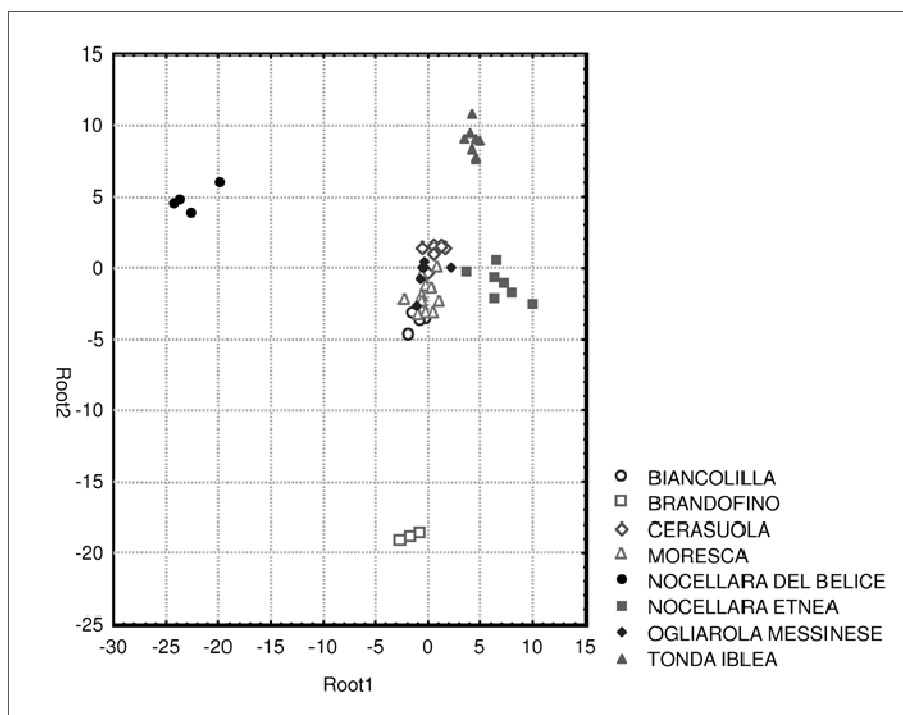
Abbiamo quindi analizzato i campioni “invecchiati” secondo la stessa metodica analitica descritta precedentemente per gli oli “freschi ” e sui dati ottenuti dall’analisi HPLC-MS abbiamo effettuato un’analisi statistica nel tentativo di discriminarli in base alla cultivar di appartenenza, a prescindere dalla loro freschezza. Analizzando quindi 100 campioni (50 “freschi” e 50 “invecchiati”) abbiamo ottenuto una discriminazione del 94% delle cultivar con un 92% di corretta attribuzione in validazione esterna utilizzando 20 variabili (figura non riportata). Nonostante i risultati dal punto statistico siano abbastanza buoni in termini di percentuale di corretta assegnazione e corretta validazione, il nuovo modello statistico non è stato in grado di distinguere in maniera adeguata tra oli appartenenti alle cultivar Biancolilla ed Ogliarola Messinese, mostrando per questa discriminazione un valore di  $p$  di 0,9. Questi risultati confermano che il processo di invecchiamento dei triacilgliceroli, principalmente rappresentato da idrolisi e ossidazioni,<sup>48</sup> portano ad un certo livellamento delle differenze nella composizione chimica tra i diversi campioni e di conseguenza nelle peculiari caratteristiche di ogni cultivar. Oltre a ciò, il numero di variabili necessarie alla discriminazione è risultato relativamente alto (20 variabili) e di conseguenza il modello statistico è stato scartato.

Queste considerazioni ci hanno portato, quindi, alla costruzione di uno specifico modello statistico interamente basato soltanto sugli oli “invecchiati”. Questo, attraverso l’utilizzo di 13 variabili discriminanti (**Tabella 4**) si è dimostrato capace di discriminare al 98% le diverse cultivar e di dare un 100% di corretta validazione esterna. Il grafico 2D relativo a questa classificazione per cultivar è mostrato in **Figura 14**.



Modello	Variabili Discriminanti		
	m/z (MH+)	RT	AG
<i>Oli “invecchiati”, per cultivar</i>			
	603	8.1	OO
	617	7.5	OLn
	617	7.5	AO
	801	10.2	PoPoPo
	829	10.5	OLM
	831	10.9	PLP
	831	10.5	OOM
	851	10.0	LnLnP
	871	11.1	OMoM
	873	11.4	OMaO
	913	11.6	OGO
	915	11.6	GOS
	943	12.5	OBO

**Tabella 4:** Lista delle variabili discriminanti utilizzate per discriminare le diverse cultivar di oli “freschi”. Abbreviazioni: RT, tempo di ritenzione; AG: acilgliceroli; Palmitoleico (Po), Palmitico (P), Eptadecanoico (Mo), Margarico (Ma), Linolenico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O), Stearico (S), Gadoleico (G), Arachidico (A), Behenico (B), Miristico (M).



**Figura 14:** Separazione delle cultivar di appartenenza degli oli di oliva “invecchiati” mediante GDA applicata ai dati analitici ottenuti mediante analisi HPLC-MS. Nell’analisi GDA, 13 variabili (intensità dei picchi) sono state usate per separare 50 campioni di olio. La validazione esterna mostra una probabilità di corretta identificazione del 100%.

	Ogliarola Messinese	Biancolilla	Nocellara Etnea	Brandofino	Nocellara Belice	Cerasuola	Moresca	Tonda Iblea
<i>Valori di F</i>								
<b>Ogliarola M.</b>		1,63240	13,39390	35,37328	56,25726	7,87386	1,85648	22,95601
<b>Biancolilla</b>	1,63240		12,39514	24,81233	44,99397	7,90179	2,57754	27,39657
<b>Nocellara Etnea</b>	13,39390	12,39514		41,36734	99,11268	21,85063	21,99682	28,60323
<b>Brandofino</b>	35,37328	24,81233	41,36734		66,57971	40,92785	37,67715	65,09831
<b>Nocellara Belice</b>	56,25726	44,99397	99,11268	66,57971		63,07396	73,09723	86,86638
<b>Cerasuola</b>	7,87386	7,90179	21,85063	40,92785	63,07396		13,32414	22,30967
<b>Moresca</b>	1,85648	2,57754	21,99682	37,67715	73,09723	13,32414		39,49656
<b>Tonda Iblea</b>	22,95601	27,39657	28,60323	65,09831	86,86638	22,30967	39,49656	
<i>Valori di p</i>								
<b>Ogliarola M.</b>		0,150372	0,000000	0,000000	0,000000	0,000015	0,097042	0,000000
<b>Biancolilla</b>	0,150372		0,000000	0,000000	0,000000	0,000015	0,024313	0,000000
<b>Nocellara Etnea</b>	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>Brandofino</b>	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
<b>Nocellara Belice</b>	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000	0,000000
<b>Cerasuola</b>	0,000015	0,000015	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000	0,000000
<b>Moresca</b>	0,097042	0,024313	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000		0,000000
<b>Tonda Iblea</b>	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	

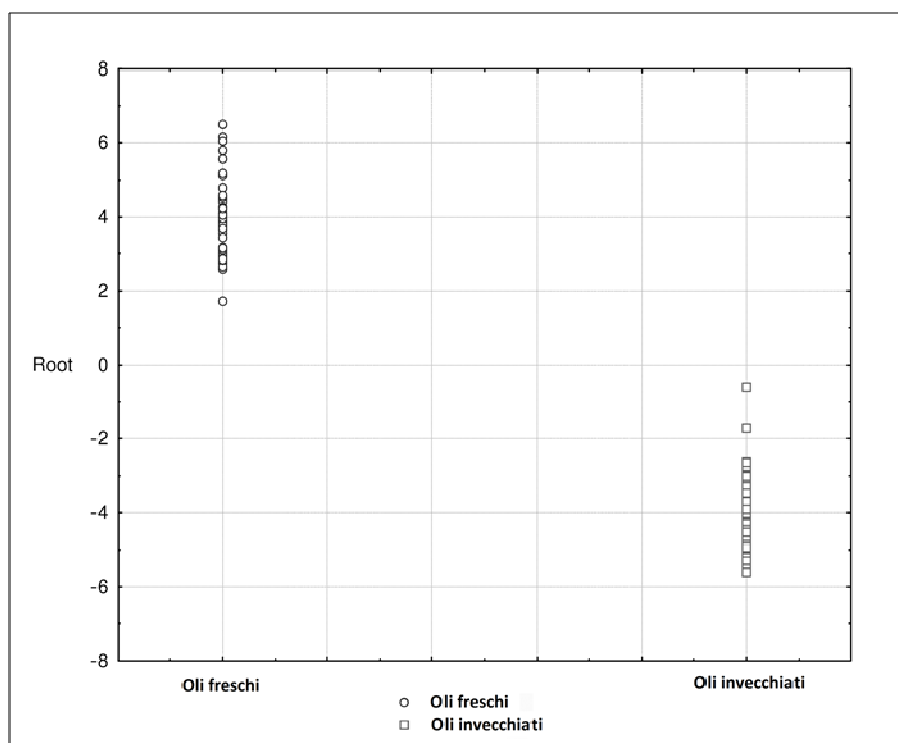
**Tabella 5:** valori  $F$  e  $p$  per la discriminazione tra le diverse cultivar di oli “invecchiati” analizzate utilizzando 13 variabili.

Anche in questa analisi i criteri di discriminazione ottenuti sono soddisfacenti, mostrando un buon rapporto tra la varianza tra i gruppi e quella all’interno dei gruppi ( $F \gg 1$ ) ed un ottimo livello di significatività ( $p \ll 0.05$ ) (**Tabella 5**).

Un ulteriore modello statistico è stato inoltre sviluppato per distinguere, indipendentemente dalla cultivar di appartenenza, oli “freschi” e oli “invecchiati”. Com’è ben noto, infatti, diversi effetti benefici e proprietà organolettiche degli oli di oliva sono strettamente legati alla freschezza del prodotto. Molti degli antiossidanti e dei composti volatili (che ne caratterizzano l’aroma), infatti, sono soggetti a processi di ossidazione e di progressiva deplezione col passare del tempo<sup>48</sup>. Così, chiaramente, oli vecchi oppure eventuali miscele di questi con oli freschi risultano prodotti meno attrattivi e di valore indubbiamente inferiore. In questo nuovo modello sviluppato, sottomettendo all’analisi i 100 campioni (50 “freschi” e 50 “invecchiati”), abbiamo ottenuto un’elevata discriminazione con un ridotto numero di variabili, pari a 5 (**Tabella 6**). La separazione ottenuta è mostrata in **Figura 15**. Sia i valori di  $F$  sia quelli di  $p$  ottenuti con questa analisi statistica sono molto buoni (**Tabella 7**).

Modello	Variabili Discriminanti		
	m/z (MH+)	RT	AG
<i>Oli "freschi" ed "invecchiati", per età</i>			
	603	8.1	OO
	805	11.3	POM
	885	11.3	OLS
	889	11.7	SOS
	971	13.0	LiOO

**Tabella 6:** Lista delle variabili discriminanti utilizzate per discriminare oli "freschi" ed "invecchiati" sulla base dell'età. Abbreviazioni: RT, tempo di ritenzione; AG: acilgliceroli; Palmitoleico (Po), Linoleico (L), Oleico (O), Stearico (S), Lignocericico (Li), Miristico (M).



**Figura 15:** Separazione degli oli di oliva "freschi" ed "invecchiati" mediante GDA applicata ai dati analitici ottenuti mediante analisi HPLC-MS. Nell'analisi GDA, 5 variabili (intensità dei picchi) sono state usate per separare 100 campioni di olio. La validazione esterna mostra una probabilità di corretta identificazione del 100%.

	Oli "freschi"	Oli "invecchiati"
<i>Valori di F</i>		
Oli "freschi"		254,7779
Oli "invecchiati"	254,7779	
<i>Valori di p</i>		
Oli "freschi"		0,000
Oli "invecchiati"	0,000	

**Tabella 7:** valori  $F$  e  $p$  per la discriminazione tra oli di oliva "freschi" ed "invecchiati" utilizzando 5 variabili.

Questo modello discriminatorio rappresenta quindi una nuova metodica più semplice, rapida e meno laboriosa per la caratterizzazione diretta del fenomeno di invecchiamento degli oli di oliva, rispetto a quelle già presenti in letteratura.<sup>30,31</sup>

## 2.5 CONCLUSIONI

La certificazione di qualità di un prodotto è particolarmente importante per identificare specialità regionali e prodotti di elevata qualità, così come gli oli extravergini di oliva. E' di fondamentale importanza, quindi, proteggere prodotti con un elevato valore di mercato ma anche di profondo interesse culturale (gli oli extravergini di oliva sono parte integrante della tradizione culturale italiana) da prodotti *low-cost*, di dubbia provenienza e dalle scarse qualità organolettiche e nutrizionali. Controllo di qualità implica che le frodi messe in atto possano essere individuate attraverso l'applicazione di misure analitiche obiettive.

In Sicilia, come detto, c'è una stretta corrispondenza tra le cultivar e la zona geografica in cui esse sono coltivate<sup>8</sup>. Di conseguenza, l'identificazione della cultivar di appartenenza di un prodotto derivato da olive siciliane, come ad esempio l'olio extravergine di oliva, potrebbe suggerire anche un'indicazione geografica di provenienza dello stesso.

La metodica analitica sviluppata in questo lavoro è basata su un'analisi HPLC-MS. E' facilmente applicabile anche al controllo qualità in ambito industriale e non necessita di alcuna procedura di purificazione né di derivatizzazione del campione. Grazie a questo richiede tempi di analisi relativamente brevi, soprattutto se confrontati con quelli necessari ad altre metodiche di analisi dello stesso tipo, e presenta caratteristiche tali da poter essere automatizzata in praticamente tutti i passaggi, il che ne accorcerebbe ulteriormente la durata. Il modello statistico sviluppato (GDA) permette facilmente di distinguere tra oli di oliva prodotti da ben 8 diverse cultivar. La procedura di validazione ha mostrato come esso sia non soltanto molto selettivo ma anche robusto.

Questo lavoro dimostra che l'approccio di studio dei dati analitici chemiometrico è uno strumento utilissimo per l'estrapolazione di informazioni non facilmente individuabili da una semplice analisi classica. Con una sola indagine strumentale sui campioni di olio la metodica statistica si è dimostrata in grado, ad esempio, non solo di discriminare le diverse cultivar degli oli analizzati, ma anche di identificare la degradazione cui è andato incontro l'olio extravergine con l'invecchiamento (i risultati mostrano chiaramente una grande differenza tra prodotti “freschi” e prodotti “invecchiati”), e di confermare che i processi di invecchiamento portano ad un certo livellamento in quelle che sono le differenze nelle caratteristiche peculiari delle varie cultivar.

I risultati mostrano anche come l'altitudine di coltivazione o il periodo di raccolta siano parametri che tendono a compensarsi l'un l'altro dimostrando che la scelta di un'anticipazione o un ritardo nella raccolta potrebbe effettivamente essere usato per garantire un'alta qualità del prodotto.

Sembrerebbe infine che la metodologia descritta sia in grado di adeguarsi al meglio anche per la verifica di altre caratteristiche degli oli di oliva, e potrebbe essere tranquillamente applicata anche all'identificazione di altri oli vegetali oppure al riconoscimento qualitativo di miscele di oli freschi e invecchiati a scopo di frode.

Attraverso questo lavoro rimane ampiamente dimostrato come un utilizzo delle moderne tecniche di analisi strumentale, accoppiate con metodi di indagine statistica, stia sempre più avvicinando la

possibilità di riconoscimento, sul prodotto finito, di alcuni passaggi del processo produttivo. Chiaramente l'individuazione di eventuali *markers* per cultivar, periodi di raccolta o zone di provenienza, sarebbe l'auspicabile, ma difficilmente realizzabile, soluzione definitiva. Rimane comunque evidente che i risultati ottenuti potrebbero permettere una certificazione a posteriori di prodotti di qualità, come ulteriore garanzia di fattori meritori quali processi di produzione in purezza di oli ottenuti da cultivar pregiate o indicazione di un processo di raccolta e molitura precoce.

**3. STUDIO DELLA COMPONENTE AROMATICA E DELLE PROPRIETA  
CHIMICO FISICHE DI CULTIVAR DI ALBICOCCO PRECOCI,  
INTERMEDIE E TARDIVE**

**3.1 INTRODUZIONE**

L'albicocco (*Prunus armeniaca*) è un albero originario della Cina e dell'Asia Centrale che vanta circa 4000 anni di storia.

Come classificazione tassonomica, la pianta appartiene alla famiglia delle Rosacee, sottofamiglia delle Prunoidee, genere *Prunus*, specie *armeniaca*.

Alla stessa famiglia e genere appartengono altri alberi da frutto, quali ciliegio (*Prunus avium*), pesco (*Prunus persica*), prugno (*Prunus domestica*) ed il mandorlo (*Prunus amygdalus o Prunus dulcis*).

L'albicocco (**Figura 1**) è una pianta di media grandezza che presenta un'altezza a pieno sviluppo che generalmente varia dai 5 ai 7 metri. Anche se allo stato selvatico possono superare i 10 metri, nelle coltivazioni di solito gli alberi vengono mantenuti al di sotto dei 3 metri per facilitarne la raccolta dei frutti, le albicocche.

La coltivazione dell'albicocco richiede preferenzialmente un clima asciutto temperato e terreni sciolti. Anche se l'albero sopporta abbastanza bene le temperature rigide invernali, la precocità della sua fioritura, che come in tutti i *Prunus* avviene prima della fogliazione, lo rende particolarmente sensibile alle gelate primaverili.

La maturazione delle albicocche richiede un periodo che va dai 3 ai 6 mesi e la raccolta viene eseguita manualmente da maggio fino alla metà di luglio.



**Figura 1.** Suggestiva immagine di un albicocco (*Prunus armeniaca*) in fiore.

### 3.1.1 Storia

Secondo la tradizione, fu Alessandro Magno a scoprire la pianta durante una spedizione in Armenia (terra da cui prese il nome scientifico, *Prunus armeniaca*) da dove fu importata in Europa ad opera del Generale romano Lucullus (106-57 D. C.).

In seguito i Romani e nel corso dei secoli anche gli Arabi (il termine albicocca è di derivazione araba, “al-barquq”), favorirono la sua diffusione nell’Europa del sud apprezzando non soltanto il sapore e le indubbe qualità alimentari, ma anche le sue proprietà officinali.

Oggi è una delle coltivazioni più diffuse nel bacino del Mediterraneo, ma è ampiamente coltivata anche in tutta l’America ed è stata introdotta con grande successo anche in Australia.

### 3.1.2 L’albicocca

Il frutto dell’albicocco, l’albicocca, è una drupa che ha forma tondeggianti o ovale, con buccia di colore giallo-arancio, spesso sfumata di rosso, lievemente vellutata e presenta un solco longitudinale più o meno pronunciato. La polpa è dolce, aromatica e possiede un seme singolo all’interno di un nocciolo molto duro. Esistono molte varietà di albicocche tutte abbastanza simili nel sapore, ma che possono variare nella grandezza e nel colore del frutto. Esse sono coltivate principalmente negli Stati Uniti e nei paesi che si affacciano nel Mediterraneo come Turchia, Italia, Spagna e Grecia.

L’albicocca è un frutto molto nutriente ricco di vitamine, tra le quali le più abbondanti sono la B1, B2, C, PP (**Tabella 1 e 2**). Le albicocche sono inoltre particolarmente ricche di carotenoidi, importantissima classe di composti che fungono da provitamine, venendo trasformati dall’organismo in vitamina A.

NUTRIENTI	UNITÀ	VALORE PER 100 g
Acqua	g	86,35
Calorie	kcal	48
Calorie	kJ	201
Proteine	g	1,40
Lipidi	g	0,39
Ceneri	g	0,75
Carboidrati (per differenza)	g	11,12
Fibre	g	2,0
Zuccheri	g	9,24
Saccarosio	g	5,87
Glucosio (destrosio)	g	2,37
Fruttosio	g	0,94
Maltosio	g	0,06

**Tabella 1:** Composizione media per 100 g di frutto.

VITAMINE	UNITÀ	VALORE PER 100 g
Vitamina C, acido ascorbico	mg	10,0
Tiamina (B-1)	mg	0,030
Riboflavina (B-2)	mg	0,040
Niacina (B-3)	mg	0,600
Acido pantotenico (B-5)	mg	0,240
Vitamina (B-6)	mg	0,054
Folati, totali	µg	9
Folato, alimentare	µg	9
Vitamina A, UI	UI	1926
Vitamina A	µg	96
Vitamina E (alpha-tocoferolo)	µg	0,89
Vitamina K	µg	3,3

**Tabella 2:** Valori medi di vitamine per 100 g di frutto.

L'albicocca è inoltre ricca di minerali quali magnesio, fosforo, ferro, calcio, potassio e grazie ad essi presenta attività riequilibranti (**Tabella 3**).

Le albicocche, oltre che come frutto fresco, sono utilizzate nell'industria per la produzione di succhi, sciroppi, marmellate e gelatine. Vengono inoltre conservate sciroppate o essiccate.

MINERALI	UNITÀ	VALORE PER 100 g
Calcio	mg	13
Ferro	mg	0,39
Magnesio	mg	10
Fosforo	mg	23
Potassio	mg	259
Sodio	mg	1
Zinco	mg	0,20
Rame	mg	0,078
Manganese	mg	0,077
Selenio	µg	0,1

**Tabella 3.** Contenuto medio di sali minerali per 100 g di frutto.

Grazie ai suoi effetti benefici sul tessuto epiteliale, l'albicocca è stata sempre usata per la cura della pelle nella cosmesi popolare. L'olio contenuto nei suoi semi è molto efficace sia per il trattamento delle smagliature che delle rughe. Il frutto fresco ha proprietà astringenti mentre le albicocche secche hanno effetti lassativi.

### 3.1.3 Produzione delle albicocche

L'interesse per la coltura dell'albicocco è cresciuto negli ultimi dieci anni con un incremento della superficie impiegata pari all'11% su scala mondiale, raggiungendo 436581 ha (dati Fao, 2006), e del 33% in Italia. Nei Paesi del bacino del Mediterraneo si realizza oltre il 60% della produzione mondiale ( $\approx 3.2 \times 10^6$  ton). L'Italia occupa il settimo posto per superficie dopo Turchia, Iran, Algeria, Pakistan,



Spagna e Cina, e il terzo per produzione (244.000 ton nel 2005). La coltivazione dell'albicocco è praticata soprattutto in Campania, Emilia-Romagna, Basilicata, Piemonte e Sicilia (80% della produzione nazionale).<sup>49</sup>

I consumatori mediterranei, ai quali è prevalentemente destinata la produzione italiana, apprezzano l'albicocca per il sapore, in particolare dolcezza, succosità e aroma. Le varietà tradizionali hanno finora assolto tale funzione, almeno per le «filieri corte» dove la raccolta coincide con la maturità fisiologica e il consumo segue al massimo di pochi giorni.

I grandi canali distributivi, la cui importanza cresce di anno in anno, pongono in primo piano una nuova esigenza: la lenta maturazione, che consenta di posizionare la raccolta al momento ottimale senza temere il rapido deterioramento del frutto. Le cultivar più recenti sono valutate anche in funzione della maggior consistenza della polpa, della serbevolezza e della *shelf life*, per far sì che al consumatore giungano frutti nel pieno della qualità organolettica.<sup>50,51</sup>

La produzione di albicocche è concentrata in un periodo di 30-40 giorni, principalmente a cavallo del mese di giugno ed è caratterizzata, specie nelle aree tradizionali, dalla presenza di un numero elevato di cultivar locali. In Italia, la forte richiesta del mercato, insieme all'introduzione di nuove cultivar straniere, sembrano spingere verso la possibilità di estendere la raccolta delle albicocche ad un periodo più ampio che vada da maggio a luglio. Negli ultimi anni il miglioramento genetico ha reso disponibili numerose novità varietali caratterizzate da buona produttività, interessante epoca di maturazione, minore suscettibilità alle fitopatie e, spesso, da lenta maturazione dei frutti che può consentire una più facile commercializzazione. I diversi programmi di innovazione delle varietà locali e l'introduzione di cultivar di elevata qualità dagli Stati Uniti d'America sono mirati anche ad offrire una più ampia scelta di varietà ai frutticoltori. In particolare, alcune cultivar americane hanno mostrato ottimi risultati in termini di grandezza ed aspetto (Goldrich) o di sapore dei frutti (Orange Red).<sup>52</sup> Questi indiscutibili vantaggi, unitamente a una maggiore resistenza alle manipolazioni e ai trasporti, tuttavia si trovano spesso accoppiati, nelle nuove cultivar, ad aspetti non sempre soddisfacenti quali bassa produttività,<sup>52</sup> scarsa capacità di adattamento ai climi ed ai suoli delle nostre regioni oltre che l'elevato fabbisogno in freddo e la auto incompatibilità.<sup>49</sup>

### **3.1.4 Varietà**

L'attuale panorama varietale per l'albicocco è caratterizzato da una gamma piuttosto ristretta di cultivar nel periodo precoce e in quello tardivo, mentre ci sono molte cultivar con epoca di maturazione intermedia. Questo causa una concentrazione dell'offerta in un periodo piuttosto ristretto a svantaggio della remunerazione commerciale del prodotto.

Tra le numerose varietà di albicocca più coltivate in Italia troviamo:

Alba, Antonio Errani, Aurora, Bella d'Imola, Boccuccia liscia, Boccuccia spinosa, Boreale, Bulida, Dany, Dulcinea, Fracasso, Frenesie, Giulia, Goldrich (Sungiant), Ivonne Liverani, Laycot, Mandorlon,

Monaco Bello, Ninfa, Orange Red, Ovardi, Palummella, Pellecchiella, Perla, Pinkot® Copty, Pisana, Portici, San Castrese, Silvercot® Versyl, Tonda di Costigliole, Tyrinthos, Valdesi, Vitillo.

### 3.1.5 Caratteristiche qualitative e organolettiche delle albicocche

L'albicocca è considerata da molti uno dei più deliziosi frutti dei climi temperati, grazie principalmente ad un buon bilanciamento tra zuccheri ed acidi ed un piacevole aroma caratteristico che ne determinano una qualità eccezionale.

Negli anni passati, in campo agronomico, numerosi sforzi sono stati rivolti nel tentativo di migliorare ulteriormente le caratteristiche di questi frutti, principalmente in termini di innalzamento del loro contenuto acidico e zuccherino. Più recentemente, inoltre, numerose campagne di produzione finalizzate al miglioramento della componente aromatica di questi frutti sono state attivate, e spesso, sono state accompagnate da studi mirati alla comprensione dei ruoli giocati dai principali acidi e zuccheri nello sviluppo dell'aroma.<sup>53, 54, 55</sup>

Il saccarosio è il principale zucchero solubile presente nelle albicocche mature,<sup>53</sup> e l'elevato indice di rifrazione di questi frutti (indice di un alto contenuto glucidico) è stato associato ad un elevato contenuto proprio di questo zucchero.<sup>54</sup> Questo si ripercuote sul sapore di questi prodotti, che presentano un gusto decisamente gradevole.

Molte delle varietà coltivate in Italia ed in Spagna tendenzialmente mostrano un elevato contenuto in zuccheri.<sup>54,56</sup> Al contrario, invece, le cultivar di recente introduzione provenienti dagli Stati Uniti d'America, e le varietà precoci (quelle, cioè, che vengono raccolte a maggio), generalmente presentano una polpa sub-acida, principalmente dovuta ad una più alta acidità totale.<sup>54,57</sup> Si tratta questa di una caratteristica che non sempre trova il favore dei consumatori europei, che normalmente approvano e di conseguenza scelgono i frutti per lo più in base alla dolcezza ed all'aroma.<sup>58</sup>

Il colore dei frutti è un altro parametro importantissimo per la determinazione della qualità, principalmente perché esso gioca un ruolo di primo piano nella percezione visiva della qualità dei frutti da parte dei consumatori. Nelle albicocche, tuttavia, una migliore colorazione della buccia (tra il rosso e l'arancio) sembra essere correlata con valori più elevati di acidità ma non di contenuto zuccherino,<sup>59</sup> e la scelta di raccogliere frutti con queste caratteristiche di colorazione della buccia potrebbe comportare la perdita di gran parte dell'aroma e del sapore negli stessi.

Molte delle cultivar tradizionali delle regioni mediterranee di solito presentano una buccia bianca, gialla o arancione chiaro, mentre le cultivar recentemente introdotte sono state spesso selezionate al fine di ottenere frutti dai colori più invitanti.<sup>59,60</sup> Molte delle nuove cultivar presentano queste caratteristiche e il riscontro di gradimento è evidente e immediato.

Dunque anche se l'attrazione visiva è comunque ancora uno delle principali peculiarità che contraddistingue il mercato della frutta fresca, il crescente interesse dei consumatori verso l'aroma dei frutti sembrerebbe incoraggiare una riconsiderazione di quelle che sono le tradizionali varietà e

indirizzare il lavoro di selezione verso cultivar meno attrattive dal punto di vista visivo ma aromaticamente più ricche.

### 3.1.6 Profilo aromatico

L'aspetto e l'aroma dei frutti sono tra i parametri più significativi per la valutazione della qualità di questi prodotti. Il piacevole e caratteristico aroma<sup>58,61</sup> delle albicocche, ad esempio, è una delle caratteristiche basilari per la determinazione della loro qualità, e rappresenta uno degli aspetti primari che distingue le albicocche dagli altri frutti ad esse correlati, quali ad esempio le prugne ed i loro inter-ibridi.

Una recente indagine ha confermato l'importanza che l'aroma riveste anche per i consumatori, mostrando un'influenza diretta sulla loro approvazione.<sup>58</sup>

Esso è una miscela complessa di sostanze volatili, e nel caso delle albicocche, è costituito da più di 100 composti differenti.<sup>62,63</sup>

Numerosi studi sono presenti in letteratura sulla caratterizzazione del profilo aromatico delle albicocche a partire dagli anni '60.<sup>64,65</sup> Da questi studi esso risulta formato da centinaia di composti appartenenti alle classi di terpeni, alcoli, lattoni, esteri e numerosi altri composti a 6 atomi di C (aldeidi e chetoni principalmente) originati dalla degradazione di molecole di lipidi a 6 atomi di C.<sup>66,67,68,69,70,71,72</sup> Molto studiate sono state le tecniche di estrazione dei composti volatili applicabili<sup>70,71,73</sup> ed anche i cambiamenti nella composizione dell'aroma delle albicocche durante lo sviluppo<sup>74</sup> e la conservazione dei frutti.<sup>75</sup>

Studi che prevedevano analisi di tipo sensoriale<sup>76</sup> hanno permesso di ottenere una correlazione dei dati analitici ottenuti da analisi strumentali classiche con quelle che sono le note d'odore caratteristiche delle albicocche. Così risulta che l'esile acetato, il  $\gamma$ -octalattone e il  $\gamma$ -decalattone sono risultati i responsabili delle note fruttate tipiche dell'aroma delle albicocche, mentre il Linalolo, il 6-metil-5-epten-2-one e il  $\beta$ -ionone sembrano sviluppare una nota aromatica di tipo floreale, l'etile acetato, il  $\beta$ -ciclocitrale e il limonene conferiscono note fruttate mentre l'(E)-esen-2-ale note erbose ed il mentone note di menta.

È interessante notare che sono stati individuati, tra i composti volatili delle albicocche, il  $\beta$ -ciclocitrale, prodotto di degradazione termica, fotossigenazione o degradazione enzimatica del  $\beta$ -carotene (principale carotenoide delle albicocche), ed il 6-metil-5-epten-2-one, proveniente invece dalla degradazione del licopene. Questi composti probabilmente provengono dalla degradazione enzimatica e fotochimica che ha luogo durante il processo di maturazione delle albicocche.

Nonostante l'elevatissimo numero di composti volatili identificati nell'aroma delle albicocche, non tutti questi composti possono essere strettamente collegati all'aroma di questi frutti. Il contributo di ogni composto all'odore caratteristico di un frutto dipende, infatti, in primo luogo dalla sua soglia di odore (*odour threshold*, OTH), cioè la concentrazione minima affinché un composto possa essere rilevato dal naso umano e, in secondo luogo, dalla sua concentrazione,<sup>77</sup> a sua volta dipendente

dall'attività degli enzimi preposti a sintetizzarlo e dalla disponibilità dei substrati necessari alla sintesi.<sup>78,79</sup>

L'apporto relativo di un componente volatile alla formazione dell'aroma totale può essere espresso mediante le unità di odore, determinabili dal rapporto tra la concentrazione di un composto nell'alimento in esame ed il suo valore di soglia di odore.<sup>80,81</sup>

Secondo la teoria delle unità di odore soltanto le sostanze con un logaritmo delle unità di odore  $> 0$  contribuiscono attivamente alla formazione del profilo aromatico, mentre non si tiene in considerazione il contributo all'aroma di base (*background flavour*) apportato da sostanze con un logaritmo  $< 0$ .<sup>77</sup> Inoltre, questa rappresentazione del profilo aromatico non tiene conto del fatto che la diversa soglia olfattiva di ogni singolo componente può risultare modificata da interazioni sinergiche o antagoniste con altre sostanze presenti nella matrice o con la matrice stessa. Essa rimane comunque uno strumento utile nell'individuazione dei componenti che maggiormente contribuiscono alla creazione di un aroma caratteristico.<sup>82</sup>

Il profilo aromatico finale, quindi, è il risultato del fine bilanciamento fra tutti i composti emessi, e di conseguenza ogni variazione di questo bilanciamento si tradurrà in un cambiamento nell'aroma del frutto.<sup>83</sup>

### 3.2 SCOPO

È noto che l'aroma dipende dalla quantità e dalla composizione della miscela dei differenti composti volatili,<sup>84</sup> e la loro formazione aumenta con la maturazione dei frutti ed è associata alla produzione di etilene.<sup>85,86,87</sup> È noto inoltre che alcuni di questi composti aromatici possono essere utilizzati come *markers* molecolari per discriminare le diverse varietà.<sup>66</sup>

Nonostante il gran numero di studi volti alla caratterizzazione dei cambiamenti del profilo aromatico delle albicocche durante la maturazione dei frutti,<sup>74,85,87</sup> e alcune evidenze che indicano una migliore qualità dei frutti di cultivar tardive (elevato rapporto zuccheri/acidi),<sup>54,56,57</sup> ad oggi alcuno sforzo è stato fatto per vedere se esiste una correlazione tra la composizione aromatica e la stagione di raccolta, che sembrerebbe conferire un miglior aroma alle albicocche tardive.

In questa parte del mio lavoro di tesi, condotta in collaborazione con il Dipartimento S.En.Fi.Mi.Zo, sez. Frutticoltura Mediterranea, Tropicale e Sub-Tropicale dell'Università di Palermo, mi sono occupato di valutare le caratteristiche qualitative ed aromatiche di alcune cultivar di albicocco diffuse nel territorio italiano. Sono state effettuate analisi strumentali di laboratorio necessarie per individuare i più importanti parametri estetici quali pezzatura, forma e colore, le proprietà fisiche come consistenza della polpa e la composizione chimica come acidità titolabile e contenuto in solidi solubili. Per una più completa definizione delle caratteristiche dei frutti è stata effettuata la determinazione semiquantitativa della frazione aromatica, sviluppando una metodica di analisi basata sulla *Solid Phase Micro Extraction* (SPME) seguita da Gas Cromatografia – Spettrometria di Massa (GC-MS).

Così, il profilo aromatico insieme con alcune proprietà chimico-fisiche dei frutti, sono stati impiegati per provare a vedere se le differenti varietà di albicocche possano essere raggruppate sulla base di simili caratteristiche aromatiche o attributi di qualità dei frutti ed inoltre se esistano specifici tratti di qualità o aromatici dei frutti in grado di caratterizzare le varietà con differenti stagioni di raccolta.

Nel set di campioni analizzato, costituito da un pool molto vario di 16 cultivar diffuse sul territorio italiano a diversa epoca di maturazione (precoci, intermedie e tardive) (**Tabella 4**), sono state incluse sia varietà ad alta produttività, sia varietà di nuova introduzione (in fase di valutazione su scala locale), sia varietà vecchie o non più raccomandate<sup>49,50,51</sup> (principalmente abbandonate o valutate negativamente per via di una produttività scarsa o irregolare, perché richiedono climi troppo freddi, per pezzature di frutto eccessivamente piccole, polpa molle o per un basso rapporto zuccheri/acidi).

I dati analitici sono anche stati analizzati attraverso un approccio chemiometrico, applicando una *Linear Discriminant Analysis* per provare a verificare se il set di dati ottenuti (riguardanti sia gli attributi di qualità dei frutti, sia le loro componenti volatili, sia il contributo di queste alle note di odore) possano essere specifici o associati a specifici gruppi di cultivar appartenenti a diversi periodi di raccolta (precoci, intermedie e tardive). Abbiamo anche usato la *Principal Component Analysis* per investigare le relazioni tra i diversi attributi fisici, chimici ed aromatici e ogni possibile raggruppamento tra le cultivar sulla base di proprietà similari.

Inoltre, definendo al meglio l'identità delle cultivar in termini di qualità dei frutti, le nostre osservazioni dovrebbero fornire informazioni utili alla scelta di varietà che possano portare ad un incremento della qualità dei prodotti e ad un'estensione della stagione di raccolta.

PRECOCI (5)	INTERMEDIE (9)	TARDIVE (2)
Ninfa	Alba	Mandorlon
Pinkot® Copty	Bella di Imola	Pellecchiella
Silvercot® Versyl	Bulida	
Antonio Errani	Fracasso	
Ovardi	Frenesie	
	Goldrich	
	Dany	
	Palummella	
	Orange Red® Bhart	

**Tabella 4.** Classificazione delle sedici cultivar secondo le diverse epoche di maturazione.

### 3.3 SEZIONE SPERIMENTALE

#### 3.3.1 Campioni

La ricerca è stata condotta sui frutti coltivati in impianti sperimentali situati nella zona di Lascari (PA) (37.99° N, 13.94° E, 150 m s.l.m.) (**Figura 2**), utilizzando piante adulte appartenenti a 16 varietà. Di queste 5 erano cultivar precoci (Ninfa, Pinkot® Copty, Silvercot® Versyl, Ovardy e Antonio Errani), 9 intermedie (Alba, Bella di Imola, Bulida, Dany, Fracasso, Frenesie, Goldrich, Orange Red® Bhart e Palummella) e 2 tardive (Mandorlon e Pellecchiella) (**Tabella 4**). Un’ulteriore classificazione tra le cultivar oggetto di analisi può essere effettuata sulla base della loro presenza nelle liste varietali, cioè in quelle liste annualmente aggiornate da commissioni nazionali di agronomi che, sulla base di pregi e difetti salienti, stilano una classifica sulla qualità delle varietà orto-frutticole più diffuse sul territorio che rappresentano delle vere e proprie guide per i frutticoltori. Secondo i giudizi delle liste varietali, 6 di queste cultivar sono altamente produttive e quindi consigliate alla coltura (Ninfa, Antonio Errani, Bella di Imola, Fracasso, Goldrich e Pellecchiella), 2 sono varietà di recente introduzione nelle liste e sono ancora sottoposte a valutazione (Pinkot e Silvercot), ed 8 sono cultivar vecchie oppure non più raccomandate per la coltivazione (Ovardi, Alba, Bulida, Frenesie, Dany, Palummella, Orange Red e Mandorlon).



**Figura 2:** Impianto sperimentale delle sedici cultivar di albicocco.

Le albicocche sono state raccolte secondo i periodi di maturazione indicati dai report tecnici nazionali,<sup>49,50,51</sup> (generalmente riferiti alla cultivar San Castrese) in un periodo compreso tra il 26 Maggio ed il 25 Giugno.

Tre o quattro alberi adulti uniformi in dimensione sono stati selezionati per ogni cultivar e dalle piante è stato prelevato, a maturazione commerciale, un campione costituito da 35 frutti per cultivar di cui 30 sono stati sottoposti alle determinazioni analitiche delle caratteristiche chimico fisiche, mentre i restanti 5 sono stati utilizzati per la determinazione della frazione volatile.

### 3.3.2 Parametri estetici e chimico-fisici dei frutti

In laboratorio, sui 30 frutti freschi selezionati per cultivar, sono stati determinati:

- peso (g);
- grandezza (mm): il diametro equatoriale è stato misurato tramite un calibro digitale;
- consistenza della polpa ( $\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ): è stata determinata tramite uno strumento chiamato penetrometro (il nostro era un penetrometro digitale della TR di Turoni & Co., Forlì, Italy), su due superfici sbucciate per ogni frutto. Questa misura rappresenta un indice di maturazione commerciale e viene misurata tramite un processo distruttivo che consiste nella determinazione della forza necessaria a far penetrare un puntello di un determinato diametro (8 mm) nel frutto. Minore sarà il valore ottenuto, minore sarà la consistenza della polpa e quindi più avanzato lo stato di maturazione del frutto, che a sua volta conterrà una maggiore quantità di zucchero.

Sul succo ottenuto per estrazione da tre gruppi di dieci frutti per cultivar, sono stati misurati:

- solidi solubili totali (total soluble solids, TSS) (gradi Brix, °Bx): misurazione mediante un rifrattometro digitale Atago Palette PR-32 (Atago Co., Ltd, Tokyo, Japan);
- pH;
- acidità titolabile (g di acido malico·L<sup>-1</sup> di succo), utilizzando un titolatore compatto Crison S (Crison Instruments, SA, Barcelona, Spain).

La colorazione delle bucce è stata, invece, determinata dall’analisi delle immagini digitali di cinque fotografie per cultivar, ognuna contenente sei frutti (**Figura 3**). Le immagini digitali sono state analizzate attraverso un algoritmo sviluppato dal *software* MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) che converte le immagini dal formato RGB a quello CIE 1976 L\*a\*b, estrae i frutti dalle immagini (rimuove lo sfondo) e quantifica le caratteristiche cromatiche come differenza pesata di ogni pixel dell’immagine da un campione di riferimento.<sup>88</sup> Il software elabora un indice compreso tra 0 (assenza di rosso-arancio) e 1 (completamente rosso-arancio). I valori medi riscontrati sono riportati in

**Tabella 5.**



**Figura 3:** Frutti della cultivar Ninfa



CULTIVAR	Stagione di raccolta (P, I, T)	Peso (g)	Diametro (mm)	Consistenza della Polpa (N·cm <sup>-2</sup> )	TSS (°Brix)	Acidità (g·L <sup>-1</sup> )
Ninfa	P	49,12	43,85	36,6	13,87	1,59
Silvercot <sup>®</sup> Versyl	P	60,17	45,30	42,3	12,53	5,83
Pinkot <sup>®</sup> Copty	P	39,05	39,41	34,5	12,43	3,72
Orange Red <sup>®</sup> Bhart	I	36,78	37,79	40,2	14,70	2,69
Goldrich	I	53,78	43,68	39,5	12,67	6,16
Bulida	I	77,43	50,02	28,6	11,47	5,99
Ovardi	I	48,71	44,13	36,4	13,30	4,42
Palummella	I	32,72	37,34	38,1	13,97	5,24
Alba	I	64,42	47,12	43,7	12,37	6,66
Fracasso	I	59,32	46,08	45,5	13,57	3,81
Pellecchiella	T	37,92	39,51	39,0	11,17	5,47
Mandorlon	T	53,21	45,06	31,5	16,03	3,91
Bella di Imola	P	53,10	44,64	25,0	13,03	5,23
Antonio Errani	I	56,90	45,96	23,2	17,43	3,13
Frenesie	I	32,90	36,98	57,4	11,97	5,04
Dany	I	71,47	49,14	22,0	12,83	4,12

**Tabella 5:** Valori medi per cultivar dei parametri qualitativi misurati su 30 frutti freschi (in grassetto sono riportate le 12 cultivar aventi grado di maturazione comparabile).

Lo stadio di maturazione dei frutti ne influenza enormemente i parametri qualitativi, e la velocità di maturazione dipende fortemente dalla temperatura dell’ambiente nel quale i frutti si sviluppano. Cambiamenti delle condizioni climatiche di anno in anno (inclusa la temperatura) possono quindi causare differenze tra i tempi di raccolta indicati nei *report* tecnici per le diverse cultivar e quelli reali. Per questo motivo, abbiamo usato la consistenza della polpa come indice dello stato di maturazione dei frutti, e tutte le valutazioni qualitative sono state effettuate soltanto su 12 delle 16 cultivar in esame. Abbiamo di fatto escluso dallo studio le quattro varietà (Antonio Errani, Bella di Imola, Dany e Frenesie) i cui frutti presentavano valori di consistenza della polpa molto diversi dagli altri e che erano quindi ad uno stadio di maturazione non paragonabile a quello delle altre varietà, che invece presentavano tutti valori di consistenza della polpa compresi nel *range* 28,6 – 45,5 N·cm<sup>-2</sup> (in grassetto nella **Tabella 5**).

### 3.3.3 Analisi della Componente Volatile

Le basse concentrazioni dei componenti volatili presenti nelle albicocche rendono difficoltosa la loro individuazione, il loro isolamento e la loro estrazione.

L’analisi della componente volatile è stata eseguita in spazio di testa (HS) mediante la *Solid Phase Micro-Extraction* (SPME),<sup>89</sup> abbinata alla Gas-Cromatografia/Spettrometria di Massa (GC/MS),<sup>90,91</sup> utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico.

Tutte le analisi preliminari sono state eseguite sulla varietà “Ninfa”. Le prove di riproducibilità sono state eseguite per tre volte su tre differenti campioni con ottimi risultati (RSD<10%).

### 3.3.3.1 Estrazione degli analiti

La Solid Phase Micro-Extraction è una tecnica che permette di estrarre con elevata sensibilità un gran numero di sostanze volatili da diverse matrici, le quali, attraverso un sistema a siringa, possono essere iniettate direttamente in un Gas-Cromatografo. Essa, inoltre, presenta numerosi vantaggi quali la semplicità di utilizzo, la rapidità dei tempi di estrazione ed una buona riproducibilità del metodo.

La metodica SPME è stata accuratamente ottimizzata con lo scopo di ottenere un’ estrazione che fosse abbastanza rapida, sensibile, ed affidabile, in grado cioè di fornire una rappresentazione il più fedele possibile di quelle che sono le sostanze volatili effettivamente presenti nello Spazio di Testa. Esistono infatti in commercio un gran numero di fibre SPME aventi diverse fasi stazionarie, le quali possiedono differenti affinità per le classi di sostanze (principalmente in termini di polarità) e quindi possono essere maggiormente indicate per certe tipologie di analisi piuttosto che per altre.

A tal scopo, sono state eseguite delle analisi preliminari per ottimizzare i principali parametri chiave della tecnica SPME in Spazio di Testa: il tempo di saturazione dello spazio di testa (HS) alla temperatura di analisi del campione, la fibra SPME più adatta ed il tempo di esposizione della stessa nello HS.

#### 3.3.3.1.1 Scelta della fibra

Per individuare il tipo di fibra SPME più adatta all’analisi dello spazio di testa sono state effettuate delle prove con quattro differenti fibre mono o multicomponenti:

1. DiVinilBenzene/carboxen/PoliDimetil Silossano (50/30 µm DVB/carboxen/PDMS).
2. PoliDimetil Silossano/DiVinilBenzene (65 µm PDMS/DVB)
3. PoliDimetil Silossano/carboxen (75 µm PDMS/CAR)
4. PoliDimetil Silossano (100 µm PDMS)

La scelta della fibra si è basata sul parametro  $F_{ij}$ , variante della funzione già modificata nel 2003 da Hamm<sup>92</sup> (**Equazione 1**) rispetto a quella introdotta da Zuba<sup>93</sup> nel 2002.  $F_{ij}$  non è altro che il rapporto tra la media di  $H_{ij}$  per  $n$  analiti con una fibra  $j$ , e la media di  $H_{ij}$  per  $n$  analiti per le  $f$  fibre:

$$F_{ij} = \frac{1/n \sum_i H_{ij}}{1/f \left( 1/n \sum_{ij} H_{ij} \right)} \quad \text{Equazione 1}$$

in cui  $H_{ij}$  è l’altezza del picco dell’analita  $i$  usando la fibra  $j$ . Nella versione utilizzata per il nostro studio l’altezza del picco  $H_{ij}$  è stata sostituita dall’area del picco  $A_{ij}$ . Nel calcolo sono stati monitorati 6 picchi significativi, rilevati con tutte le fibre provate, e poiché sono state testate 4 diverse fibre l’Eq. 1 si commuta nella **Equazione 2**:

$$F_{ij} = \frac{1/6 \sum_i A_{ij}}{1/4 \left( 1/6 \sum_{ij} A_{ij} \right)} \quad \text{Equazione 2}$$

dove  $\sum_{ij} A_{ij}$  corrisponde alla sommatoria dei 6 picchi.

Il valore di  $F_{ij}$  calcolato per le quattro fibre, riportato in **Tabella 6**, mostra come la fibra trifasica (DVB/carboxen/PDMS) sia quella migliore per estrarre dallo spazio di testa un maggior quantitativo di sostanze avendo un valore  $F_{ij}$  di 1,56, superiore a quello ottenuto con le altre fibre.

Fibre	$F_{ij}$
<b>DVB/carboxen/PDMS</b>	<b>1,56</b>
PDMS	1.37
PDMS/DVB	0.90
PDMS/CAR	0.15

**Tabella 6:** Valore di  $F_{ij}$  calcolato per le 4 fibre secondo l'Equazione 2.

### 3.3.3.1.2 Saturazione Spazio di Testa

Sono state eseguite delle analisi preliminari per individuare il tempo di saturazione dello spazio di testa (HS) dei *vials* contenenti il frutto alla temperatura di analisi del campione (25 °C).

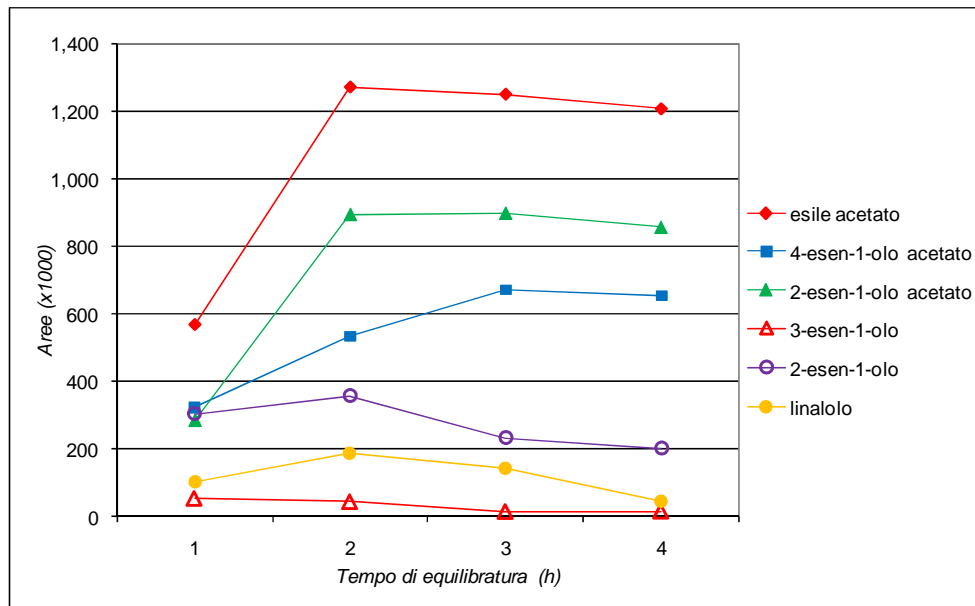
A questo scopo è stato studiato l'andamento nel tempo delle aree dei picchi cromatografici di sei sostanze volatili rappresentative del profilo aromatico delle albicocche.

Le prove sperimentali sono state effettuate per i tempi di 1 ora, 2 ore, 3 ore, 4 ore, monitorando l'ampiezza delle aree dei picchi cromatografici dei seguenti composti: esile acetato, 4-esen-1-olo acetato, 2-esen-1-olo acetato, 3-esen-1-olo, 2-esen-1-olo, linalolo.

L'indagine è stata eseguita su 0,5 g di frutto omogeneizzato, posto ad equilibrare in un *vial* da 2 mL con tappo perforabile di gomma siliconica rivestita di PoliTetraFluoroEtilene (PTFE) alla temperatura controllata di 25 °C, effettuando quattro analisi SPME-HS-GC-MS ad intervalli di tempo regolari di 1 ora.

I risultati ottenuti, riportati nel grafico in **Figura 4**, mostrano chiaramente che in una prima fase iniziale tutti i composti principali presentano una bassa concentrazione nello HS che tende poi ad aumentare nel tempo fino a stabilizzarsi; è possibile notare, infatti, che dopo due ore quattro picchi su sei presentano il massimo adsorbimento sulla fibra (i due più abbondanti, l'esile acetato ed il 2-esen-1-olo acetato, ma anche il 2-esen-1-olo ed il linalolo) e la loro concentrazione, col procedere dell'equilibratura, diminuisce soltanto leggermente. Il composto meno abbondante dei sei studiati, il 3-esen-1-olo, invece raggiunge il massimo già dopo un'ora di equilibratura ma col passare del tempo subisce una leggera flessione, probabilmente perché “spostato” dalle altre sostanze più abbondanti presenti nello HS.

Queste evidenze ci hanno quindi portato a scegliere, come miglior tempo per la saturazione dello spazio di testa, un intervallo di equilibratura dei campioni di 2 ore.



**Figura 4:** Andamento dell'estrazione dallo spazio di testa al variare del tempo di equilibratura del campione.

### 3.3.3.1.3 Tempo di esposizione della fibra

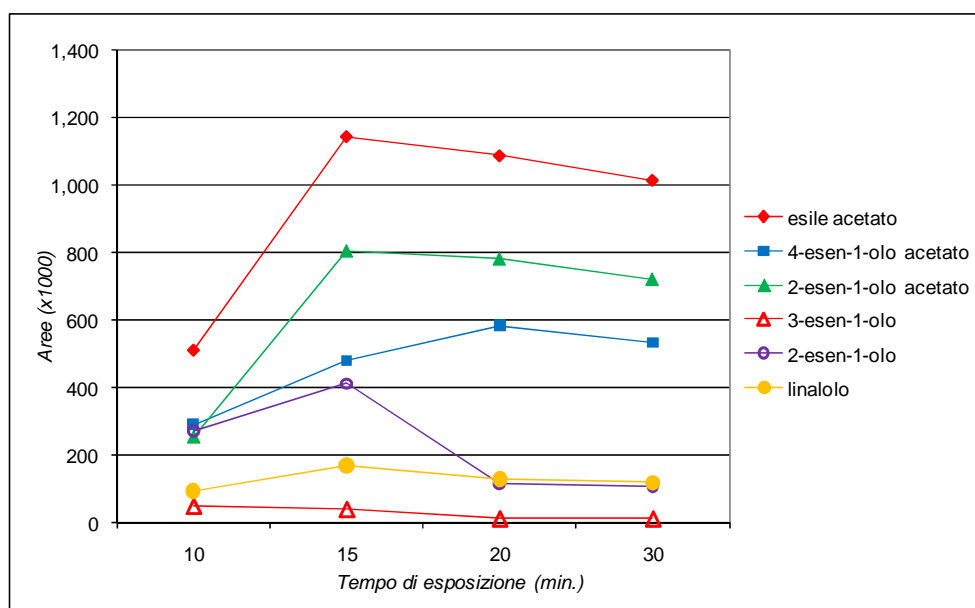
Sono state eseguite delle analisi preliminari per individuare il tempo ottimale di esposizione della fibra nello spazio di testa dei *vials* contenenti 0,5 g frutto omogeneizzato, necessario all'adsorbimento dei composti volatili.

Lo studio è stato condotto analizzando la variazione delle quantità di sei sostanze al variare del tempo di esposizione della fibra SPME nello spazio di testa. A tale scopo sono stati saggiati i tempi di esposizione 10, 15, 20 e 30 minuti; ogni analisi è stata ripetuta tre volte e per lo studio sono stati utilizzati i valori mediati.

Sono stati monitorati gli stessi composti già utilizzati per descrivere la saturazione dello spazio di testa: esile acetato, 4-esen-1-olo acetato, 2-esen-1-olo acetato, 3-esen-1-olo, 2-esen-1-olo, linalolo.

I risultati ottenuti, riportati nel grafico in **Figura 5**, mostrano chiaramente che dieci minuti di esposizione della fibra non sono sufficienti ad ottenere una buona estrazione delle sostanze volatili in esame. Di queste, infatti, quattro raggiungono un massimo di adsorbimento dopo un quarto d'ora di esposizione (esile acetato, 2-esen-1-olo acetato, 2-esen-1-olo, linalolo) per poi diminuire leggermente in concentrazione all'aumentare del tempo di esposizione (probabilmente per fenomeni di competizione con altre sostanze meno volatili o meno affini alla fase stazionaria della fibra). Il 4-esen-1-olo acetato, invece, raggiunge il massimo di adsorbimento dopo 20 minuti di esposizione della fibra (ma poi anche la sua concentrazione diminuisce alla mezz'ora), mentre il 3-esen-1-olo, il composto peraltro meno abbondante tra gli otto, già dopo dieci minuti raggiunge il suo massimo di estrazione diminuendo poi leggermente col trascorrere del tempo.

Queste evidenze ci hanno quindi portato a scegliere, come miglior tempo di esposizione della fibra SPME nello spazio di testa, un intervallo di 15 minuti.



**Figura 5:** Andamento dell'estrazione dallo spazio di testa al variare del tempo di esposizione della fibra SPME.

### 3.3.3.2 Analisi GC/MS

L'analisi semiquantitativa della componente volatile delle albicocche è stata eseguita mediante Gas-cromatografia/Spettrometria di massa (GC/MS), utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico derivato dal protocollo di analisi già sviluppato in precedenti lavori sulla componente aromatica di pesche<sup>91</sup> e mele.<sup>94</sup>

Tutti i campioni sono stati preparati per l'analisi delle componenti volatili secondo questo protocollo: 0,5 g di albicocche (buccia e polpa), accuratamente pesati ed omogeneizzati, sono stati introdotti in *vials* da 2 mL con tappo a tenuta perforabile in gomma siliconica rivestita di PoliTetraFluoroEtilene (PTFE) e sono stati posti alla temperatura di  $25 \pm 0,5$  °C nel carosello termostato con sistema Peltier dell'autocampionatore Varian 8200 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). A questi sono stati aggiunti, come standard interno, 3  $\mu$ L di una soluzione acquosa contenenti 0,445  $\mu$ g di 1-eptanolo, ottenuta per diluizione di una soluzione madre di 1-eptanolo di concentrazione 115  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Seguendo le indicazioni ottenute dalle prove preliminari, i campioni all'interno dei *vials* sono stati lasciati per 2 ore in termostato (tempo necessario per l'equilibratura); dopo questo periodo la fibra trifasica (DVB/carboxen/PDMS) è stata introdotta attraverso il setto ed esposta per 15 minuti nello spazio di testa. Successivamente essa è stata posta a desorbire nell'iniettore del gas-cromatografo.

Le analisi sono state eseguite con un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax, i cui principali parametri strumentali sono stati accuratamente ottimizzati.

### 3.3.3.2.1 Scelta della colonna Gas Cromatografica

Le separazioni cromatografiche sono state eseguite testando due differenti colonne capillari:

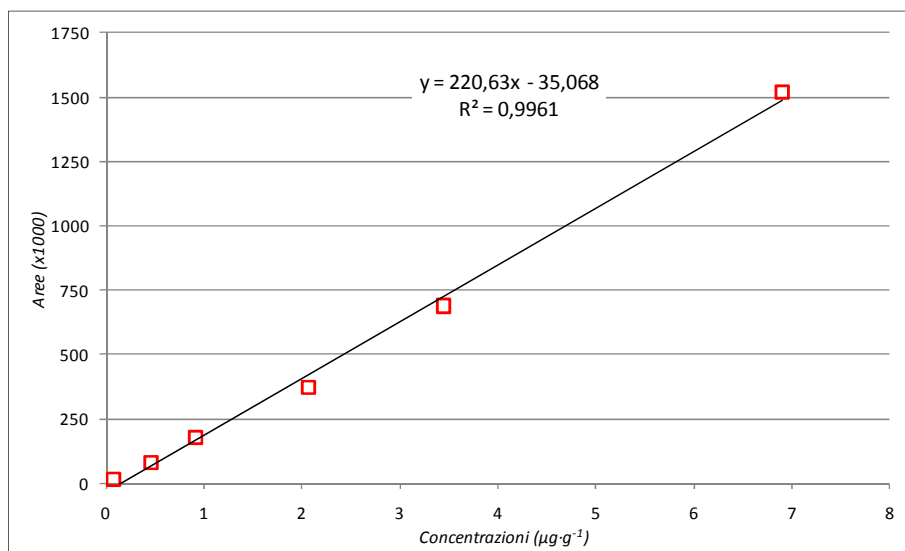
- colonna J & W DB5 (J & W Scientific Inc.) di silice fusa lunga 30 m, con diametro interno di 0,25 mm e rivestita di una fase stazionaria costituita da 5% difenil 95% polidimetil silossano, con uno spessore del film di 0,25  $\mu\text{m}$ ;
- colonna Supelcowax-10 (Supelco, Bellafonte, PA) di silice fusa, lunga 30 m, diametro interno 0,25 mm rivestita di una fase stazionaria costituita da polietilenglicole, con uno spessore del film di 0,25  $\mu\text{m}$ .

In seguito ai test effettuati, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando la colonna gas cromatografia Supelcowax-10, che presenta una polarità della fase stazionaria maggiore della J & W DB5.

### 3.3.3.2.2 Analisi semiquantitativa

L'analisi semiquantitativa è stata eseguita per confronto delle aree dei picchi cromatografici degli analiti con quello dello standard interno, 1-eptanolo, aggiunto in concentrazione nota al campione.

La curva di calibrazione (**Figura 6**), eseguita per accertare la linearità di risposta dello standard interno, è stata costruita con i valori di 6 soluzioni di 1-eptanolo a concentrazione decrescente, nel range compreso tra 0,77  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e 6,9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $R^2=0,996$ ).



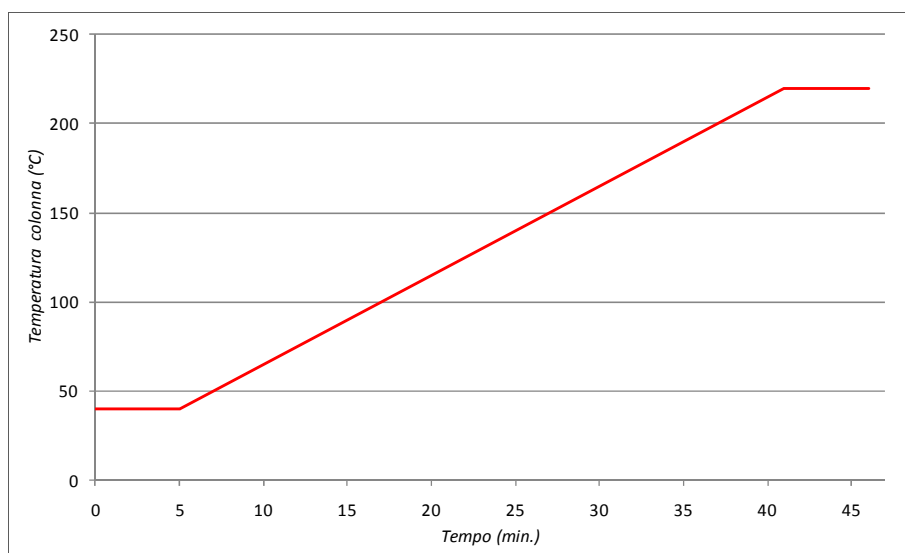
**Figura 6:** Curva di calibrazione dello standard interno (1-eptanolo).

### 3.3.3.2.3 Parametri del Gas Cromatografo

Le analisi sono state eseguite utilizzando un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax e con un autocampionatore

Varian 8200 CX termostato, i cui principali parametri strumentali sono i seguenti: temperatura dell'iniettore, 250 °C; modalità introduzione, *splitless*; gas di trasporto, elio (He); pressione in testa alla colonna, 12 psi; temperatura *transfer-line*, 180 °C.

La rampa di temperature del GC è riportata in **Figura 7** e prevede una durata totale del metodo di 46 minuti.



**Figura 7:** Rappresentazione della programmata termica del GC.

#### 3.3.3.2.4 Parametri dello Spettrometro di Massa

Questi sono i principali parametri della trappola ionica: modalità di ionizzazione, ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV; modalità di scansione, *Total Ion Current* (TIC); *range* di massa, 40 – 400 Da; frequenza di scansione, tre scansioni al secondo; temperatura trappola ionica, 180 °C.

I dati raccolti sono stati processati con il data system dello strumento e i cromatogrammi e gli spettri hanno mostrato una eccellente riproducibilità.

Gli analiti sono stati tabulati piuttosto che secondo i tempi di ritenzione (TR), soggetti a variazioni dovute alla colonna ed alle condizioni cromatografiche, secondo i valori di Indice di Ritenzione Lineare (LRI), i cui valori sono stati calcolati utilizzando l'equazione di E. Sz. Kovats<sup>95</sup>, utilizzando una sequenza di idrocarburi lineari dal C10 al C26.

I 34 composti volatili delle albicocche sono stati identificati dapprima attraverso una ragionata e critica comparazione con gli spettri registrati nella libreria NIST 2002; successivamente tutti i composti presenti nelle **Tabelle 7 ed 8**, ad eccezione dei composti 2, 13, 21,23, 27, 30, 31 e 33, sono stati confermati tramite i valori dei LRI riportati in letteratura, mentre i composti 4, 12, 17 e 20 sono stati comparati con i rispettivi standard.

### 3.3.4 Analisi dell'aroma

Abbiamo condotto un'ulteriore indagine sulla componente volatile delle albicocche, analizzando il contributo relativo di ogni composto volatile alla formazione dell'aroma caratteristico dei frutti. A tal scopo sono stati calcolati i valori delle unità di odore delle sostanze volatili presenti nel profilo aromatico delle albicocche per le quali, in letteratura, sono noti gli *Odour Threshold* (OTH). L'OTH, o soglia di odore, è la concentrazione minima della soluzione acquosa di un composto affinché esso possa essere rilevato dal naso umano,<sup>77</sup> per il quale una sostanza con una soglia di odore molto bassa quindi, a parità di concentrazione, è percepita maggiormente rispetto ad un'altra avente un valore di OTH più elevato.

Di conseguenza la percezione di un aroma da parte dell'uomo è totalmente differente da quella di uno strumento come il GC/MS che, di ogni composto presente nello HS, rileva esclusivamente la quantità. La percezione degli odori ( $\Pi$ ) dipende, secondo l'equazione di Weber-Fechner del 1886 (**Equazione 3**), da una funzione Logaritmica:

$$\Pi = a \cdot \text{Log} \frac{c}{c_0}$$

**Equazione 3**

in cui  $a$  è una costante caratteristica per ogni sostanza,  $c$  è la sua concentrazione e  $c_0$  è la sua soglia di odore. Il rapporto  $c/c_0$  è definito Unità di Odore.<sup>80,81</sup>

Secondo la teoria delle unità di odore soltanto le sostanze con un logaritmo delle unità di odore  $> 0$  contribuiscono attivamente alla formazione del profilo aromatico, mentre non si tiene in considerazione il contributo all'aroma di base (*background flavour*) apportato da sostanze con un logaritmo  $< 0$ .<sup>77</sup>

In questo studio, sono stati trovati in letteratura soltanto gli *Odour Threshold* di 27 dei 34 composti presenti e di questi sono stati calcolate le corrispondenti unità di odore e di conseguenza il relativo contributo di ogni sostanza volatile alla formazione dell'aroma finale. Ogni composto può essere associato ad una specifica nota di odore e si può assumere che composti con note di odore simili possano contribuire insieme alla formazione delle prevalenti note aromatiche. Così i composti volatili più rappresentativi, espressi in  $\text{Log}_{10}$  delle unità di odore, sono stati raggruppati nelle tre principali componenti olfattive caratteristiche delle albicocche secondo la seguente logica: l'odore fruttato viene dato dall'esile acetato, dal (Z)-3-esenile acetato e dal  $\gamma$ -decalattone; l'odore fruttato viene dato dal linalolo e dal  $\beta$ -ionone; l'odore erboso viene dato dal (Z)-3-esenolo, dal (Z)-2-esenolo e dal  $\beta$ -ciclocitrato.

### 3.3.5 Analisi Statistica

I dati relativi agli attributi fisici, chimici e aromatici sono stati sottoposti ad analisi statistica. In primo luogo è stata effettuata una *analysis of means* (analisi delle medie): sono stati riportati in un grafico i



limiti di decisione superiore ed inferiore (*upper and lower decision limits*) e sono stati usati per evidenziare le differenze tra i valore medio di ogni cultivar e la media generale.

Procedure di SYSTAT (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA, USA) sono state utilizzate per effettuare correlazioni tra i valori medi degli attributi fisici, chimici e aromatici. L’analisi multivariata LDA (*Linear Discriminant Analysis*) è stata applicata per provare ad individuare quale set di attributi qualitativi e aromatici fosse in grado di discriminare le varietà raggruppandole in base alla stagione di raccolta in precoci, intermedie e tardive. Infine è stata eseguita un’analisi PCA (*Principal Component Analysis*) per determinare eventuali associazioni esistenti tra gli attributi fisici, chimici e aromatici ed ogni possibile raggruppamento delle cultivar basato su simili proprietà. Quindi è stata effettuata una *Cluster Analysis* attraverso la tecnica *k-means* sulle Componenti Principali (PCs) per individuare eventuali raggruppamenti varietali ed i risultati sono stati presentati in un grafico a due dimensioni (tramite la metodica *biplot*) che mostra le posizioni relative delle cultivar e degli attributi qualitativi secondo le prime due PCs.

### 3.4 RISULTATI E DISCUSSIONI

#### 3.4.1 Valutazione degli attributi fisici dei frutti

L'analisi delle medie sugli attributi fisici dei frutti mostra significative differenze tra le 12 varietà prese in esame che non sembrano legate alla stagione di maturazione dei frutti.

In particolare, il colore della buccia si è rivelato simile per molte cultivar; soltanto una cultivar intermedia, la Goldrich, ha mostrato un'intensità di colorazione più intensa, attestandosi al di sopra dei limiti di decisione superiori (*UDL*), mentre una cultivar precoce, la Fracasso, ha mostrato una colorazione al di sotto dei limiti di decisione inferiori (*LDL*) (**Figura 8A**), rivelando una colorazione più debole delle altre. La colorazione biancastra era già stata riportata per la cultivar Ninfa, mentre Orange Red aveva finora mostrato un'intensa colorazione rosso/arancio in studi precedenti.<sup>56</sup>

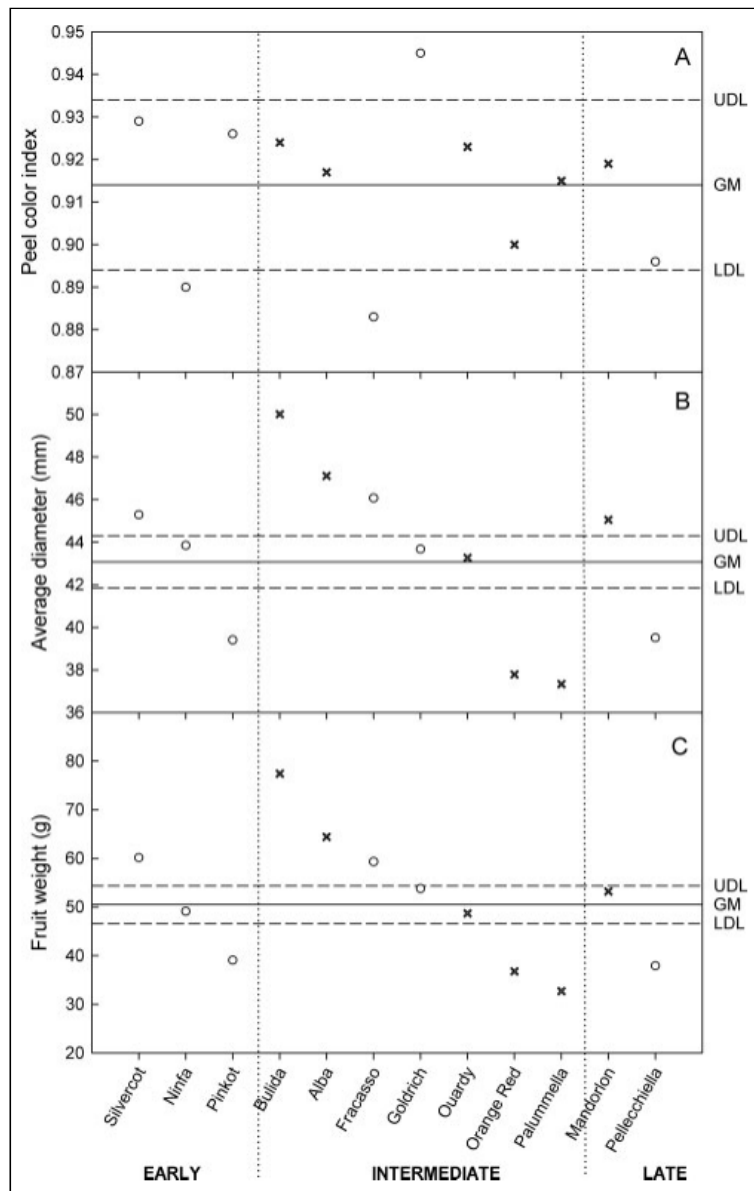
Il diametro medio dei frutti ed il loro peso, invece, variano notevolmente tra le varietà. Tra tutte, la Palummella si è rivelata la cultivar con i frutti più piccoli, con un diametro medio di 37 mm ed un peso medio di 32,9 g, mentre la Bulida è quella che presenta i frutti mediamente più grandi con un diametro ed un peso medi di 50 mm e 77,4 g rispettivamente (**Figure 8B e 8C**). Tra le cultivar con stagione di maturazione intermedia, Bulida, Alba e Fracasso hanno mostrato frutti di dimensione significativamente superiore alla media, con un peso maggiore di 60 g, mentre Orange Red e Palummella hanno mostrato una dimensione inferiore alle altre, con un peso inferiore ai 40 g. Tra le cultivar tardive, solo Pellecchiella presenta dimensioni ridotte, trovandosi la sua dimensione al di sotto del limite di decisione inferiore.

#### 3.4.2 Valutazione degli attributi chimici dei frutti

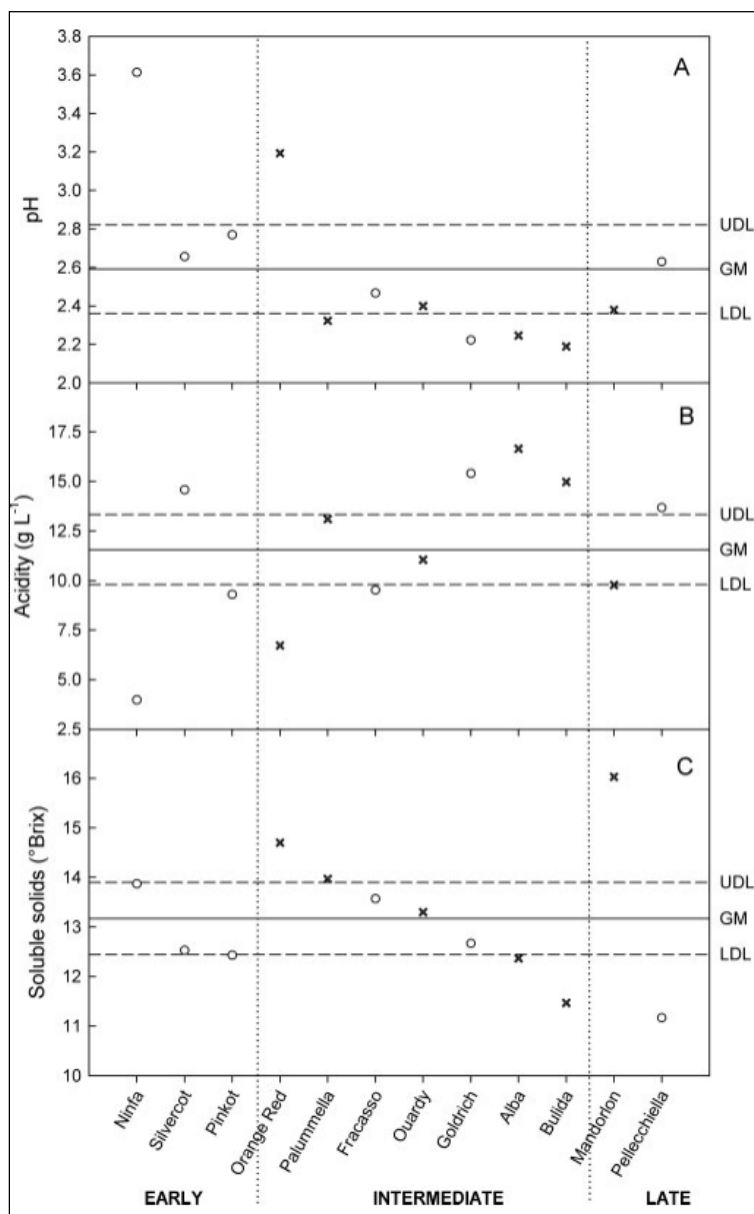
I parametri qualitativi chimici, al pari di quelli fisici, hanno mostrato una consistente variabilità tra le cultivar, anche se i valori si mantengono simili per i frutti appartenenti alle stesse stagioni di raccolta. Il pH riscontrato varia tra i valori 2,2 e 3,6, con Ninfa (precoce) e Orange Red (intermedia) che presentano valori al di sopra dei limiti di decisione e Palummella, Goldrich, Alba e Bulida che presentano invece valori al di sotto dei limiti di decisione (**Figura 9A**).

L'acidità del succo, espressa come  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  di acido malico, varia enormemente tra le varietà, andando da 1,59 a 6,66 (**Figura 9B**). Tra le varietà precoci, solo Silvercot ha mostrato un'acidità molto superiore alle altre, mentre per le restanti due cultivar sono state riscontrate acidità medie al di sotto dei limiti di decisione. Le intermedie Goldrich, Bulida e Alba e la tardiva Pellecchiella, presentano un'elevata acidità (valori superiori ai limiti di controllo), mentre Orange Red e Fracasso (tardive) si attestano al di sotto dei limiti. L'acidità media ( $11,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) delle cultivar in esame sotto le nostre condizioni sperimentali, climatiche e a maturazione commerciale, comunque, risulta ben al di sotto dei limiti massimi di accettabilità dei *panel test* ( $44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ed all'interno del *range* necessario per ottenere un elevato punteggio di sapore.<sup>96</sup>

I solidi solubili della maggior parte delle varietà si trovano all'interno dell'intervallo di concentrazione tra i limiti di decisione, con la sola eccezione delle Orange Red (intermedia) e Mandorlon (tardiva), che mostrano un contenuto medio in TSS superiore, e della Bulida (intermedia) e della Pellecchiella (tardiva) che ne presentano invece un contenuto inferiore ai limiti di decisione (**Figura 9C**). In questo caso, solo le varietà con contenuto in TSS al di sotto della media (tra 11 e 12,4 °Brix) potrebbero non avere qualità eccelse di sapore, ma posseggono comunque livelli soddisfacenti in termini di dolcezza. In termini di rapporto dolcezza/acidità, solo la Ninfa, la Orange Red e la Mandorlon sembrerebbero sufficientemente bilanciati (*dati non riportati*).



**Figura 8:** Valori medi del colore delle bucce (A), del diametro (B) e del peso (C) per le dodici varietà di albicocche in esame. Simboli: ○, cultivar ancora raccomandate; x, cultivar vecchie, non più raccomandate per la coltivazione; Le linee orizzontali continue indicano le medie generali (*grand means, GM*) per il colore della buccia ( $N=60$ ) e per il peso ed il diametro ( $N=453$ ). Le linee tratteggiate indicano i limiti di controllo superiore ed inferiore (*upper and lower decision limits, UDL e LDL*) per l'analisi delle medie ( $\alpha = 0.05$ ). Le linee punteggiate verticali separano le cultivar in base alla stagione di raccolta.



**Figura 9:** Valori medi del pH del succo (A), acidità (B) e solidi solubili (C) per le dodici varietà di albicocche in esame. Simboli: ○, cultivar ancora raccomandate; x, cultivar vecchie, non più raccomandate per la coltivazione; Le linee orizzontali continue indicano le medie generali (*grand means*, GM) ( $N=36$ ). Le linee tratteggiate indicano i limiti di controllo superiore ed inferiore (*upper and lower decision limits*, UDL e LDL) per l'analisi delle medie ( $\alpha = 0.05$ ). Le linee punteggiate verticali separano le cultivar in base alla stagione di raccolta.

### 3.4.3 Valutazione della componente volatile dei frutti

Dall'attenta analisi dei cromatogrammi e degli spettri di massa acquisiti relativi ai frutti di albicocche in esame, sono stati determinati trentaquattro composti volatili. I valori delle concentrazioni relative dei composti elencati nella **Tabella 7** sono i risultati della media di cinque analisi eseguite su cinque frutti diversi per ogni varietà e sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . L'analisi semi-quantitativa è stata eseguita per raffronto delle aree dei composti con quella dello standard interno, l'1-eptanolo, aggiunto in ogni campione alla medesima concentrazione al fine di minimizzare gli errori di quantificazione dovuti ad eventuali variazioni nelle risposte analitico-strumentali. In **Tabella 7** sono anche riportati i valori degli Indici di Ritenzione Lineare (LRI) calcolati secondo l'equazione di Kovats e, per molti dei composti identificati, i relativi valori LRI riportati in letteratura utilizzati per confermare le attribuzioni effettuate mediante l'analisi degli spettri di massa.

Il *pattern* di sostanze aromatiche trovate include 12 esteri, 8 terpeni, 9 alcoli, un'aldeide, due chetoni e due lattoni. Il profilo aromatico delle dodici varietà presenta differenze qualitative e quantitative, ma tra queste e la stagione di raccolta non sembra esserci una specifica relazione. In termini di concentrazione totale dei composti volatili Ninfa, Mandorlon, Ovardi e Fracasso mostrano i valori più alti, che oscillano tra 6 e 9  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , Goldrich, Orange Red e Palummella presentano valori intermedi, compresi nel *range* 2,5-5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , mentre Silvercot, Pinkot, Pellecchiella, Bulida e Alba sono scarsamente aromatiche, con una concentrazione totale compresa tra 0,8 e 2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Composti associati ad un forte odore di foglie verdi, come il (Z)-3-esenolo (composto N. 17), il (E)-2-esenolo (N. 18), ed un composto dall'odore tipicamente floreale, il linalolo (N. 23), sono le uniche tre sostanze individuate in tutte le cultivar. La presenza del (E)-2-Esenil acetato (N. 13, odore ceroso, simil-banana), dell' $\alpha$ -Terpineolo (N. 26, odore fortemente floreale, tipo lilla), del (Z)-3-Esenil acetato (N. 12, odore fruttato-foglia verde) e dell'Esil acetato (N. 10, odore fruttato) è stata invece riscontrata in quasi tutte le varietà.

Di contro, altri composti sono invece stati individuati soltanto in una sola cultivar, a volte peraltro in bassa concentrazione. Questi sono il Butil butanoato (N. 7, odore di ananas) in Bulida, il (Z)-3-Esenil butirato (N. 20, odore verde-fruttato) in Silvercot ed il  $\gamma$ -Esalattone (N. 27, odore erboso, simil tabacco o cumarinico) in Ninfa.

N	LRI	Riferimenti			Picchi												TOTALE µg <sup>-1</sup>
		LRI	Nota	Composti	Ninfa	Pinkot	Silver	Orange	Goldrich	Bulda	Ovardi	Palum.	Alba	Fracas.	Pellic.	Mandor.	
1	1053	1059	97	Butil acetato	0,249	ND	ND	ND	ND	0,005	ND	0,014	ND	ND	0,011	ND	
2	1082	1083	97	2-Metil-1-propanolo	ND	0,082	ND	0,019	0,062	0,024	0,453	0,062	0,026	0,065	ND	0,265	
3	1148	1149	98	1-Butanolo	0,153	ND	ND	ND	ND	ND	0,126	0,021	0,006	0,131	ND	0,022	
4	1160	1160	99	β-Mircene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
5	1174	1176	98	Pentil acetato	0,023	ND	ND	ND	0,007	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,008	
6	1210	1207	98	3-Metil-1-Butanolo	0,038	0,249	ND	0,054	0,209	0,033	1,161	0,23	0,078	0,231	0,115	0,544	
7	1218	1219	100	Butil butanoato	ND	ND	ND	ND	ND	0,006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
8	1215	1212	101	(E)-2-Esenale	ND	ND	ND	0,005	ND	0,005	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
9	1260	1257	102	1-Pentanolo	0,034	0,008	ND	0,011	0,006	0,006	ND	0,006	0,006	0,003	0,005	0,014	
10	1280	1275	98	Esil acetato	3,318	ND	0,101	0,749	1,207	0,058	1,016	0,304	0,03	0,034	0,034	2,799	
11	1319			2,2,6-Trimetil-cicloesossone	ND	0,011	ND	ND	0,009	ND	0,018	ND	0,004	ND	0,004	ND	
12	1324	1320	98	(Z)-3-Esenil acetato	1,4	ND	0,156	0,713	0,827	0,128	2,031	0,637	0,077	ND	0,008	0,641	
13	1342	1337	98	(E)-2-Esenil acetato	1,863	0,012	0,158	0,369	1,283	0,071	0,584	0,144	0,043	0,034	0,034	1,535	
14	1348	1339	98	6-Metil-5-epren-2-one	ND	0,013	ND	ND	ND	ND	ND	0,03	0,038	0,003	0,003	ND	
15	1363	1361	98	1-Esanolo	0,385	0,276	0,209	0,397	ND	0,006	ND	0,291	0,028	1,455	0,413	1,721	
16	1377	1377	98	Epil acetato	0,32	ND	ND	0,222	0,442	0,112	0,206	0,063	0,092	ND	ND	0,155	
17	1393	1389	98	(Z)-3-Esenolo	0,165	0,133	0,149	0,205	0,032	0,071	0,373	0,22	0,052	0,346	0,033	0,05	
18	1414	1415	83	(E)-Esenolo	0,409	0,402	0,479	0,377	0,206	0,267	0,569	0,29	0,165	0,499	0,212	0,014	
19	1417			Esil butanoato	ND	0,178	0,055	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
20	1466	1459	99	(Z)-3-Esenil butirato	0,033	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
21	1482			(E)-2-Esenil butirato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
22	1500	1484	98	2-Eil-1-esanolo	ND	ND	ND	ND	ND	0,006	0,116	0,003	ND	0,029	0,022	ND	
23	1556	1546	103	Linaleolo	0,446	0,318	0,15	0,206	0,167	0,061	1,267	0,174	0,117	2,84	0,265	0,771	
24	1621	1614	104	β-Cidochitrato	ND	0,084	0,072	0,088	0,135	0,064	0,184	0,029	0,047	0,058	0,051	ND	
25	1649			Butil metacrilato	0,043	ND	0,02	ND	0,013	ND	ND	ND	0,005	ND	ND	ND	
26	1701	1697	103	α-Terpinolo	0,037	0,024	0,014	0,016	0,01	ND	0,103	0,014	0,01	0,177	0,017	0,066	
27	1705	1708	98	γ-Esialtone	0,02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
28	1760			Geraniil acetato	ND	0,046	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,004	ND	0,045	ND	
29	1838			Dilido-β-ionone	ND	0,004	ND	0,006	ND	ND	ND	ND	0,016	0,087	0,002	0,082	
30	1857	1858	103	Geraniil acetone	0,028	ND	0,02	ND	0,028	0,021	ND	0,021	0,011	ND	ND	ND	
31	1887			Acido propionico-2-metil	ND	ND	0,015	ND	0,07	ND	0,087	ND	ND	ND	ND	ND	
32	1922	1918	105	Fenilil alcol	ND	0,019	0,015	0,007	0,02	0,005	0,003	0,033	0,008	ND	ND	0,029	
33	1945	1942	98	β-Ionone	ND	0,007	0,024	0,024	0,043	0,028	0,003	0,017	0,012	ND	0,014	ND	
34	2158	2158	98	γ-Decalotone	0,156	ND	0,004	0,004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
TOTALE µg <sup>-1</sup>					9,12	1,688	1,819	3,452	4,776	0,957	8,3	2,603	0,875	5,924	1,249	8,761	

**Tabella 7:** concentrazione, espressa in µg·g<sup>-1</sup>, dei 34 composti volatili identificati nel profilo aromatico delle 12 cultivar di albicocche. Sono riportati anche i valori dei LRI calcolati e di quelli ritrovati in letteratura a conferma della corretta assegnazione dei picchi, con la relativa nota bibliografica. Abbreviazioni: ND, non determinato. Riferimenti: 83, Guadagni et al. 1966; 97, Shimoda et al. 1995; 98, Sumitami et al. 1994; 99, Hiu Tung-Hsi et al. 1989; 100, Komthong et al. 2006; 101, Unmano et al. 1987; 102, Mottram 1985; 103, Shiratsuchi et al 1993; 104, Binder at al. 1990; 105, Verzera et al. 2004.

#### 3.4.4 Valutazione dell'aroma dei frutti

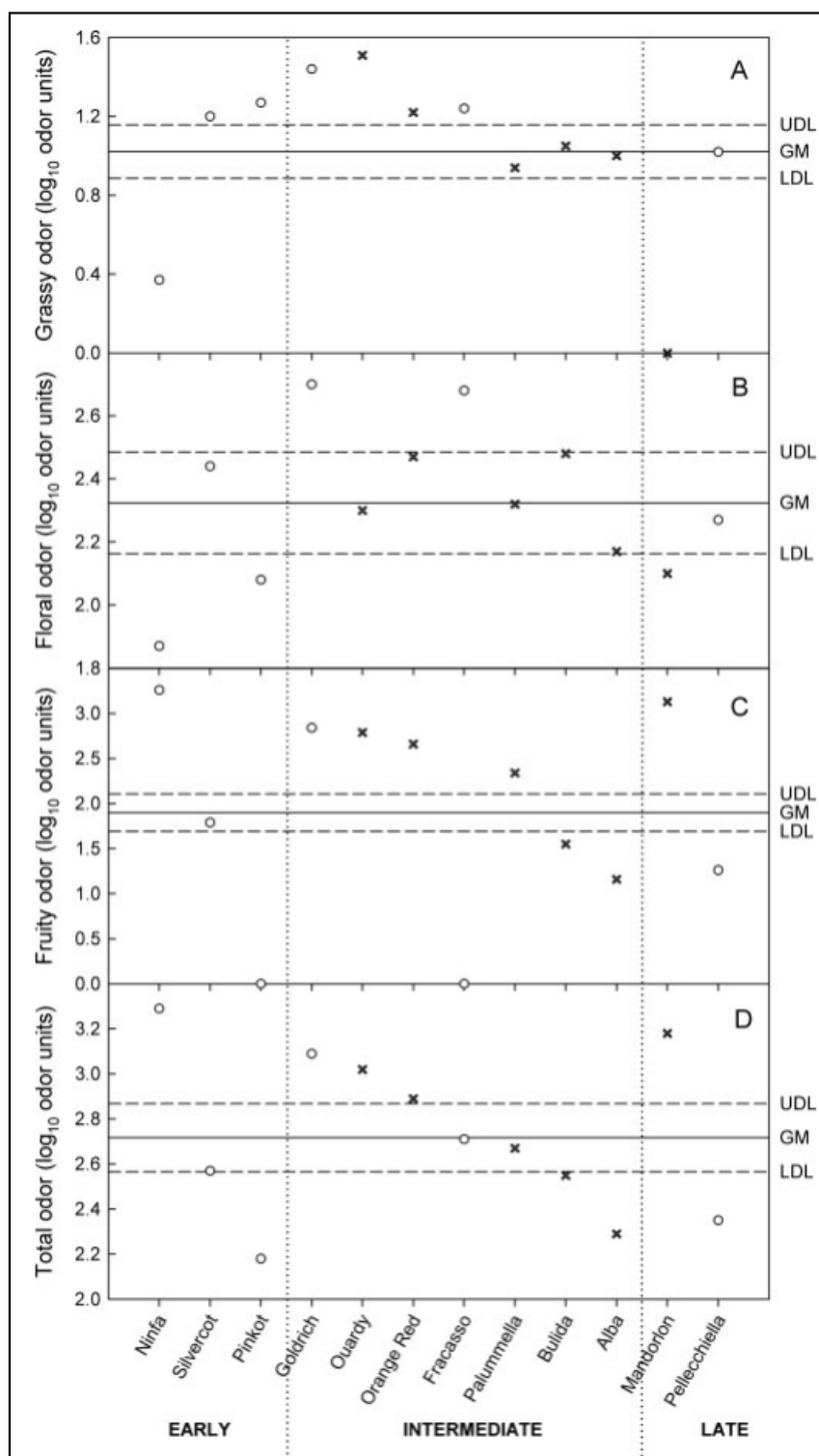
La conversione delle concentrazioni dei composti volatili in  $\text{Log}_{10}$  delle rispettive unità di odore è stata possibile soltanto per 27 dei 34 composti identificati e quantificati. Questo perché soltanto di questi composti sono disponibili in letteratura i valori di soglia di odore (*odour threshold*). Dai valori calcolati si evince che soltanto per 11 composti su 27 i valori dei  $\text{Log}_{10}$  ottenuti sono risultati positivi, cioè hanno mostrato un rapporto concentrazione nello HS/OTH maggiore di uno, mentre i rimanenti 16 composti sono presenti nei frutti ad una concentrazione inferiore alla loro soglia olfattiva e di conseguenza essi non contribuiscono, almeno teoricamente, alla formazione del *flavour* complessivo di queste varietà di albicocche. In realtà ciò potrebbe essere solo in parte vero, dal momento che nella teoria delle unità di odore si tengono in considerazione soltanto i contributi assoluti di ogni sostanza, trascurando i possibili sinergismi dovuti alle interazioni reciproche tra le componenti volatili e quelle con la matrice, che potrebbero far variare nel complesso la percezione umana dell'aroma.

L'esil acetato (N. 10), il  $\beta$ -ionone (N. 33), il linalolo (N. 23) e il (Z)-3-esenil acetato (N. 12) sono i composti che, per tutte le cultivar, maggiormente contribuiscono alla definizione dell'aroma delle albicocche (**Tabella 8**). Inoltre, quelle cultivar risultate relativamente scarse in esil acetato e in (Z)-3-esenil acetato si presentano invece più ricche di altri composti aromatici tipici delle albicocche, come il  $\beta$ -ionone e/o il linalolo (Ovardi e Fracasso) che hanno un sapore floreale oltre che una nota di profumo fruttata, ma anche il  $\beta$ -ciclocitrale (Silvercot, Pinkot, Orange Red, Goldrich, Bulida, Palummella, Alba e Pellecchiella) che apporta all'aroma dei frutti anche componenti verdi-erbose (**Tabella 8**).

La varietà Ninfa, oltre ad avere una forte componente fruttata dovuta all'esil acetato ed uno discreto contenuto in linalolo (dal profumo floreale), è l'unica varietà a presentare un certo quantitativo di  $\gamma$ -decalattone, un composto dal caratteristico profumo simil-pesca.

Le 12 cultivar mostrano differenze significative in termini di componenti odorose e di aroma totale (quantità espresse il  $\text{Log}_{10}$  delle rispettive unità di odore) ma queste differenze non sembrano essere correlate con la stagione di maturazione. In particolare, due cultivar precoci (Silvercot e Pinkot) e quattro intermedie (Goldrich, Ovardi, Orange Red e Fracasso) hanno mostrato una componente di odore erboso al di sopra dei limiti di decisione, mentre al di sotto di essi si sono attestate una cultivar precoce (Ninfa) ed una tardiva (Mandorlon) (**Figura 10A**). Due cultivar intermedie (Goldrich e Fracasso), invece, hanno mostrato un aroma floreale significativamente maggiore delle altre (valore superiore ai limiti di decisione), mentre due precoci (Ninfa e Pinkot) ed una tardiva (Mandorlon) hanno mostrato un contenuto in note floreali al di sotto dei limiti di decisione (**Figura 10B**). Una cultivar precoce (Ninfa), quattro intermedie (Goldrich, Ovardi, Orange Red e Palummella) ed una tardiva (Mandorlon) si sono rivelate più ricche in note fruttate, al contrario di Pinkot (precoce), Fracasso, Bulida, Alba (intermedie) e Pellecchiella (tardiva) che sono risultate avere una componente fruttata ben al disotto della media (**Figura 10C**). Infine le cultivar che più delle altre si sono distinte per un'abbondante profumazione, in termini di odore totale, sono la precoce Ninfa, le intermedie Goldrich

e Ovardi e la tardiva Mandorlon. Viceversa la Pinkot (precoce), l'Alba (intermedia) e la Pellecchiella (tardiva) sono risultate significativamente meno profumate delle altre albicocche in esame. (Figura 10D).



**Figura 10:** Valori medi dei Log<sub>10</sub> delle unità di odore per le note erbosa (A), floreale (B), fruttato (C) e totale (D) per le dodici varietà di albicocche in esame. Simboli: ○, cultivar ancora raccomandate; x, cultivar vecchie, non più raccomandate per la coltivazione; Le linee orizzontali continue indicano le medie generali (*grand means*, GM) (N=60). Le linee tratteggiate indicano i limiti di controllo superiore ed inferiore (*upper and lower decision limits*, UDL e LDL) per l'analisi delle medie ( $\alpha = 0.05$ ). Le linee punteggiate verticali separano le cultivar in base alla stagione di raccolta.



N	Riferimenti:		Composti	Preoci												Intermedie				Tardive	
	OTH	Nota		Ninfa	Pinkot	Silver	Orange	Goldrich	Bulda	Ovardi	Palum.	Alba	Fracas.	Pellic.	Mandor.						
1	63	106	Butil acetato	0,58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
4	13	107	Palmitene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
5	5	108	Penil acetato	0,688	ND	ND	ND	0,169	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,196		
10	2	106	Esil acetato	3,22	ND	1,701	2,574	2,781	1,429	1,016	2,706	1,173	ND	ND	1,234	3,11	1,904	3,11	3,11		
12	8	109	(Z)-3-Esenil acetato	2,243	ND	1,289	1,95	2,014	1,193	2,031	2,405	0,992	ND	ND	ND	ND	1,904	1,904	1,904		
17	70	110	(Z)-3-Esendo	0,371	0,28	0,329	0,467	ND	0,015	0,373	0,726	ND	0,712	0,712	ND	ND	ND	ND	ND		
23	6	110	Linolio	1,871	1,724	1,397	1,537	1,443	1,012	1,267	2,325	1,29	2,691	2,691	1,644	2,109	2,109	2,109	2,109		
24	5	65	$\beta$ -Ciclocitralo	ND	1,226	1,157	1,133	1,431	1,102	0,184	1,566	0,975	1,088	1,088	1,013	ND	ND	ND	ND		
28	9	111	Geranil acetato	0,49	0,705	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,7		
33	0,09	112	$\beta$ -Ionone	ND	1,875	2,417	2,425	2,681	2,465	0,003	1,481	2,131	ND	ND	2,181	ND	ND	ND	ND		
34	11	113	$\gamma$ -Decalitone	1,152	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		

**Tabella 8:** . Odour thresholds (OTH) e valori dei  $\text{Log}_{10}$  delle unità di odore per le 12 cultivar di albicocche in esame. Per ogni valore di OTH sono riportati anche i riferimenti bibliografici nei quali sono stati ritrovati. Abbreviazioni: ND, non determinato. Riferimenti: 106, Flath *et al.* 1967; 107, Buttery *et al.* 1987; 108, Herrmann *et al.* 1991; 109, Grager *et al.* 2007; 110, Buttery *et al.* 1990; 111, Buttery *et al.* 1988; 112, Ferreira *et al.* 2000; 113, Engel *et al.* 1988.

### 3.4.5 Correlazione tra le variabili

Dall’analisi di correlazione semplice tra i dati (mediati per cultivar) riguardanti i parametri chimico-fisici e la componente volatile dei frutti, non sono state trovate correlazioni dei parametri qualitativi misurati né con la data di raccolta né con la consistenza della polpa, indicando che la qualità e le caratteristiche olfattive dei frutti non sono influenzate dallo stato di maturazione degli stessi.

Inoltre, contrariamente a quanto riscontrato in studi precedenti,<sup>57,58</sup> non è stata trovata alcuna relazione tra la data di maturazione ed il peso dei frutti, o il contenuto in solidi solubili totali (TSS) o l’acidità del succo. Queste discrepanze con i risultati riportati in lavori precedenti potrebbero essere spiegati da differenze nel materiale vegetale (le piante) e dal numero di cultivar in esame; in alternativa, l’uso della colorazione della buccia come indice di maturazione in altri studi, potrebbe essere la causa delle differenze nei risultati ottenute.

È invece stata trovata l’attesa relazione diretta tra il peso dei frutti ed il loro diametro ( $r = 0.965$ ,  $P < 0.001$ ) ed una relazione inversa tra i solidi solubili totali (TSS, indicativi del contenuto zuccherino) e l’acidità del succo ( $r = -0.572$ ,  $P = 0.050$ ), cosa che è ben documentata per le pesche,<sup>114</sup> mentre sulle albicocche sono riportati in letteratura risultati contrastanti.<sup>55,57</sup> Inoltre il contenuto in TSS è stato positivamente correlato con la concentrazione totale di composti volatili ( $r = 0.675$ ,  $P = 0.016$ ) ed in particolare con il contenuto in alcoli ( $r = 0.595$ ,  $P = 0.041$ ). Questo potrebbe essere parzialmente spiegato dal fatto che gli zuccheri accumulati durante la maturazione dei frutti, forniscono substrati per l’aumento della respirazione climaterica, che è a sua volta accompagnato da un accumulo di acidi grassi,<sup>115</sup> diretti precursori dei composti volatili.<sup>116</sup>

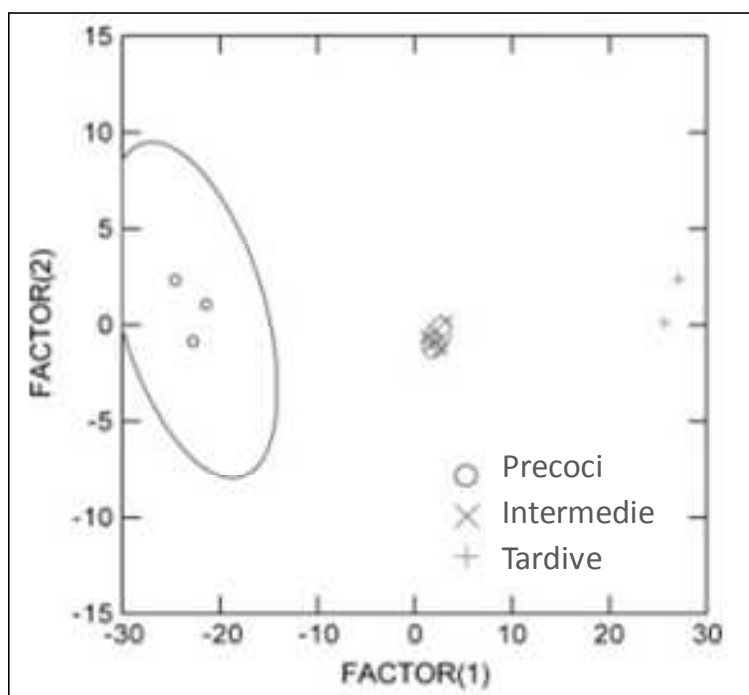
Inoltre, è stata trovata una correlazione inversa tra l’acidità del succo e la concentrazione totale delle sostanze volatili, ed in particolare con gli esteri ( $r = -0.644$ ,  $P = 0.024$ ) ed i lattoni ( $r = -0.612$ ,  $P = 0.034$ ). Inoltre, la nota odorosa fruttato è stata positivamente associata al contenuto in esteri, mentre è stata trovata una correlazione inversa tra il contenuto in lattoni e l’odore floreale ( $r = -0.575$ ,  $P = 0.050$ ), che invece sono direttamente correlati con l’odore erboso ( $r = 0.633$ ,  $P = 0.027$ ).

### 3.4.6 Discriminazione tramite LDA delle cultivar precoci, intermedie e tardive

La *Linear Discriminant Analysis* (LDA) applicata agli attributi chimico-fisici dei frutti ed alla concentrazione delle sostanze volatili trovate, si è dimostrata in grado di effettuare un raggruppamento delle varietà di albicocca in base alla stagione di maturazione (**Figura 11**). In particolare, il *canonical score plot* mostra una distanza leggermente maggiore tra i gruppi di albicocche precoci e intermedie (Mahalanobis = 638), rispetto a quella tra le intermedie e le tardive (Mahalanobis = 590).

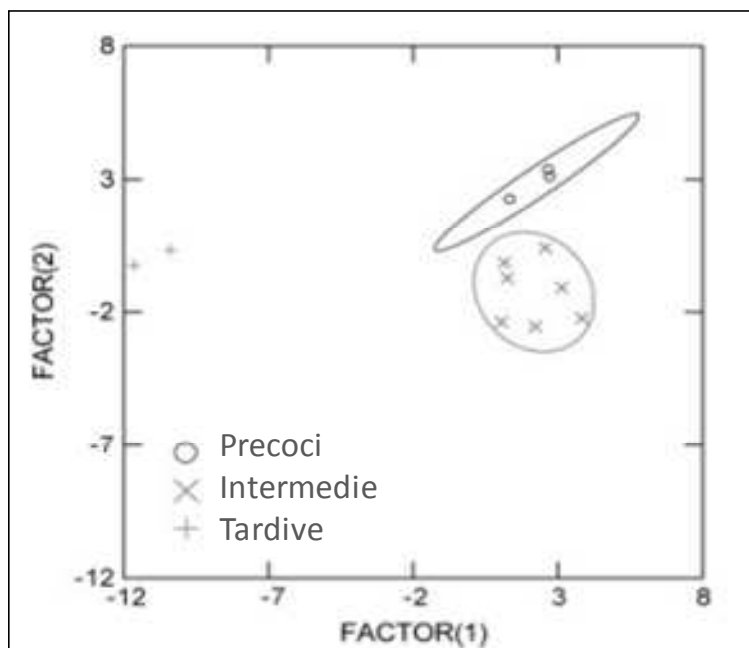
Questa analisi discriminante è stata effettuata in modalità *backward-stepwise* ed ha portato all’inclusione, nella funzione canonica discriminante tra i frutti in base alla stagione di maturazione, di sei variabili: cinque composti volatili (N. 8, 15, 18, 22 e 28 della **Tabella 7**) e il diametro dei frutti. È interessante notare che nella funzione discriminante ottenuta non è stato incluso nessuno dei

composti volatili più abbondanti del profilo aromatico delle albicocche e, tra i selezionati, soltanto il (E)-2-esenale era già stato indicato come composto caratteristico dell’aroma di questi frutti.<sup>70</sup>



**Figura 11:** *Canonical score plot* della LDA effettuata sui parametri chimico fisici e sulla concentrazione delle sostanze volatili per la discriminazione delle 12 cultivar di albicocche, raggruppate secondo la stagione di maturazione. Simboli: ○, varietà precoci; ×, varietà intermedie; +, varietà tardive.

Includendo nella costruzione del modello statistico, oltre ai parametri chimico fisici, anche i valori delle unità di odore espressi in  $\text{Log}_{10}$  degli undici composti riportati in **Tabella 8**, l’LDA ottenuta riesce a discriminare comunque i tre gruppi di albicocche a diversa stagione di maturazione (**Figura 12**). In questo caso, comunque, il *canonical score plot* mostra una distanza notevolmente maggiore, rispetto a quanto ottenuto precedentemente, tra le albicocche tardive e i due gruppi di precoci e intermedie (Mahalanobis = 189 e 180), mentre questi due gruppi si trovano molto vicini l’un l’altro (Mahalanobis = 23). Anche questa funzione discriminante è stata ottenuta in modalità *backward-stepwise* ed in essa sono state incluse 6 delle sostanze volatili considerate (5, 10, 12, 17, 23 e 24 della **Tabella 8**) ed il colore della buccia. In questo caso, eccezion fatta per il pentil acetato, composto presente in bassa concentrazione e soltanto in tre varietà (Ninfa, Goldrich e Mandorlon), tutte le altre sostanze volatili selezionate dall’analisi statistica sono quelle che maggiormente contribuiscono alla determinazione dell’aroma dei frutti. Tra queste, l’esil acetato, il linalolo ed il  $\beta$ -Ciclocitrato erano già state indicate, in lavori precedenti, come tipiche dell’aroma delle albicocche.<sup>70</sup>



**Figura 12:** Canonical score plot della LDA effettuata sui parametri chimico fisici e sugli attributi olfattivi ( $\text{Log}_{10}$  delle unità di odore) per la discriminazione delle 12 cultivar di albicocche, raggruppate secondo la stagione di maturazione. Simboli: ○, varietà precoci; x, varietà intermedie; +, varietà tardive.

### 3.4.7 PCA e raggruppamento delle cultivar

La *Principal Component Analysis* (PCA) effettuata su tutti i parametri qualitativi ed aromatici dei frutti, ha mostrato come oltre il 76% della variabilità totale può essere spiegata tramite i primi tre fattori o Componenti Principali (PCs) (**Tabella 9**). PC1, PC2 e PC3 rappresentano, rispettivamente, il 41.1, il 20.5 ed il 15.3% della variabilità totale. La **Tabella 10** mostra la correlazione tra le variabili originali e le prime tre componenti principali: la PC1 spiega principalmente i TSS, l'acidità ed il pH del succo e la nota d'odore floreale, la PC2 spiega, invece, principalmente le variabili peso, diametro e nota erbosa, mentre il colore della buccia e la nota di odore fruttato sono per lo più riconducibili alla PC3.

PC	Radici latenti	Variabilità (%)	Variabilità cumulativa
1	3,695	41,06	<b>41,06</b>
2	1,849	20,54	61,60
3	1,376	15,29	76,89
4	0,890	9,89	86,77
5	0,635	7,06	93,83
6	0,355	3,94	97,77
7	0,132	1,47	99,24
8	0,060	0,67	99,91
9	0,008	0,09	100,00

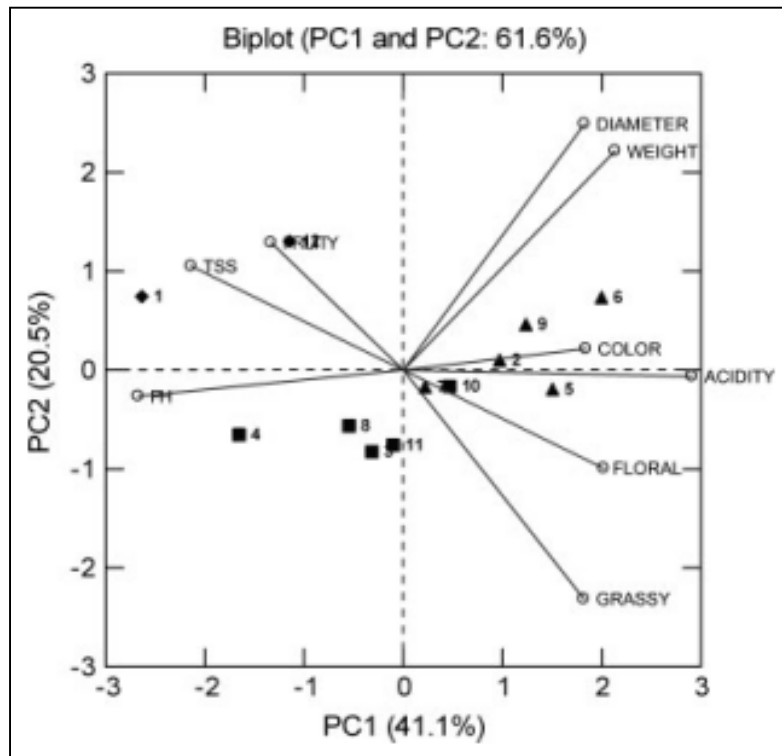
**Tabella 9:** Radici latenti e percentuale della variabilità totale tra le cultivar di albicocca spiegata dalle nove componenti principali (PCs). Le prime tre PCs sono in grado di descrivere nel complesso oltre il 76% della variabilità totale.

FATTORI	PC1	PC2	PC3
<i>Attributi qualitativi</i>		<i>Peso delle componenti</i>	
Peso	0,664	<b>0,668</b>	-0,292
Diametro	0,551	<b>0,750</b>	-0,307
Colore Buccia	0,555	0,065	<b>0,669</b>
TSS	<b>-0,645</b>	0,317	0,380
Acidità	<b>0,878</b>	-0,020	0,230
pH	<b>-0,805</b>	-0,080	-0,308
Fruttato	-0,401	0,388	<b>0,669</b>
Floreale	<b>0,610</b>	-0,300	0,095
Erboso	0,549	<b>-0,698</b>	-0,015
<i>Cultivar</i>		<i>Punteggio delle componenti</i>	
Ninfa	-1,934	1,090	-0,897
Silvercot	0,713	0,145	0,092
Pinkot	-0,232	-1,214	-0,495
Orange Red	-1,215	-0,960	0,309
Goldrich	1,105	-0,287	1,520
Bulida	1,467	1,077	-0,635
Ovardi	0,162	-0,250	0,745
Palummella	-0,401	-0,829	1,214
Alba	0,908	0,675	-0,476
Fracasso	0,344	-0,243	-1,791
Pellecchiella	-0,074	-1,115	-0,684
Mandorlon	-0,843	1,910	1,098

**Tabella 10:** Peso delle componenti per i parametri qualitativi dei frutti e punteggio delle componenti per le cultivar di albicocca ricavati dalla PCA.

La *Cluster Analysis*, condotta mediante la tecnica *k-means* sul peso dei componenti (*component loadings*) separa gli attributi qualitativi in tre gruppi ben visibili nel grafico a due dimensioni ottenuto tramite la metodica *biplot* e riportato in **Figura 13**: il primo associa il contenuto in TSS, il pH e l'odore fruttato, il secondo associa il peso ed il diametro dei frutti ed il terzo associa l'acidità, la colorazione della buccia e gli odori floreale ed erboso. Sulla base del posizionamento nel *biplot* ottenuto con le sole prime due PCs, la PCA mostra alcune prevedibili relazioni, quali una relazione opposta tra pH ed acidità, tra TSS ed acidità e tra le note odorose fruttato ed erboso. Inoltre altre interessanti relazioni sono state messe in mostra dalla PCA: una relazione opposta tra odore fruttato ed odore floreale, e tra colore della buccia e TSS e/o pH (**Figura 13**). La correlazione diretta tra acidità e colore della buccia, riscontrabile con la PCA ma non tramite analisi di correlazione semplice, era stata già riportata in precedenti lavori.<sup>57</sup> Inoltre la *Cluster Analysis* tramite *k-means* dei punteggi delle componenti (*component scores*) ha permesso di effettuare dei raggruppamenti delle varietà che però non possono essere facilmente percettibili dal *biplot*, essenzialmente perché essendo un grafico bidimensionale non mostra la variabilità espressa dalla terza componente (PC3, 15%). Per lo stesso motivo, il raggruppamento varietale sulla base di similarità negli attributi qualitativi dei frutti, non è proprio immediato da osservare nel nostro *biplot*. Nello specifico la *cluster analysis* ottenuta

indica che: Ninfa e Mandorlon formano un gruppo che si posiziona nel quadrante in alto a sinistra, insieme con i TSS e l'odore fruttato; Bulida, Ovardi, Alba, Goldrich e Silvercot formano un secondo gruppo che si distribuisce nei due quadranti di destra, vicino alle variabili peso, diametro, colore, acidità e odori floreale e erboso; Fracasso, Pellecchiella, Palummella e Pinkot, infine, formano un terzo gruppo e sono posizionate nei due quadranti in basso, tra il pH e l'odore erboso (**Figura 13**). Il raggruppamento, quindi, non mostra alcuna separazione relativa alla stagione di maturazione.



**Figura 13:** Raggruppamento delle dodici varietà di albicocche secondo i parametri qualitativi dei frutti (chimico-fisici e note di odore) determinato tramite PCA seguita da *cluster analysis* tramite *k-mean* dei *component loadings* e dei *component scores*. Simboli ed abbreviazioni: 1, Ninfa; 2, Silvercot<sup>®</sup> Versyl; 3, Pinkot<sup>®</sup> Copty; 4, Orange Red<sup>®</sup> Bhart; 5, Goldrich; 6, Bulida; 7, Ovardi; 8, Palummella; 9, Alba; 10, Fracasso; 11, Pellecchiella; 12, Mandorlon; TSS, solidi solubili totali. Simboli differenti (■,◆,▲) indicano diversi raggruppamenti ottenuti dalla *cluster analysis*.

### 3.5 CONCLUSIONI

In questo studio sono state analizzate le caratteristiche chimico fisiche di frutti di albicocche appartenenti a 12 diverse varietà. Il set di campioni analizzato, costituito da un pool molto vario di cultivar diffuse in Italia a diversa stagione di maturazione (precoci, intermedie e tardive), prevedeva sia varietà ad alta produttività, sia varietà di nuova introduzione e quindi ancora in fase di valutazione, sia varietà vecchie o oramai non più raccomandate. Per mezzo della metodica di estrazione SPME abbinata all'analisi GC/MS è stata anche eseguita una selettiva identificazione quali-quantitativa della componente volatile degli stessi frutti. Al fine di ottenere una caratterizzazione della qualità dettagliata degli stessi, alle suddette analisi è stata inoltre affiancata un'analisi dell'aroma dei frutti. Essa è stata effettuata analizzando il contributo relativo dei composti volatili identificati alla formazione dell'aroma complessivo tipico delle diverse varietà di albicocche, permettendoci di evidenziare i differenti composti che caratterizzano le dodici diverse cultivar analizzate, e fornendo anche informazioni specifiche sull'aroma di ciascuna di esse.

Tra le cultivar ancora raccomandate ed ampiamente diffuse sul territorio italiano per la coltivazione della albicocche, Ninfa e Goldrich hanno confermato in questo studio di possedere delle proprietà chimico-fisiche ed aromatiche davvero molto interessanti, che fanno di questi frutti prodotti di elevata qualità.

In altre varietà ancora raccomandate come la Fracasso, qualità chimico fisiche in generale abbastanza buone, sono accompagnate da altre caratteristiche non proprio attrattive come una colorazione della buccia troppo chiara ed un aroma poco accattivante, praticamente privo di note fruttate. Altre ancora, come la Pellecchiella, in questo studio appaiono praticamente non soddisfacenti sia in termini di qualità dei frutti, sia in termini di caratteristiche aromatiche degli stessi (**Figure 8-10**).

Tra le cultivar vecchie o comunque non più segnalate per la coltivazione, invece, la Mandorlon, la Ovardi e la Orange Red mostrano senza dubbio delle ottime caratteristiche chimico fisiche insieme con un intenso e ben bilanciato aroma. Sebbene sfavorite dalla forte necessità di climi freddi e dalle conseguenti produzioni irregolari<sup>49,50,51</sup>, Mandorlon e Orange Red, per esempio, potrebbero essere proposte per la coltivazione ad alte quote e/o latitudini oppure potrebbero essere utilizzate come base di partenza per futuri miglioramenti genetici. Grazie alle egregie qualità dei loro frutti, insieme al fatto che le tre varietà presentano tre diverse epoche di maturazione, Mandorlon, Ovardi e Orange Red potrebbero davvero rappresentare una eccellente fonte genetica per l'estensione temporale della stagione di raccolta di albicocche di elevata qualità.

Inoltre questo studio indica come, per frutti molto profumati come le albicocche, uno studio dettagliato del loro aroma è essenziale per l'ottenimento di utilissime informazioni sulla qualità generale dei frutti.

L'analisi chemiometrica dei dati analitici si è dimostrata ancora una volta uno strumento utilissimo per l'estrapolazione di informazioni aggiuntive dai dati analitici, permettendo così l'ottenimento di una

visione generale di un problema complesso, altrimenti non ottenibile con i classici strumenti di analisi dei dati. Essa si è rivelata particolarmente fruttuosa nel nostro studio in cui il sistema da analizzare è costituito da un cospicuo numero di campioni, descritti da un elevato numero di variabili, peraltro molto disomogenee, rappresentate da parametri chimico-fisici e qualità aromatiche dei frutti. La LDA infatti ha mostrato la sua capacità discriminativa, riuscendo a separare i tre gruppi di cultivar in base alla stagione di maturazione, grazie alla combinazione di variabili chimico-fisiche con le concentrazioni delle sostanze volatili e degli attributi olfattivi.

Questo dimostra che la determinazione dei composti volatili rappresenta un passaggio chiave nella definizione della qualità generale dei frutti, oltre che un possibile strumento utile alla discriminazione tra le diverse cultivar, e quindi essa dovrebbe essere prevista tra analisi per la determinazione di quelli che sono i giudizi tecnici presentati annualmente nelle liste varietali.



#### **4. STUDIO DELLA COMPONENTE AROMATICA, TRAMITE SPME-GC-MS, DI OLIVE VERDI DA MENSA SOTTOPOSTE A DIFFERENTI TRATTAMENTI IRRIGUI**

##### **4.1 INTRODUZIONE**

###### **4.1.1 Coltivazione delle olive da mensa**

L'importanza della coltura delle olive da tavola sul territorio nazionale è secondaria rispetto alla coltivazione di cultivar per l'ottenimento dell'olio di oliva.

La produzione mondiale ammonta a 2 milioni di tonnellate, delle quali il 38% è prodotto in Europa, ed in particolare in Spagna, Grecia, Italia e Portogallo.<sup>117</sup>

Le olive da mensa rappresentano un settore emergente di grande interesse per l'olivicoltura italiana; in Italia la produzione olivicola ha luogo principalmente nelle regioni meridionali dalle quali provengono circa 85.000 tonnellate l'anno. Tra le regioni olivicole italiane la Sicilia, con il 46,7% della produzione nazionale ed un utilizzo in media del 7% della sua produzione olivicola annuale, è quella che maggiormente contribuisce a rifornire i mercati interni ed esteri di olive destinate al consumo diretto. Ad essa seguono Puglia 27%, Campania 5,5%, Calabria 5%, Sardegna 4,5%, Basilicata 1,8% ed ancora Lazio, Abruzzo, Liguria, Marche, Toscana ed altre.<sup>118</sup>

Non c'è dubbio che il patrimonio olivicolo italiano, caratterizzato da una notevole biodiversità varietale, abbia tutte le potenzialità per conquistare competitività sul mercato grazie alle spiccate caratteristiche organolettiche del prodotto.

Nonostante questa grande varietà, nel nostro paese il numero di cultivar che per resistenza e sviluppo della polpa, nocciolo piccolo e limitata resa in olio dimostrano una buona attitudine alla trasformazione in olive da tavola, risulta limitato.

Pertanto, le incentivazioni attuate a favore della olivicoltura non hanno prodotto l'effetto sperato anche nei casi in cui le condizioni ambientali risultavano favorevoli.

La condizione della olivicoltura siciliana non è difforme rispetto a quella nazionale e l'intero settore richiederebbe, in tempi brevi, un intervento organico in grado di apportare profonde innovazioni delle strutture produttive migliorando la qualità della produzione e riducendo al contempo i costi.

###### **4.1.2 Olive da mensa**

L'oliva, frutto prodotto da *Olea europea*, è una drupa carnosa che viene coltivata in tutti i paesi del bacino del Mediterraneo, soprattutto nel centro e nel sud di Spagna e Italia, Grecia, Turchia, Tunisia e Marocco.

Essa è caratterizzata da un epicarpo o buccia, da un mesocarpo carnoso ed amaro e da un endocarpo legnoso contenente un singolo seme.

L'epicarpo è lo strato più esterno e più sottile della drupa e rappresenta dall'1 al 3% in peso del frutto. Per più del 50% (sulla sostanza secca) è composto da una frazione solubile in cloroformio costituita da idrocarburi saturi, squalene, cere, trigliceridi, alcoli grassi e triterpenici, acidi grassi liberi e acidi triterpenici. Nel periodo che precede l'invasatura (cambiamento di colore della drupa) è di colore verde più o meno chiaro, ed alla maturazione il colore varia dal biancastro al rossiccio, al violaceo ed al nero (**Figura 1**).



**Figura 1:** Differenti stati di maturazione delle olive da mensa.

Il mesocarpo o polpa rappresenta il 70-80% dell'intero frutto, ed è costituito principalmente da acqua e sostanze grasse, ma in percentuali minori contiene anche zuccheri semplici, polisaccaridi, proteine, acidi organici, tannini, sostanze pectiche, pigmenti e sostanze minerali.

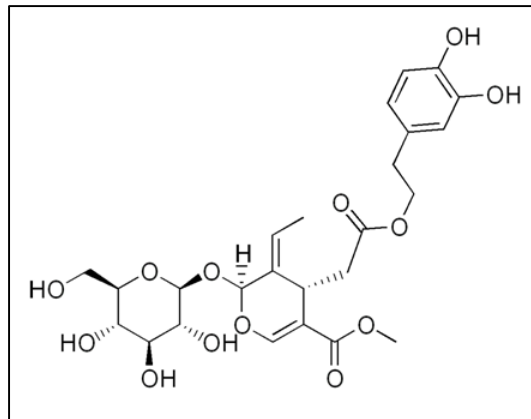
Il contenuto di grassi varia dall'8 al 10% (soprattutto nelle olive da tavola), ma esso non rimane sempre costante durante lo sviluppo della drupa: durante il progredire della maturazione il contenuto di acqua diminuisce e quello in olio aumenta.

Gli zuccheri semplici come glucosio e fruttosio, sono contenuti in percentuale variabile dal 2,5 al 6%. I polisaccaridi, le cui quantità variano in rapporto allo stato di maturazione, sono principalmente costituiti da cellulose, emicellulose e gomme.

Fra i vari componenti di natura glucosidica presenti nell'olivo, riveste particolare importanza l'oleuropeina. Questo composto, la cui concentrazione nella polpa varia dall'1 al 3% in rapporto allo stato di maturazione e varietà, è un estere eterosidico dell'acido elenolico con l'idrossitiroso, ed è uno dei principali responsabili del sapore amaro dei frutti e delle foglie di olivo (**Figura 2**). La sua degradazione è correlata all'incremento di enzimi idrolitici, in particolare le  $\beta$ -glucosidasi, che catalizzano l'idrolisi della stessa.

Oltre ad essere responsabile della sensazione d'amaro nelle olive, vengono riconosciute all'oleuropeina diverse attività biologiche tra cui, principalmente, una spiccata capacità

antiossidante,<sup>119,120,121</sup> ma anche anti-infiammatorie,<sup>122,123,124</sup> battericida contro un ampio spettro di batteri Gram negativi e Gram positivi, oltre che proprietà antivirali<sup>125</sup> ed antimicrobiche.<sup>126,127,128,129,130</sup>



**Figura 2:** estere dell'oleuropeina, responsabile del sapore amaro delle olive

L'endocarpo dell'oliva è costituito da una parte esterna legnosa e diversa a seconda delle varietà e da una parte interna rappresentata dal seme. Anche il seme, detto mandorla, contiene un'apprezzabile quantità di olio.

I valori nutrizionali e le proprietà salutistiche delle olive da mensa variano a seconda della varietà, del grado di maturazione e dei sistemi di lavorazione.

L'elevato contenuto di sali minerali, il buon rapporto calcio/potassio e la presenza di amminoacidi e di antiossidanti naturali (vitamine A, D, E, K, tocoferoli, carotenoidi e polifenoli), conferiscono al frutto il ruolo di alimento non limitato al solo aspetto edonistico, ma anche di prevenzione di determinate patologie cardiovascolari esplicando un effetto cardiotonico, causando la riduzione della pressione sanguigna, l'aumento del flusso di sangue all'arteria coronaria, diminuzione delle aritmie,<sup>131,132,133</sup> l'inibizione dell'aggregazione piastrinica<sup>134</sup> ed inoltre un'attività ipoglicemizzante.<sup>135</sup>

Le più importanti zone di coltivazione dell'olivo sono il bacino mediterraneo (in cui viene coltivato il 98% degli oliveti) in cui si osservano grandi cambiamenti delle condizioni climatiche durante l'anno.<sup>136</sup>

L'olivo infatti ha un buon livello di resistenza alle basse temperature, superato il quale, muoiono germogli, rami e perfino la pianta. In generale, le basse temperature in inverno causano danni nelle foglie, nei frutti e nei piccioli: le gelate raggrinziscono le olive, i piccioli appassiscono e quindi il contenuto e la qualità dell'olio di oliva diminuisce.

Anche le grandinate hanno gli stessi effetti sull'olivo delle gelate e del freddo. Se si verificano quando i frutti sono completamente maturi, le perdite nella qualità possono essere molto importanti.

D'altra parte, le cultivar di olive sono influenzate allo stesso modo dal caldo, dai venti caldi e dalla siccità che causano danni negli olivi giovani.

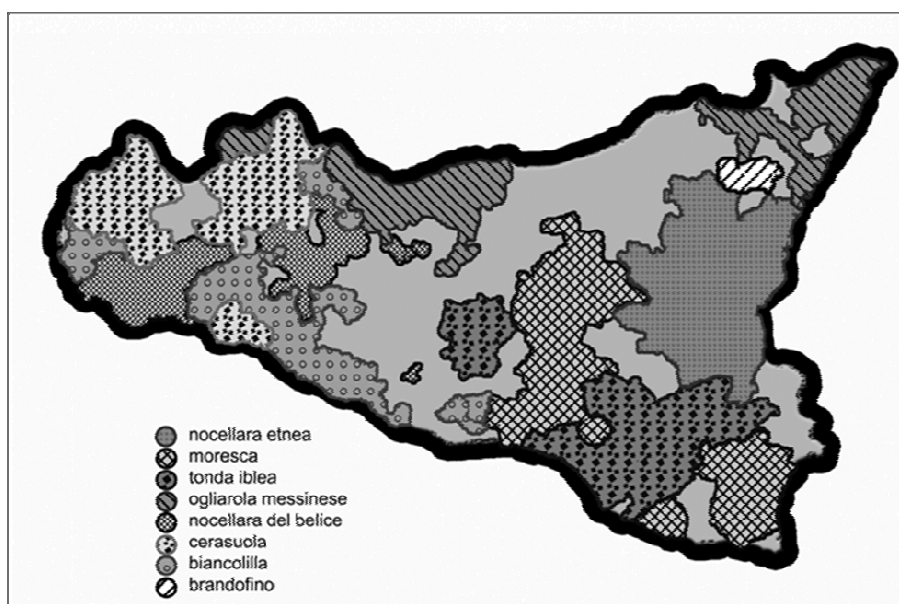
Altre alterazioni dovute ad agenti abiotici, come quelle prodotte da trattamenti con erbicidi, fitosanitari o inquinanti dell'aria, sono meno importanti.

#### 4.1.3 Cultivar di olive da mensa siciliane

Studi condotti più recentemente e pubblicati nel lavoro dal titolo *Cultivar di olivo siciliane. Identificazione, validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli* dal Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Palermo, dai Servizi allo Sviluppo dell'Assessorato regionale agricoltura e dall'Ente di Sviluppo Agricolo hanno portato alla discriminazione di 28 cultivar certe<sup>8</sup> attraverso rilevamenti bio-morfologici e genetici.

Tra queste, alcune hanno ampia diffusione nel territorio regionale, altre hanno una presenza circoscritta a particolari aree geografiche, talora molto ristrette.

Sono otto le cultivars predominanti: la Biancolilla, l'Ogliarola messinese, la Cerasuolo, la Nocellara del Belice, la Moresca, la Nocellara Etnea, la Tonda Iblea e la Brandofino (**Figura 3**).



**Figura 3:** Distribuzione delle cultivar nella regione Sicilia

Le varietà si diversificano per una serie di caratteri: dalla vigoria alla produttività, dalla fertilità alla sensibilità ai parassiti, dalla resistenza ai fattori biotici alla tolleranza dei deficit pedologici, ecc..

Dal punto di vista pratico la classificazione delle cultivar viene fatta sulla base delle finalità produttive con un raggruppamento in tre tipi:

1. **Cultivar da olio:** sono quelle che vengono coltivate per l'estrazione dell'olio, e sono caratterizzate da una resa in olio normalmente non inferiore al 18%. Il frutto generalmente ha pezzatura media o medio-piccola con peso oscillante da 1 a 3,5 g.. La polpa è poco spessa ed il nocciolo è relativamente grosso per cui si ha un rapporto polpa - nocciolo relativamente basso;
2. **Cultivar da mensa:** sono quelle i cui frutti a seguito di opportune lavorazioni, vengono destinate al consumo diretto. Sono caratterizzate da un buon sapore ed aroma del frutto.

La pezzatura del frutto è medio-grossa ed il peso varia da 5 a 16 grammi. Si contraddistinguono per la polpa spessa e consistente ed il nocciolo relativamente piccolo con un rapporto polpa / nocciolo più elevato, mentre presentano una resa in olio inferiore al 17-18%. Inoltre, si contraddistinguono per l’attitudine alla lavorazione industriale. Le cultivar commercialmente più apprezzate sono quelle con drupa grossa, la cui appariscenza influenza sensibilmente il prezzo di vendita;

3. **Cultivar a duplice attitudine:** sono quelle utilizzate sia per l’estrazione dell’olio che per la produzione di olive da mensa verdi, e più comunemente cangianti o nere. Il frutto presenta caratteristiche intermedie rispetto ai gruppi precedentemente descritti. La pezzatura è media ed il peso varia da 3,5 a 5 g, mentre la resa in olio può superare il 18%. Il rapporto polpa-nocciolo può essere relativamente elevato.<sup>137</sup>

#### 4.1.4 Classificazione commerciale delle olive da tavola

Con lo scopo di soddisfare le esigenze dei consumatori le olive da tavola sono poste in commercio in diverse tipologie che sono classificate sinteticamente nel seguente modo:

- a. **olive conciate:** olive verdi, cangianti o nere deamarizzate con trattamento alcalino e poste successivamente in salamoia dove subiscono una fermentazione totale o parziale e conservate con aggiunta o meno di acidificanti. Commercialmente si definiscono:
  - olive verdi conciate in salamoia;
  - olive cangianti in salamoia;
  - olive nere conciate.
- b. **olive al naturale:** olive verdi, cangianti o nere deamarizzate in salamoia totalmente o parzialmente fermentate e conservate con o senza aggiunta di acidificanti. Commercialmente si definiscono:
  - olive verdi al naturale;
  - olive cangianti al naturale;
  - olive nere al naturale.
- c. **olive disidratate e/o raggrinzite:** olive verdi, cangianti o nere che possono aver subito una deamarizzazione in bagno alcalino e possono essere conservate in salamoia o parzialmente disidratate al sale secco, con riscaldamento o con altri processi tecnologici. Commercialmente si definiscono:
  - olive verdi disidratate e/o raggrinzite;
  - olive cangianti disidratate e/o raggrinzite;
  - olive nere disidratate e/o raggrinzite.

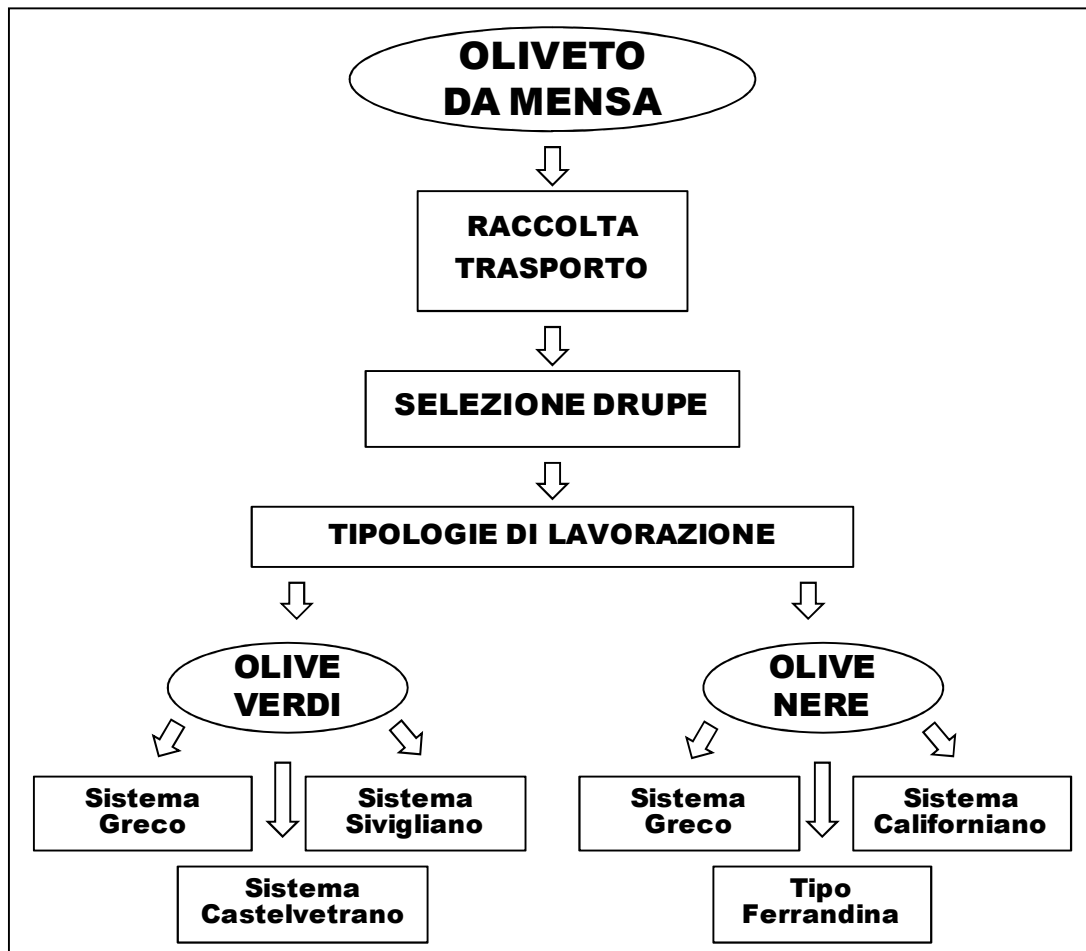
**d. olive annerite per ossidazione:** olive verdi o cangianti conservate in salamoia, che possono aver subito fermentazione, annerite per ossidazione in ambiente alcalino e conservate in recipienti ermetici mediante un processo termico di sterilizzazione. Presentano un colore nero uniforme. Commercialmente sono definite:

- olive nere.

#### 4.1.5 Sistemi tecnologici delle olive da mensa

Le olive da mensa raccolte dall'albero non possono essere consumate subito, ma richiedono un trattamento di lavorazione più o meno lungo che le rende commestibili, determinano tuttavia l'eliminazione o la riduzione del principio amaro contenuto nell'oliva (oleuropeina).

I procedimenti di trasformazione delle olive da tavola sono diversi a seconda se le olive vengono lavorate in verde o in nero (**Figura 4**).



**Figura 4:** schema dei differenti processi di produzione di olive da tavola

Nonostante l'indiscussa importanza economica delle olive da mensa nel mercato mondiale, le tecniche di fermentazione di questi vegetali sono rimaste ad un livello empirico.

Le tre preparazioni commerciali più importanti nel mondo sono: lo stile Sivigliano delle olive verdi in salamoia, lo stile Californiano di olive nere mature ed il metodo tradizionale di olive nere al naturale.<sup>138, 139</sup>

La fermentazione nello stile Sivigliano è realizzata dall'attività dei Batteri Lattici Acidi (LAB), mentre nelle due restanti preparazioni gli organismi responsabili del processo fermentativo sono i lieviti, mentre i LAB rappresentano una piccola frazione rispetto alla microflora totale.<sup>140</sup> Oltre ai suddetti sistemi di preparazione esistono altri processi tecnologici tradizionali delle olive da mensa, meno conosciuti nel mercato internazionale.<sup>141</sup>

**Sistema Sivigliano:** le olive sono immerse in una soluzione di soda caustica la cui concentrazione varia a seconda dei parametri di processo quali temperatura, varietà dell'olivo, dimensioni e caratteristiche della drupa e grado di maturazione dei frutti. Tutti questi criteri determinano un numero di ore necessarie per far sì che la soluzione alcalina possa raggiungere il giusto grado di penetrazione della polpa, raggiungendo i 2/3 o i 3/4 di profondità senza mai raggiungere l'endocarpo. Le olive vengono quindi lavate e successivamente immerse in salamoia all'8%. Segue un ulteriore lavaggio ed in ultimo viene effettuata l'immersione in una salamoia con sale comune nelle botti dove avviene la fermentazione lattica.

**Fermentazione Naturale:** le olive utilizzate possono essere sia raccolte appositamente per l'applicazione di questo processo, sia derivate da olive non idonee ad altre lavorazioni. Le olive non devono essere molto mature per evitare che la polpa si spappoli e quindi fornisca un prodotto non idoneo. Le olive vengono inizialmente poste in fusti in salamoia al 6-7% dove subiscono un lento processo di deamarizzazione in seguito alla scissione enzimatica dell'oleuropeina, la quale viene rimossa parzialmente, così come avviene nel metodo Californiano.<sup>142</sup> La crescita dei microorganismi dipende dalla tipologia delle olive e da tutte le condizioni legate alla maturazione, alla raccolta ed ai trattamenti subiti dalle drupe. La specie maggiormente responsabile della fermentazione lattica è il *Lactobacillus plantarum*, un microorganismo capace di fermentare un'ampia gamma di carboidrati solubili producendo acido acetico e lattico, che contribuiscono alle caratteristiche organolettiche del prodotto finito. La salamoia può, inizialmente, essere pastorizzata in modo da eliminare la carica di microorganismi che andrebbero eventualmente a competere con gli *starter* di *L. plantarum*, producendo una miscela di composti volatili associati con il deterioramento delle olive da mensa.<sup>143, 144, 145, 146, 147, 148</sup> L'idrolisi dell'oleuropeina avviene, invece, in seguito all'azione combinata del pH e dell'enzima  $\beta$ -glucosidasi prodotto dai microorganismi della specie *Lactobacillus*.

**Alla Castelvetro o metodo dolcificato:** consiste nel porre le olive in una soluzione sodica la cui concentrazione dipende dalle dimensioni della drupa e dal grado di maturazione della stessa. La

concentrazione della soda deve essere tale da non compromettere le caratteristiche di consistenza della polpa delle olive e, nello stesso tempo, da salvaguardare le stesse dall’instaurarsi delle fermentazioni anomale. Inoltre viene aggiunto un quantitativo di sale tale da creare una salamoia con una concentrazione del 6-7%. L’intervallo di tempo necessario affinché si instauri un equilibrio tra le olive ed i costituenti della salamoia creata dalla soluzione alcalina utilizzata per il processo di deamarizzazione varia uno a più mesi. Soltanto dopo tale periodo le olive sono così pronte al consumo.

**Alla Greca:** con tale metodo vengono lavorate olive già mature che vengono poste per alcuni mesi in salamoia, dove si instaura una fermentazione naturale.

**Sistema Californiano:** prevede l’immersione delle olive in salamoia al 9% per circa due mesi, cui seguono l’addolcimento con soda, la neutralizzazione mediante lavaggi giornalieri con acqua, l’esecuzione del trattamento con sali ferrosi e l’esposizione all’aria delle drupe fino ad assunzione del caratteristico colore nero.

#### 4.1.5.1 Il sistema al naturale

Contrariamente alle trasformazioni Castelvetro e Sivigliano con il sistema al naturale possono essere utilizzate anche olive parzialmente mature e nere senza che questa condizione sia sfavorevole.

Si trasformano con il suddetto sistema olive verdi (intere e schiacciate), rosate (parzialmente mature) e nere secondo le fasi riportate in **Tabella 1**.

<b>Fasi della produzione “al naturale”</b>
<b>Raccolta e trasporto delle olive</b>
<b>Lavaggio</b>
<b>Eliminazione dello scarto</b>
<b>Calibratura</b>
<b>Fermentazione e deamarizzazione in salamoia</b>
<b>Commercializzazione</b>

**Tabella 1:** Fasi della produzione nel sistema “al naturale”.

La Raccolta delle olive avviene generalmente a mano (per produzioni di buona qualità merceologica). Dopo le operazioni di cernita per eliminare lo scarto si effettua la calibratura delle olive (tramite macchine a vagli vibranti o a filiere mobili divergenti) che successivamente vengono poste in contenitori colmati con salamoia.

La salamoia utilizzata per la colmatura dei contenitori è preparata a concentrazione diversa in funzione di alcuni aspetti di primaria importanza: per le olive schiacciate, intere nere o mature, ad esempio, è necessario impiegare una salamoia all’8-9 % per evitare il fenomeno dell’ammollamento della polpa; per le olive verdi intere con polpa tenace è preferibile invece, nella fase iniziale della trasformazione, utilizzare una salamoia concentrata al 6-7 % per portarla successivamente all’8-9 % riducendo così al



minimo il pericolo di raggrinzimento delle olive causato dalla disidratazione della polpa per effetto del sale.

La fermentazione spontanea delle olive al naturale si sviluppa ad opera di microrganismi che aderiscono alle superfici esterne delle drupe o derivano da contaminazioni casuali ad opera di batteri lattici e lieviti appartenenti ai generi *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, e *Saccharomyces*. Le ricerche più recenti tendono a favorire lo sviluppo di fermentazioni lattiche con inoculo di *starter* nella salamoia per migliorare la sicurezza igienica e le caratteristiche organolettiche delle olive al naturale. La specie più interessante per l’avvio della fermentazione lattica è il *Lactobacillus Plantarum* che riesce a fermentare una vasta gamma di zuccheri con produzione di acido lattico. La deamarizzazione delle olive al naturale è un processo lento determinato da scissione enzimatica dell’oleuropeina, ad opera della beta-glucosidasi. Il prodotto si presta al consumo dopo 5-6 mesi dalla raccolta e all’assaggio conserva un leggero sapore amarognolo, gradevole e tipico delle olive al naturale.

#### 4.1.6 Il profilo aromatico delle olive da mensa

L’aroma è il risultato della complessa combinazione di odore e sapore. Esso è strettamente associato con la composizione quali-quantitativa dei composti volatili, i quali rappresentano i parametri che più incidono sulla percezione della qualità delle olive e forniscono, dunque, un importante criterio di valutazione sulla loro appetibilità.

Fra tutti i parametri qualitativi, la componente aromatica di delle drupe gioca un ruolo fondamentale nel determinarne il gradimento e l’accettabilità da parte dei consumatori.<sup>149, 150</sup>

La componente aromatica delle olive da mensa dipende da differenti fattori come la varietà, le loro caratteristiche intrinseche ed il grado di maturazione del frutto e dalla tipologia di lavorazione a cui sono sottoposte.<sup>140,151</sup>

Il profilo aromatico origina da un processo dinamico che si sviluppa maggiormente durante la fermentazione delle olive ad opera di batteri lattici acidi e lieviti, insieme ad una varietà di microrganismi contaminanti che attraverso i loro *pathways* biochimici sono responsabili della produzione dei composti volatili che contribuiscono ai principali costituenti sensoriali (ad esempio del fruttato) e della fragranza dei frutti.<sup>152</sup>

I batteri lattici acidi vengono impiegati nella fermentazione delle olive per migliorarne la conservazione dato che sono responsabili della progressiva acidificazione della salamoia, e della produzione di sostanze antimicrobiche.<sup>151,153</sup>

È noto che le componenti riscontrabili nel profilo aromatico di olive da mensa sono costituite da una miscela di alcoli, esteri, aldeidi, chetoni ed acidi, e sono prodotti dai *pathways* metabolici di microrganismi che competono con i batteri lattici acidi nelle olive fermentate.<sup>145</sup>

Risulta quindi importante, non solo indagare sulla fermentazione delle olive da un punto di vista microbiologico, ma anche determinare il contenuto dei composti volatili e semi-volatili ed i

cambiamenti dei loro profili qualitativi e quantitativi durante l'intero processo di produzione e consumo.

Molte ricerche sono state condotte al fine di caratterizzare il profilo aromatico di diverse cultivar di olive da mensa tramite la Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC/MS).

Nello studio condotto nel 2008 da Sabatini *et al.*<sup>152</sup>, sono stati caratterizzati analiticamente i composti volatili delle olive verdi della cultivar Nocellara del Belice trattate secondo le tre preparazioni commerciali: metodo Sivigliano, Tradizionale ed il metodo alla Castelvetro.

Sono stati estratti 22 composti, comprendenti alcoli, aldeidi, chetoni, esteri ed acidi, formati durante la fermentazione (dopo 6, 7 ed 8 mesi di conservazione in salamoia), attraverso il metodo di estrazione dinamico dello spazio di testa (DHS) ed identificati tramite GC/MS.

I risultati dimostrano che i differenti processi tecnologici influenzano la composizione volatile dei campioni. Ad esempio, un alto contenuto di etanolo, acido acetico e 2-butanolo sono stati trovati in tutti i campioni, così come l'etil acetato, presente però in maggior quantità nelle olive preparate con il sistema Sivigliano; l'1-propanolo, il propil-acetato, l'etil propanoato e l'acido propionico, invece, sono stati trovati in maggior concentrazione nelle olive prodotte con il sistema Sivigliano; il cis-3-esen-1-ol ed il 2-butanone sono presenti nelle olive prodotte con il sistema Castelvetro, mentre l'1-esanolo e l'isopentanololo sono stati trovati principalmente nelle olive trattate con il metodo Sivigliano e tradizionale. Un maggior quantitativo di 2-pentanololo e 3-pentanololo, invece, è stato trovato nelle olive elaborate secondo i sistemi Castelvetro e Sivigliano.

Inoltre, in questo studio, è stato dimostrato che le concentrazioni dei composti volatili subiscono delle variazioni all'aumentare del periodo di conservazione in salamoia delle stesse.

Nei campioni trattati con il metodo tradizionale, si osserva un importante incremento del contenuto in etil propanoato, 2-butanone ed acido propionico. I campioni preparati con il metodo Sivigliano mostrano una significativa diminuzione del 2-butanolo, dell'etanolo e del cis-3-esen-1-olo.

I campioni di olive elaborate con il metodo alla Castelvetro, invece, mostrano un aumento del contenuto della maggior parte dei composti volatili fino al settimo mese di fermentazione ed un decremento oltre tale periodo.

In uno studio successivo, condotto nel 2009 da Sabatini *et al.*<sup>154</sup>, è stato dimostrato che alcuni composti ritrovati nella matrice delle olive verdi da mensa, quali cis-3-esen-1-olo, 1-esanolo ed esanale derivano dalla degradazione degli acidi grassi poliinsaturi attraverso le reazioni enzimatiche a catena conosciuta come il “*pathway* della lipossigenasi (LOX)” la stessa coinvolta nella biosintesi dei composti volatili nell'olio di oliva<sup>155,156,157,158,159</sup> o da *pathways* simili di enzimi prodotti dai batteri lattici acidi, lieviti ed altri microorganismi presenti nella soluzione salina.

Aponte M., *et al.* nel 2009,<sup>160</sup> hanno analizzato, dal punto di vista microbiologico, chimico e sensoriale, delle olive da tavola provenienti da 4 differenti cultivar siciliane (Brandofino, Castriciana, Nocellara del Belice e Passalunara) ed una cultivar spagnola (Manzanilla).

L'analisi del profilo aromatico dei campioni è stata condotta in periodi diversi di maturazione delle olive. Dopo 60 giorni di maturazione delle olive è stata rivelata la presenza di 52 composti tra i quali esanolo, eptanolo, octanolo e 2-nonen-1-olo così come eptanale, octanale ed altre aldeidi sono stati trovati in un simile *range* di concentrazione in tutte le cultivars.

Dopo 120 giorni di maturazione sono stati identificati, invece, 31 composti ed inoltre le concentrazioni dei caratteristici alcoli, aldeidi, metil esteri ed acetati risultano notevolmente diminuite; al contempo sono stati rivelati alcuni acidi grassi che prima mancavano, come gli acidi ottanoico e nonanoico trovati ad alte concentrazioni in tutte le cultivar analizzate.

I risultati ottenuti dimostrano che durante la conservazione le olive mostrano considerevoli cambiamenti nel loro profilo qualitativo.

È evidente che le diverse sostanze variano in concentrazione al variare della dinamica di proliferazione dei microorganismi e di conseguenza dei loro *pathways* metabolici.

Il profilo aromatico finale, quindi, risultato di un fine bilanciamento fra tutti i composti emessi è suscettibile di notevoli variazioni dovute a cambiamenti anche minimi in quelle che sono le condizioni di lavorazione del prodotto. Differenze, a volte anche minime, delle concentrazioni saline, ad esempio, si traducono in repentini cambiamenti dell'aroma che facilmente possono condurre anche a fragranze non gradite del frutto.

## 4.2 SCOPO

L'obiettivo di questa parte del mio lavoro di tesi è stato quello di studiare la componente aromatica di olive da mensa ottenute da alberi di Nocellara del Belice, una tra le più diffuse e note cultivar siciliane. Nonostante esistano in letteratura numerosi studi riguardanti i cambiamenti nell'aroma delle olive da mensa in base alla metodica di preparazione impiegata, poche informazioni sono disponibili sugli effetti di trattamenti agronomici non convenzionali (applicati agli alberi di ulivo da cui le olive provengono) sul prodotto finito.

Ad oggi esistono diverse tecniche di coltivazione dell'olivo tra le quali, quelle definite di deficit idrico, prevedono protocolli in cui agli alberi viene somministrata una quantità di acqua irrigua inferiore a quella convenzionale e richiedono una minore manodopera da parte dei produttori. Queste metodiche potrebbero trovare una diretta applicabilità in tutti quegli oliveti impiantati su terreni in cui la disponibilità di acqua oppure di manodopera non è molto elevata.

Scopo di questo *trial* analitico è proprio quello di valutare se trattamenti applicati a monte lungo la catena produttiva (stress irriguo) abbiano effetti (ed eventualmente quali) sulla qualità delle olive conciate.

In particolare le olive, provenienti da alberi sottoposti a sistemi irrigui differenti, sono state trattate secondo un definito protocollo di produzione costituito da una trasformazione secondo un unico processo tecnologico e la medesima concentrazione salina per la conservazione, allo scopo di valutare gli effetti dei differenti sistemi irrigui sulle caratteristiche qualitative dei prodotti ultimi.

Diversi aspetti qualitativi saranno presi in considerazione: l'analisi delle componenti volatili mediante la *Solid Phase Micro Extraction* (SPME) accoppiata ad un sistema GC/MS (SPME-GC/MS) sarà eseguita dal nostro Dipartimento; il Dipartimento SENFIMIZO dell'Università di Palermo (Scienze Entomologiche, Fitopatologiche, Microbiologiche Agrarie e Zootecniche) si occuperà degli aspetti di microbiologia agraria; il Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Palermo di quelli relativi alle coltivazioni sperimentali; il Dipartimento di OrtoFloro Arboricoltura e Tecnologie Agroalimentari (DOFATA), dell'Università degli Studi di Catania, infine, si occuperà dell'analisi sensoriale.

### 4.3 SEZIONE SPERIMENTALE

#### 4.3.1 Campioni

Le indagini agronomiche sono state condotte nel territorio di Castelvetro, presso un impianto commerciale della cultivar Nocellara del Belice esteso circa 13 ha. Nei mesi estivi le esigenze idriche dell'oliveto vengono soddisfatte mediante un impianto di sub-irrigazione. Nell'estate 2009 le piante di olivo sono state sottoposte a diversi regimi idrici al fine di verificare la risposta vegetativa e produttiva, quest'ultima valutata sia in termini qualitativi che quantitativi. Al fine di pervenire ad un sensibile risparmio di acqua si è ritenuto utile confrontare l'effetto dell'irrigazione in deficit, rispetto alla piena irrigazione.

I diversi campioni di olive studiati provengono da ulivi sottoposti a quattro diversi trattamenti irrigui:

- a. **Controllo (T-100)**: alberi sottoposti, nel periodo compreso tra Luglio a Settembre, ad un protocollo di irrigazione convenzionale;
- b. **Deficit Idrico Costante (CDI)**: il CDI ha comportato l'erogazione di un volume irriguo pari al  $420 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$  (circa il 30% ETc reale del periodo), somministrato con cadenza settimanale a partire dalla seconda decade di luglio (inizio distensione cellule del mesocarpo) e fino alla terza decade di settembre, in prossimità del verificarsi delle prime precipitazioni;
- c. **Deficit Idrico Controllato (RDI)**: l'RDI è stato gestito mantenendo le piante in asciutto fino alla seconda decade di agosto per poi effettuare una piena irrigazione ( $720 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ , pari al 50% dell'ETc reale);
- d. **Aridi - in asciutto (T-0)**: piante allevate in asciutto, a cui non è mai stata fornita acqua, se non quella piovana, nel periodo compreso tra Luglio e Settembre.

#### 4.3.2 Preparazione salamoia al naturale

Alla raccolta, effettuata nella prima settimana di ottobre, i frutti sono stati trasportati al magazzino di lavorazione dove si è proceduto alla calibratura delle drupe, selezionando quelle che avevano raggiunto il calibro di 19 mm e su queste, quindi, si è proceduto alla concia in verde, con fermentazione a carico della microflora spontanea.

La sperimentazione è iniziata l'08 ottobre del 2009 su drupe di Nocellara del Belice trattate secondo le suddette quattro tesi agronomiche (quattro sistemi irrigui). Circa 17 Kg di olive sono state messe in contenitori di plastica da 25 L con circa 12 L di salamoia al 6% di NaCl. Le olive sono state coperte totalmente dalla salamoia con l'ausilio di una retina in modo tale che non ci fossero olive galleggianti che potessero andare incontro ad imbrunimento.

I contenitori sono rimasti a temperatura ambiente per l'intero arco della lavorazione in modo da mimare una lavorazione industriale.

Al fine di analizzare la variazione delle caratteristiche chimico-fisiche e della componente aromatica delle olive da mensa durante tutto il processo di fermentazione in salamoia, è stato stabilito un protocollo sperimentale costituito da tre diversi campionamenti. Il primo è stato effettuato il 28 gennaio 2010, il secondo il 14 giugno 2010, mentre, il terzo ed ultimo campionamento è stato effettuato nel mese di dicembre 2010. Le analisi della componente aromatica sui campioni appartenenti a questo terzo campionamento sono tuttora in fase di esecuzione nei nostri laboratori e di conseguenza i risultati e le conclusioni presentati in questo lavoro sono parziali e non possono essere riferiti all'intero processo di preparazione delle olive.

Per i diversi campioni analizzati, provenienti da alberi trattati secondo i quattro differenti sistemi irrigui, sono state effettuate tre repliche.

### **4.3.3 Analisi della componente volatile**

Le basse concentrazioni dei componenti volatili presenti nelle olive rendono difficoltosa la loro individuazione, il loro isolamento e la loro estrazione.

L'analisi della componente volatile è stata eseguita in spazio di testa (HS) mediante la *Solid Phase Micro-Extraction* (SPME),<sup>89</sup> abbinata alla Gas-Cromatografia/Spettrometria di Massa (GC/MS),<sup>90,91</sup> utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico.

Sono state eseguite diverse analisi preliminari volte all'ottimizzazione della metodica analitica.

Le prove di riproducibilità sono state eseguite per tre volte su tre differenti campioni con ottimi risultati (RSD<10%).

#### **4.3.3.1 Estrazione degli analiti**

Come già precedentemente descritto per l'analisi della componente volatile delle albicocche (*v. par 3.3.3.1*), la metodica SPME, utilizzata per l'estrazione degli analiti dallo Spazio di Testa, è stata ottimizzata in tutti i principali parametri chiave: tempo di saturazione dello spazio di testa (HS) alla temperatura di analisi del campione, fibra SPME più adatta ed tempo di esposizione della stessa nello HS.

##### **4.3.3.1.1 Scelta della fibra**

Tre differenti fibre SPME, mono o multicomponenti, sono state saggiate: una PoliDimetil Silossano (PDMS, 100 µm), una DiVinilBenzene/carboxen/ PoliDimetil Silossano (DVB/carboxen/PDMS, 50/30 µm) ed una PoliDimetil Silossano/ DiVinilBenzene (PDMS /DVB, 65 µm).

Similmente a quanto effettuato per lo studio sulle componenti volatili delle albicocche (v. par. 3.3.4.1), è stato calcolato il valore della funzione  $F_{ij}$ , per le tre diverse fibre prendendo in esame 5 composti rappresentativi (metil esanoato, 3-esen-1-olo, 2-metil-butanale, undecan-1-olo e lo standard interno, il 2-pentanol-4-metil). Il valore di  $F_{ij}$  calcolati, riportati in **Tabella 2**, mostra come la fibra trifasica (DVB/carboxen/PDMS) sia quella migliore per estrarre dallo spazio di testa un maggior quantitativo di sostanze avendo un valore  $F_{ij}$  di 1,437, superiore a quello ottenuto con le altre fibre.

Fibre	$F_{ij}$
DVB/carboxen/PDMS	1,437
PDMS	0,478
PDMS/DVB	0.889

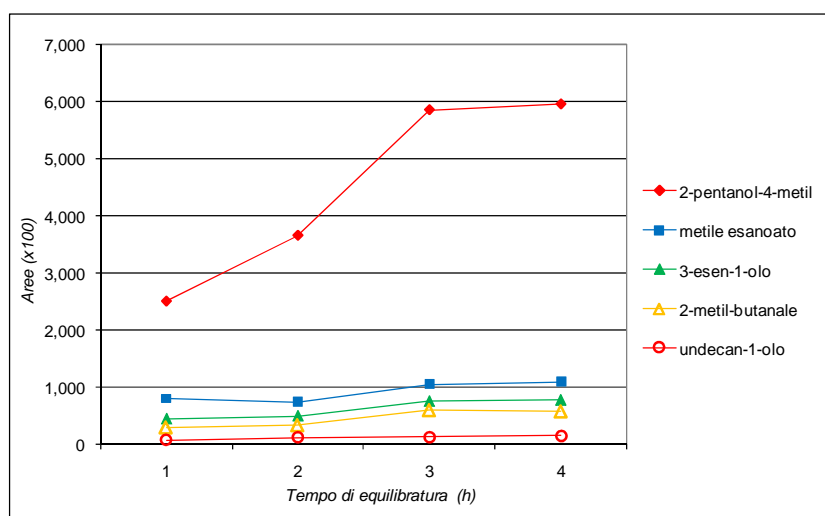
**Tabella 2:** Valore di  $F_{ij}$  calcolato per le 3 fibre SPME.

#### 4.3.3.1.2 Saturazione dello Spazio di Testa

Per la determinazione del tempo di equilibratura dello spazio di testa è stata applicata la stessa metodica descritta nello studio sulla componente aromatica delle albicocche (v. par. 3.3.4.1.2). In questo studio abbiamo preso in esame le stesse 5 sostanze volatili utilizzate per l’analisi della capacità estrattiva delle fibre SPME ed abbiamo testato i tempi di 1 ora, 2 ore, 3 ore e 4 ore.

I risultati ottenuti, riportati nel grafico in **Figura 5**, mostrano chiaramente che inizialmente tutti i composti principali presentano una bassa concentrazione nello HS, che, col passare del tempo aumenta salvo poi stabilizzarsi dopo tre ore di equilibratura. Dopo 180 minuti, infatti, tutti e cinque i composti presi in esame raggiungono un *plateau* di concentrazione, dimostrando il raggiungimento dell’equilibrio nello spazio di testa.

Questa evidenza ci ha quindi portato a scegliere, come miglior tempo per la saturazione dello spazio di testa, un intervallo di equilibratura dei campioni di 3 ore.



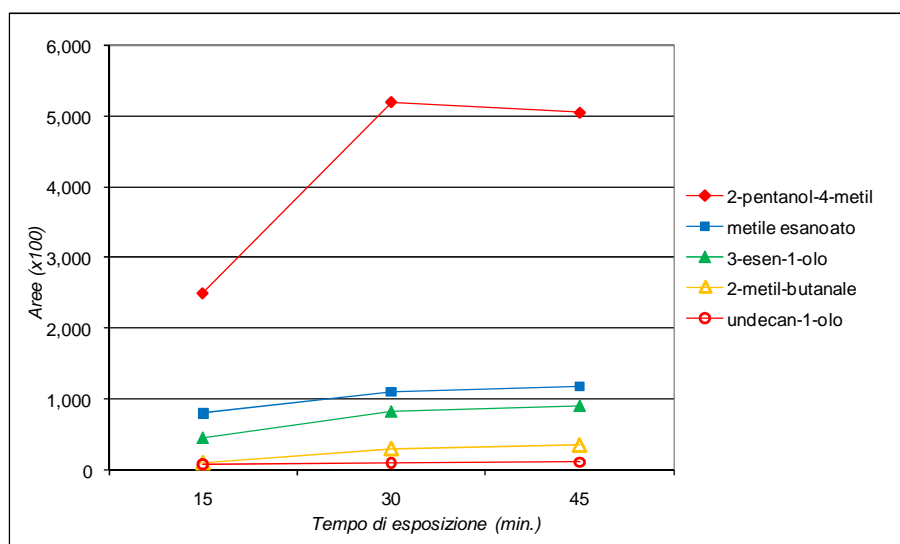
**Figura 5:** Andamento dell’estrazione dallo spazio di testa al variare del tempo di equilibratura del campione.

#### 4.3.3.1.3 Tempo di esposizione della fibra

Per la determinazione del tempo ottimale di esposizione della fibra SPME nello spazio di testa è stata applicata la stessa già metodica descritta nello studio sulla componente aromatica delle albicocche (v. par. 3.3.4.1.3). In questo studio abbiamo preso in esame le stesse 5 sostanze volatili utilizzate per l'analisi della capacità estrattiva delle fibre SPME ed abbiamo testato i tempi di 15, 30 e 45 minuti.

I risultati ottenuti, riportati nel grafico in **Figura 6**, mostrano chiaramente che quindici minuti di esposizione della fibra non sono sufficienti ad ottenere una buona estrazione delle sostanze volatili in esame. Queste, infatti, raggiungono un massimo di assorbimento dopo mezz'ora di esposizione ed anche per tempi di estrazione maggiori (45 minuti) le concentrazioni ottenute risultano praticamente inalterate.

Queste evidenze ci hanno quindi portato a scegliere, come miglior tempo di esposizione della fibra SPME nello spazio di testa, un intervallo di 30 minuti.



**Figura 6:** Andamento dell'estrazione dallo spazio di testa al variare del tempo di esposizione della fibra SPME.

#### 4.3.3.2 Analisi GC-MS

L'analisi semiquantitativa della componente volatile delle olive è stata eseguita mediante Gas-cromatografia/Spettrometria di massa (GC/MS), utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico derivato dal protocollo di analisi già sviluppato in precedenti lavori sulla componente aromatica di pesche<sup>91</sup> e mele.<sup>94</sup>

Tutti i campioni sono stati preparati per l'analisi delle componenti volatili secondo questo protocollo: 0,5 g di olive, accuratamente pesati ed omogeneizzati, sono stati introdotti in *vials* da 2 mL con tappo a tenuta perforabile in gomma siliconica rivestita di PoliTetraFluoroEtilene (PTFE) e sono stati posti alla temperatura di  $22 \pm 0,5$  °C nel carosello termostato con sistema Peltier dell'autocampionatore Varian 8200 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). A questi sono stati aggiunti, come standard



interno 10 µl di una soluzione acquosa di 2-pentanol-4-metil di concentrazione 0,822 µg·mL<sup>-1</sup>, ottenuta per diluizione di una soluzione madre di 2-pentanol-4-metil 0,808 mg·mL<sup>-1</sup>.

Seguendo le indicazioni ottenute dalle prove preliminari, i campioni all'interno dei *vials* sono stati lasciati per almeno 3 ore in termostato (tempo necessario per l'equilibratura); dopo questo periodo la fibra trifasica (DVB/carboxen/PDMS) è stata introdotta attraverso il setto ed esposta per 30 minuti nello spazio di testa. Successivamente essa è stata posta a desorbire nell'iniettore del gas-cromatografo. Le analisi sono state eseguite con un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax, i cui principali parametri strumentali sono stati accuratamente ottimizzati.

#### 4.3.3.2.1 Scelta della Colonna Gas Cromatografica

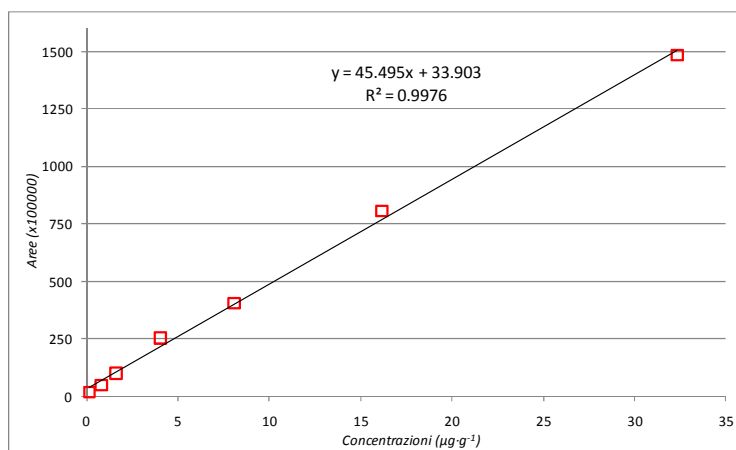
Le separazioni cromatografiche sono state eseguite testando due differenti colonne capillari:

- colonna Heliflex® AT™-1 (Alltech Associates, Inc., Deerfield, Illinois) di silice fusa lunga 30 m, con diametro interno di 0,25 mm e rivestita di una fase stazionaria costituita al 100% di DimetilPoliSilossano dello spessore di 0,25 µm;
- colonna Supelcowax-10 (Supelco, Bellafonte, PA) di silice fusa, lunga 30 m, diametro interno 0,25 mm rivestita di una fase stazionaria costituita da polietilenglicole, con uno spessore del film di 0,25 µm.

In seguito ai test effettuati, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando la colonna gas cromatografia Heliflex® AT™-1, che presenta una apolarità della fase stazionaria maggiore della Supelcowax-10.

#### 4.3.3.2.2 Analisi semiquantitativa

L'analisi semiquantitativa è stata eseguita per confronto delle aree dei picchi cromatografici degli analiti con quello dello standard interno, 2-pentanol-4-metil, aggiunto in concentrazione nota al campione. La curva di calibrazione (**Figura 7**) eseguita per accertare la linearità di risposta dello standard interno è stata costruita in matrice (0,5 g di drupa) con i valori di 7 soluzioni dello stesso in un *range* di concentrazioni compreso tra 0,1616 µg·mL<sup>-1</sup> a 32,32 µg·mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>= 0,9929).

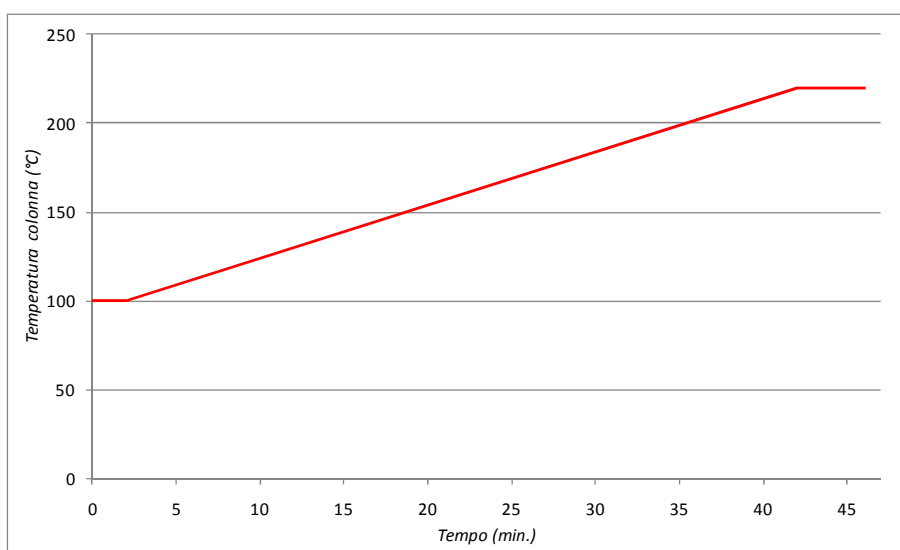


**Figura 7:** Curva di calibrazione del 2-pentanol-4-metil.

#### 4.3.3.2.3 Parametri del Gas Cromatografo

Le analisi sono state eseguite utilizzando un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Heliflex® AT™-1 e con un autocampionatore Varian 8200 CX termostato, i cui principali parametri strumentali sono i seguenti: temperatura dell'iniettore, 250 °C; modalità introduzione, *splitless*; gas di trasporto, elio (He); pressione in testa alla colonna, 12 psi; temperatura *transfer-line*, 180 °C.

La rampa di temperature del GC inizia con una isoterma di 2 minuti a 100 °C; da questa temperatura si arriva fino a 300 °C con un incremento di 5 °C·m<sup>-1</sup>, ed infine termina con una isoterma di 4 minuti (**Figura 8**).



**Figura 8:** Rappresentazione della programmata termica del GC.

#### 4.3.3.2.4 Parametri dello Spettrometro di Massa

Questi sono i principali parametri della trappola ionica: modalità di ionizzazione, ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV; modalità di scansione, *Total Ion Current* (TIC); *range* di massa, 40 – 400 Da; frequenza di scansione, tre scansioni al secondo; temperatura trappola ionica, 180 °C.

I dati raccolti sono stati processati con il *data system* dello strumento e i cromatogrammi e gli spettri hanno mostrato una eccellente riproducibilità.

In questa fase iniziale dello studio, i composti volatili delle olive sono stati parzialmente identificati attraverso una ragionata e critica comparazione con gli spettri registrati nella libreria NIST 2005; successivamente, l'attuale provvisoria attribuzione dei composti verrà confermata, ove possibile, mediante l'utilizzo di standard ed, una volta calcolati i valori dei LRI dei composti (mediante l'equazione di Kovats<sup>95</sup>), questi potranno essere utilizzati per confrontarli con i corrispondenti valori riportati in letteratura.

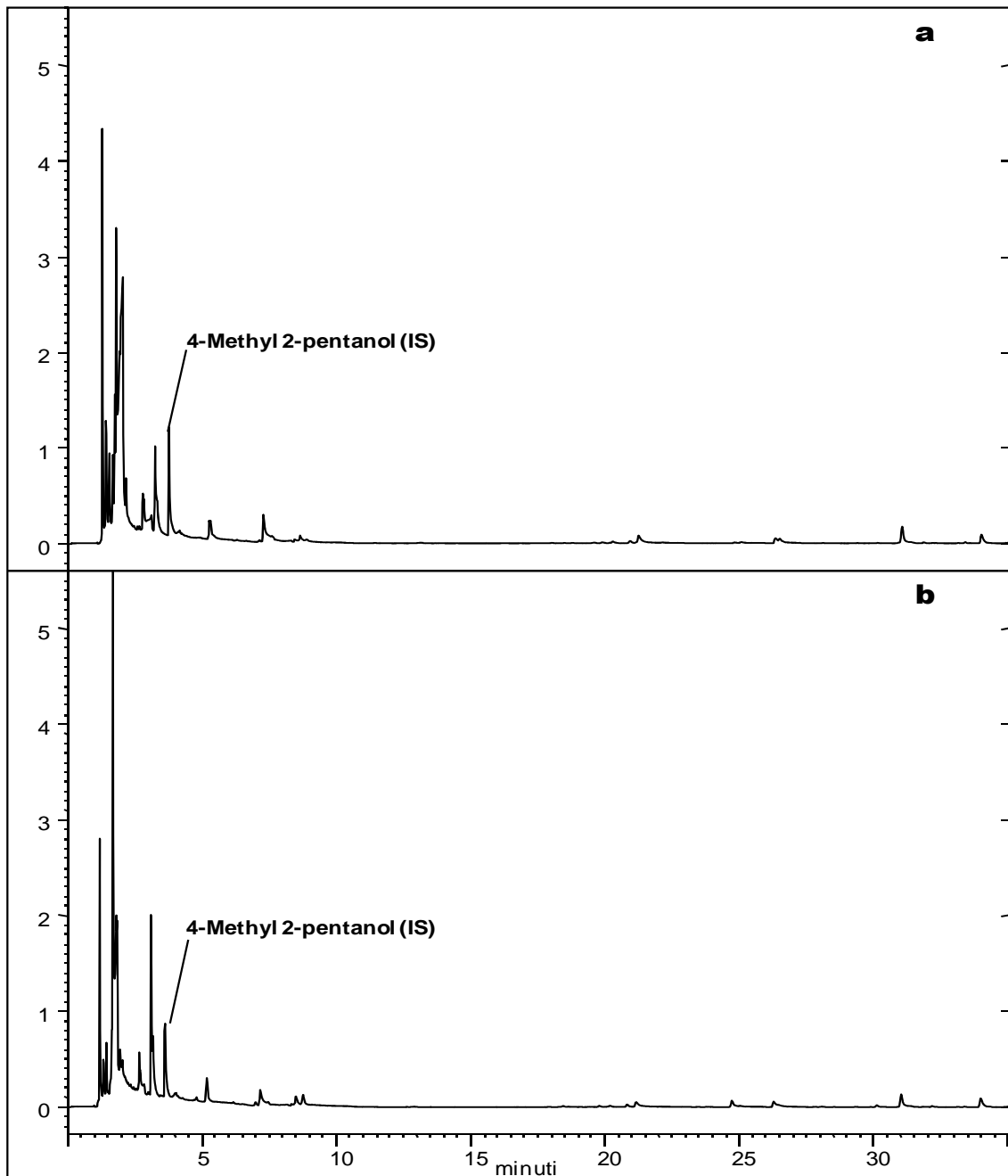
#### **4.3.3.3 Analisi statistica**

I dati ottenuti dalle analisi GC-MS sono stati sottoposti ad un’analisi statistica utilizzando il *software* Statsoft Statistica 7. È stato adottato l’approccio multivariato *Linear Discriminant Analysis* (LDA),<sup>46,47</sup> già descritta a proposito dell’analisi statistica sulla componente triacilgliceridica degli oli di oliva siciliani, per verificare se i cambiamenti indotti nel profilo aromatico delle olive da mensa fossero utili a discriminare i diversi campioni analizzati.

#### 4.4 RISULTATI E DISCUSSIONI

##### 4.4.1 Valutazione delle componenti volatili delle olive

In **Figura 9** è riportato un esempio di cromatogrammi ottenuti dalle analisi di campioni del primo campionamento.



**Figura 9:** andamento cromatografico tipico di campioni T-100 (a) e T-0 (b).

Dall'analisi dei cromatogrammi e degli spettri di massa acquisiti relativi alle olive da mensa in esame, sono stati determinati 49 composti volatili differenti presenti in tutti i campioni analizzati. La loro identificazione, essendo stata eseguita per il momento soltanto attraverso l'analisi critica degli spettri

di massa acquisiti (per confronto con quelli registrati nella libreria NIST 2005), presenta un carattere di provvisorietà e verrà in seguito rianalizzata. Saranno infatti calcolati i valori dei LRI per tutti gli analiti determinati e questi saranno impiegati per confermare o per rimettere in discussione le attribuzioni finora fatte, che, ove possibile, verranno ulteriormente avvalorate tramite l'utilizzo di *standard puri*.

L'analisi semi-quantitativa è stata eseguita per raffronto delle aree dei composti con quella dello standard interno, il 2-pentanol-4-metil, aggiunto in ogni campione alla medesima concentrazione al fine di minimizzare gli errori di quantificazione dovuti ad eventuali variazioni nelle risposte analitico-strumentali.

Il *pattern* di sostanze aromatiche trovate include 12 esteri, 13 alcoli, 8 composti carbonilici (aldeidi e chetoni), 7 idrocarburi, 4 terpeni e 2 acidi, più 3 sostanze non appartenenti alle classi precedenti. I valori delle concentrazioni dei composti elencati nelle **Tabelle 3 e 4a-b** sono i risultati della media di cinque repliche e sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Composti	Primo Campionamento				Seconda Campionamento			
	T-100	CDI	RDI	T-0	T-100	CDI	RDI	T-0
Esteri	3437	4643	4510	6251	2836	4074	3922	5189
Acidi	3813	4012	3293	4839	3195	3726	3176	3357
Aldeidi e Chetoni	3092	3357	2523	2997	4095	4943	2974	4540
Alcoli	2640	3589	3819	4218	3049	4984	3032	3710
Idrocarburi	316	336	348	550	358	481	464	607
Terpeni	34	65	80	136	79	77	66	79
Vari	682	626	474	812	865	965	688	840
<b>TOTALE</b>	14014	16628	15047	19802	14477	19251	14320	18322

Composti	Primo Campionamento				Seconda Campionamento			
	T-100	CDI	RDI	T-0	T-100	CDI	RDI	T-0
Esteri	24,53%	27,92%	29,97%	31,57%	19,59%	21,16%	27,39%	28,32%
Acidi	27,21%	24,13%	21,88%	24,44%	22,07%	19,35%	22,18%	18,32%
Aldeidi e Chetoni	22,06%	20,19%	16,77%	15,14%	28,29%	25,68%	20,77%	24,78%
Alcoli	18,83%	21,59%	25,38%	21,30%	21,06%	25,89%	21,17%	20,25%
Idrocarburi	2,26%	2,02%	2,31%	2,78%	2,47%	2,50%	3,24%	3,31%
Terpeni	0,24%	0,39%	0,53%	0,68%	0,55%	0,40%	0,46%	0,43%
Vari	4,87%	3,76%	3,15%	4,10%	5,98%	5,01%	4,80%	4,58%

**Tabella 3:** Concentrazioni e percentuali delle sostanze volatili (raggruppate per classi chimiche) estratte dalle olive del primo e secondo campionamento per i 4 trattamenti irrigui. I valori delle concentrazioni sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Nel primo campionamento le classi più abbondanti sono risultate, in valore assoluto ed in percentuale, per i campioni T-100 gli acidi (27%) seguiti dagli esteri (25%); con l'aumentare dello stress idrico (T-0) i composti appartenenti ad entrambe le classi aumentano in valore assoluto ma percentualmente gli esteri diventano la classe più abbondante (32%) mentre gli acidi diminuiscono leggermente (24%).

Anche nel secondo campionamento, in cui sulle concentrazioni riscontrate incide maggiormente il processo fermentativo, si osserva lo stesso andamento sopra descritto: gli esteri aumentano

percentualmente all'aumentare dello stress idrico tanto che nei campioni T-0 raggiungono il 28% e sono la classe più rappresentativa.

Gli acidi non presentano particolari variazioni sulla base dello stress idrico. I composti carbonilici nel secondo campionamento sono notevolmente più abbondanti (T-100 = 28%) rispetto al primo ed all'aumentare dello stress idrico diminuiscono (T-0 = 25%).

Gli idrocarburi sia nel primo che nel secondo campionamento aumentano con l'aumentare dello stress idrico.

Questo andamento così descritto suggerisce che lo stress idrico ha in generale un effetto positivo sulla quantità di composti volatili totali, ed in particolare, favorisce la presenza di esteri ed idrocarburi, mentre riduce la formazione di composti carbonilici e di acidi.

I processi fermentativi, invece, aumentano la quantità di composti carbonilici e di idrocarburi facendo osservare una diminuzione di esteri ed acidi.

N	Nome	CAS	Prima Campionatura			
			T-100	CDI	RDI	T-0
1	Acido tioglicolico	68-11-1	3002,2	3608,6	2992,6	4460,1
2	Metil acetato	79-20-9	1109,1	935,9	1010,8	1083,0
3	Acido acetico, 2-metil	79-31-2	810,9	403,5	300,0	378,6
4	Etil acetato	141-78-6	2058,9	3414,8	3221,1	4801,9
5	3-Metil-butanale	590-86-3	1962,7	1726,2	701,4	497,4
6	2-Metil-butanale	96-17-3	465,9	715,6	524,1	554,3
7	1-Pentanolo	71-41-0	1022,4	1301,4	2244,5	2795,8
8	(E)-3-Penten-2-one	3102-33-8	636,0	894,5	1270,6	1924,3
9	Sconosciuto al RT 5,385	-	538,4	427,9	343,7	642,3
10	Sconosciuto al RT 7216	-	32,7	50,7	44,8	57,9
11	3-Esenolo	544-12-7	741,7	743,9	691,7	409,9
12	Propil ciclopropano	2415-72-7	64,2	58,9	55,1	36,7
13	Pentil acetato	628-63-7	119,7	146,7	155,3	207,1
14	Stirene	100-42-5	74,7	118,5	115,2	334,0
15	Metil esanoato	106-70-7	26,7	17,8	15,5	17,4
16	Benzaldeide	100-52-7	2,7	3,3	4,2	2,7
17	(E)-2-Eptenale	18829-55-5	2,5	0,2	0,9	1,3
18	Benzene, 1-etil-3-metil-	620-14-4	2,2	10,2	1,6	1,7
19	Benzene, 1,2,3-trimetil-	526-73-8	3,1	8,2	1,3	1,1
20	Benzene, 1,2,4-trimetil-	95-63-6	3,9	9,8	2,4	2,4
21	1-Eptanolo	111-70-6	20,8	16,8	15,8	13,5
22	Fenolo	108-95-2	14,9	36,0	34,0	37,6
23	Etil esanoato	123-66-0	35,6	38,6	26,3	40,8
24	(Z)-4-Esenil acetato	42125-17-7	36,8	35,4	33,4	28,1
25	Ottanolo, 2-metil-	818-81-5	50,6	35,3	16,4	201,8
26	Benzenacetaldeide	122-78-1	15,9	10,6	11,7	11,1
27	Benzil alcol	100-51-6	207,4	695,0	191,5	113,3
28	Mequinolo	150-76-5	33,4	211,4	115,9	153,9
29	o-Guaiacolo	90-05-1	11,3	30,0	27,0	86,2
30	Fenilettil alcol	60-12-8	107,9	127,4	239,7	145,8
31	Idrazina, fenilmetil-	555-96-4	110,7	147,4	85,8	111,6
32	Eptano, 2,4-dimetil-	2213-23-2	1,6	1,7	1,7	1,7
33	1,7-Ottadien-3-one, 2-metil-6-metilene	41702-60-7	2,9	8,5	4,3	21,2
34	Metil ottanoato	111-11-5	11,6	11,3	10,6	14,0
35	Fenilmetil acetato	140-11-4	7,3	5,0	3,8	4,7
36	Etil benzanoato	93-89-0	1,6	2,0	2,1	2,3
37	Fenolo, 2-etil-	90-00-6	33,0	64,3	29,0	69,6
38	p-Cresolo, 2-etil	93-51-6	328,2	260,6	165,8	141,6
39	Fenolo, 4-metossi-3-metil-	14786-82-4	44,9	41,3	23,8	22,2
40	Etil ottanoato	106-32-1	22,6	24,6	21,3	38,6
41	Undecanolo	112-42-5	22,9	26,2	23,9	27,1
42	1-Metil-3-(1'-metilciclopropil)ciclopentene	103240-53-5	166,9	128,8	170,6	172,0
43	2-Fenilettil acetato	103-45-7	4,5	5,7	5,9	7,6
44	(E)-2-Decenale	3913-81-3	4,4	4,9	6,4	4,6
45	2,6,10,10-Tetrametil-1-ossa-spiro[4.5]deco-6-ene	-	1,6	1,7	4,1	2,2
46	2-Cicloesen-1-one, 4,4,6-trimetil-	13395-73-8	2,0	1,5	3,5	1,6
47	Etil benzenpropanoato	2021-28-5	2,8	4,7	4,0	5,3
48	Copaene	3856-25-5	7,3	32,6	39,5	63,4
49	$\alpha$ -Muurolene	31983-22-9	22,0	21,9	32,2	48,8

**Tabella 4a:** Concentrazioni delle sostanze volatili estratte dalle olive del primo campionamento per i 4 trattamenti irrigui. I valori delle concentrazioni sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

N	Nome	CAS	Seconda Campionatura			
			T-100	CDI	RDI	T-0
1	Acido tioglicolico	68-11-1	2385,7	3020,2	2669,4	2768,8
2	Metil acetato	79-20-9	1075,7	931,4	830,4	771,1
3	Acido acetico, 2-metil	79-31-2	809,8	705,7	506,5	587,7
4	Etil acetato	141-78-6	1477,5	2717,2	2780,0	3996,9
5	3-Metil-butanale	590-86-3	2909,5	2848,1	1927,0	3300,0
6	2-Metil-butanale	96-17-3	449,4	737,9	350,6	167,5
7	1-Pentanolo	71-41-0	1121,8	2387,2	1115,7	1617,9
8	(E)-3-Penten-2-one	3102-33-8	721,5	1337,8	677,7	1055,0
9	Sconosciuto al RT 5,385	-	677,1	714,2	539,1	678,1
10	Sconosciuto al RT 7216	-	41,1	77,4	53,0	70,0
11	3-Esenolo	544-12-7	758,3	756,1	664,2	612,0
12	Propil ciclopropano	2415-72-7	43,6	36,8	42,0	34,6
13	Pentil acetato	628-63-7	128,1	209,2	176,1	257,2
14	Stirene	100-42-5	47,0	130,7	110,5	212,7
15	Metil esanoato	106-70-7	26,3	22,3	13,8	15,6
16	Benzaldeide	100-52-7	2,6	3,6	2,7	2,9
17	(E)-2-Eptenale	18829-55-5	0,5	1,4	0,4	0,0
18	Benzene, 1-etil-3-metil-	620-14-4	2,1	9,7	1,9	1,9
19	Benzene, 1,2,3-trimetil-	526-73-8	2,2	8,3	1,3	1,4
20	Benzene, 1,2,4-trimetil-	95-63-6	2,2	7,3	2,8	2,1
21	1-Eptanolo	111-70-6	18,0	15,7	11,6	10,7
22	Fenolo	108-95-2	14,6	66,6	46,1	40,7
23	Etil esanoato	123-66-0	35,6	53,4	34,3	43,5
24	(Z)-4-Esenil acetato	42125-17-7	35,8	49,9	34,7	29,9
25	Ottanolo, 2-metil-	818-81-5	53,4	51,7	56,8	70,5
26	Benzenacetaldeide	122-78-1	1,1	4,0	2,6	1,3
27	Benzil alcol	100-51-6	274,4	301,4	240,3	248,7
28	Mequinolo	150-76-5	62,1	245,0	182,1	236,7
29	o-Guaiacolo	90-05-1	21,3	26,1	16,7	16,8
30	Fenilettil alcol	60-12-8	154,6	327,9	175,5	206,3
31	Idrazina, fenilmetil-	555-96-4	147,2	173,7	95,4	91,4
32	Eptano, 2,4-dimetil-	2213-23-2	2,3	1,7	1,3	1,4
33	1,7-Ottadien-3-one, 2-metil-6-metilene	41702-60-7	6,7	5,0	4,8	8,3
34	Metil ottanoato	111-11-5	12,4	17,6	9,1	13,8
35	Fenilmetil acetato	140-11-4	10,0	9,5	7,4	8,2
36	Etil benzanoato	93-89-0	2,2	4,1	2,2	3,7
37	Fenolo, 2-etil-	90-00-6	23,6	68,0	24,5	79,0
38	p-Cresolo, 2-etil	93-51-6	469,8	630,6	441,6	506,8
39	Fenolo, 4-metossi-3-metil-	14786-82-4	46,0	72,2	32,1	45,1
40	Etil ottanoato	106-32-1	21,5	45,7	22,5	30,4
41	Undecanolo	112-42-5	30,6	35,6	24,7	18,9
42	1-Metil-3-(1'-metilciclopropil)ciclopentene	103240-53-5	258,4	286,9	303,8	353,2
43	2-Fenilettil acetato	103-45-7	6,2	7,7	6,4	10,6
44	(E)-2-Decenale	3913-81-3	9,0	7,4	10,1	12,1
45	2,6,10,10-Tetrametil-1-ossa-spiro[4.5]deco-6-ene	-	2,3	5,1	3,0	2,5
46	2-Cicloesen-1-one, 4,4,6-trimetil-	13395-73-8	1,7	2,8	2,7	1,4
47	Etil benzenpropanoato	2021-28-5	4,2	6,1	5,3	8,5
48	Copaene	3856-25-5	61,3	58,1	49,6	59,3
49	$\alpha$ -Murolene	31983-22-9	9,0	8,7	8,1	8,6

**Tabella 4b:** Concentrazioni delle sostanze volatili estratte dalle olive del secondo campionamento per i 4 trattamenti irrigui. I valori delle concentrazioni sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

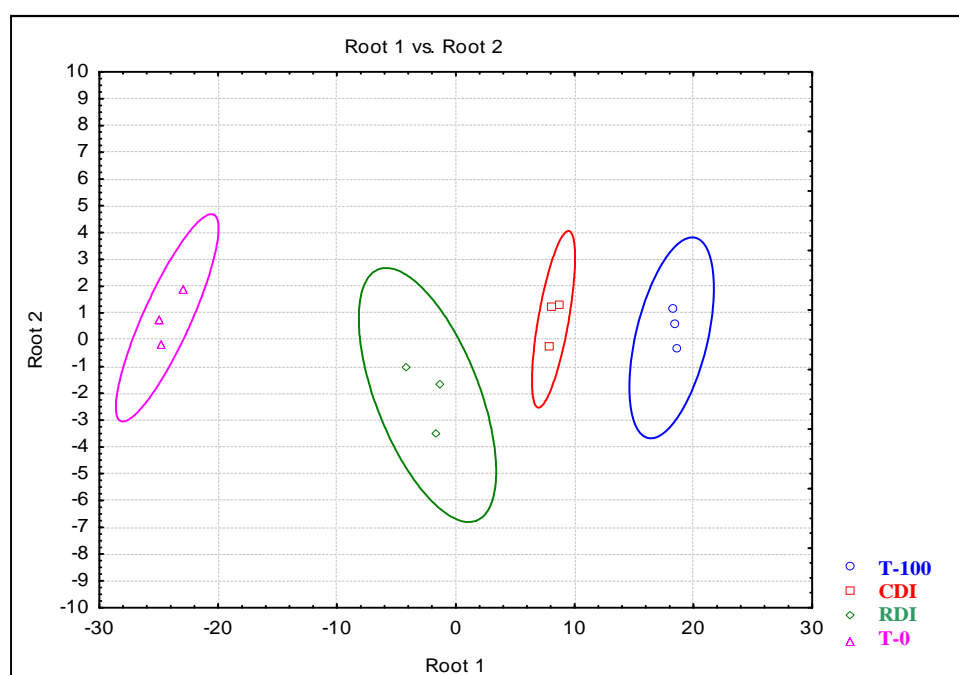


#### 4.4.2 Analisi statistica

I dati provvisori riguardanti le quantità dei composti volatili, presenti nel profilo aromatico delle olive da mensa trattate secondo le quattro tecniche irrigue e appartenenti alle due campionature, sono stati sottoposti ad un’analisi statistica della varianza. In particolare è stato condotto uno studio secondo la tecnica di esplorazione multivariata LDA (*Linear Discriminant Analysis*) utilizzando il software STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001), al fine di verificare gli effetti sulla componente aromatica delle olive ottenute da alberi sottoposti a i diversi trattamenti irrigui.

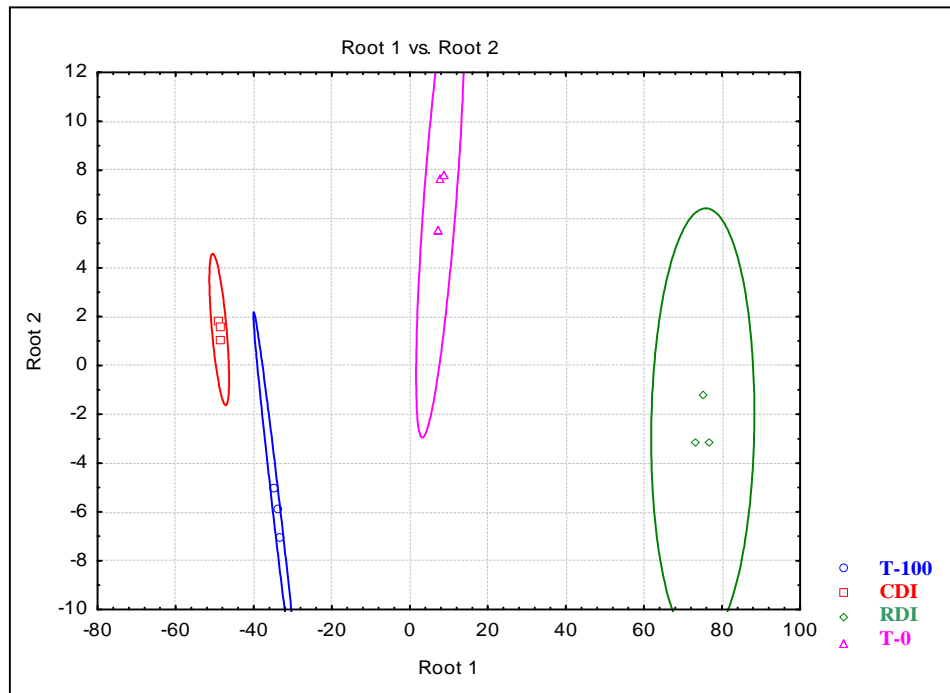
L’approccio statistico è stato applicato ai dati riguardanti le quantità delle componenti volatili (valori delle concentrazioni dei cinque campioni non mediati) dei campioni analizzati, divisi per campionatura. I risultati mostrano come sia possibile distinguere i campioni di olive, all’interno dello stesso gruppo di campionamento, in base ai diversi trattamenti irrigui.

Nella primo campionamento per mezzo di 4 variabili discriminanti (composti Numero 12,13,50,51 nelle **Tabelle 4 a-b**), si ottiene una separazione del 100% tra i quattro diversi sistemi irrigui utilizzati con un valore di  $p < 0.0000$  ed un valore di  $F = 12,13$  (**Figura 10**).



**Figura 10:** LDA per il primo campionamento in relazione ai 4 sistemi irrigui.

Anche per il nel secondo campionamento per mezzo di altre 6 variabili discriminanti (composti Numero 13,19,20,21,22,38 nelle Tabelle 2), si ottiene una separazione del 100% tra i quattro diversi sistemi irrigui utilizzati con un valore di  $p < 0.0000$  ed un valore di  $F = 18,80$  (**Figura 11**).



**Figura 11:** LDA per il nel secondo campionamento in relazione ai 4 sistemi irrigui.

I valori di  $F$  più alti ottenuti per l'analisi statistica sui dati riguardanti la il nel secondo campionamento stanno ad indicare una migliore discriminazione rispetto alla prima dei quattro sistemi irrigui sui campioni che hanno subito un processo fermentativo, seppure non ancora completo.

Ad uno stadio di fermentazione più avanzato, quindi, sembrerebbero essere più apprezzabili le differenze dell'aroma delle olive da mensa rispetto ad una fase iniziale di fermentazione corrispondente al primo campionamento.

Al fine di avere un quadro più completo sull'evoluzione dell'aroma delle olive da mensa durante la maturazione in salamoia e sugli effetti che i diversi trattamenti irrigui possono determinare su di esso, ci riproponiamo di riapplicare l'analisi chemiometrica anche ai dati riguardanti le sostanze volatili relative al prodotto finito, quelle cioè relative alla terza campagna di campionamento (dicembre 2010).

#### 4.5 CONCLUSIONI

In questo studio, la tecnica di estrazione SPME abbinata all’analisi GC-MS è risultata valida e selettiva per l’identificazione quali-quantitativa della componente volatile delle olive da mensa. Ciò ha permesso di evidenziare i differenti composti che caratterizzano le diverse tipologie di olive ottenute con differenti sistemi irrigui.

È interessante notare come la metodica sviluppata sia in grado di identificare e quantificare un maggior numero di sostanze rispetto a tecniche già applicate in altri lavori presenti in letteratura.<sup>152,154,160</sup>

Gli studi fin qui condotti in base alla sola componente aromatica permettono di evidenziare differenze significative in relazione ai differenti sistemi irrigui utilizzati e mostrano anche gli effetti che i processi fermentativi hanno sul profilo aromatico delle olive.

Valutando le quantità assolute della componente aromatica al variare dei trattamenti irrigui, si nota senza dubbio che lo stress idrico non fa decrescere la componente aromatica, come si potrebbe immaginare, ma anzi porta ad un incremento che è ben evidente tra il controllo (T-100) ed il campione definito “arido” (T-0). Sempre in base al valore assoluto tra il campione che ha subito un deficit idrico costante di circa il 30% (CDI) e quello che ne ha subito uno definito “controllato” (piante in asciutto fino alla seconda decade di agosto seguito da piena irrigazione, RDI) il primo trattamento è senza dubbio quello più favorevole. Questo andamento, riscontrabile in tutti e due i campionamenti effettuati, indicherebbe che il trattamento RDI è quello meno favorevole, seguito dal CDI ed in fine dal T-0, ma questi dati andranno anche confrontati con quelli relativi al prodotto finito, quelli cioè relativi alla terza campagna di campionamento.

Queste considerazioni sono da considerarsi parziali ed andranno sicuramente integrate con i valori agronomici e non ultimi con quelli provenienti dall’analisi sensoriale (*panel test*).

Ad un incremento della componente aromatica non sempre, infatti, corrisponde un maggiore apprezzamento da parte del consumatore: esso è il risultato del fine bilanciamento tra le quantità assolute e relative di tutte le sostanze volatili emesse e delle reciproche interazioni sinergiche o antagoniste tra i diversi composti aromatici e di quelle tra essi e la matrice. Inoltre, in uno studio più completo, andrebbe considerato anche il contributo in termini di note olfattive di ogni sostanza individuata, ancor più in campioni come questi sottoposti a fermentazione che presentano un profilo aromatico in continua evoluzione durante il quale non è escluso che possano essere liberate sostanze definite *Off flavour* che potrebbero portare alla comparsa di odori stantii o comunque sgradevoli.

I risultati fin qui ottenuti inerenti la componente aromatica sono quindi da ritenersi parziali sia in quanto non sono ancora disponibili i dati relativi ai prodotti finiti, sia perché comunque da soli non potranno dare una indicazione univoca sugli effetti dei trattamenti irrigui (stress idrico) sulla qualità del prodotto finale. La raccolta di tutti i dati analitici e sperimentali quali dati agronomici,

microbiologici e sensoriali sono necessari per una valutazione globale al fine di indicare quale sia il migliore compromesso per ottenere delle olive da mensa appetibili ed apprezzabili dal consumatore, con un auspicabile risparmio idrico e di manodopera da parte dei produttori.

## **5. STUDIO DELLA COMPONENTE AROMATICA E DELLE PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE DI MELE ANNURCA SOTTOPOSTE A TRATTAMENTO IN MELAIIO TRAMITE GC-MS ED ANALISI STATISTICA**

### **5.1 INTRODUZIONE**

#### **5.1.1 Origine e diffusione**

Originario dell'Asia centrale, il melo è una specie largamente diffusa e coltivata. Il suo areale di coltivazione è, infatti, molto ampio essendo una specie riscontrabile dalla Siberia, dove le temperature medie invernali scendono fino a 30-40°C sotto lo zero, fino ad Israele, ossia fino ai limiti meridionali delle zone subtropicali. Questo è dimostrazione di una grande plasticità di adattamento, legata probabilmente alla notevole variabilità genetica, caratteristica della specie, e che ne ha consentito la diffusione in areali con caratteristiche climatiche sicuramente differenti.

La specie è ascrivibile alla famiglia delle Rosacee, al genere *Malus* che comprende circa 25 specie, di cui solo poche vengono coltivate per il frutto destinato al consumo fresco o all'industria (estrazione di sidri, produzione di bevande alcoliche); le rimanenti specie vengono utilizzate soltanto come portinnesti e come fonte di germoplasma per il miglioramento genetico, oltre che come piante ornamentali.

Il nome botanico della specie coltivata è stato oggetto di molte variazioni nel corso degli anni ma la nomenclatura oggi adottata è quella di *Malus domestica*.

La specie è presente in Italia nominalmente con circa 2000 varietà.

#### **5.1.2 Melicoltura in Italia e nel mondo**

La melicoltura è presente, seppure in diversa misura, in tutti i continenti, raggiungendo, in particolare nel 2007, una produzione mondiale di circa 65.97 milioni di tonnellate.<sup>161</sup> Al primo posto, con più del 50% della produzione mondiale, si configura l'Asia, all'interno della quale si distingue la Cina con 27,86 milioni di tonnellate.<sup>161</sup> Nel continente americano, invece, gli Stati Uniti, nonostante la recente tendenza alla riduzione delle produzioni si configurano come il secondo produttore mondiale di mele<sup>161</sup>.

Un ruolo di tutto rilievo occupa anche l'Europa, con una produzione nel 2007 pari a circa 11 milioni di tonnellate.<sup>161</sup> Nell'ambito dei Paesi europei l'area comunitaria è senza dubbio la più significativa, concentrando al suo interno il 55% della produzione europea. Tra i Paesi della Comunità, principali produttori si configurano la Francia, l'Italia e la Germania che nel complesso determinano circa il 70% della produzione totale.

In termini numerici la coltivazione del melo in Italia occupa una superficie di 58.309 ettari con una produzione raccolta di 22.047.442 quintali<sup>162</sup> e interessa soprattutto le aree del Nord, dove si raccoglie più del 90% della produzione nazionale.

In Italia la coltura del melo si estende soprattutto nelle zone temperato-fredde, in pianura, collina ed alcune zone montane dell’Italia settentrionale. Il melo vegeta bene anche nelle nostre zone temperato calde purché sia soddisfatto il fabbisogno in freddo. E’ resistente sia ai freddi invernali che alla brinate primaverili perché fiorisce tardi. E’ adattabile in fatto di terreno tollerando sia i terreni calcarei che quelli argillosi. Le terre migliori sono però quelle fresche, profonde, permeabili e dotate di buona fertilità.

Nelle regioni centrali la coltivazione del melo ha un ruolo del tutto marginale, sia in termini di superfici investite che di quantità prodotte, mentre tra le regioni meridionali, la Campania presenta una realtà molto significativa. La melicoltura di questa regione è rappresentata per oltre il 70% dalla cultivar Annurca che costituisce una realtà locale con le sue caratteristiche e problematiche specifiche.

### 5.1.3 LA MELA ANNURCA

L’Annurca (**Figura 1**), definita la “regina delle mele”, è una cultivar molto antica e le prime testimonianze della coltivazione in Campania risalgono alle rappresentazioni fatte ad Ercolano, precedenti l’eruzione del 79 d.c.



**Figura 1:** La mela Annurca.

Negli anni ’50 per la coltivazione dell’Annurca in Campania cominciò però un periodo di crisi, dovuto principalmente all’introduzione di nuove cultivar americane, specialmente la Golden Delicious gialla e la rossa Starking.

A causa dell’autosterilità di tali cultivar, nel decennio successivo si verificò un ritorno all’Annurca (che si era rivelata un’ottima impollinatrice) (Forte 1963), dapprima coltivata ancora con tecniche tradizionali, poi oggetto di profondo rinnovamento colturale con l’introduzione dei portinnesti clonali

(MM106 e M26), la conseguente intensificazione degli impianti e la possibilità di allevamento a spalliera.

Gli anni 70 fecero registrare una forte espansione in tutte le province e un ulteriore impulso si ebbe intorno al 1985-1986 per la diffusione del clone “Annurca Rossa del Sud” e “Bella del Sud” selezionate da F. Limongelli nel 1979 per la colorazione più rossa dei frutti. Per la regione Campania l’Annurca costituisce ancora oggi una risorsa produttiva di rilievo, dato che, come già riportato nella parte generale, la melicoltura è rappresentata per oltre il 70% da tale cultivar.

Ancora oggi l’Annurca è molto diffusa nel Sud Italia, soprattutto in Campania, ed è molto apprezzata per le sue caratteristiche organolettiche e per la consistenza della polpa.<sup>163</sup> Il frutto è di pezzatura media, di forma appiattita o rotondeggiante con epidermide rosso-striata. La polpa è di colore bianco, di consistenza compatta, dolce e succosa, piacevolmente acidula e fortemente aromatica. La resistenza alle manipolazioni è elevata e l’attitudine alla conservazione ottima. Al clone standard ne sono stati affiancati due caratterizzati da una migliore colorazione della buccia: la Rossa del Sud e la Bella del Sud.<sup>164</sup>

### 5.1.3.1 Descrizione cloni

**Annurca tradizionale:** frutto piccolo, circa 100 g, con peduncolo corto o medio-corto (7-14 mm) e buccia mediamente rugginosa, con piccole lenticelle poco evidenti, grigie o rugginose, giallo-verdastra, con striature rosse sul 40-70% della superficie, di un rosso intenso all’insolazione; ha la polpa bianca, appena rossa sotto l’epidermide, molto compatta, croccante, mediamente dolce o leggermente acidula, mediamente aromatica, di qualità ottima. La resistenza alle manipolazioni è ottima ma la cascola (caduta spontanea del frutto dall’albero) pre-raccolta è medio-elevata e dovuta soprattutto al peduncolo corto.

**Annurca Rossa del Sud:** mutazione della cultivar Annurca individuata da F. Limongelli nell’autunno del 1979, presenta un frutto di pezzatura media, con peduncolo corto e una buccia gialla, liscia con lenticelle numerose, ma poco evidenti, e sovraccolore rosso sul 90-100% della superficie; la polpa è bianca, compatta, croccante, dolce-acidula, profumata e resistente alle manipolazioni. Presenta una media cascola in pre-raccolta e i frutti cascolati hanno già la colorazione rossa su tutta la superficie dell’epidermide. I frutti si raccolgono nel mese di ottobre, 8-10 giorni prima dell’Annurca tradizionale, e necessitano in misura minore di arrossamento in melaio. Questo clone si differenzia dalla tradizionale per alcuni caratteri migliorativi, quali una buona pezzatura e la colorazione rossa uniforme ed estesa a tutta la superficie del frutto alla raccolta come hanno anche evidenziato recenti studi su frutti cresciuti nelle condizioni climatiche dell’entroterra siciliano.<sup>165</sup>

**Annurca Bella del Sud:** frutto, di pezzatura media, con peduncolo corto e buccia liscia con lenticelle numerose, ma poco evidenti, gialla, con sovraccolore rosso brillante sul 90-100% della superficie. La

polpa è bianca, compatta, croccante, dolce-acidula e profumata e presenta un’ottima resistenza alle manipolazioni. La cascola pre-raccolta è media; i frutti cascolati hanno gran parte della superficie dell’epidermide già rossa. I frutti si raccolgono nel mese di ottobre, 8-10 giorni prima dell’Annurca tradizionale. Il 60% circa dei frutti alla raccolta presenta il sovraccolore rosso-brillante su tutta la superficie e quindi può andare subito in frigorifero; il restante 40% circa richiede 4-6 giorni di “melaio” per favorire una migliore colorazione della superficie interessata dalla fossa peduncolare.

#### 5.1.4 Problematiche inerenti al coltivazione dell’Annurca: il melaio

A fronte dei notevoli pregi esposti precedentemente, l’Annurca però presenta delle problematiche a livello agronomico capaci di influire pesantemente sul suo costo di produzione e che sicuramente hanno contribuito al ridimensionamento della sua coltivazione: su tutte la raccolta, e soprattutto la gestione delle fasi successive, sono particolari e legate all’antica tradizione dell’arrossamento nei cosiddetti ‘melai’ (**Figura 2**).<sup>166</sup>

Uno degli elementi che caratterizzano questa cultivar è, come precedentemente detto, la cascola dei frutti prima di raggiungere la completa maturazione; questo problema è da correlare al fatto che la mela ha un peduncolo debole e corto, inserito in una depressione stretta e profonda nel frutto. Per questa caratteristica costituzionale, quando il frutto raggiunge una certa pezzatura esercita una spinta verso il rametto che lo sostiene e, per la debolezza dell’attacco, cascola. Tale fenomeno si accentua quanto più ci si avvicina all’epoca di maturazione fisiologica e quindi la cascola anticipata sarebbe quasi totale se non si raccogliessero i frutti anticipatamente.<sup>167</sup> Ovviamente questi frutti raccolti anticipatamente non raggiungono mai una colorazione ed un grado di maturazione ottimale e questo implica un periodo obbligato nei cosiddetti “melai”, che consente ai pomi sia il conseguimento della colorazione ottimale (arrossamento), sia il raggiungimento di quelle che sono le loro prerogative organolettiche.



**Figura 2:** Mele Annurca sottoposte al trattamento in melaio.

I terreni su cui sorgono i melai vengono sistemati in “prosoni” o “porche” separate e il piano delle stesse, appena elevato nella parte centrale, viene ricoperto con dei trucioli di legno.



Durante la permanenza nei melai le Annurche vengono rivoltate più volte esponendo al sole la parte da arrossare e nel frattempo eliminando i frutti che presentano segni di deprezzamento. L'esposizione delle mele alla luce risulta indispensabile per un'adeguata formazione del pigmento colorante;<sup>168</sup> è anche vero comunque che bisogna proteggerle dall'azione diretta dei raggi solari per evitare che si verificino danni (dal leggero appassimento fino all'avvizzimento). Per evitare quest'inconveniente, si prevede l'inserimento di reti ombreggianti e il bagnamento periodico delle mele; quest'ultima pratica ha la funzione da un lato di mantenerle fresche e turgide e dall'altro di rallentarne la maturazione (conseguenza dell'abbassamento di temperatura).<sup>166</sup> Dopo una permanenza in queste strutture per 20-50 giorni i frutti possono essere destinati al consumo fresco o alla conservazione in celle frigo.

Questa pratica descritta è indispensabile per l'Annurca standard, e in un certo senso ne determina la tipicità della stessa, anche se ne aggrava sensibilmente i costi di produzione. Tale tempo di permanenza dei frutti in melaio è ridotto per il mutante naturale Annurca Rossa del Sud, grazie al fatto che esso presenta alla raccolta frutti più rossi dell'Annurca tradizionale. **Errore. Il segnalibro non è definito.**

### 5.1.5 Profilo aromatico delle mele

Fra tutti i parametri qualitativi, la componente aromatica di un frutto gioca un ruolo fondamentale nel determinarne il gradimento e l'accettabilità da parte dei consumatori.

L'aroma è il risultato della complessa combinazione di odore e sapore. Benché il sapore e la consistenza siano importanti per la qualità dei frutti, la presenza e la quantità delle sostanze volatili, responsabili del loro odore caratteristico, sono i parametri che più incidono sulla percezione della qualità delle mele<sup>169</sup> e sono quindi un importante criterio di valutazione sulla loro appetibilità. Molte ricerche sono state condotte sulla componente volatile delle mele, nelle quali, grazie alla Gas Cromatografia accoppiata alla Spettrometria di Massa (GC/MS), più di 300 sostanze sono state identificate.<sup>169</sup> Si tratta di una miscela complessa di alcoli, aldeidi C1-C6, acidi esterificati e terpeni.<sup>170</sup>

Il maggior contributo alla composizione della componente volatile viene comunque dagli esteri, che rappresentano rispettivamente l'80, 88, 90 e 98% dei volatili totali in mele Golden Delicious,<sup>171</sup> Granny Smith,<sup>172</sup> Fuji,<sup>173</sup> e Starking Delicious.<sup>174</sup> Gran parte di questi esteri prodotti durante la maturazione delle mele si forma dal catabolismo primario di lipidi e aminoacidi.<sup>175</sup>

Soltanto 20-40 di questi composti possono essere strettamente collegati all'aroma delle mele; tra di essi ricordiamo l'esanale, il (E)-2-esenale, gli etil-, butil-, ed esil- esteri degli acidi acetico, butanoico, ed esanoico, l'esanolo, il etil-2-metil-butanoato, il  $\beta$ -damascenone e l'alfa-Farnesene.<sup>176,177,178,179</sup>

Il contributo di ogni composto all'odore caratteristico di ciascun frutto dipende in primo luogo dalla sua “soglia di odore” (odour threshold OTH), cioè la concentrazione minima affinché un composto possa essere rilevato dal naso umano e, in secondo luogo, dalla sua concentrazione,<sup>180</sup> a sua volta

dipendente dall'attività degli enzimi predisposti a sintetizzarlo e dalla disponibilità dei substrati necessari alla sintesi.<sup>175, 181</sup>

L'apporto relativo di un componente volatile alla formazione dell'aroma totale può essere espresso mediante le “unità di odore”, determinabili dal rapporto tra la concentrazione di un composto nell'alimento in esame ed il suo valore di “soglia di odore”.<sup>182,183</sup>

La maturità del frutto alla raccolta è un punto critico che ne influenza tutte le qualità organolettiche e ne determina l'impiego.

Studi condotti sul profilo aromatico dell'Annurca hanno evidenziato che la buccia risulta più ricca rispetto alla polpa<sup>184</sup> e che nei frutti esposti al sole c'è un cambiamento quantitativo dei composti volatili.<sup>185</sup> In particolare l'aumento dell'aroma totale dopo trattamento in melaio è dovuto principalmente, seppur in misura differente, agli esteri ed agli alcoli: gli esteri proporzionalmente diventano più abbondanti degli alcoli e questo potrebbe anche migliorare le qualità complessive dell'aroma totale. Inoltre sembrano giocare un ruolo chiave nella definizione del profilo aromatico di queste mele il pentanolo (come alcol e come pentil estere), i butanoati e gli esanoati, come anche il  $\delta$ -octalattone.

Anche in studi precedenti, erano stati verificati cambiamenti nelle concentrazioni delle sostanze volatili: in particolare si era registrato un incremento delle aldeidi C1-C6 e degli esteri con l'avvicinarsi della data di raccolta.<sup>186</sup>

## 5.2 SCOPO

Scopo di questa di questa parte del mio lavoro di tesi è quello di investigare l'effetto dell'esposizione post-raccolta al sole sulla qualità dei frutti e sull'aroma di tre cloni di mela Annurca.

In particolare sono state analizzate sia le caratteristiche chimico fisiche dei frutti, sia la componente volatile della buccia e della polpa di mele di Annurca Rossa del Sud, Annurca Bella del Sud ed Annurca AICA, sottoposte per due settimane a trattamento in un melaio sperimentale.

Lo studio, condotto in collaborazione con il Dipartimento Senfimizio, sez. Frutticoltura Mediterranea, Tropicale e Sub-Tropicale dell'Università di Palermo, ha indagato la possibilità di applicare un protocollo di arrossamento dei frutti più breve (quindici giorni invece dei consueti cinquanta), che consentirebbe notevole risparmio in termini di tempo, manodopera che notevolmente incidono sul costo finale di questi frutti, senza alterarne le caratteristiche qualitative.

Ci si è proposto di valutare l'aspetto esteriore delle mele Annurca arrossate e non (pezzatura, colore, forma), le proprietà fisiche della loro polpa (compattezza dei frutti) e la composizione chimica (solidi solubili, acidità titolabile, zuccheri etc...), insieme alle caratteristiche aromatiche e per stimare gli effetti del trattamento in melaio sui frutti è stata effettuata un'analisi statistica della varianza.

### 5.3 SEZIONE SPERIMENTALE

#### 5.3.1 Campioni

I frutti provengono da Caltavuturo (37° 49' N a 850 m s.l.m.) in Sicilia, da alberi di otto anni dei cloni AICA, Bella del Sud (ABS), e Rossa del Sud (ARS), innestati su M9, in file singole e spaziate 4 x 1.5 m, allevati a fusetto e sottoposti a cure colturali ordinarie.

Tre o quattro alberi adulti uniformi in dimensione sono stati selezionati per ogni clone. La raccolta è avvenuta a maturazione commerciale (ultima decade di ottobre) e dalle piante è stato prelevato un campione costituito da 40 frutti per clone, metà dei quali è stata analizzata subito (15 sono stati sottoposti alle determinazioni analitiche delle caratteristiche chimico fisiche, mentre i restanti 5 sono stati utilizzati per la determinazione della frazione volatile) mentre un'altra metà è stata sottoposta a trattamento in melaio.

I frutti sono rimasti esposti al sole per 15 giorni, su porche costituite da assi di legno e sono stati ruotati ogni 3 giorni, senza innaffiatura.

#### 5.3.2 Parametri estetici e chimico-fisici dei frutti

In laboratorio, sui 15 frutti freschi selezionati per clone e per trattamento post-raccolta, sono stati determinati, secondo le metodiche già esposte per l'analisi dei parametri qualitativi delle albicocche (v. par. 3.3.2), il peso, la consistenza della polpa, il contenuto in solidi solubili totali (total soluble solids, TSS), il pH e l'acidità titolabile.

La colorazione delle bucce è stata, determinata dall'analisi delle immagini digitali è espressa da un indice compreso tra 0 (assenza di rosso-arancio) e 1 (completamente rosso-arancio).

Per la determinazione del contenuto d'amido è stato impiegato il test iodio-ioduro,<sup>187</sup> mediante l'impiego della soluzione di Lugol. Le sezioni dei frutti trattate con la soluzione Lugol sono state fotografate e lo stesso algoritmo usato per determinare il colore dell'epicarpo è stato usato per quantificare la colorazione delle sezioni. Il risultato, in questo caso, è un indice con valori compresi tra 0 (non colorato) e 1 (completamente colorato).

#### 5.3.3 Analisi della componente volatile

Le basse concentrazioni dei componenti volatili, sia della buccia che della polpa, delle mele Annurca rendono difficoltosa la loro individuazione, il loro isolamento e la loro estrazione.

L'analisi della componente volatile è stata eseguita in spazio di testa (HS) mediante la *Solid Phase Micro-Extraction* (SPME)<sup>89</sup>, abbinata alla Gas-Cromatografia/Spettrometria di Massa (GC/MS)<sup>90,91</sup>, utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico.

Tutte le analisi preliminari sono state eseguite sul clone AICA. Le prove di riproducibilità sono state eseguite per tre volte su tre differenti campioni con ottimi risultati.

### 5.3.3.1 Estrazione degli analiti

Come già precedentemente descritto per l'analisi della componente volatile delle albicocche (v. par. 3.3.3.1), la metodica SPME, utilizzata per l'estrazione degli analiti dallo Spazio di Testa, è stata ottimizzata in tutti i principali parametri chiave: tempo di saturazione dello spazio di testa (HS) alla temperatura di analisi del campione, fibra SPME più adatta ed tempo di esposizione della stessa nello HS.

#### 5.3.3.1.1 Scelta della fibra e del tempo di esposizione

Per individuare il tipo di fibra SPME più adatta all'analisi dello spazio di testa sono state effettuate delle prove con tre differenti: una DiVinilBenzene/carboxen/PoliDimetil Silossano (50/30  $\mu\text{m}$  DVB/carboxen/PDMS), una PoliDimetil Silossano/DiVinilBenzene (65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB) ed una PoliDimetil Silossano (100  $\mu\text{m}$  PDMS).

Similmente a quanto effettuato per lo studio sulle componenti volatili delle albicocche (v. par. 3.3.4.1), sono stati saggiati otto composti e tre tempi di esposizione (10, 15, 20 e 30 minuti). I composti scelti sono: l' Etile Butanoato, l'1-Butanolo, l'1-Butanolo-2-metil, l'Esile acetato, il Metil-(Z)-3-Esanoato, l'Etile esanoato, l'Esil 2-metilbutanoato e l'Esil esanoato.

Dai grafici ottenuti, riportati nella **Figura 3**, risulta evidente che la fibra trifasica è, tra le fibre utilizzate, quella che riesce a estrarre il maggior quantitativo di sostanze. L'andamento della sua estrazione al variare del tempo di esposizione è diverso a seconda del composto: l'Esile acetato e l'Etile Butanoato sono recuperati in maniera pressoché costante tra 10 e 15 minuti ma poi, all'aumentare del tempo di esposizione, la loro quantità aumenta; gli alcoli (1-Butanolo e 1-Butanolo 3-metil) sono estratti in quantità quasi costante e presentano un plateau tra 15 e 20 minuti, tempi nei quali si ha il loro massimo recupero; l'estrazione del l'Etile esanoato e dell'Esil esanoato aumenta sempre con l'aumentare del tempo di esposizione della fibra, mentre quella del Metil-(Z)-3-Esanoato e del Esil 2-metilbutanoato si stabilizza attorno ai 20 minuti.

La fibra monofasica è quasi sempre quella che presenta il minor recupero in termini quantitativi, ed anche per essa si nota un certo *range* di stabilità nell'intervallo tra 15 e 20 minuti.

L'andamento dell'estrazione per la fibra bifasica, infine, è all'incirca uguale per tutti i composti: risulta stabile nell'intervallo tra 10 e 20 minuti per poi precipitare a valori molto più bassi per esposizioni di 30 minuti.

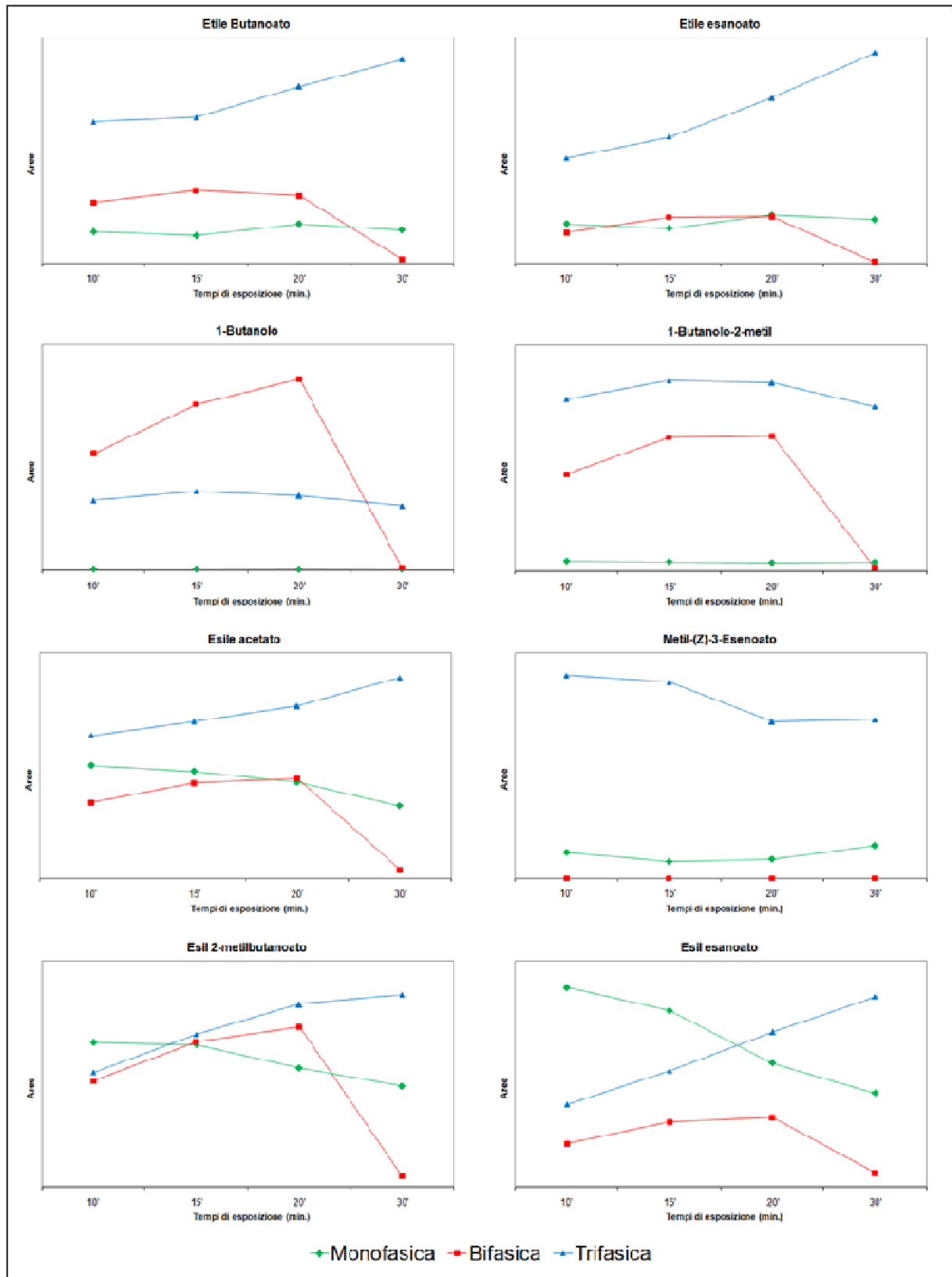


Figura 3: Andamento dell'estrazione dallo HS al variare delle fibre SPME e del tempo di esposizione.

Benché risultasse chiaro che, in termini quantitativi, per le sostanze in esame il miglior recupero lo si otteneva con le fibre trifasica e bifasica tra 15 e 20 minuti, i dati non permettevano di scegliere quale

tra le due fibre fosse più conveniente utilizzare e quale fosse il miglior tempo di estrazione dallo spazio di testa.

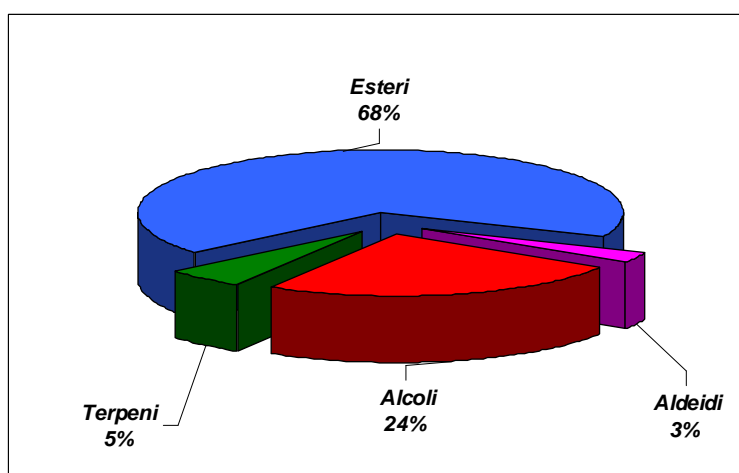
Si è pertanto proceduto con uno studio più approfondito, basato su due diversi criteri: la già descritta funzione  $F_{ij}$  (v. par. 3.3.4.1.1) e la rappresentatività dell'estrazione rispetto alle sostanze realmente contenute nel profilo aromatico delle mele

Il valore di  $F_{ij}$  calcolato per le tre fibre, riportato in **Tabella 1**, mostra come la fibra monofasica sia quella meno capace di estrarre sostanze dallo spazio di testa, avendo un valore  $F_{ij}$  di 0,562 e 0,481 a 15 e 20 minuti rispettivamente. Per quanto riguarda le fibre bifasica e trifasica, la prima presenta un valore di  $F_{ij}$  minore della seconda dopo un'esposizione di 15 minuti (1,197 per la bifasica e 1,241 per la trifasica), mentre la situazione si inverte quando il tempo di esposizione viene aumentato di 5 minuti (1,335 per la bifasica e 1,184 per la trifasica).

Fibre	$F_{ij}$	
	15 minuti	20 minuti
DVB/carboxen/PDMS	1.241	1.184
PDMS	0.562	0.481
PDMS/DVB	1.197	1.335

**Tabella 1:** Valore di  $F_{ij}$  calcolato per le 3 fibre a 15 e 20 minuti di esposizione.

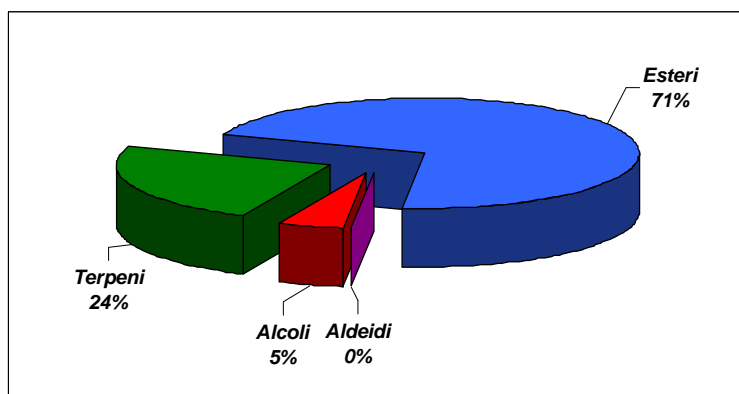
Un'analisi accurata di quella che è la distribuzione percentuale di tutte le sostanze identificate nella componente volatile delle mele Annurca, riportata in **Figura 4**, mostra che la maggioranza delle sostanze presenti è costituita da esteri, seguita da alcoli, terpeni ed infine da una piccola percentuale di aldeidi.



**Figura 4:** Rappresentazione delle percentuali delle classi chimiche presenti nella componente aromatica delle mele Annurca.

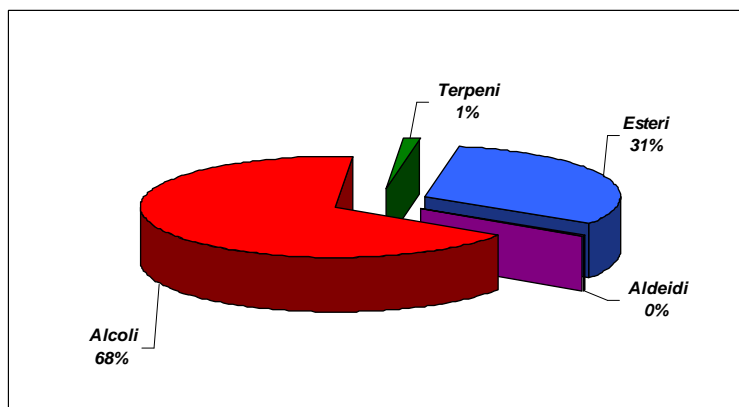
La composizione relativa delle sostanze estratte dalla fibra monofasica (**Figura 5**) evidenzia l'elevata affinità della sua matrice di PDMS verso le sostanze apolari. Essa infatti lega preferenzialmente esteri

(71%) e terpeni (24%), questi ultimi invece nella componente volatile totale rappresentano solamente il 5% del totale. Molto più bassa risulta invece la percentuale delle sostanze un po' più polari; in particolare gli alcoli che rappresentano circa un quarto dei composti aromatici totali si riducono al 5% a causa della loro scarsa affinità con la matrice di copertura della fibra monofasica.



**Figura 5:** Rappresentazione della distribuzione percentuale delle sostanze volatili estratte dalla fibra monofasica.

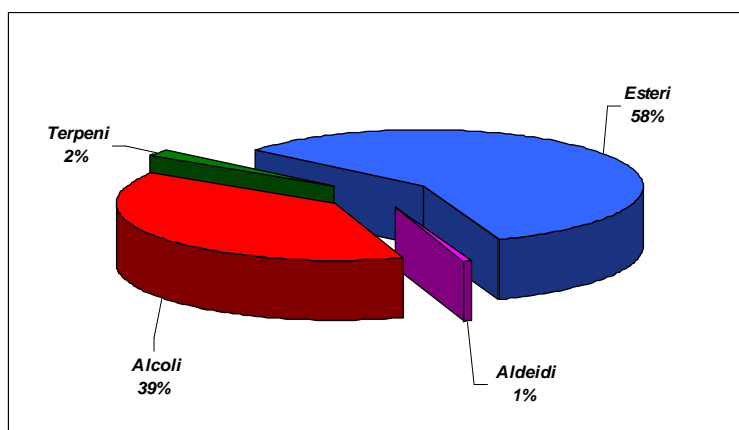
Discorso opposto vale invece per la fibra bifasica (**Figura 6**), che in virtù di una spiccata polarità riesce ad estrarre una grande quantità di alcoli, circa i due terzi del totale, a discapito degli esteri che si riducono a meno di un terzo del totale.



**Figura 6:** Rappresentazione della distribuzione percentuale delle sostanze volatili estratte dalla fibra bifasica.

La rappresentazione più fedele della componente aromatica si ottiene invece con la fibra trifasica (**Figura 7**) la quale, presentando sia funzioni polari che funzioni apolari, dallo spazio di testa riesce ad estrarre per buona parte esteri (58%), ma anche alcoli (39%) e terpeni (2%), con un profilo quasi sovrapponibile a quello mostrato in **Figura 4**.





**Figura 7:** Rappresentazione della distribuzione percentuale delle sostanze volatili dalla fibra trifasica.

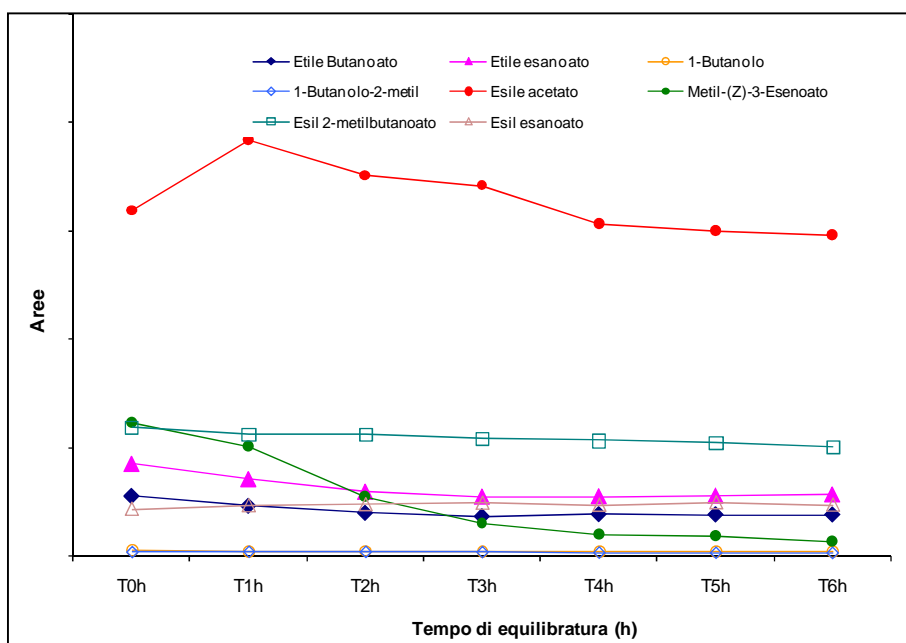
Si è quindi scelto di effettuare le analisi sulla componente aromatica delle mele Annurca utilizzando la fibra trifasica (50/30  $\mu\text{m}$  DVB/carboxen/PDMS) ed un tempo di esposizione della stessa di 15 minuti.

#### 5.3.3.1.2 Saturazione Spazio di Testa

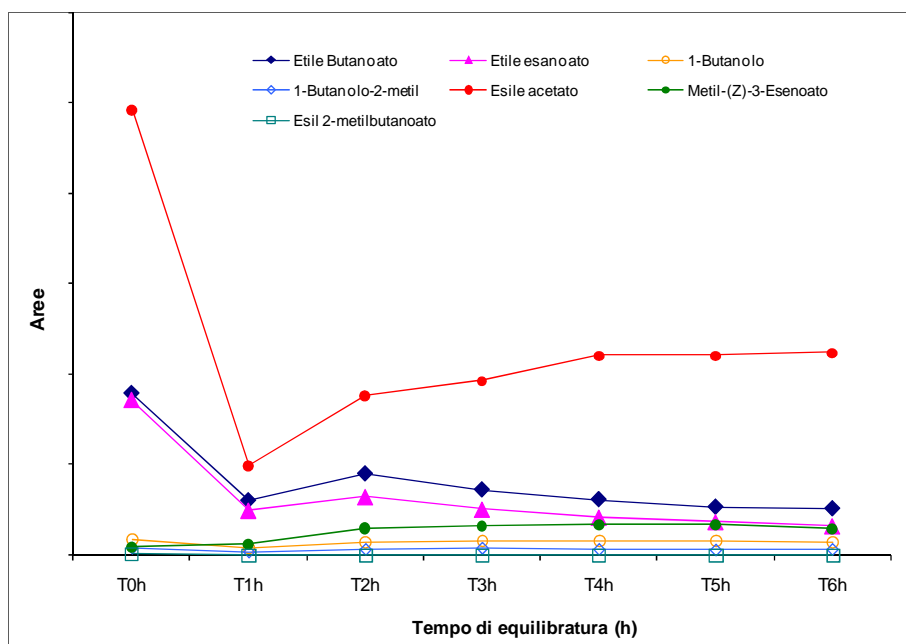
Per la determinazione del tempo di equilibratura dello spazio di testa è stata applicata la stessa metodica descritta nello studio sulla componente aromatica delle albicocche (v. par. 3.3.4.1.2). In questo studio abbiamo preso in esame le stesse otto sostanze volatili utilizzate per l'analisi della capacità estrattiva delle fibre SPME ed abbiamo analizzato i campioni di buccia e polpa separatamente.

I risultati ottenuti sono stati riportati in due grafici (**Figure 8 e 9**), dai quali si evince che, sia per la buccia, sia per la polpa, si raggiunge un equilibrio delle concentrazioni all'interno dello spazio di testa dopo circa 4 ore.

Per quanto riguarda la polpa infatti, si nota come le tre sostanze più abbondanti, l'Esile acetato, l'Etile Butanoato e l'Etile esanoato, raggiungano subito un'elevata concentrazione nello HS, e dopo un'ora di equilibratura diminuiscano perché "spostate" dalle altre sostanze meno abbondanti, per poi aumentare di nuovo in concentrazione e stabilizzarsi dopo circa 4 ore. Le sostanze meno abbondanti o meno volatili, come i due alcoli e il Metil-(Z)-3-Esanoato, invece aumentano gradatamente la loro concentrazione nello spazio di testa e anch'esse dopo quattro ore raggiungono un plateau di concentrazione. Un fenomeno simile si verifica con le sostanze presenti nella buccia: il Metil-(Z)-3-Esanoato e l'Esile acetato raggiungono rapidamente il loro picco massimo, ma col passare del tempo diminuiscono lasciando spazio a sostanze meno volatili o meno concentrate e con esse raggiungono un equilibrio dopo circa 4 ore.



**Figura 8:** Andamento temporale delle sostanze della buccia nello HS.



**Figura 9:** Andamento temporale delle sostanze della polpa nello HS.

### 5.3.3.2 Analisi GC/MS

L'analisi semiquantitativa della componente volatile delle mele Annurca è stata eseguita mediante Gas-cromatografia/Spettrometria di massa (GC/MS), utilizzando un rapido e riproducibile metodo analitico derivato dal protocollo di analisi già sviluppato in precedenti lavori sulla componente aromatica di pesche<sup>91</sup> e mele.<sup>94</sup>

Tutti i campioni sono stati preparati per l'analisi delle componenti volatili secondo questo protocollo: 2 g di frutto finemente tritato sono stati introdotti in vials da 7 mL con tappo perforabile di gomma siliconica rivestita di PoliTetraFluoroEtilene (PTFE). nel carosello termostato con sistema Peltier

dell'autocampionatore Varian 8200 CX (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Come Standard Interno (IS) sono stati aggiunti 10 µl di una soluzione acquosa di 1-eptanolo di concentrazione 0.822 µg·mL<sup>-1</sup> pari a 8.22•10<sup>-3</sup> µg di standard e posti alla temperatura di 25 ± 0,5 °C.

Seguendo le indicazioni ottenute dalle prove preliminari, i campioni all'interno dei *vials* sono stati lasciati per 4 ore in termostato (tempo necessario per l'equilibratura); dopo questo periodo la fibra trifasica (DVB/carboxen/PDMS) è stata introdotta attraverso il setto ed esposta per 15 minuti nello spazio di testa. Successivamente essa è stata posta a desorbire nell'iniettore del gas-cromatografo.

Le analisi sono state eseguite con un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax, i cui principali parametri strumentali sono stati accuratamente ottimizzati.

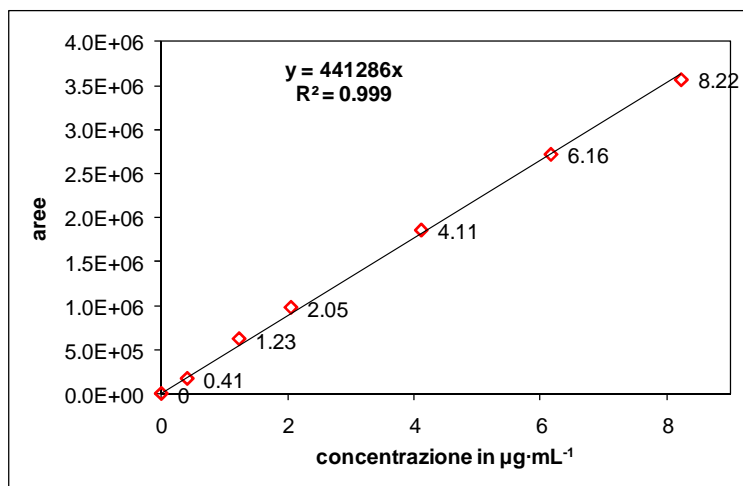
### 5.3.3.2.1 Scelta della colonna

Le separazioni cromatografiche sono state eseguite con due differenti colonne capillari: una colonna J & W DB5 di silice fusa, lunga 30 m, con diametro interno di 0.25 mm, rivestita di 5% difenil-95% polidimetil silossano, con lo spessore del film di 0.25 µm e una colonna Supelcowax-10 (Supelco, Bellafonte, PA) di silice fusa, più polare, lunga 30 m, con diametro interno di 0.25 µm, rivestita di polietilenglicole, con lo spessore del film di 0.25 µm. I migliori risultati si sono ottenuti utilizzando la colonna Supelcowax-10.

### 5.3.3.2.2 Analisi Semiquantitativa

L'analisi semiquantitativa è stata eseguita per confronto delle aree dei picchi cromatografici degli analiti con quello dello standard interno, 1-eptanolo, aggiunto in concentrazione nota al campione.

La curva di calibrazione (**Figura 10**), eseguita per accertare la linearità di risposta dello standard interno, è stata costruita con i valori di 6 soluzioni acquose di 1-eptanolo a concentrazione decrescente, con un range compreso tra 8,22 µg/mL e 0,41 µg/mL. ( $R^2=0,999$ ).

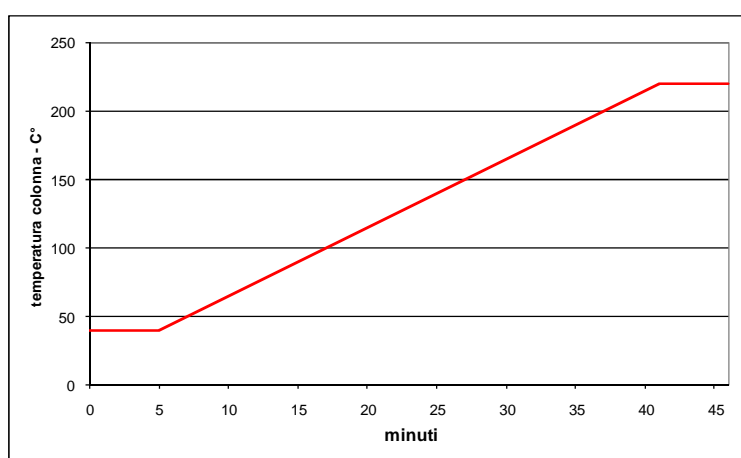


**Figura 10:** Curva di calibrazione dello standard interno 1-eptanolo.

### 5.3.3.2.3 Parametri del Gascromatografo

Le analisi sono state eseguite utilizzando un GC/MS Varian Saturn 3-Ion Trap System (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipaggiato con una colonna capillare Supelcowax e con un autocampionatore Varian 8200 CX termostato, i cui principali parametri strumentali sono i seguenti: temperatura dell'iniettore, 250 °C; modalità introduzione, *splitless*; gas di trasporto, elio (He); pressione in testa alla colonna, 12 psi; temperatura *transfer-line*, 180 °C.

La rampa di temperature del GC inizia con un'isoterma di 5 minuti a 40 °C, continua con un incremento di 5 °C al minuto fino alla temperatura di 220 °C, e finisce con un'isoterma di 5 minuti (**Figura 11**), per una durata totale del metodo di 46 minuti.



**Figura 11:** Rappresentazione della programmata termica del GC.

### 5.3.3.2.4 Parametri dello Spettrometro di Massa

Questi sono i principali parametri della trappola ionica: modalità di ionizzazione, ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV; modalità di scansione, *Total Ion Current* (TIC); *range* di massa, 40 – 400 Da; frequenza di scansione, tre scansioni al secondo; temperatura trappola ionica, 180 °C.

I dati raccolti sono stati processati con il data system dello strumento e i cromatogrammi e gli spettri hanno mostrato una eccellente riproducibilità.

Gli analiti sono stati tabulati piuttosto che secondo i tempi di ritenzione (TR), soggetti a variazioni dovute alla colonna ed alle condizioni cromatografiche, secondo i valori di Indice di Ritenzione Lineare (LRI), i cui valori sono stati calcolati utilizzando l'equazione di E. Sz. Kovats,<sup>95</sup> utilizzando una sequenza di idrocarburi lineari dal C10 al C26.

I composti volatili delle mele Annurca sono stati identificati dapprima attraverso una ragionata e critica comparazione con gli spettri registrati nella libreria NIST 2005; successivamente tutti i composti identificati, presenti nelle **Tabelle 3a** e **3b**, ad eccezione dell'Esil 2-Butenoato, sono stati confermati tramite i valori dei LRI riportati in letteratura e, ove possibile, tramite l'utilizzo di standard puri.

#### 5.3.4 Analisi Statistica

I dati relativi agli attributi fisici, chimici e aromatici sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Procedure di SYSTAT (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA, USA) sono state utilizzate per effettuare correlazioni tra i valori medi degli attributi fisici, chimici e aromatici. In particolare è stata eseguita un’analisi PCA (*Principal Component Analysis*) per determinare eventuali associazioni esistenti tra gli attributi fisici, chimici e aromatici ed ogni possibile raggruppamento dei cloni basato su simili proprietà. Quindi è stata effettuata una *Cluster Analysis* attraverso la tecnica *k-means* sulle Componenti Principali (PCs) per individuare eventuali raggruppamenti varietali ed i risultati sono stati presentati in un grafico a due dimensioni (tramite la metodica *biplot*) che mostra le posizioni relative delle cultivar e degli attributi qualitativi secondo le prime due PCs.

## 5.4 RISULTATI E DISCUSSIONI

### 5.4.1 Valutazione degli attributi fisici e chimici dei frutti

I valori relativi ai parametri chimico-fisici delle mele Annurca riscontrati nei campioni sono riportati in **Tabella 2**. I dati sono il risultato della media di 15 frutti per clone di Annurca e per trattamento agronomico.

Trattamento	AICA		ARS		ABS	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
Sovracolore (%)	66,54	96,22	57,62	89,25	65,21	87,48
Colore di fondo (indice)	0,813	0,837	0,808	0,827	0,812	0,833
Peso (g)	110,98	111,34	129,28	126,69	109,25	110,06
Consistenza polpa (kg·cm <sup>-2</sup> )	11,47	11,49	11,40	11,42	11,45	11,60
Solidi solubili (°Brix)	13,66	14,68	13,53	14,13	13,16	13,99
Acidità titolabile (g·L <sup>-1</sup> )	1,547	1,427	1,547	1,314	1,493	1,362
Amido (indice)	0,972	0,951	0,972	0,964	0,968	0,954

**Tabella 2:** Valori medi per cultivar dei parametri qualitativi misurati su 15 frutti freschi per clone di Annurca prima e dopo il trattamento in melaio.

Il trattamento di esposizione al sole al quale sono stati sottoposti i frutti ha indotto differenze significative nella loro qualità indipendentemente dal clone.

Come previsto, sia l'intensità del colore che la percentuale di sovracolore sono aumentati dopo il trattamento (**Tabella 2**). Inoltre, avendo il trattamento in melaio avanzato il grado di maturazione dei frutti, il contenuto in solidi solubili risulta aumentato dopo l'arrossamento mentre l'indice dello stato d'amido e l'acidità titolabile sono diminuiti. La consistenza della polpa non ha subito cambiamenti così come il peso dei frutti, e nonostante non siano stati sottoposti a innaffiatura non hanno mostrato segni di raggrinzimento.

Aldilà degli effetti del trattamento in melaio ARS ha mostrato i frutti più grandi, mentre AICA presenta il più elevato contenuto in Solidi Solubili, seguita da ARS ed ABS. Gli indici relativi alla colorazione, la durezza della polpa, il pH, l'acidità titolabile e l'indice di amido sono risultati molto simili nei tre diversi cloni.

### 5.4.2 Valutazione della componente volatile dei frutti

Sono state identificate e quantificate 36 sostanze volatili nelle bucce e 30 nelle polpe. I valori delle concentrazioni relative dei composti elencati nelle **Tabelle 3a** e **3b** sono il risultato della media delle cinque analisi eseguite sulle bucce e sulle polpe di mele Annurca prima e dopo il trattamento in melaio e sono espressi in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . L'analisi semi-quantitativa è stata eseguita per raffronto delle aree dei composti con quella dello standard interno.

Differenze sono state riscontrate nella componente aromatica dei due tessuti analizzati: nella buccia risultano sempre concentrazioni più alte, indipendentemente sia dal clone che dal trattamento in melaio.



Dall’analisi dei dati risulta chiaro come il trattamento in melaio porti ad un incremento dell’aroma totale in tutti i cloni analizzati, sia per la buccia sia per la polpa. In particolare l’incremento è proporzionalmente maggiore per le bucce e raggiunge l’84% nelle mele ARS, cui seguono le AICA (37%) e le BDS (33%). Le polpe invece mostrano un discreto aumento della componente aromatica per ARS e BDS (44 e 53%, rispettivamente) mentre per le AICA l’incremento è praticamente nullo (>4%).

Il clone che presenta l’aroma più abbondante è l’AICA, e questo è valido per la componente aromatica prima e dopo l’arrossamento e per entrambe le matrici. Seguono ARS ed infine BDS.

La sostanza di gran lunga più abbondante nelle bucce è un terpene, l’(E,E)- $\alpha$ -Farnesene (che peraltro aumenta notevolmente con l’arrossamento), seguito da un estere, il Metile esanoato. L’alcol maggiormente rilevato nelle bucce risulta essere infine l’1-Esanolo.

Per quanto riguarda le polpe la sostanza maggiormente presente in ARS e BDS è l’1-esanolo, mentre per AICA si tratta del Metile esanoato. In questa matrice l’(E,E)- $\alpha$ -Farnesene, composto molto abbondante nelle bucce, rappresenta un composto minore.

I dati relativi alla composizione del profilo aromatico sono anche stati raggruppati sulla base dell’appartenenza dei composti alle diverse classi chimiche (**Tabella 4a e 4b**). Mentre la buccia risulta più ricca in esteri e soprattutto in terpeni, la polpa mostra maggiori concentrazioni di esteri ed alcoli ed in esse è anche riscontrabile la presenza di aldeidi, che però tendono a diminuire nei frutti trattati in melaio. L’aumento dell’aroma totale dopo il trattamento in melaio è dovuto sostanzialmente ad un incremento di tutte le classi chimiche di composti. In particolare però i terpeni e gli alcoli crescono in misura maggiore rispetto agli esteri, sia nelle bucce, sia nelle polpe.

4a	AICA		ARS		BDS	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
<b>Esteri</b>	540,35	645,82	619,94	552,82	362,64	374,75
<b>Alcoli</b>	58,41	107,44	49,35	92,02	36,47	90,69
<b>Terpeni</b>	916,31	1325,41	467,76	1396,64	854,49	1204,48
<b>Altro</b>	14,89	21,61	10,82	9,64	12,74	19,85

4b	AICA		ARS		BDS	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
<b>Esteri</b>	16,00	16,47	1,86	3,98	1,31	2,10
<b>Alcoli</b>	6,55	6,89	5,42	6,61	4,83	7,44
<b>Terpeni</b>	1,17	1,11	0,40	0,63	0,41	0,65
<b>Aldeidi</b>	0,00	0,00	0,07	0,07	0,14	0,06
<b>Altro</b>	0,24	0,23	0,14	0,12	0,07	0,17

**Tabella 4:** Concentrazione, espressa in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , delle classi di composti volatili identificati nel profilo aromatico di buccia (4a) e polpa (4b) dei tre cloni di mele Annurca prima e dopo il trattamento in melaio.



### 5.4.3 PCA e raggruppamento delle cultivar

La *Principal Component Analysis* (PCA) effettuata su tutti i parametri qualitativi e sulle classi di composti aromatici dei frutti, ha mostrato come oltre il 93% della variabilità totale può essere spiegata tramite i primi tre fattori o Componenti Principali (PCs) (**Tabella 5**). PC1, PC2 e PC3 rappresentano, rispettivamente, il 60,48, il 20,45 ed il 12,96% della variabilità totale. La **Tabella 10** mostra la correlazione tra le variabili originali e le prime tre componenti principali: la PC1 spiega principalmente gli indici del colore, la consistenza della polpa, i TSS, l'acidità del succo, l'indice di amido ed il contenuto in terpeni ed alcoli; la PC2 spiega, invece, principalmente il contenuto in esteri ed aldeidi, mentre il peso dei frutti è per lo più riconducibile alla PC3.

PC	Radici latenti	Variabilità (%)	Variabilità cumulativa
1	6,65	60,48	60,48
2	2,25	20,45	80,93
3	1,43	12,96	93,91
4	0,38	3,50	97,41
5	0,28	2,59	100,00

**Tabella 5:** Radici latenti e percentuale della variabilità totale i cloni di Annurca spiegata dalle cinque componenti principali (PCs). Le prime tre PCs sono in grado di descrivere nel complesso oltre il 93% della variabilità totale.

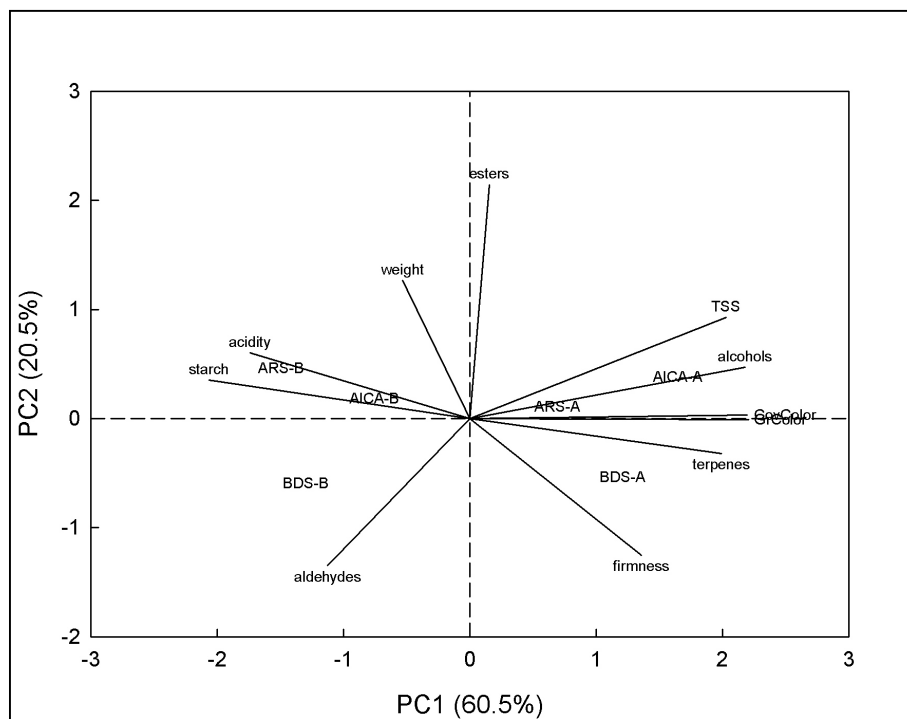
FATTORI	PC1	PC2	PC3
<i>Attributi qualitativi</i>		<i>Peso delle componenti</i>	
Sovracolore	<b>0,983</b>	0,014	0,165
Colore di fondo	<b>0,988</b>	-0,005	0,060
Peso	-0,238	0,566	<b>0,736</b>
Consistenza polpa	<b>0,607</b>	-0,560	-0,453
TSS	<b>0,907</b>	0,414	-0,017
Acidità	<b>-0,779</b>	0,270	-0,547
Amido	<b>-0,925</b>	0,158	0,096
Terpeni	<b>0,890</b>	-0,143	0,160
Alcoli	<b>0,975</b>	0,210	0,040
Esteri	0,068	<b>0,959</b>	-0,215
Aldeidi	-0,504	<b>-0,603</b>	0,516
<i>Cloni e trattamento</i>		<i>Punteggio delle componenti</i>	
AICA - Prima	-0,559	0,394	-1,239
AICA - Dopo	1,217	0,832	-0,648
ARS - Prima	-1,104	1,011	0,408
ARS - Dopo	0,513	0,237	1,674
BDS - Prima	-0,961	-1,302	0,074
BDS - Dopo	0,894	-1,173	-0,269

**Tabella 6:** Peso delle componenti per i parametri qualitativi dei frutti e punteggio delle componenti per i cloni di Annurca ricavati dalla PCA.

La *Cluster Analysis*, condotta mediante la tecnica *k-means* sul peso dei componenti (*component loadings*) separa gli attributi qualitativi in due gruppi ben visibili nel grafico a due dimensioni ottenuto tramite la metodica *biplot* e riportato in **Figura 12**: il primo, che si distribuisce sui quadranti di destra,

associa il contenuto in TSS, alcoli, terpeni, consistenza della polpa e gli indici di colore; il secondo, che si sviluppa nei quadranti di sinistra, associa il peso, l'acidità, l'indice di amido ed il contenuto in aldeidi. Sulla base del posizionamento nel *biplot* ottenuto con le sole prime due PCs, la PCA mostra alcune prevedibili relazioni, quali una relazione opposta tra TSS ed acidità, TSS ed indice d'amido ma anche tra consistenza della polpa e acidità e contenuto in amido.

Inoltre la *Cluster Analysis* tramite *k-means* dei punteggi delle componenti (*component scores*) ha permesso di evidenziare due raggruppamenti, percettibili dal *biplot*, basati essenzialmente sulla similarità trattamento subito dai campioni. Sulla destra, associati ai principali indici di maturazione dei frutti (contenuto in TSS, indici di colore e contenuto in terpeni) si distribuiscono le mele di tutt'e tre i cloni in analisi che hanno subito il processo di arrossamento in melaio, mentre sulla sinistra insieme ai campioni che non hanno subito il trattamento in melaio si posizionano gli indici di amido e l'acidità.



**Figura 12:** Raggruppamento dei campioni di Annurca secondo i parametri qualitativi dei frutti (chimico-fisici e classi di sostanze volatili) determinato tramite PCA seguita da *cluster analysis* tramite *k-mean* dei *component loadings* e dei *component scores*. Simboli ed abbreviazioni: -B, prima del trattamento in melaio; -A, dopo il trattamento in melaio.

## 5.5 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio mostrano che la metodica di analisi sviluppata, basata sulla tecnica di Micro-Estrazione in Fase Solida SPME abbinata all’analisi GC-MS è risultata valida e selettiva per l’identificazione quali-quantitativa della componente volatile della buccia e della polpa delle mele Annurca, e ci ha permesso di determinare un elevato numero di composti che contraddistinguono il complesso profilo aromatico di questi frutti.

Insieme ai dati riguardanti la composizione aromatica sono stati determinati i principali parametri chimico-fisici che caratterizzano i la qualità interna dei frutti oltre che la colorazione della loro buccia. Questa caratterizzazione completa dei frutti è stata realizzata nel tentativo di mettere in evidenza i cambiamenti cui gli stessi vanno incontro a seguito di un trattamento in melaio innovativo rispetto a quello classico, del quale è notevolmente più breve (15 giorni invece dei 50-60 del protocollo classico).

I nostri dati mostrano che una permanenza relativamente breve dei frutti all’esposizione diretta al sole ne migliora la colorazione e la qualità interna, senza perdita di consistenza o raggrinzimento esprimendone così al meglio le peculiari caratteristiche.

Inoltre questo tipo di trattamento determina nei frutti, oltre che variazioni in termini qualitativi, un sensibile incremento della componente aromatica, esaltando le caratteristiche peculiari che contraddistinguono questa cultivar e che la rendono unica ed apprezzata sul mercato locale ed in quello nazionale.

L’analisi statistica effettuata, infine, ci ha permesso di mettere in evidenza le relazioni esistenti tra i parametri qualitativi e quelli aromatici e di raggruppare i campioni analizzati sulla base di similarità trattamento subito.

## **6. CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO PROTEICO DEL LATTE D’ASINA**

### **6.1 INTRODUZIONE**

#### **6.1.1 Il latte**

Il latte costituisce uno dei maggiori componenti nell'alimentazione umana per l'elevato valore nutrizionale e per la possibilità di dar luogo, mediante trasformazione, ad una grande varietà di derivati (yogurt, panna, formaggi etc.).

L'importanza del latte come alimento è dimostrata dalla funzione che questo svolge come insostituibile fonte di nutrimento sin dalla nascita, ma anche in età adulta costituisce un'importante fonte di principi nutritivi.

Dal punto di vista chimico-fisico è un sistema molto complesso, il cui costituente più abbondante è l'acqua ( $\approx 88\%$ ) nella quale tutti gli altri costituenti si trovano o in soluzione (lattosio, sostanze azotate a basso peso molecolare, sali minerali e vitamine idrosolubili), o in dispersione colloidale (proteine e taluni fosfati), o sottoforma di emulsione (gliceridi, steroli e vitamine liposolubili). Fra gli zuccheri il lattosio è quello preponderante, mentre il galattosio e il glucosio sono generalmente presenti in quantità inferiori.

Il latte inoltre rappresenta una fonte importantissima di vitamine liposolubili (A, D, E) ed idrosolubili (C, B1, B2, B3, B6, B12, acido pantotenico, biotina, acido folico), anche se il loro contenuto tende a diminuire notevolmente durante i processi di lavorazione e stoccaggio.

I lipidi sono presenti in media in quantità pari al 3.4% in peso e per lo più sono costituiti da acidi grassi polinsaturi, caratterizzati da buona digeribilità e con ridotte attitudini ad elevare i livelli di colesterolo del sangue.

La qualità delle proteine presenti nel latte è molto elevata, poiché contengono nelle giuste quantità e nelle giuste proporzioni tutti gli amminoacidi di cui l'organismo ha bisogno; in particolare nel latte sono presenti gli amminoacidi essenziali che l'organismo non è capace di sintetizzare e che devono necessariamente essere assunti tramite l'alimentazione.

Le proteine del latte vengono usualmente distinte in due frazioni: la frazione caseinica, una famiglia di fosfoproteine costituita da quattro sotto-classi, le  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  caseine, e le proteine del siero, ovvero un insieme molto eterogeneo di proteine, tra le quali le più abbondanti sono la  $\alpha$ -lattoalbumina e la  $\beta$ -lattoglobulina, insieme a lisozima, immunoglobuline, lattoferrina e albumina del siero. Le due frazioni possono essere separate, partendo dal latte crudo scremato, per precipitazione, a temperatura ambiente, delle caseine a valori di pH coincidenti con il loro punto isoelettrico (pH 4.2 ÷ 4.6). In generale, le proteine del latte sono numerose ed eterogenee. La loro eterogeneità è dovuta a polimorfismo genetico, a fenomeni di “splicing” differenziale e a modifiche post-traduzionali che determinano l'esistenza di numerose varianti per ogni proteina, le quali si differenziano per sostituzioni

amminoacidiche, per la mancanza di intere catene peptidiche o per il diverso grado di fosforilazione e/o glicosilazione.

Nelle varie specie il latte presenta la stessa composizione qualitativa, mentre i rapporti quantitativi fra i vari componenti variano sensibilmente (**Tabella 1**), anche nell’ambito di una stessa specie. Ad esempio, la composizione del latte materno varia da persona a persona e subisce dei cambiamenti durante il periodo d’allattamento adattandosi alle esigenze del neonato. In media il latte materno è composto dall’ 1-2% di proteine, dal 3-5% di grassi, dal 6.5-10% di carboidrati e dal 2% di sali, mentre la parte restante è costituita da acqua. Tale composizione differisce sensibilmente da quella del latte vaccino, il cui contenuto proteico può essere anche quattro volte superiore a quello del latte umano, mentre il contenuto di vitamine essenziali può variare da metà fino ad un decimo.

	UMANO	ASINA	VACCA	BUFALA	RENNA
<b>Estratto Secco Totale</b>	11.7	10	12.5	17.8	31.9
<b>Materia Grassa</b>	3.5	1.5	3.5	7.5	17.5
<b>Lattosio</b>	7	6.2	4.7	4.7	2.5
<b>Sali</b>	0.2	0.5	0.8	0.8	1.5
<b>Proteine Totali</b>	0.9	1.8	3.5	4.8	10.4
<b>Caseina</b>	28	45	78	80	80
<b>Sieroproteine</b>	55	55	17	20	20
<b>Azoto non-Proteico</b>	17	-	5	-	-

**Tabella 1:** Composizione quantitativa percentuale del latte nelle varie specie

D’altra parte, l’elevato consumo di latte vaccino durante l’infanzia ha evidenziato una sempre maggiore incidenza di forme allergiche a tale alimento.

Infatti, Tra le allergie alimentari, la più frequente in età pediatrica è rappresentata proprio dall’allergia alle proteine del latte vaccino (“cow’s milk protein allergy”, CMPA),<sup>216</sup> con una percentuale di bambini affetti da CMPA che è compresa fra lo 0,3 ed il 7,5%.<sup>217</sup> Questa forma di allergia alimentare tende a risolversi spontaneamente con la crescita e la maggior parte dei neonati affetti da CMA inizia a tollerare il latte vaccino a partire dal terzo anno di età.<sup>218, 219</sup> Attualmente il problema è di grande rilevanza anche a causa della progressiva diminuzione di neonati allattati al seno e il parallelo incremento delle produzioni di latte animale per l’alimentazione infantile.

L’allergia alle proteine del latte vaccino è causata dalla presenza di anticorpi IgE specifici verso una o più proteine presenti nel latte, ma il ruolo giocato da ciascuna proteina nel manifestarsi della reazione allergica non è ancora ben chiaro. Infatti, mentre alcune ricerche hanno mostrato che le proteine più frequentemente e più intensamente riconosciute dalle IgE sono quelle più abbondanti nel latte ( $\beta$ -lattoglobulina e caseina), parallelamente studi di allergicità condotti su ampie popolazioni di pazienti allergici hanno evidenziato come tutte le proteine del latte, comprese quelle presenti a livello

di tracce (es. lattoferrina, IgG e siero albumina), siano coinvolte in reazioni di sensibilizzazione<sup>220,221, 222, 223</sup>

In Italia 15-20.000 nuovi bambini l'anno sono affetti da CMPA e richiedono una dieta priva di latte bovino e suoi derivati. Pertanto, un aspetto importante del controllo di questa patologia richiede alimenti alternativi al latte bovino. Nei casi di accertata CMPA si ricorre a formulati a base di soia o a preparati ipoallergici, nei quali il latte vaccino è reso meno allergenico attraverso processi termici o di idrolisi spinta delle proteine.<sup>224, 225, 226</sup> In questi prodotti tuttavia l'allergenicità risulta ridotta ma mai completamente soppressa. Ciò si verifica in quanto le proteine denaturate mediante riscaldamento possono presentare anche nuovi siti antigenici, resi accessibili in seguito a processi di unfolding, oppure creatisi in seguito a nuove reazioni chimiche con altre molecole presenti negli alimenti (come la beta-lactoglobulina associata all'alfa-lactoalbumina nel latte)<sup>227</sup>. Inoltre, questi formulati hanno un costo elevato e una scarsa palatabilità, nonché un basso quoziente calorico che ne limita l'uso nei neonati pretermine per i quali è possibile un'alterazione dell'aminoacidemia e del rapporto Ca/P.<sup>228</sup> Il latte materno (raccolto e conservato in banche del latte) costituirebbe l'alternativa ideale, ma in Italia la sua disponibilità è molto limitata.

Ciò premesso, alcuni studi hanno chiaramente dimostrato che il latte d'asina, l'alimento di origine animale con le caratteristiche organolettiche più vicine al latte materno, può costituire il trattamento d'elezione in bambini con allergie alimentari nei primi mesi di vita, soggetti che spesso non rispondono ad altre terapie.

### **6.1.2 Il latte d'asina**

Da sempre considerato animale esclusivamente da soma e per questo sottovalutato nelle sue potenzialità, l'asino negli ultimi decenni è stato riscoperto e rivalutato, utilizzandolo in molte attività di carattere sociale ed economico (onodidattica, onoturismo e onoterapia).

Recenti studi clinici hanno chiaramente dimostrato come il latte d'asina, grazie all'assenza di allergenicità in quasi tutti i soggetti affetti da CMPA ed alla sua buona palatabilità, può costituire l'alimento d'elezione in alternativa al latte vaccino, sia per i lattanti, garantendo curve di crescita analoghe o superiori a quelle ottenute con "latti-formulati"<sup>229, 230, 231</sup> sia per soggetti in età geriatrica intervenendo nei processi di osteogenesi<sup>232</sup>, nella terapia dell'arteriosclerosi, nel recupero degli infartuati cardiaci, nei casi di senescenza precoce e nelle diete ipocolesterolemiche<sup>233</sup>.

L'elevato contenuto di lattosio, oltre a conferire maggiore appetibilità, contribuisce al corretto sviluppo della microflora lattica intestinale, mentre l'elevata concentrazione di acidi grassi polinsaturi e vitamine conferiscono al latte d'asina un eccellente valore nutrizionale ed un'alta digeribilità. Il rapporto calcio-fosforo e la concentrazione azotata media sono prossimi a quelli umani, mentre il contenuto proteico del latte d'asina è inferiore rispetto al latte vaccino. La differenza più rilevante rispetto al latte bovino consiste soprattutto nel rapporto tra la frazione di siero proteine e di caseine. Nel latte equino le proteine del siero costituiscono il 35-50% della frazione proteica, mentre nel latte

vaccino rappresentano solo il 20%. Il latte d’asina è inoltre molto ricco in lisozima, una proteina del siero caratterizzata da elevata proprietà antibatterica, in grado di proteggere il neonato da possibili patologie e che rende questo prodotto meno deperibile del latte di mucca.

Da queste premesse, è chiaro come le potenziali proprietà farmacologiche e nutrizionali del latte equino (*Equus caballus* ed *Equus asinus*, *Perissodactyla*) siano oggetto di un sempre maggiore interesse sia a livello sociale che scientifico. Infatti, sebbene, come accennato, evidenze cliniche hanno dimostrato che il latte d’asina è spesso ben tollerato da pazienti affetti da CMA, il meccanismo di tale tolleranza, a livello molecolare, resta ancora da chiarire. Esso è certamente legato alla peculiare composizione chimica della frazione proteica del latte d’asina, la cui caratterizzazione però, a differenza del latte bovino, è piuttosto limitata.

Le maggiori informazioni riguardano le proteine del siero,<sup>234,235,236,237,238,239</sup> mentre ancora le conoscenze scientifiche relative alla frazione caseinica sono piuttosto limitate.<sup>240,241, 242</sup>

In particolare, solo recentemente sono state pubblicate una caratterizzazione, seppure parziale, della frazione caseinica del latte di giumenta<sup>243</sup> nonché le sequenze di  $\kappa$ -,  $\alpha_{s1}$ -<sup>244,245</sup> e  $\beta$ -caseina<sup>246</sup>, mentre ancora nessuna informazione è attualmente disponibile per quanto riguarda le caseine del latte d’asina (**Tabella 2**).

Proteina	M, Calcolato* (Da)	
	Asina (Acc. N. o gi)	Giumenta (Acc. N. o gi)
<b><math>\alpha</math>-Lattoalbumina</b>		
$\alpha$ -Lattoalbumina	14214.31 (gi 262063)	14216.28 (gi 67418)
$\alpha$ -Lattoalbumina A		14215.29 (gi 125991)
$\alpha$ -Lattoalbumina B		14243.26 (gi 125992)
$\alpha$ -Lattoalbumina C		14241.33 (gi 125992)
<b><math>\beta</math>-Lattoglobulina</b>		
$\beta$ -Lattoglobulina I	18524.26 (gi 125913)	18496.25 (gi 2851437)
$\beta$ -Lattoglobulina I bis		18536.32 (gi 72082)
$\beta$ -Lattoglobulina I B	18510.28 (gi 125913)	
$\beta$ -Lattoglobulina II A	18258.69 (gi 125904)	18257.69 (gi 2851599)
$\beta$ -Lattoglobulina II B	18222.58 (gi 125904)	
$\beta$ -Lattoglobulina II D	18310.71 (gi 125904)	
<b>Lisozima</b>		
Lisozima B	14631.55 (gi 126613)	
Lisozima A	14679.64 (gi 126613)	14644.59 (gi 126614)
<b>Siero Albumina</b>		
Siero Albumina	65596.95 (gi)	65717.11 (gi 399672)
<b>Lattoferrina</b>		
Lattoferrina (apo)		75386.43 (gi 6136044)
Lattoferrina (apo)-bis		75244.22 (gi 4388854)
<b><math>\alpha_1</math>-Caseina *</b>		
$\alpha_1$ -Caseina I		23750.72 (gi 19031195)
$\alpha_1$ -Caseina II		23144.87 (gi 15723738)
<b><math>\alpha_2</math>-Caseina</b>		
-		
<b><math>\beta</math>-Caseina</b>		
$\beta$ -Caseina variante A		25512.40 (gi 90111821)
$\beta$ -Caseina variante A <sup>Δ5</sup>		24588.40 (AAG43954)
<b><math>\kappa</math>-Caseina *</b>		
$\kappa$ -Caseina		18842.70 (gi 30316368)
-		
(*) Sequenze dedotte dal cDNA		

**Tabella 2:** Confronto delle proteine presenti nel latte d'asina e nel latte di giumenta attualmente note.



## 6.2 SCOPO

L'impiego del latte equino per le sue caratteristiche terapeutiche e cosmetiche è noto fin dall'antichità. In particolare il latte d'asina nella tradizione popolare veniva utilizzato in sostituzione del latte materno per quei neonati che non potevano essere allattati dal seno materno e manifestavano allergia al latte bovino.

Recenti studi clinici hanno evidenziato come nei casi di accertata CMPA il latte d'asina possa costituire, in termini di tollerabilità clinica, una valida alternativa. Tali risultati tuttavia sono stati ottenuti essenzialmente partendo da basi meramente empiriche; pertanto il meccanismo di tale tolleranza, a livello molecolare, seppur certamente legato alla peculiare composizione chimica della frazione proteica, resta ancora da chiarire.

A differenza del latte bovino la caratterizzazione delle componenti proteiche e in particolare delle caseine nel latte degli equidi è piuttosto limitata ed uno studio sistematico delle componenti proteiche del latte equino, necessario per una valutazione dell'utilizzo di questo prodotto nell'alimentazione umana o per usi terapeutici, non è stato ancora affrontato.

Allo scopo di ampliare le conoscenze sui componenti proteici principali presenti nel latte d'asina, il presente parte del mio lavoro di tesi, ha avuto come obiettivo quello di caratterizzare la frazione proteica, con particolare riferimento alle caseine, presente in un campione di latte d'asina commerciale.

Questo studio è stato condotto mediante l'utilizzo combinato della cromatografia liquida in fase inversa (RP-HPLC), la spettrometria di massa (MALDI, ESI-MSMS), reazioni di digestione enzimatica e strumenti bioinformatici.

### **6.3 MATERIALI E METODI**

#### **6.3.1 Separazione della frazione caseinica dalle siero proteine**

Il campione di latte studiato è stato inizialmente centrifugato a 3500 giri per 20 min e 4°C, con lo scopo di eliminare la frazione lipidica. Successivamente 5 mL di latte scremato sono stati portati a pH 4.6 mediante l'aggiunta di un tampone costituito da acido acetico al 10% (m/v) e acetato sodico 1N (1:1, v/v). Il campione è stato lasciato a riposo a 4°C per circa 10-20 min per consentire la completa precipitazione della frazione caseinica.

Successivamente il precipitato è stato separato dalla soluzione surnatante (s/n), costituita dalle siero proteine, mediante centrifugazione a 3500 giri per 10 min a 4°C. La soluzione contenente le siero proteine è stata quindi conservata tal quale a -24°C. Il precipitato, contenente la frazione caseinica, è stato lavato con acetato sodico 1N a pH 4.6 e nuovamente centrifugato per separarlo dal s/n. Il residuo così ottenuto è stato liofilizzato ed infine conservato a -20°C.

#### **6.3.2 Separazione delle proteine mediante RP-HPLC analitica**

La separazione dei diversi componenti presenti nella frazione delle siero proteine e delle caseine è stata effettuata con un cromatografo Varian 9010 (Sunnyvale, CA, U.S.A.) equipaggiato con un detector Uv - Varian 9050. I dati sono stati acquisiti mediante un PC dotato del software Peak Simple II. Le soluzioni proteiche investigate sono state preventivamente filtrate con filtri Micro-spin e caricate su una colonna analitica in fase inversa Vydac C4 (0.46 x 25 cm, 300Å, 10µm). La colonna è stata eluita a 50 °C con un gradiente lineare del solvente B (CH<sub>3</sub>CN + 0.05% TFA) in A (H<sub>2</sub>O + 0.05% TFA) dal 35% al 55% in 60 min., con un flusso di 1 mL/min. Le frazioni cromatografiche eluenti sono state monitorate a 224 nm, raccolte manualmente ed infine singolarmente liofilizzate.

#### **6.3.3 Reazione di defosforilazione della frazione caseinica**

La reazione di defosforilazione della frazione caseinica è stata condotta sulla miscela di caseine, solubilizzata in una soluzione di NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0.4%) a pH 8.5 ad una concentrazione di 1 mg/mL, aggiungendo 40 U di enzima fosfatasi alcalina per ogni mg di proteina. La soluzione è stata incubata a 37°C per 2h e successivamente la reazione è stata bloccata per congelamento a -24°C.

#### **6.3.4 Reazioni di digestione enzimatica**

Le frazioni cromatografiche isolate mediante RP-HPLC analitica e successivamente liofilizzate, sono state solubilizzate in bicarbonato d'ammonio 50mM, pH 8.3.

La digestione triptica delle due frazioni cromatografiche investigate è stata condotta aggiungendo un'aliquota di tripsina porcina solubilizzata in bicarbonato d'ammonio 50mM pH 8.3, secondo un

rapporto molare enzima/proteina di 1:50. La soluzione proteica è stata quindi incubata a 37 °C per 4h; la reazione è stata bloccata per congelamento a -24°C

La digestione enzimatica con la endoproteinasi Glu-C sulle due frazioni cromatografiche è stata effettuata aggiungendo l'endoproteinasi Glu-C, solubilizzata in bicarbonato d'ammonio 50mM pH 8.3, secondo un rapporto in peso enzima/proteina di 1:50. La soluzione proteica è stata quindi incubata a 37 °C per 48h; la reazione è stata bloccata per congelamento a -24°C.

### 6.3.5 Analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF

Gli spettri di massa MALDI sono stati acquisiti mediante uno spettrometro Voyager DE-PRO (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, USA) equipaggiato con un analizzatore a tempo di volo (TOF) e un laser ad azoto (337 nm).

Gli spettri delle proteine presenti nelle frazioni cromatografiche isolate sono stati ottenuti operando in modalità lineare positiva e *delayed extration mode* da una media di circa 150 *laser shots* ed acquisiti nei *ranges m/z* 1000-10000 e 10000-30000, mentre gli spettri delle miscele di peptidi sono stati ottenuti operando in modalità positiva in *ion reflectron* e *delayed extration mode* da una media di circa 150 *laser shots* ed acquisiti nel *range m/z* 400-4000.

Ogni soluzione in esame (miscela di peptidi ottenuti per digestione enzimatica o proteine presenti nella frazione cromatografica isolata) è stata sottoposta ad uno step di micro-desalificazione/concentrazione su *microcolonnine* (5 mm) impaccate con una resina Poros 20 R2 in fase inversa preparate manualmente con puntali GELoader (Eppendorf Scientific, Westbury, NY).

In dettaglio, un'aliquota da 10 µL di campione in esame è stata utilizzata per lo step di micro-purificazione (desalificazione/concentrazione); successivamente la *microcolonnina* è stata sottoposta ad uno step di lavaggio con 10 µL di TFA 0.1 % ed infine i peptidi (o le proteine) sono stati eluiti dalla *microcolonnina* direttamente sulla piastrina MALDI utilizzando 0.6 µL di soluzione di matrice CHCA (conc.:10 mg/mL in CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA 70/30 (v/v)) nel caso delle miscele di peptidi e di matrice SA (conc.:10 mg/mL in CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA 70/30 (v/v)) nel caso delle proteine.<sup>247, 248, 249</sup>

Gli spettri di massa relativi alle miscele di digeriti enzimatici sono stati analizzati utilizzando il *software m/z* (Proteometrics, NY) e calibrati internamente tramite i segnali relativi ai prodotti di autolisi della tripsina porcina modificata (*m/z* 842.5 e 2211.1). In assenza dei segnali della tripsina, gli spettri sono stati calibrati esternamente mediante i segnali (*m/z* 837.5, 2313.3 e 2707.4) di una miscela di digerito triptico di β-Lattoglobulina bovina.

Gli spettri di massa relativi alle proteine presenti nelle frazioni cromatografiche isolate sono stati analizzati mediante il *software Data Explorer* (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, USA) e calibrati esternamente mediante i segnali di una miscela (1:10:10; v:v:v) di citocromo bovino (M<sub>r</sub> 12231 Da), mioglobina di cavallo (M<sub>r</sub> 16951.5 Da) e tripsinogeno bovino (M<sub>r</sub> 23981 Da) nel *range m/z* 10000-30000.

### 6.3.6 Analisi on-line RP-HPLC/n-ESI MSMS

Le analisi RP-HPLC/nESI-MSMS dei digeriti enzimatici sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa Thermo-Finnigan LTQ, equipaggiato con un analizzatore a trappola lineare, con sorgente nano-ESI ed accoppiato on-line con un cromatografo liquido (Ultimate 3000, LC Packings). 10 µL della miscela di digeriti enzimatici sono stati iniettati in un sistema on-line di concentrazione/separazione dotato di una µ-pre-colonna di accumulo ed una colonna capillare d'analisi (180 µm x 15 cm, 3 µm, PepMap C18, Thermo). La separazione cromatografica è stata ottenuta fluendo la colonna d'analisi per 4 minuti con una miscela al 10% del solvente B (CH<sub>3</sub>CN + 0.1% HCOOH) nel solvente A (H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH) ed in seguito con un gradiente lineare del solvente B nel solvente A dal 10% al 50% in 35 min (flusso di 2 µL/min).

Gli spettri di massa ESI sono stati acquisiti effettuando delle scansioni nell'intervallo  $m/z$  350-2000. La temperatura della sorgente è stata mantenuta a 220 °C ed il voltaggio del capillare era pari a 1.9 KV. Le sequenze amminoacidiche dei peptidi di interesse sono state ottenute durante l'analisi RP-HPLC/nESI-MS mediante analisi MS/MS. Le condizioni di analisi per gli esperimenti MS/MS sono: finestra di isolamento, 2 Da; energia di collisione normalizzata, 35 u.a., coefficiente Q di attivazione, 0.250.

Per l'acquisizione e l'analisi dei dati è stato utilizzato il software *Excalibur*. L'asse delle masse è stato calibrato utilizzando una miscela standard composta da caffeina ( $M_r$  194.1 Da), un tetra-peptide Met-Arg-Phe-Ala (MRFA,  $M_r$  423.6 Da) ed un polimero denominato Ultramark ( $M_r$  1621 Da).

### 6.3.7 Ricerca bioinformatica

L'identificazione dei componenti proteici presenti nelle due frazioni cromatografiche investigate è stata effettuata utilizzando i dati sperimentali ottenuti dagli spettri MALDI dei digeriti enzimatici.

In particolare, i dati sperimentali sono stati utilizzati per interrogare la banca dati proteica nrNCBI mediante il server Mascot (<http://www.matrixscience.com>) in modalità *Peptide mass fingerprint* inserendo i seguenti parametri:

- - Enzima: tripsina o Glu-C
- - specie: Other Mammalia;
- - accuratezza della massa monoisotopica: 80 ppm;
- - numero massimo di misscleavage: 2;
- - modificazioni fisse: nessuna;
- - possibili modificazioni: ossidazione delle metionine e ciclizzazione dei residui N-terminali glutammina e glutammico ad acido piroglutammico.

I dati ottenuti dall’analisi on-line RP-HPLC/nESI-MSMS sono stati utilizzati per la ricerca nella banca dati proteica nrNCBI utilizzando il server Mascot nella modalità *MSMS Ion Search* utilizzando i seguenti parametri:

- Enzima: tripsina o Glu-C
- specie: *Other Mammalia*;
- tolleranza del peptide: 100 ppm
- tolleranza ioni frammento MS/MS: 0.6 Da
- numero massimo di misscleavage: 2;
- modificazioni fisse: nessuna;
- possibili modificazioni: ossidazione delle metionine e ciclizzazione dei residui N-terminali glutammina e glutammico ad acido piroglutammico.

## 6.4 RISULTATI E DISCUSSIONI

Come riportato nell'introduzione, le informazioni attualmente disponibili sul profilo proteico del latte d'asina sono abbastanza limitate (**Tabella 2**), con particolare riferimento alla frazione caseinica le cui conoscenze a livello molecolare sono praticamente nulle.

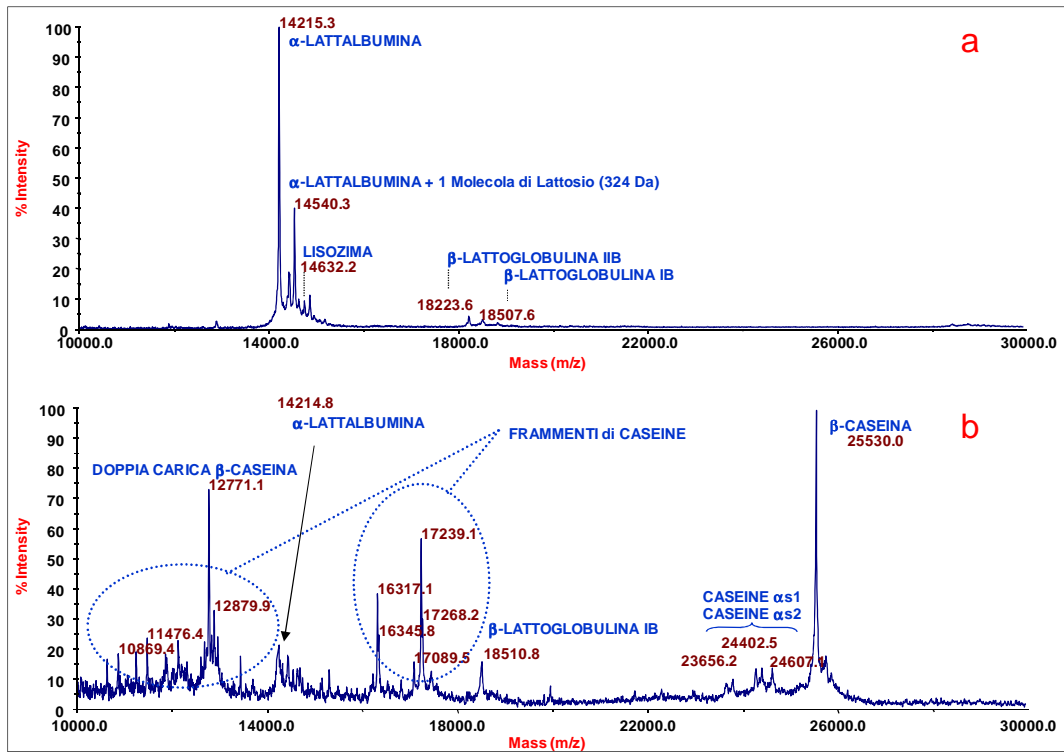
Pertanto, con lo scopo di approfondire le attuali conoscenze sulla frazione proteica del latte di asina, un campione di latte commerciale, è stato sottoposto ad uno step di separazione della frazione sieroproteica dalla frazione caseinica, per precipitazione delle caseine al loro punto isoelettrico (pH 4.6). Successivamente le due frazioni proteiche sono state investigate mediante l'utilizzo combinato di analisi cromatografica, reazioni di digestione enzimatica e spettrometria di massa.

In **Figura 1a e 1b** sono riportati gli spettri di massa MALDI-TOF rispettivamente della frazione delle siero proteine e della frazione caseinica. In dettaglio, lo spettro della frazione serica (**Figura 1a**) mostra la presenza di cinque segnali rispettivamente a  $m/z$  14215.3, 14540.3, 14632.2, 18223.6 e 18507.6. Sulla base delle informazioni attualmente disponibili sulle siero proteine d'asina (**Tabella 2**), e considerando un errore sperimentale nella determinazione delle masse mediante MALDI-TOF di  $\pm 1$  Da, il picco principale ( $m/z$  14215.3) potrebbe essere attribuito alla  $\alpha$ -lattalbumina ( $M_r$  calcolato 14214.3 Da), i due picchi a  $m/z$  18223.6 e 18507.6 i quali potrebbero essere attribuiti rispettivamente alle  $\beta$ -lattoglobulina IIB e  $\beta$ -lattoglobulina IB ( $M_r$  calcolato 18222.6 Da e 18510.3 Da), mentre il segnale a  $m/z$  14632.2 è dovuto probabilmente al lisozima ( $M_r$  calcolato 14631.5 Da). Il segnale a  $m/z$  14540.3, che differisce dal picco della  $\alpha$ -lattalbumina di 324 Da, è probabilmente da attribuire alla forma mono-lattosilata di quest'ultima, generatasi a causa del leggero trattamento termico di sterilizzazione al quale è stato sottoposto il campione prima della commercializzazione. È noto infatti che un trattamento termico (come la pastorizzazione) induce la formazione, a seguito della reazione di Maillard, di specie lattosilate principalmente a carico delle due siero proteine più abbondanti,  $\alpha$ -lattalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina<sup>250</sup>.

Lo spettro di massa MALDI-TOF relativo alla frazione caseinica (**Figura 1b**), a causa della presenza di numerosi segnali distribuiti in tutto il *range* di massa esplorato, mostra un aspetto ben più complesso rispetto a quello delle siero proteine. Essendo totalmente assenti in letteratura le informazioni sulle caseine d'asina, le potenziali attribuzioni dei segnali presenti nello spettro di massa MALDI-TOF sono state effettuate dal confronto con i pesi molecolari delle caseine di giumenta attualmente note.

In particolare, il picco più intenso dello spettro a  $m/z$  25530.0 è probabilmente da attribuire alla  $\beta$ -caseina ( $M_r$  di giumenta calcolato 25512.4 Da). La serie di segnali a minore intensità nel range di massa 23-24 kDa potrebbero essere dovuti alle caseine di tipo  $\alpha_{s1}$  ( $M_r$  di giumenta calcolato 23750.7 Da e 23144.9 Da). Inoltre due serie di segnali, rispettivamente compresi nei range di massa 10-11 e 16-17 kDa, potrebbero essere identificati come frammenti di caseine, originatisi per azione degli enzimi endogeni naturalmente presenti nel latte (principalmente plasmina e chimosina).<sup>251, 252, 253, 254, 255</sup>

Tra gli altri, seppure con bassa intensità, lo spettro mostra anche la presenza dei segnali delle due principali proteine della frazione serica ( $\alpha$ -lattalbumina e  $\beta$ -lattoglobulina) presenti in tale frazione come micro-contaminanti.

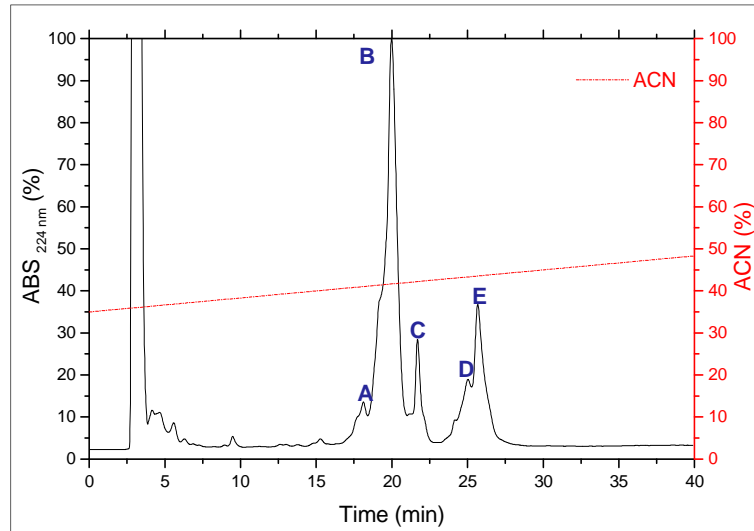


**Figura 1a e 1b** . Spettro di massa MALDI-TOF della frazione serica (1a) e della frazione caseinica (1b) del latte d'asina. Per i diversi segnali presenti negli spettri sono riportate le potenziali attribuzioni (vedi testo)

#### 6.4.1 Caratterizzazione off-line RP-HPLC/MALDI-TOF MS della frazione sieroproteica

In **Figura 2** è riportato il profilo cromatografico relativo alla miscela delle proteine del siero del campione di latte analizzato.

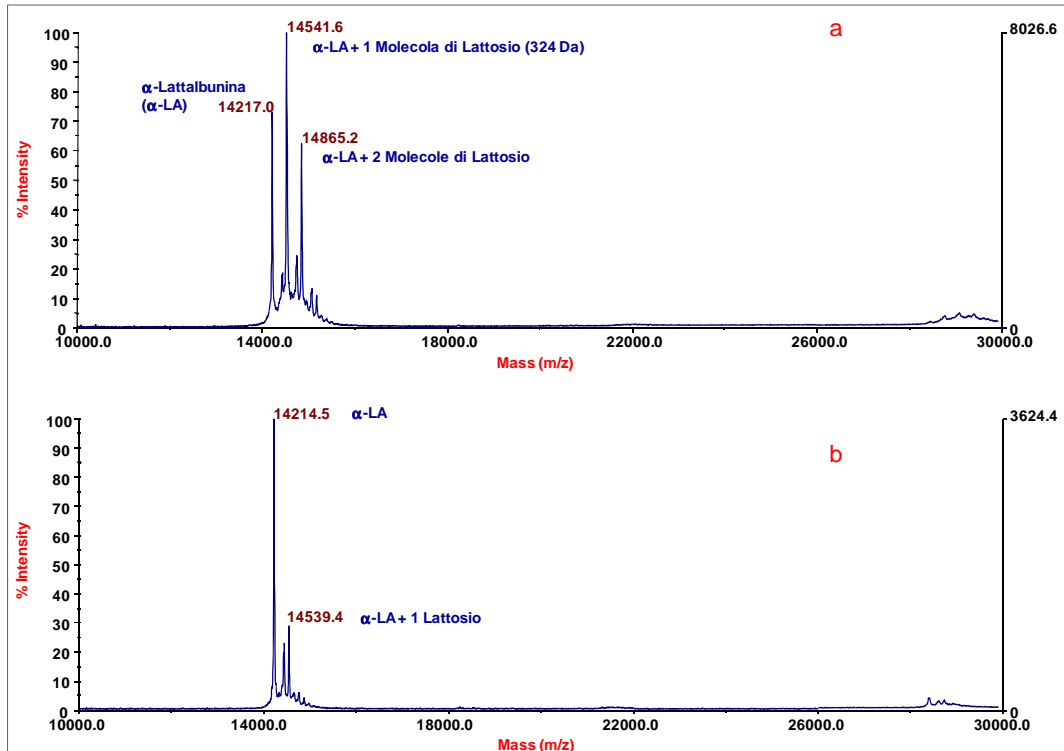
Le cinque frazioni cromatografiche principali, denominate con le lettere A, B, C, D ed E, sono state raccolte manualmente e successivamente caratterizzate off-line mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.



**Figura 2** . Profilo HPLC-UV della frazione serica del latte d'asina. Le cinque frazioni principali, denominate con le lettere da A a E, sono state raccolte manualmente e successivamente caratterizzate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

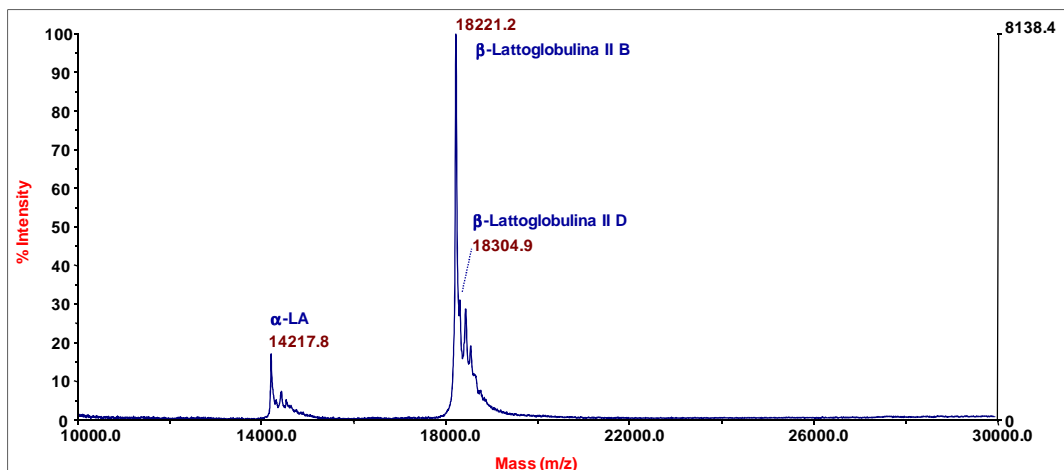
Gli spettri di massa MALDI-TOF delle frazioni A e B (**Figura 3a e 3b**) sono molto simili tra loro e rivelano la presenza della  $\alpha$ -lattalbumina (**Tabella 2**) accompagnata dalla presenza delle relative specie mono- ( $\Delta = 324$  Da) e di-lattosilata ( $\Delta = 648$  Da), generatesi attraverso la reazione di Maillard, attivata del leggero trattamento termico di sterilizzazione al quale è stato sottoposto il campione di latte prima di essere messo in commercio.





**Figura 3a e 3b:** Spettri di massa MALDI-TOF relativi alle frazione cromatografiche A e B (Fig. 2).

In **Figura 4** è riportato lo spettro di massa MALDI-TOF della frazione C che presenta come componente principale la  $\beta$ -lattoglobulina tipo II variante B come componente principale, probabilmente accompagnata anche dalla variante D (**Tabella 2**). Lo spettro mostra inoltre che tale frazione presenta anche piccole quantità di  $\alpha$ -lattalbumina eluita nella frazione precedente. Anche gli spettri MALDI-TOF delle frazioni D ed E sono molto simili tra loro (**Figura 5a e 5b**), presentando come componenti principali la  $\beta$ -lattoglobulina tipo I variante B e le corrispondenti specie mono- e di-lattosilata. Nella frazione D, infine, lo spettro di massa MALDI-TOF mostra la presenza anche di un componente minore con  $MH^+$  11368 Da, il quale potrebbe essere attribuito ad un frammento di  $\beta$ -caseina.



**Figura 4:** Spettro di massa MALDI-TOF relativo alla frazione cromatografica C (Fig. 2).

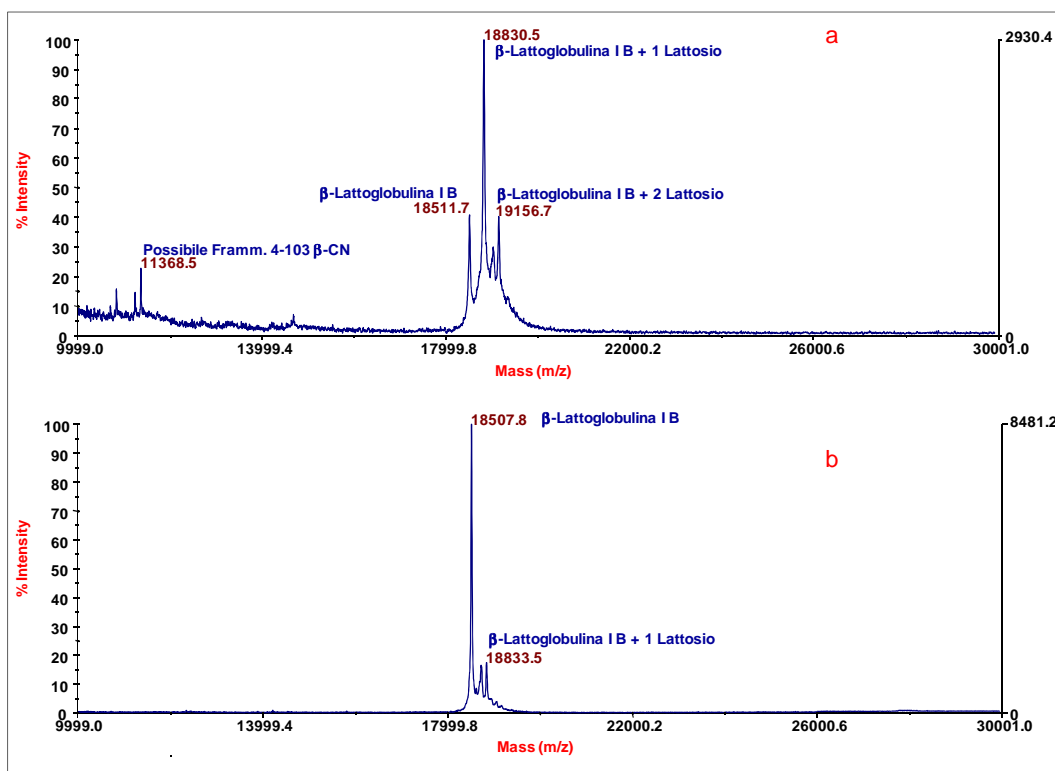


Figura 5a e 5b . Spettri di massa MALDI-TOF relativi alle frazione cromatografiche D (5a) ed E (5b) (Fig. 2).

#### 6.4.2 Caratterizzazione della frazione caseinica

In Figura 6 è riportato il cromatogramma relativo alla separazione della miscela delle caseine del campione di latte analizzato.

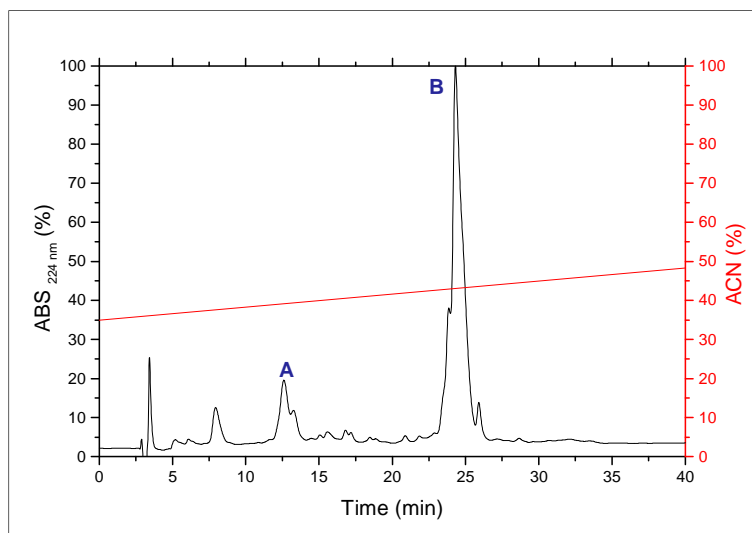


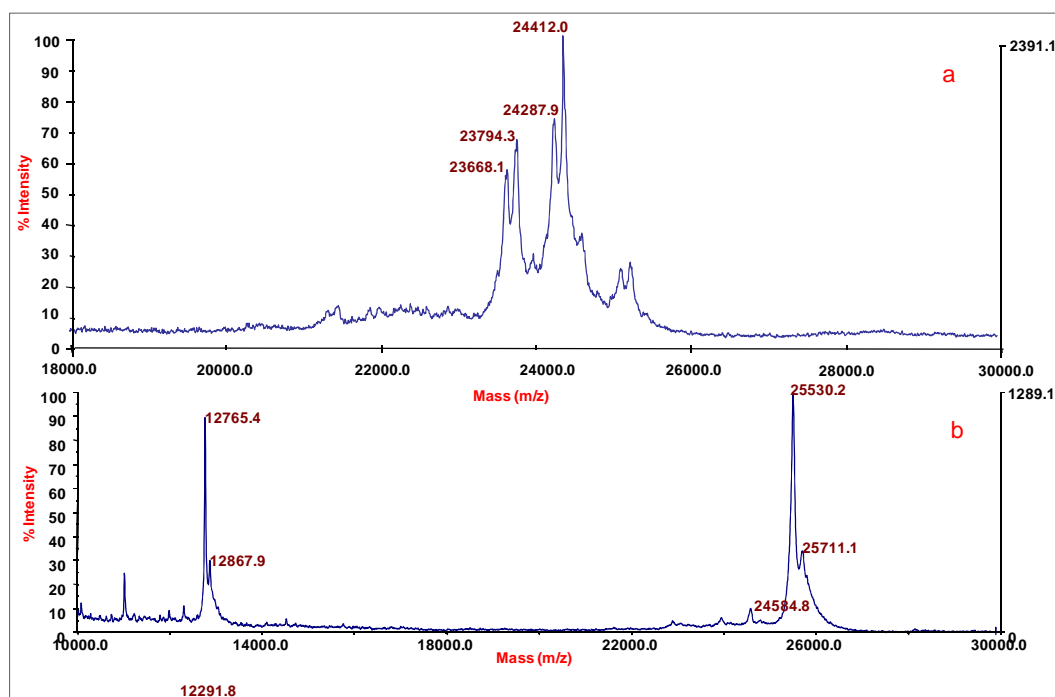
Figura 6: Profilo HPLC-UV della frazione caseinica del latte d’asina. Sono state raccolte due frazioni principali denominate con le lettere A e B e successivamente caratterizzate mediante l’utilizzo combinato di reazioni di digestione enzimatica, spettrometria di massa e strumenti bioinformatica

Le due principali frazioni cromatografiche, denominate rispettivamente con le lettere A e B, sono state raccolte manualmente e caratterizzate successivamente off-line mediante spettrometria di massa MALDI-TOF.

In **Figura 7a**, lo spettro di massa MALDI-TOF relativo alla frazione cromatografica A, acquisito nel range di massa tra 18 e 30 kDa, mostra la presenza di quattro componenti rispettivamente a  $m/z$  23668.1, 23794.3, 24287.9 e 24412.0, mentre lo spettro di massa MALDI-TOF del picco cromatografico B (**Figura 7b**), acquisito nel range di massa tra 10 e 30 kDa, mostra la presenza di due componenti rispettivamente a  $m/z$  25530.2 e 24584.8, e dei relativi segnali a doppia carica ( $m/z$  12765.4 e 12291.8).

La potenziale identificazione di componenti proteici presenti nelle frazioni analizzate è stata effettuata confrontando i pesi molecolari ottenuti sperimentalmente con i pesi molecolari teorici delle sequenze proteiche note del latte di giumenta (**Tabella 2**). Cospicché, considerando anche l'ordine di eluizione, i componenti presenti nel picco A potrebbero essere identificati con le caseine di tipo  $\alpha_{s1}$ , mentre i due componenti che eluiscono nel picco B potrebbero essere identificati con due  $\beta$ -caseine.

Pertanto, con lo scopo di verificare tali ipotesi e conseguentemente effettuare una caratterizzazione a livello molecolare dei componenti proteici presenti nelle frazioni cromatografiche isolate, quest'ultime sono state sottoposte a reazione di digestione enzimatica, analisi MALDI-TOF MS, RP-HPLC/nESI MS/MS e ricerca nelle banche dati proteiche.



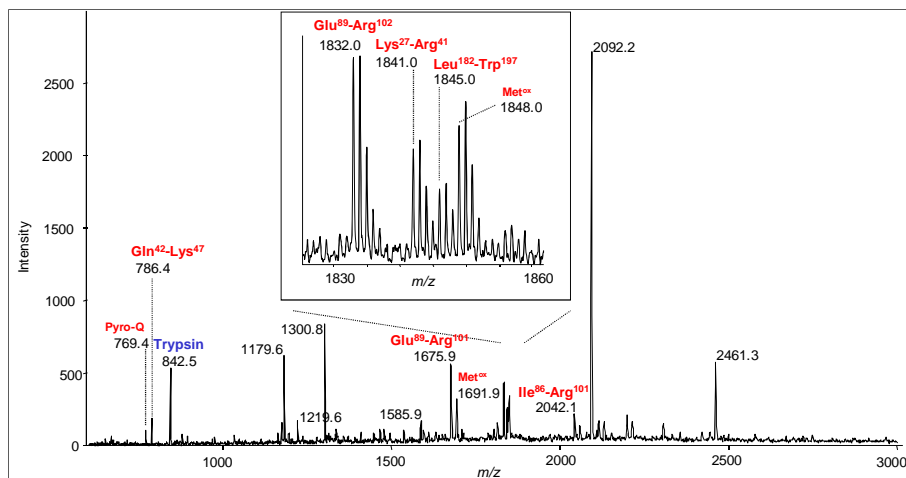
**Figura 7a e 7b:** Spettri di massa MALDI-TOF relativi alle frazione cromatografiche A e B (**Fig. 6**).

### 6.4.3 Caratterizzazione della frazione cromatografica A

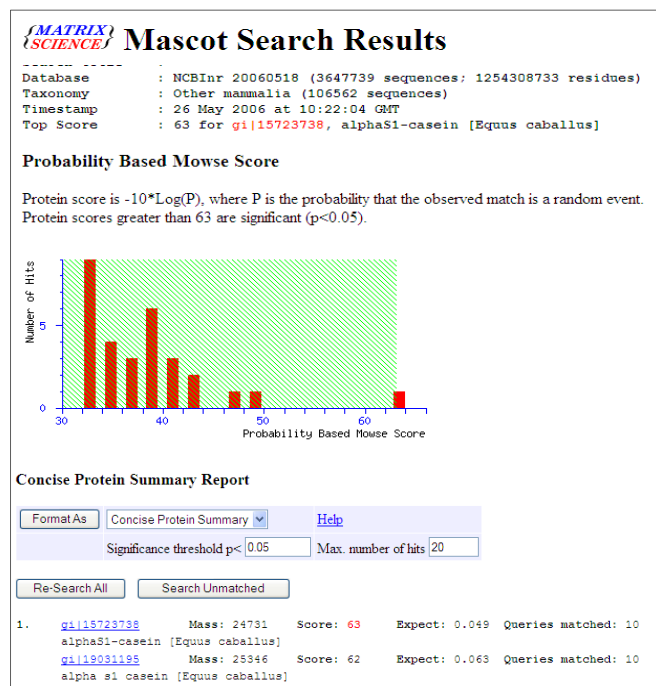
Come accennato, la frazione cromatografica A mostra la co-eluzione di quattro componenti aventi rispettivamente  $M_r$  23668.1, 23794.3, 24287.9 e 24412.0 Da (**Figura 7a**) i quali potrebbero essere identificati come caseine di tipo  $\alpha_{s1}$ .

Al fine verificare tale ipotesi la frazione cromatografica in esame è stata isolata mediante cromatografia su fase inversa utilizzando una colonna analitica; nonostante i diversi tentativi di modifica del gradiente di eluizione, non è stato possibile ottenere la completa risoluzione dei singoli componenti proteici da caratterizzare, e pertanto tale frazione è stata sottoposta tal quale a di reazione di digestione enzimatica con tripsina porcina. La miscela di peptidi triptici così ottenuta, è stata successivamente caratterizzata mediante MALDI-TOF MS e ricerca nelle banche dati proteiche.

In **Figura 8** è riportato lo spettro di massa MALDI-TOF relativo al digerito triptico di tale frazione. I segnali presenti nello spettro sono stati utilizzati per interrogare la banca dati proteica nrNCBI mediante il *server* Mascot, ed hanno permesso di identificare due varianti di caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta rispettivamente costituite da 193 (M, 23144.9 Da; general index|15723738) e 197 amminoacidi (M, 23750.7 Da; gi|19031195) (**Figura 9**).



**Figura 8:** Spettro di massa MALDI-TOF del digerito triptico della frazione cromatografica A (**Fig. 6**).



**Figura 9:** Report relativo alla ricerca nel database nrNCBI effettuato mediante il server Mascot, utilizzando i segnali presenti nello spettro di massa MALDI (**Fig. 8**) del digerito triptico della frazione cromatografica A (**Fig 6**).

La variante a più elevato peso molecolare differisce da quella a minore peso per una sostituzione puntiforme Pro→Leu in posizione 2, per l'assenza del tratto di sequenza DTSNESTE dopo la lisina in posizione 55, per la presenza di un residuo di glutammina in posizione 83 e per la presenza del tratto di sequenza EQLIRMKENSQ dopo la glutammina in posizione 117. L'identificazione è stata effettuata attraverso dieci segnali che corrispondono a frammenti triptici (**Tabella 3 e 4**) di porzioni comuni alle due varianti di  $\alpha_{s1}$ . In dettaglio, i segnali a  $m/z$  786.4, 1299.8, 1675.9, 1832.0, 1841.0, 1845.0 e 2042.1 corrispondono rispettivamente all' $MH^+$  dei frammenti triptici Gln<sup>42</sup>-Lys<sup>47</sup>, Gln<sup>42</sup>-Lys<sup>51</sup>, Glu<sup>89</sup>-Arg<sup>101</sup>, Glu<sup>89</sup>-Arg<sup>102</sup>, Lys<sup>27</sup>-Arg<sup>41</sup>, Leu<sup>182</sup>-Trp<sup>197</sup> ed Ile<sup>86</sup>-Arg<sup>101</sup> (**Tabella 3**; numerazione riferita alla sequenza dell' $\alpha_{s1}$  di giumenta gi|19031195); il segnale a  $m/z$  769.4 corrisponde al frammento Gln<sup>42</sup>-Lys<sup>47</sup> con l'N-terminale sottoforma di acido piroglutammico, mentre i segnali a  $m/z$  1691.9 e 1848.0 corrispondono rispettivamente ai frammenti Glu<sup>89</sup>-Arg<sup>101</sup> e Glu<sup>89</sup>-Arg<sup>102</sup> con una metionina ossidata.

Frammento	Posizione	$MH^+$ monoisotopico	$MH^+$ MALDI -MS	Sequenza di riferimento (NCBI gi 19031195)
T1	1-3	400.3	-	RPK
T2	4-7	522.3	-	LPHR
T3	8-19	1456.7	-	QPEIIQNEQDSR
T4	20-21	276.2	-	EK
T5	22-24	359.3	-	VLK
T6	25-26	304.2	-	ER
T7	27-27	147.1	-	<b>K</b>
T8	28-41	1712.8	1712.9	<b>FPSFALEYINELNR</b>
T(7+8)	27-41	1840.9	1841.0	
T9	42-43	303.2	-	<b>QR</b>
T10	44-47	502.3	-	<b>ELLK</b>
T(9+10)	42-47	786.5	786.4	
T11	48-49	276.2	-	<b>EK</b>
T12	50-51	275.2	-	<b>QK</b>
T(9+10+11+12)	42-51	1299.7	1299.7	
T13	52-55	528.2	-	DEHK
T14	56-84	3282.5	-	EYLIQPEQEQSSSTSSSEEVVPINTEQK
T15	85-85	175.1	-	R
T16	86-88	385.3	-	<b>IPR</b>
T17	89-101	1675.8	1675.9	<b>EDMLYQHTLEQLR</b>
T(16+17)	86-101	2042.0	2042.1	
T18	102-102	175.1	-	<b>R</b>
T(17+18)	89-102	1831.9	1832.0	
T19	103-105	347.2	-	LSK
T20	106-122	2066.1	-	YNQLQLQAIHAQEQLIR
T21	123-124	278.1	-	MK
T22	125-129	633.3	-	ENSQR
T23	130-133	531.3	-	KPMR
T24	134-181	5734.7	-	VVNQEQA YFYLEPFQPSYQLDV YP YAA WFHPAQIMQHVA YSPFH DTAK
T25	182-190	990.5	-	<b>LIASENSEK</b>
T26	191-197	873.4	-	<b>TDIPEW</b>
T(25+26)	182-197	1844.9	1845.0	

**Tabella 3:** Frammenti triptici e relativi  $MH^+$ , monoisotopici calcolati e sperimentali, relativi alla caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta (NCBI gi|19031195), presa come sequenza di riferimento. In grassetto è riportata la sequenza identificata mediante MALDI-MS.

Frammenti	Posizione	MH+	MH+	Sequenza di riferimento ( NCBI gi 15723738)
		Monoisotopico	MALDI-MS	
T1	1-1	175.1	-	RPK
T2	2-3	175.1	-	LK
T3	4-7	522.3	-	LPHR
T4	8-19	1456.7	-	QPEIIQNEQDSR
T5	20-21	276.2	-	EK
T6	22-24	359.3	-	VLK
T7	25-26	304.2	-	ER
T8	27-27	147.1	-	<b>K</b>
T9	28-41	1712.8	1712.9	<b>FPSFALEYINELNR</b>
T(8+9)	27-41	1840.9	1841.0	
T10	42-43	303.2	-	<b>QR</b>
T11	44-47	502.3	-	<b>ELLK</b>
T(10+11)	42-47	786.5	786.4	
T12	48-49	276.2	-	<b>EK</b>
T13	50-51	275.2	-	<b>QK</b>
T(10+11+12+13)	42-51	1299.7	1299.7	
T14	52-55	528.2	-	DEHK
T15	56-91	4017.5	-	DTSNESTEEYLIEDPEQQESSSTSSEEVPINTEK
T16	92-92	175.1	-	R
T17	93-95	385.3	-	<b>IPR</b>
T18	96-108	1675.8	1675.9	<b>EDMLYQHTLEQLR</b>
T(17+18)	93-108	2042.0	2042.1	
T19	109-109	175.1	-	<b>R</b>
T(18+19)	89-102	1831.9	1832.0	
T20	110-112	347.2	-	LSK
T21	113-125	1582.8	-	YNQLQLQAIHAQR
T22	126-129	531.3	-	KPMR
T23	130-177	5734.7	-	VVNQEQAIFYLEPFQPSYQLDVYPYAAWFHPAQIMQHVAYSPFHDTAK
T24	178-186	990.5	-	<b>LIASENSEK</b>
T25	187-193	873.4	-	<b>TDIPEW</b>
T(24+25)	178-193	1844.9	1845.0	

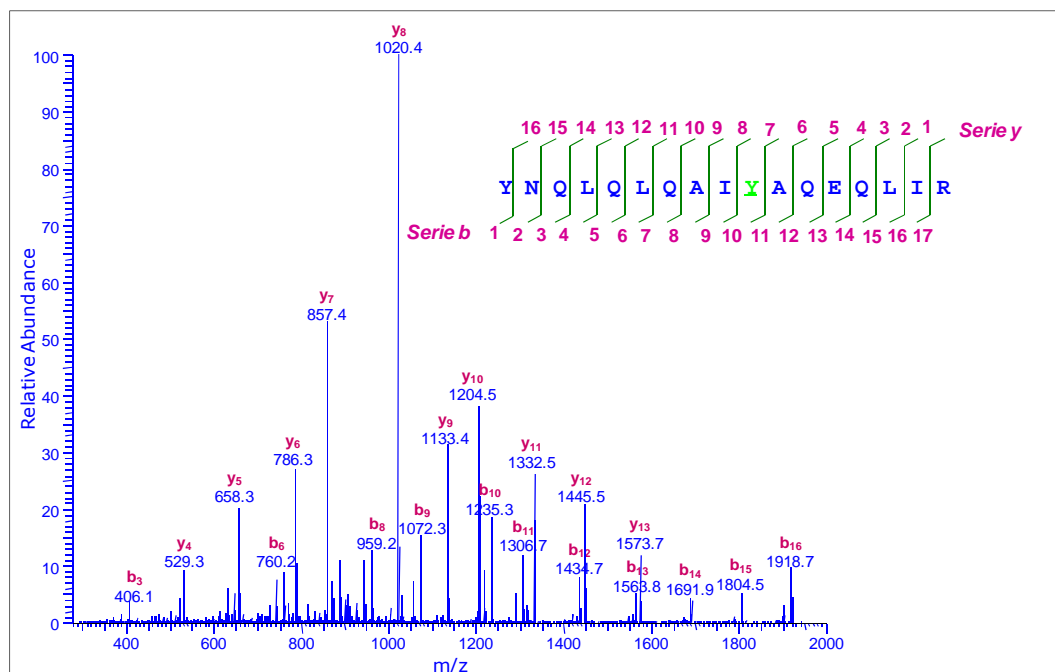
**Tabella 4:** Frammenti triptici e relativi MH+, monoisotopici calcolati e sperimentali, relativi alla caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta (gi|15723738), presa come riferimento. In grassetto è riportata la sequenza identificata mediante MALDI-MS.

Complessivamente, i risultati ottenuti mediante MALDI-TOF MS e ricerca in banca dati hanno permesso di identificare i componenti presenti nella frazione investigata con caseine d'asina di tipo  $\alpha_{s1}$ , le cui sequenze sono attualmente sconosciute. A tal proposito, bisogna evidenziare che, pur non essendo presenti nelle banche dati sequenze di caseine appartenenti alla specie asinina, tale identificazione è resa possibile dall'elevata similarità di sequenza esistente con le omologhe proteine del latte di giumenta presenti nei databases (*cross-species proteins identification*), in conseguenza alla appartenenza allo stesso ordine tassonomico dei due animali (*Perissodactyla*). D'altra parte, gli altri segnali presenti nello spettro di massa MALDI-TOF e rimasti non assegnati sono probabilmente dovuti a frammenti triptici, contententi delle sostituzioni amminoacidiche rispetto alle sequenze di caseine  $\alpha_{s1}$  di giumenta, e che di conseguenza non possono essere identificati sulla sola base dell'approccio del *peptide mass fingerprint (PMF)*.

Pertanto allo scopo di caratterizzare ulteriori porzioni di sequenza ed identificare le possibili sostituzioni amminoacidiche presenti nelle caseine  $\alpha_{s1}$  di asina, la miscela di peptidi triptici è stata sottoposta ad analisi on-line RP-HPLC/nESI MS/MS.

L'insieme dei dati ottenuti mediante l'analisi on-line RP-HPLC/nESI MS/MS, oltre che confermare i risultati ottenuti mediante l'approccio *PMF* ha permesso di caratterizzare la sequenza del peptide responsabile del segnale più intenso a  $m/z$  2092.2 presente nello spettro di massa MALDI-TOF e rimasto non identificato (**Figura 9**). In dettaglio, dall'interpretazione dei segnali presenti nello spettro MS/MS (**Figura 10**) dello ione molecolare a doppia carica a  $m/z$  1047.16 ( $M_r$  2091.10) di tale peptide,

è stato possibile ricavare la sequenza YNQLQLQAIYAQEQQLIR, che corrisponde alla sequenza del frammento triptico teorico Tyr<sup>106</sup>-Arg<sup>122</sup> presente nella variante di caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta a più alto peso molecolare (**Tabella 3**, gi|19031195) a meno di una sostituzione aminoacidica, Tyr→His<sup>115</sup>.



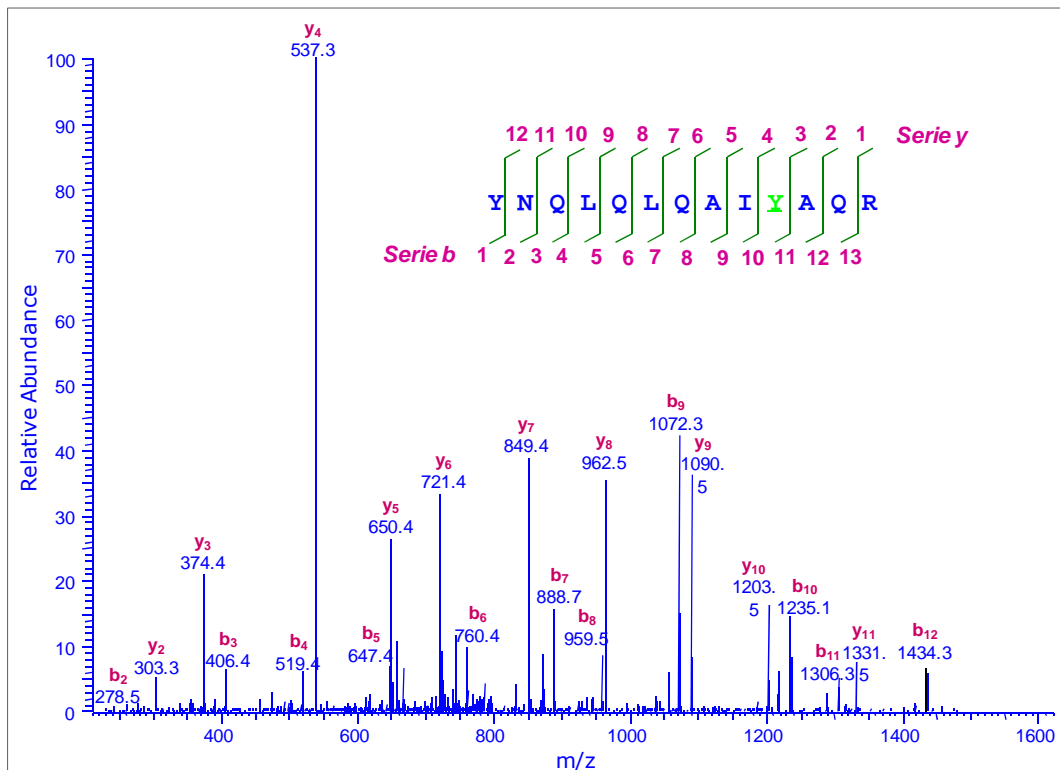
**Figura 10:** Spettro ESI MSMS dello ione molecolare a doppia carica  $m/z$  1047.16 ( $M_r$  2091.1) relativo al peptide triptico Tyr<sup>106</sup>-Arg<sup>122</sup> della  $\alpha_{s1}$  caseina contenente la monosostituzione Tyr→His<sup>115</sup>.

Inoltre, l'interpretazione dello spettro MS/MS (**Figura 11**) dello ione molecolare a doppia carica a  $m/z$  805.0 ( $M_r$  1608.0) ha permesso di individuare la presenza di un peptide la cui sequenza (YNQLQLQAIYAQR) corrisponde alla sequenza del frammento triptico teorico Tyr<sup>113</sup>-Arg<sup>125</sup> presente nella seconda variante di caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta (**Tabella 4**, gi|15723738) a meno di una sostituzione aminoacidica, Tyr→His<sup>122</sup>.

La caratterizzazione dei due frammenti sopra citati evidenzia che, almeno due dei quattro componenti presenti nella frazione cromatografica in esame, presentano nella porzione centrale della loro sequenza aminoacidica, la stessa differenza che caratterizza le due varianti proteiche di caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta, ovvero l'assenza, in una delle due proteine del tratto EQLIRMKENSQ.

Successivamente, con lo scopo di ottenere informazioni addizionali sulla sequenza delle caseine  $\alpha_{s1}$  di asina, un'aliquota della frazione cromatografica A è stata sottoposta a digestione enzimatica con Glu-C. La miscela di frammenti enzimatici così ottenuta è stata successivamente caratterizzata mediante MALDI-TOF MS e analisi on-line RP-HPLC/nESI MS/MS.

Tale approccio oltre che confermare i risultati ottenuti mediante la caratterizzazione del digerito triptico ha permesso di ottenere ulteriori informazioni sulla sequenza delle caseine  $\alpha_{s1}$  d'asina.



**Figura 11:** Spettro ESI MS/MS dello ione molecolare a doppia carica  $m/z$  804.99 ( $M_r$  1607.98)

Complessivamente, l'insieme dei risultati ottenuti seppur ancora non conclusivi ha permesso di identificare i quattro componenti presenti nella frazione investigata con caseine d'asina di tipo  $\alpha_{s1}$ , la cui sequenza è stata in buona parte caratterizzata prendendo come riferimento le omologhe proteine presenti nel latte di giumenta (**Figura 12**). Tale caratterizzazione ha evidenziato un'elevata similarità tra le sequenze delle caseine  $\alpha_{s1}$  d'asina e le corrispondenti omologhe della giumenta, rivelando inoltre che almeno due dei quattro componenti presenti nella frazione cromatografica in esame, presentano nella porzione centrale della loro sequenza amminoacidica, la stessa differenza che caratterizza le due varianti proteiche di caseina  $\alpha_{s1}$  di giumenta, ovvero l'assenza, in una delle due proteine del tratto EQLIRMKENSQ e di un residuo di glutamina.

In conclusione, è possibile ipotizzare che la differenza di 618 Da tra le due caseine  $\alpha_{s1}$  rispettivamente con  $M_r$  23798 e 24416 Da possa essere dovuta a differenze analoghe a quelle che distinguono le corrispondenti caseine  $\alpha_{s1}$  di giumenta. D'altra parte il più elevato peso molecolare delle caseine  $\alpha_{s1}$  d'asina potrebbe essere imputabile alla presenza, possibilmente nella porzione N-terminale non caratterizzata, di un tratto di sequenza amminoacidica non codificato nella giumenta. Infine, i due componenti con  $M_r$  23669 e 24287 Da, il cui peso molecolare differisce di 129 Da in meno rispetto a quello dei componenti con  $M_r$  23798 e 24416, potrebbero costituire due ulteriori varianti, nella cui sequenza amminoacidica non è presente un residuo di acido glutammico (p.m = 129 Da), glutamina o lisina (p.m = 128 Da).



gi 19031195	RPKLPRHQPE IIQNEQDSRE KVLKERKFPS <u>FALEYINELN RQRELLKEKQ</u> <u>KDEHK</u> -----	55
gi 15723738	RLKLPHRQPE IIQNEQDSRE KVLKERKFPS <u>FALEYINELN RQRELLKEKQ</u> <u>KDEHKDTSNE</u>	60
	* *****	
gi 19031195	--EYLIEDP <u>EQQESSTSS</u> <u>SEEVVPINTE</u> <u>QKRIPREDML</u> <u>YQHTLEQLRR</u> <u>LSKYNQLOLO</u>	112
gi 15723738	<u>STEEYLIEDP</u> <u>EQQESSTSS</u> <u>SEEVVPINTE</u> <u>-KRIPREDML</u> <u>YQHTLEQLRR</u> <u>LSKYNQLQLQ</u>	119
	*****	
gi 19031195	<u>AIHAQEQLIR</u> <u>MKENSQRKPM</u> <u>RVVNQEAYF</u> <u>YLEPFQPSY</u> <u>QLDVYPYAAWF</u> <u>HPAQIMQHVA</u>	172
gi 15723738	<u>AIHAQ</u> ----- <u>-RKPM</u> <u>RVVNQEAYF</u> <u>YLEPFQPSY</u> <u>QLDVYPYAAWF</u> <u>HPAQIMQHVA</u>	168
	*****	
gi 19031195	<u>YSPFHDTAKL</u> <u>IASENSEKTD</u> <u>IPEW</u>	197
gi 15723738	<u>YSPFHDTAKL</u> <u>IASENSEKTD</u> <u>IPEW</u>	193
	*****	

**Figura 12:** Allineamento di sequenza delle due  $\alpha$ 1-caseine di giumenta. In corsivo è riportata l'istidina che nelle sequenze di  $\alpha$ 1 di asina è sostituita da una tirosina. Gli asterischi si riferiscono agli amminoacidi coincidenti tra le due sequenze. In blu è sottolineata la parte di sequenza caratterizzata mediante tripsina. In rosso è sottolineata la parte di sequenza caratterizzata mediante taglio con Glu-C.

#### 6.4.4 Caratterizzazione della frazione cromatografica B

Come riportato precedentemente, l'analisi RP-HPLC/ESI-MS della frazione caseinica defosforilata (**Figura 6**) mostra la co-eluzione a circa 25 minuti di due componenti aventi rispettivamente  $M_r$  24607 e 25530 Da i quali, sulla base dei tempi di eluizione e delle loro masse molecolari, potrebbero essere identificati come caseine di tipo  $\beta$ .

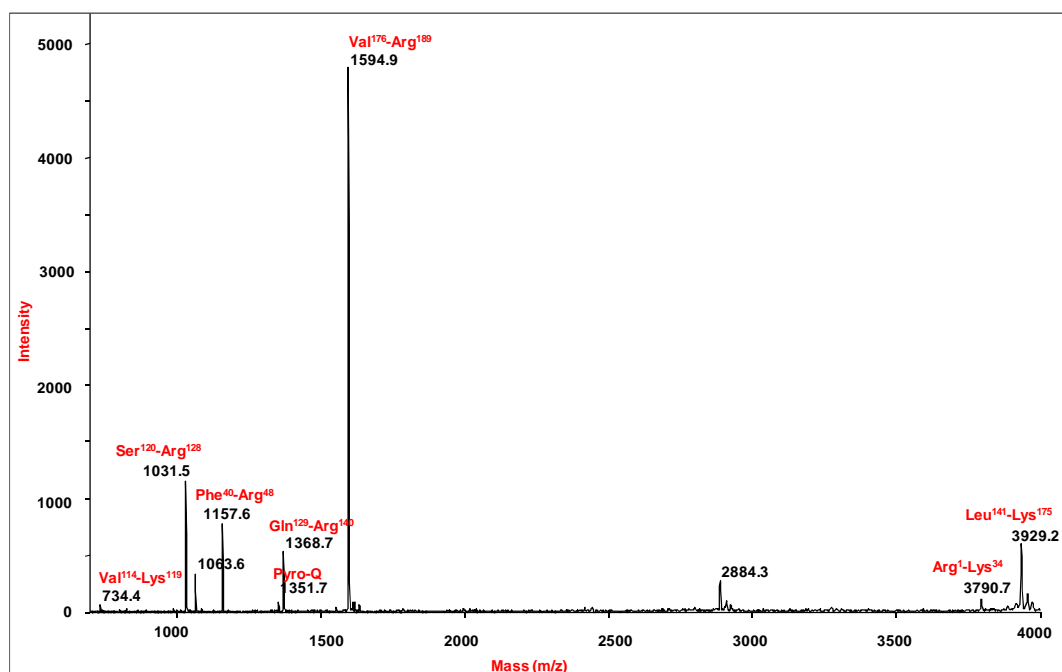
Al fine di verificare tale ipotesi, la frazione cromatografica in esame è stata isolata mediante cromatografia su fase inversa utilizzando una colonna analitica (**Figura 6, picco B**). Nonostante i diversi tentativi di modifica del gradiente di eluizione, non è stato possibile ottenere la completa risoluzione dei singoli componenti proteici da caratterizzare (**Figura 7b**). Tale frazione è stata quindi caratterizzata mediante l'utilizzo combinato della reazione di digestione enzimatica con tripsina porcina, analisi MALDI-TOF MS e ricerca nelle banche dati proteiche.

I segnali presenti nello spettro di massa MALDI (**Figura 13**), utilizzati per la ricerca nelle banche dati, hanno permesso di identificare due  $\beta$ -caseine di giumenta (**Figura 14**,  $M_r$  24588.4 Da, Acc. N. AAG43954;  $M_r$  25511.4 Da, gi|90111821), le quali differiscono tra loro per l'assenza nella sequenza più corta del tratto ESITHINK dopo il residuo di acido glutammico in posizione 27 (**Tabella 5**). Tale risultato oltre che confermare l'ipotesi che i due componenti presenti nella frazione cromatografica investigata corrispondono a  $\beta$ -caseine di asina, evidenzia, analogamente a quanto trovato per la frazione relativa alle caseine di tipo  $\alpha$ <sub>s1</sub>, una discreta similarità di sequenza tra le  $\beta$ -caseine dei due animali, appartenenti allo stesso ordine tassonomico (*Perissodactyla*).

Frammenti	Posizione	MH+ Monoisotopico	MH+ MALDI- MS	Sequenza di riferimento (Beta Caseina di giumenta; Acc. N. AAG43954 e gi 90111821)
T1	1-1	175.1	-	<b>R</b>
T2	2-3	276.1	-	<b>EK</b>
T3	4-34	3377.5	-	<b>EELNVSSETVESLSNPNPDSSESSEESITHINK</b>
T(1+2+3)	1-34	3790.7	3790.7	
	4-28*	2712.2	-	<b>EELNVSSETVESLSNPNPDSSESSEK</b>
T4	35-36	276.16	-	<b>EK</b>
T5	37-39	388.2	-	<b>LQK</b>
T6	40-41	294.2	-	<b>FK</b>
T7	42-48	882.4	-	<b>HEGQQQR</b>
T(6+7)	40-48	1157.6	1157.6	
T8	49-52	532.3	-	<b>EVER</b>
T9	53-55	390.2	-	<b>QDK</b>
T10	56-58	375.2	-	<b>ISR</b>
T11	59-105	5227.8	-	<b>FVQPQPVVYPYAEPVPYAVVPQSILPLAQPPILPFLQPEIMEVSQAK</b>
T12	106-111	700.4	-	<b>ETILPK</b>
T13	112-112	175.1	-	<b>R</b>
T14	113-113	147.1	-	<b>K</b>
T15	114-119	734.4	734.4	<b>VMPFLK</b>
T16	120-128	1031.5	1031.5	<b>SPIVPFSEK</b>
T17	129-140	1368.7	1368.7	<b>QILNPTNGENLR</b>
T18	141-175	3929.1	3929.2	<b>LPVHLIQPFMHQVPQSLLQTLMLPSQPVLSPQSK</b>
T19	176-189	1594.8	1594.9	<b>VAPFPQPVVYPQK</b>
T20	190-203	1662.8	-	<b>DTPVQAFLLYQDK</b>
T21	204-226	2337.3	-	<b>LGPTGELDPATQPIVAVHNPVIV</b>

**Tabella 5:** Frammenti triptici e relativi MH<sup>+</sup>, monoisotopici calcolati e sperimentali, relativi alla  $\beta$ -caseina ed alla  $\beta$ -caseina <sup>$\Delta$ 5</sup> di giumenta, prese come sequenze di riferimento. In grassetto è riportata la parte di sequenza identificata mediante MALDI MS. In grassetto e corsivo è riportato il tratto do sequenza Glu27-Lys34 codificato dall'esone 5 ed assente nella sequenza della  $\beta$ -caseina <sup>$\Delta$ 5</sup>

In dettaglio, i segnali a  $m/z$  734.4, 1031.5, 1157.6, 1368.7, 1594.9, 3790.7 e 3929.2 (**Figura 13**) corrispondono rispettivamente ai frammenti triptici Val<sup>114</sup>-Lys<sup>119</sup>, Ser<sup>120</sup>-Arg<sup>128</sup>, Phe<sup>40</sup>-Arg<sup>48</sup>, Gln<sup>129</sup>-Arg<sup>140</sup>, Val<sup>176</sup>-Arg<sup>189</sup>, Arg<sup>1</sup>-Lys<sup>34</sup> e Leu<sup>141</sup>-Lys<sup>175</sup> (Tabella 4) della  $\beta$ -caseina variante A di giumenta, peraltro comuni anche alla variante a più basso peso molecolare. L'identificazione di tali frammenti ha permesso di caratterizzare circa il 48% della sequenza di  $\beta$ -caseina con peso molecolare maggiore.



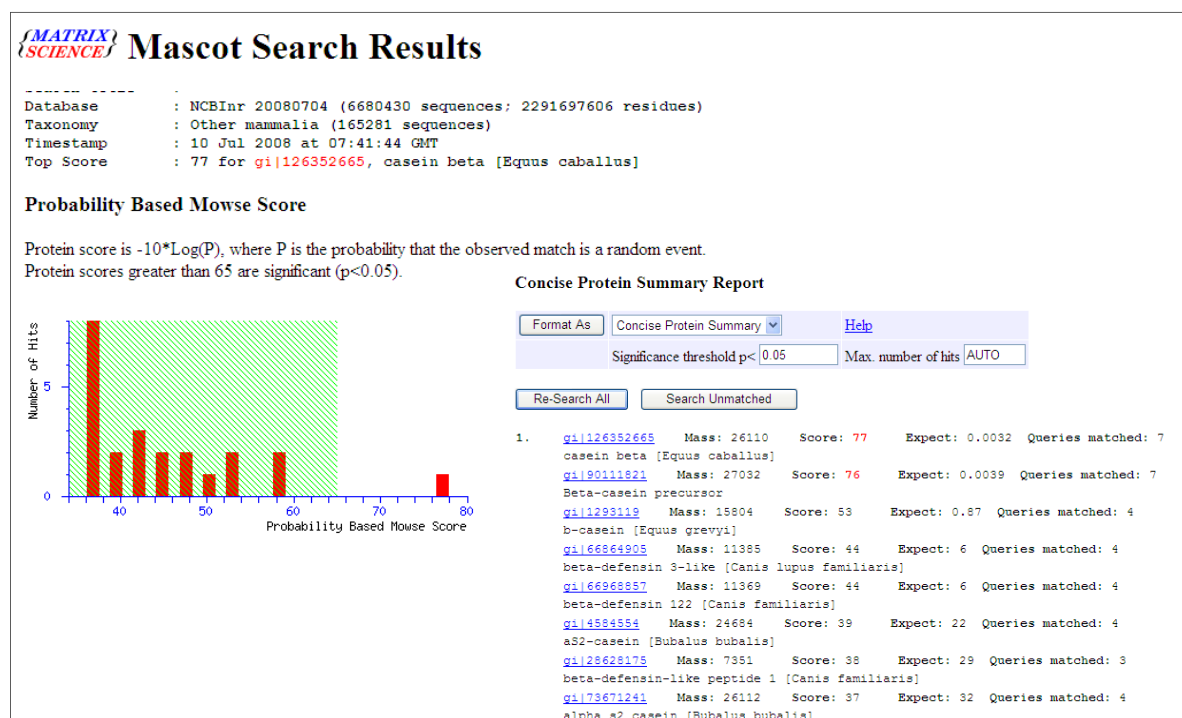
**Figura 13:** Spettro di massa MALDI-TOF del digerito triptico della frazione cromatografica B (Fig. 6).

Al fine di caratterizzare la restante parte di sequenza e possibilmente individuare le differenze amminoacidiche tra le  $\beta$ -caseine di asina e quelle della giumenta, nonché le differenze tra le due  $\beta$ -caseine di asina, la miscela triptica è stata investigata mediante RP-HPLC/nESI MS/MS.

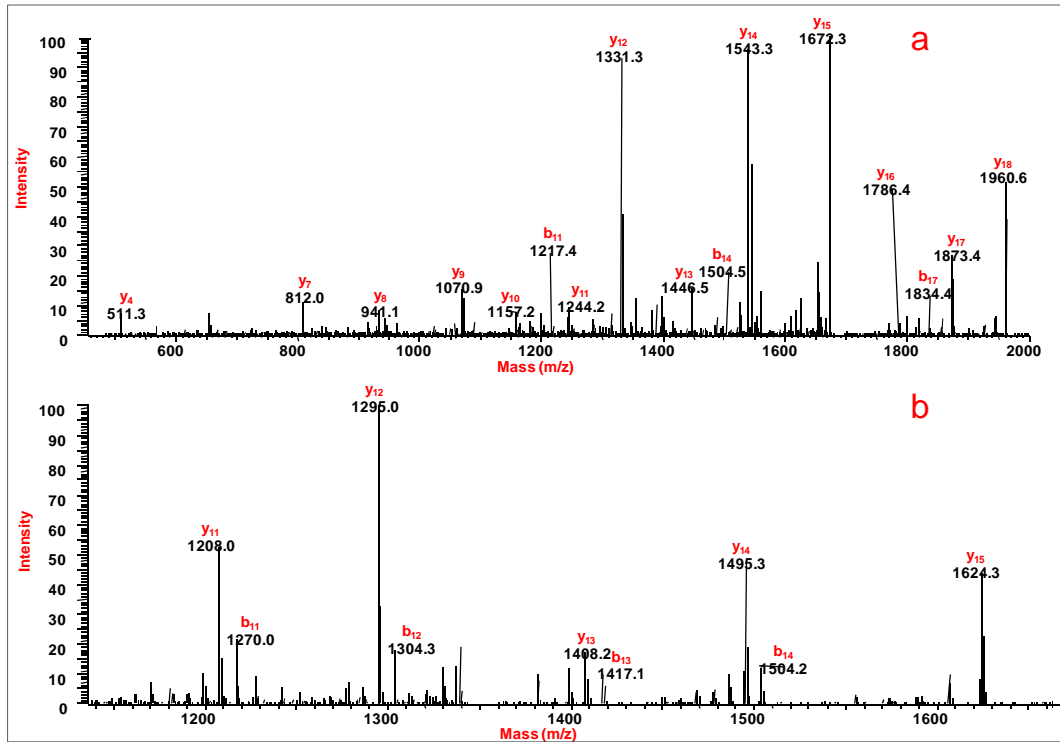
I risultati preliminari di tale studio hanno permesso allo stato attuale di individuare e caratterizzare la differenza tra le due sequenze di  $\beta$ -caseine di asina, attraverso l'identificazione e successiva caratterizzazione mediante MS/MS di due peptidi rispettivamente con  $M_r$  3376.5 e 2711.2.

L'interpretazione degli spettri MS/MS di tali peptidi, ha permesso di identificare rispettivamente il peptide a  $M_r$  3376.5 con il tratto di sequenza Glu<sup>4</sup>-Lys<sup>34</sup> (EELNVSSETVESLSSNEPDSSESITHINK) appartenente alla  $\beta$ -caseina di giumenta variante A ed il peptide a 2711.2 con il tratto di sequenza Glu<sup>4</sup>-Lys<sup>28</sup> (EELNVSSETVESLSSNEPDSSEEK) appartenente alla  $\beta$ -caseina di giumenta variante A<sup>Δ5</sup> (Figura 15a e 15b, Tabella 5).

La caratterizzazione di tali peptidi permette quindi di concludere che la differenza a livello amminoacidico che distingue le due sequenze di  $\beta$ -caseina d'asina è analoga a quella che distingue le due varianti di  $\beta$ -caseina di giumenta, ovvero l'assenza nella proteina con minore peso molecolare del tratto di sequenza <sup>27</sup>ESITHINK<sup>34</sup>, responsabile della differenza di 923 Da osservata tra i pesi molecolari delle due proteine.



**Figura 14:** Reporto relativo alla ricerca nel database nrNCBI effettuato mediante il server Mascot, utilizzando i segnali presenti nello spettro di massa MALDI (Fig. 14) del digerito triptico della frazione cromatografica B.



**Figura 15a e 15b:** Spettro ESI MS/MS dello ione a doppia carica  $m/z$  1689.84 (Mr3376.54), relativo al frammento triptico  ${}^4\text{EELNVSSSETVESLSSNEPDSSESSEESITHINK}^{34}$  della beta-caseina (a) e dello ione a doppia carica  $m/z$  1356.38 (Mr 2711.19), relativo al frammento triptico  ${}^4\text{EELNVSSSETVESLSSNEPDSSEEK}^{28}$  della beta-caseina  $\Delta 5$  (b).

## 6.5 CONCLUSIONI

Nel presente studio, l'utilizzo combinato di tecniche di separazione cromatografica, reazioni di digestione enzimatica, metodiche di spettrometria di massa (MALDI-TOF, n-ESI MSMS) e strumenti bioinformatici ha permesso la caratterizzazione dei principali componenti proteici, con particolare riferimento alle caseine, presenti in un campione commerciale di latte d'asina.

In particolare, la caratterizzazione *off-line* RP-HPLC/MALDI-TOF MS della frazione di siero proteico ha permesso di identificare in modo attendibile i principali componenti attraverso l'individuazione di varianti già note di  $\alpha$ -lattalbumina, lisozima,  $\beta$ -lattoglobulina IB e  $\beta$ -lattoglobulina IIB.

D'altra parte, una caratterizzazione dettagliata delle due principali frazioni cromatografiche isolate dalle caseine ha permesso di identificare e determinare, seppure ancora in modo parziale, la sequenza amminoacidica delle caseine d'asina di tipo  $\alpha_{s1}$  e di tipo  $\beta$ . Per la caratterizzazione delle caseine investigate sono state prese come riferimento le sequenze delle corrispondenti caseine di giumenta in quanto, ad oggi non esistono in banca dati sequenze di caseine per l'asina.

Complessivamente, i risultati sin qui ottenuti, hanno mostrato un'elevata percentuale di similarità tra le caseine, sia di tipo  $\alpha_{s1}$  che di tipo  $\beta$ , della giumenta e quelle d'asina.

Inoltre, la caratterizzazione, seppur ancora parziale, di tali proteine ha evidenziato come nell'ambito di entrambe le classi di caseine, le varianti identificate nell'asina conservino le stesse differenze amminoacidiche che distinguono le corrispondenti proteine della giumenta, probabilmente in relazione al fatto che entrambi gli animali appartengono allo stesso ordine tassonomico di *Perissodactyla*.

Le informazioni sin qui ottenute pertanto costituiscono una valida base di partenza per una più completa caratterizzazione della sequenza amminoacidica delle caseine presenti nel latte d'asina.

In conclusione, l'insieme dei risultati ottenuti mostra le potenzialità delle metodiche applicate (spettrometria di massa MALDI-TOF, analisi RP-HPLC/ESI-MS e MS/MS e reazioni enzimatiche complementari) nello studio di miscele proteiche complesse, nonché nella possibile identificazione e caratterizzazione di nuove varianti proteiche, anche nei casi in cui le informazioni in letteratura o nei *databases* sono molto scarse.



## **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- 
- <sup>1</sup> S. Terè, G. Barcelo-Coblijn, M. Benet, R. Alvarez, R. Bressani, J. E. Halver, and P. V. Escriba. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *PNAS*, **2008**, *105*: 13811.
- <sup>2</sup> Gary K. Beauchamp, Russell S. J. Keast, Diane Morel, Jianming Lin, Jana Pika, Qiang Han, Chi-Ho Lee, Amos B. Smith & Paul A. S. Breslin. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, **2005**, *437*: 45.
- <sup>3</sup> M Fitó, M Cladellas, R de la Torre, J Martí, D Muñoz, H Schröder, M Alcántara, M Pujadas-Bastardes, J Marrugat, M C López-Sabater, J Bruguera, M I Covas. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* **2008**, *62*: 570.
- <sup>4</sup> R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European J. of Cancer*, **2000**, *36*: 1235.
- <sup>5</sup> P. Cappelli, V. Vannucchi, *Chimica degli Alimenti*, Zanichelli **2009**, 537.
- <sup>6</sup> L. Rastrelli, S. Passi, F. Ippolito, G. Vacca, F. De Simone, Rate of degradation of  $\alpha$ -tocopherol, squalene, phenolics and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions, *J. Agric. Food Chem*, **2002**, *50*: 5566.
- <sup>7</sup> A. Ranalli, P. Cabras, E. Iannucci, S. Contento, Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgin olive oil are affected by processing technology, *Food Chemistry*, **2001** *73*: 445.
- <sup>8</sup> T. Caruso, D. Cartabellotta, A. Motisi, Identificazione, validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli, Dipartimento Colture Arboree dell'Università di Palermo e Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Siciliana.
- <sup>9</sup> I.O.O. Council., *Olive*, **2002**, *92*: 22.
- <sup>10</sup> EU, Off. J. Commission Eur. Commun., Regulation No. 2632/94 L208, **1996**.
- <sup>11</sup> R. Bucci, A. D. Magri, A. L. Magri, D. Marini, F. Marini. Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, *50*: 413.
- <sup>12</sup> F. Marini, F. Balestrieri, R. Bucci, A. D. Magri, A. L. Magri, D. Marini, F. Marini, Supervised pattern recognition to authenticate Italian extra virgin olive oil varieties. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *73*: 85.
- <sup>13</sup> M. D. Salvador, F. Aranda, S. Gómez-Alonso, G. Fregapane. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem*. **2003**, *80*: 359.
- <sup>14</sup> D. Krichene, W. Taamalli, D. Daoud, M. D. Salvador, G. Fregapane, M. Zarrouk. Phenolic compounds, tocopherols and other minor components in virgin olive oils of some Tunisian varieties. *J. Food Biochem*. **2007**, *31*: 179.
- <sup>15</sup> M. M. Torres, D. M. Maestri. The effects of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Traslasierra Valley, Cordoba, Argentina. *Food Chem*. **2006**, *96*: 507.
- <sup>16</sup> A. Cichelli, G. P. Pertesana. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*: 141.
- <sup>17</sup> G. Luna, M. T. Morales, R. Aparicio. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chem*. **2006**, *98*: 243.
- <sup>18</sup> F. Camin, R. Larcher, M. Perini, L. Bontempo, D. Bertoldi, G. Gagliano, G. Nicolini, G. Versini. Characterisation of authentic Italian extravirgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chem*. **2010**, *118*: 901.
- <sup>19</sup> M. J. Lerma-García, J. M. Herrero-Martínez, G. Ramis-Ramos, E. F. Simo-Alfonso. Prediction of the genetic variety of Spanish extra virgin olive oils using fatty acid and phenolic compound profiles established by direct infusion mass spectrometry. *Food Chem*. **2008**, *108*, 1142.
- <sup>20</sup> A. Rotondi, A. Bendini, L. Cerretani, M. Mari, G. Lercker, T.G. Toschi, Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem* **2004**. *52*: 3649.



- <sup>21</sup> S.M. Monti, A. Ritieni, R. Sacchi, K. Skog, E. Borgen, V. Fogliano, S.M. Monti, A. Ritieni, R. Sacchi, K. Skog, E. Borgen, V. Fogliano, *J. Agric. Food Chem.* **2001** 49: 3969.
- <sup>22</sup> A. Cert, W. Moreda, M.C. Perez-Camino, Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils, *J. Chromatogr. A* **2000** 881: 131.
- <sup>23</sup> J.A. Pereira, S. Casal, A. Bento, M. Oliveira, Influence of Olive Storage Period on Oil Quality of Three Portuguese Cultivars of Oleaeuropea, Cobrançosa, Madural, and Verdeal Transmontana *J. Agric. Food Chem.* **2002** 50: 6335.
- <sup>24</sup> R. Aparicio, R. Aparicio-Riuz, Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques *J. Chromatogr. A*, **2000** 881: 93.
- <sup>25</sup> K. Grob, A.M. Giuffrè, U. Leuzzi, B. Mincione, FettWiss. Recognition of adulterated oils by direct analysis of the minor components *Technol.-Fat Sci. Technol.* **1994** 96: 286.
- <sup>26</sup> Moret, K. Grob, L.S. Conte, *J. Chromatogr. A* On-line high-performance liquid chromatography-solvent evaporation - high-performance liquid chromatography - capillary gas chromatography - flame ionisation detection for the analysis of mineral oil polyaromatic hydrocarbons in fatty foods **1996** 750: 361.
- <sup>27</sup> G. Lercker, M.T. Rodriguez-Estrada, *J. Chromatogr. A* Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods **2000** 881: 105.
- <sup>28</sup> J.F. Cavalli, X. Fernandez, L. Lizzanti-Cuvelier, A.M. Loiseau, Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils *J. Agric. Food Chem.* **2003** 51: 7709.
- <sup>29</sup> S. Vichi, L. Pizzale, L.S. Conte, S. Buxaderas, E. Lopez-Tamames, Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Characterization of Virgin Olive Oils from Two Distinct Geographical Areas of Northern Italy *J. Agric. Food Chem.* **2003** 51: 6572.
- <sup>30</sup> H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, Springer Verlag: Berlin, **2009**
- <sup>31</sup> C. M. Kalua, D. R. Bedgood, A. G. Bishop, P. D. Prenzler, Discrimination of storage conditions and freshness in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54(19): 7144.
- <sup>32</sup> A. Ranalli, L. Pollastri, S. Contento, G. Di Loreto, E. Iannucci, L. Lucera, F. Russi. Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(13): 3775.
- <sup>33</sup> G. Di Bella, R. Maisano, L. La Pera, V. Lo Turco, F. Salvo, G. Dugo. Statistical characterization of sicilian olive oils from the Peloritana and Maghrebian zones according to the fatty acid profile. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55(16): 6568. DOI: 10.1021/jf070523r
- <sup>34</sup> N. Doubois, C. Barthomeuf, J. P. Berge. Gas chromatographic behavior of fatty acid derivatives for mass spectrometry on lowpolarity capillary columns. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, 111(7): 688.
- <sup>35</sup> G. Dobson, W. W. Christie. Spectroscopy and spectrometry of lipids (Part 2) – mass spectrometry of fatty acid derivatives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104: 36.
- <sup>36</sup> M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hrub. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1010: 195.
- <sup>37</sup> G. R. Asbury, K. Al-Saad, W. F. Siems, R. M. Hannan, H. H. Hill Jr. Analysis of triacylglycerols and whole oils by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, 10(10): 983.
- <sup>38</sup> M. D'Imperio, L. Mannina, D. Capitani, O. Bidet, E. Rossi, F. M. Bucarelli, G. B. Quaglia, A. Segre. NMR and statistical study of olive oils from Lazio: a geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chem.* **2007**, 105: 1256
- <sup>39</sup> P. Fronimaki, A. Spyros, S. Christophoridou, P. Dais. Determination of the diglycerides content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 2207.
- <sup>40</sup> S. Lanteri, C. Armannino, E. Perri, A. Palopoli. Study of oils from Calabrian olive cultivars by chemometric method. *Food Chem.* **2002**, 76: 501.
- <sup>41</sup> K. Nagy, D. Bongiorno, G. Avellone, P. Agozzino, L. Ceraulo, K. V`ekey. High performance liquid chromatography-mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1078: 90.

- <sup>42</sup>F. Guimet, R. Boqu´e, J. Ferr´e. Cluster analysis applied to the exploratory analysis of commercial Spanish olive oils by means of excitation–emission fluorescence spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52(22): 6673. DOI:10.1021/jf040169m.
- <sup>43</sup>A. Agiomyrigianaki, P. V. Petrakis, P. Dais. Detection of refined olive oil adulteration with refined hazelnut oil by employing NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Talanta*, **2010**, 80(5): 2165. DOI:10.1016/j.talanta.2009.11.024.
- <sup>44</sup>J. Parcerisa, I. Casals, J. Boatella, R. Codony, M. Rafecas. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas–liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *J. Chromatogr. A* **2000**, 88: 149.
- <sup>45</sup>N. K. Andrikopoulos, I. G. Giannakis, V. Tzamtzis. Analysis of olive oil and seed oil triglycerides by capillary gas chromatography as a tool for the detection of the adulteration of olive oil. *J. Chromatogr. Sci.* **2001**, 39: 137.
- <sup>46</sup>R. O. Duda, P. E. Hart. *Pattern Classification and Scene Analysis*, John Wiley & Sons: New York, **1973**.
- <sup>47</sup>R. I. Jennrich. In *Stepwise Discriminant Analysis in Statistical Methods for Digital Computers*, K. Enslein, A. Ralston and H. S. Wilf (Eds). Wiley: New York, **1977**.
- <sup>48</sup>E. Aprea, F. Biasioli, G. Sani, C. Cantini, T. D. M´ark, F. Gasperi. Proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS) headspace analysis for rapid detection of oxidative alteration of olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54: 7635
- <sup>49</sup>Guerriero R, Iacona C, Pellegrino S, Berra L, Pennone F, Mennone C, et al, Liste di orientamento varietale dei fruttiferi: albicocco, *Info Agrario*, **2006**, 23:S6.
- <sup>50</sup>Mattatelli B, Valutazione di cultivar di albicocco e tendenze produttive nell’Italia meridionale. *Frutticoltura*, **2004**, 6:18.
- <sup>51</sup>Pennone F, Berra L, Viti R and Guerriero R, Liste di orientamento varietale dei fruttiferi: albicocco. *Terra Vita*, **2005**, 24:S6
- <sup>52</sup>Bassi D and Audergon JM, Apricot breeding: update and perspectives. *Acta Hort*, **2006**, 701: 279
- <sup>53</sup>Bassi D and Selli R, Evaluation of fruit quality in peach and apricot. *Adv Hort Sci*, **1990**, 4:107
- <sup>54</sup>Gurrieri F, Audergon JM, Albagnac G and Reich M, Soluble sugars and carboxylic acids in ripe apricot fruit as parameters for distinguishing different cultivars. *Euphytica*, **2001**, 117:183
- <sup>55</sup>Bassi D, Bartolozzi F and Muzzi E, Patterns and heritability of carboxylic acids and soluble sugars in fruits of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breed*, **1996**, 115:67
- <sup>56</sup>Drogoudi PD, Vemmos S, Pantelidis G, Petri E, Tzoutzoukou C and Karayiannis I, Physical characters and antioxidant, sugar, and mineral nutrient contents in fruit from 29 apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars and hybrids, *J Agric Food Chem*, **2008**, 56:10754
- <sup>57</sup>Badenes ML, Martinez-Calvo J and Ll´acer G, Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group, *Euphytica*, **1998**, 102:93
- <sup>58</sup>Azodanlou R, Darbellay C, Luisier JL, Villettaz JC and Amad`o R, Development of a model for quality assessment of tomatoes and apricots, *Lebensm Wiss Technol*, **2003**, 36:223
- <sup>59</sup>Ruiz D and Egea J, Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L) germplasm. *Euphytica*, **2008**, 163:143
- <sup>60</sup>Ruiz D, Egea J, Tomas-Barberan FA and Gil MI, Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties and their relationship with flesh and skin color, *J Agric Food Chem*, **2005**, 53:6368
- <sup>61</sup>Vanoli M and Visai C, Volatile compounds production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Sci Hort*, **1997**, 70:15
- <sup>62</sup>G`omez E, Ledbetter C and Hartsell P, Volatile compounds in apricot, plum and their inter specific hybrid, *J Agric Food Chem*, **1993**, 41:1669
- <sup>63</sup>Takeoka GR, Flath RA, Mon TR, Teranishi R and Guentert M, Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*), *J Agric Food Chem*, **1990**, 38:471
- <sup>64</sup>Tang C and Jennings W, Volatile components of apricots, *J Agric Food Chem*, **1967**, 15:24
- <sup>65</sup>Tang C and Jennings W, Lactonic compounds of apricots, *J Agric Food Chem*, **1968**, 16:252
- <sup>66</sup>Rodriguez F, Seck S and Crouzet J, Constituents volatils de l’abricot vari`et`e Rouge du Roussillon, *Lebensm Wiss Technol*, **1980**, 13:152

- <sup>67</sup> Chairote G, Rodriguez F and Crouzet J, Characterization of additional volatile flavour components of apricot, *J Food Sci*, **1981**, 46:1898
- <sup>68</sup> Fan X, Argenta L and Mattheis JP, Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene prolongs storage life of apricots, *Postharv Biol Technol*, **2000**, 20:135
- <sup>69</sup> Botondi R, DeSantis D, Bellincontro A, Vizovitis K and Mencarelli F, Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots, *J Agric Food Chem*, **2003**, 51:1189
- <sup>70</sup> Guillot S, Peytavi L, Bureau S, Boulanger R, Lepoutre JP, Crouzet J, et al, Aroma characterization of various apricot varieties using headspace solid phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–olfactometry, *Food Chem*, **2006**, 96:147
- <sup>71</sup> Solis-Solis HM, Calderòn-Santoyo M, Schorr-Galindo S, Luna-Solano G and Ragazzo-Sánchez JA, Characterization of aroma potential of apricot varieties using different extraction techniques, *Food Chem*, **2007**, 105:829
- <sup>72</sup> Solis-Solis HM, Calderòn-Santoyo M, Schorr-Galindo S, Luna-Solano G and Ragazzo-Sánchez JA, Discrimination of eight varieties of apricot by electronic nose, LLE and SPME using GC–MS and multivariate analysis, *Sens Actuat B*, **2007**, 125:415
- <sup>73</sup> Chen M, Chen X, Wang X, Ci Z, Liu X, He T, et al, Comparison of headspace solid-phase microextraction with simultaneous steam distillation extraction for the analysis of the volatile constituents in Chinese apricot, *Agric Sci China*, **2006**, 5:879
- <sup>74</sup> Gómez E and Ledbetter C, Development of volatile compounds during fruit maturation: characterization of apricot and plum × apricot hybrids, *J Sci Food Agric*, **1997**, 74:541
- <sup>75</sup> Defilippi BG, San Juan W, Valdès H, Moya-León MA, Infante R and Campos-Vargas R, The aroma development during storage of Castlebrite apricots as evaluated by gas chromatography, electronic nose, and sensory analysis, *Postharv Biol Technol*, **2009**, 51:212
- <sup>76</sup> E. Guichard, P. Schlich, S. Issanchou. Composition of apricot aroma: correlations between sensory and instrumental data. *J. Food Sci*, **1990**, 55, 735
- <sup>77</sup> Buttery, R.G., Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. In: Acree, T.E., Teranishi, R. (Eds.), *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*, **1993**, ACS Professional Reference Book, Washington, 259–286.
- <sup>78</sup> Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Bostick, B.C., Mattheis, J.P., Patterson, M.E., Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low oxygen atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.*, **1993**, 3: 201
- <sup>79</sup> Sanz, C., Olias, J.M., Perez, A.G., Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Tomas-Barberan, F.A., Robins, R.J. (Eds.), *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Clarendon Press, Oxford, U.K, **1997**, 125–155.
- <sup>80</sup> Takeoka G.R., Buttery R.G. and Flath Ra, Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*), *J Agric Food Chem*, **1992**, 40: 1925
- <sup>81</sup> Echeverria, G., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I., Lopez, M.L. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biol. Technol.*, **2004**, 32: 29
- <sup>82</sup> Guadagni, D.R., Buttery, R.G., Harris, J. Odor intensities of hop oil constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **1966**, 17:142
- <sup>83</sup> Lara I, Graell J., Lopez M.L., Echeverria G., Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples, *Postharvest Biology and Technology*, **2006**, 39: 19
- <sup>84</sup> Rowan D, Allen J, Fielder S and Hunt M, Biosynthesis of straight-chain volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors, *J Agric Food Chem*, **1999**, 47:2553
- <sup>85</sup> Song J and Bangerth F, The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production, *Postharv Biol Technol*, **1996**, 8:259
- <sup>86</sup> Lalel HJD, Singh Z and Tan SC, The role of ethylene in mango fruit aroma volatiles biosynthesis. *J Hort Sci Biotechnol*, **2003**, 78:485
- <sup>87</sup> Lalel HJD, Singh Z and Tan SC, Aroma volatiles production during fruit ripening of 'Kensington Pridè mango. *Postharv Biol Technol*, **2003**, 27:323

- <sup>88</sup> Talluto G., Farina V., Lo Bianco R., 2007, Growth, fruit yield and quality of 'Golden Delicious' apple trees under fixed partial rootzone drying, *Journal of Applied Horticulture*, 9(1):50-55
- <sup>89</sup> C.L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, **1990**, 62: 2145
- <sup>90</sup> Agozzino, P, Avellone, G, Ceraulo, L, Ferrugia, M And Filizzola, F, "Volatiles profiles in sicilian prickly pear (opuntia ficus indica) by SPME/GC-MS analysis" *Italian journal of food science*, **2005**, 3, 17: 341
- <sup>91</sup> Agozzino, P, Avellone, G, Filizzola, F, Farina, V, And Lo Bianco, R., Changes in quality parameters and volatiles aroma compounds in 'Fairtime' peach during fruit development and ripening. *Italian Journal of food science* **2007**, 1, 17: 3
- <sup>92</sup> S. Hamm, E. Lesellier, J. Bleton, A. Teapla. Optimization of headspace solid phase microextraction for gas chromatography/mass spectrometry analysis of widely different volatility and polarity terpenoids in olibanum. *J. Chromatogr A*, **2003**, 1018: 73
- <sup>93</sup> D. Zuba, A. Parczewski, M. Reichenbacher. Optimization of solid phase microextraction conditions for gas chromatographic determination of ethanol and other volatile compounds in blood. *J Chromatogr B*, **2002**, 773: 75
- <sup>94</sup> Lo Bianco R, Farina V, Avellone G, Filizzola F and Agozzino P, Fruit quality and volatile fraction of 'Pink Lady' apple trees in response to rootstock vigor and partial rootzone drying, *J Sci Food Agric*, **2008**, 88:1325
- <sup>95</sup> Kovats, E. Sz. Gas chromatographic characterization of organic compounds. Linear Retention Index of aliphatic halides, alcohols, aldehydes, and ketones. *Helv Chim Acta*, **1958**, 6, 41: 1915
- <sup>96</sup> Ruiz D and Egea J, Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in apricot (*Prunus armeniaca* L) germplasm. *Euphytica*, **2008**, 163:143
- <sup>97</sup> Shimoda, M., Hiroko Shigematsu, Hideki Shiratsuchi and Yutaka Osajima. Comparison of the Odor Concentrate by SDE and Adsorptive Column Method from Green Tea Infusion, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 41: 1616
- <sup>98</sup> Sumitami, H., S. Suekane, A. Nakatani and Kiyooki Tatsuka. Changes in Composition of Volatile Compounds in High Pressure Treated Peach. *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42:785
- <sup>99</sup> Yu Tung-Hsi, Chung-May Wu and Shyh-Yuan Chen. Effects of pH Adjustment and Heat Treatment on the Stability and the Formation of Volatile Compounds of Garlic, *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37:730
- <sup>100</sup> Komthong P., Hayakawa S., Katoh T., Igura N., Shimoda M., Determination of potent odorants in apple by headspace gas dilution analysis. *LWT-Food Science and Technology*, **2006**, 39: 472
- <sup>101</sup> Umamo, K. and T. Shibamoto, Analysis of headspace volatiles from overheated beef fat, *J. Agric. Food Chem*, **1987**, 35: 14
- <sup>102</sup> Mottram, D.S., The effect of cooking conditions on the formation of volatile heterocyclic compounds in pork, *J. Sci. Food Agric.*, **1985**, 36: 377
- <sup>103</sup> Shiratsuchi, H., M. Shimoda, Y. Minegishi, and Y. Osajima., Isolation and Identification of Volatile Flavor Compounds in Nonfermented Coarse-Cut Sausage. Flavor as a Quality Factor of Nonfermented Sausage, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41: 647
- <sup>104</sup> Binder, G.R., M.E. Benson and R.A. Flath, Volatile Components of Safflower., *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, 38: 1245
- <sup>105</sup> Verzera A., Ziino M., Conduro C., Romeo V., Zappalà M., Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for rapid characterisation of semi-hard cheeses, *Anal Bioanal Chem*, **2004**, 380: 930
- <sup>106</sup> Flath RA, Black DR, Guadagni DG, McFadden WH and Schultz TH, Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence, *J Agric Food Chem* , **1967**, 15:29-35
- <sup>107</sup> Buttery RG, Ling LC and Light DM, Tomato leaf volatile aroma components, *J Agric Food Chem*, **1987**, 35:1039
- <sup>108</sup> Herrmann K, Die Aromastoffe des Obstes. Teil I: Allgemeine Angaben zu den Aromastoffen, ihren chwellenwerten und ihrer Zusammensetzung. *Erwerbsobstbau*, **1991**, 33:4

- <sup>109</sup> Greger V and Schieberle P, Characterization of the key aroma compounds in apricots (*Prunus armeniaca*) by application of the molecular sensory science concept, *J Agric Food Chem*, **2007**, 55:5221
- <sup>110</sup> Buttery RG, Teranishi R, Ling LC and Turnbaugh JG, Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles, *J Agric Food Chem*, **1990**, 38:336
- <sup>111</sup> Buttery RG, Teranishi R, Ling LC and Turnbaugh JG, Contribution of volatiles to rice aroma. *J Agric Food Chem*, **1988**, 36:1006
- <sup>112</sup> Ferreira V, Lopez R and Cacho JF, Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties, *J Sci Food Agric*, **2000**, 80:1659
- <sup>113</sup> Engel KH, Flath RA, Buttery RG, Mort TR, Ramming DW and Teranishi R, Investigation of volatile constituents of nectarines, *J Agric Food Chem*, **1988**, 36:549
- <sup>114</sup> Byrne DH, Nikolic AN and Burns E, Variability in sugars, acid, firmness, and color characteristics of 12 peach genotypes, *J Am Soc Hort Sci*, **1991**, 116:1004
- <sup>115</sup> Meigh DF and Hulme AC, Fatty acid metabolism in the apple fruit during the respiration climacteric. *Phytochemistry*, **1965**, 4:863
- <sup>116</sup> Song J and Bangerth F, Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharv Biol Technol*, **2003**, 30:113
- <sup>117</sup> IOOC.: Statistic of table olive's world production. **2008**, Available from: [http://www.internationaloliveoil.org/downloads/production3\\_ang.PDF](http://www.internationaloliveoil.org/downloads/production3_ang.PDF).
- <sup>118</sup> Venezia G, Salvo F and Cappello A, *IV quaderno dell'assistenza tecnica e divulgazione Agricola. L'olivo da mensa (cv Nocellara del Belice)*, **1986**, Available online from: <http://www.agriinnovazione.regione.sicilia.it>
- <sup>119</sup> Speroni, E., et al., *Phytother. Res.* **1998**,12, pp. S98-S100.
- <sup>120</sup> Saija, A., et al., **1998**. 'In vitro' evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.*, 166, pp. 123-133.
- <sup>121</sup> Visioli F., et al., **1998**. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, pp. 60-64.
- <sup>122</sup> De la Puerta , R., et al., **2000**. Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory assays. *Z. Naturforsch, [C]* 55, pp. 814-819.
- <sup>123</sup> De la Puerta, R., et al., **1999**. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolic from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.*, 57, pp. 445-449.
- <sup>124</sup> Soler-Rivas, C., et al., **2000**. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 80, pp.1013-1023.
- <sup>125</sup> Renis Harold. In vitro antiviral activity of calcium elnolate. In *Antimicrobial agents and Chemoterapy*, **1969**, pp. 167-279.
- <sup>126</sup> Aziz, N., et al., **1998**. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, 93, pp. 43-54.
- <sup>127</sup> Koutsoumanis , K., et al., **1998**. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurement. *J. Appl. Microbiol.*, 84, pp. 981-987.
- <sup>128</sup> Bisignano, C., et al., **1999**. On the vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51(8), pp. 971-974.
- <sup>129</sup> Tranter ,H. S., Tassou, S.C., et al., **1993**. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, pp. 253-259.
- <sup>130</sup> Gourama, H., Bullerman, L.B. Effects of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Dept. Food Science and Tecnology, University of Nebraska, Lincoln, NE 6858.
- <sup>131</sup> Visioli, F., Galli, C., **1995**. Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease:the potential role of olive oil and minor constituents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 5, pp. 306-314.
- <sup>132</sup> Maimeskulova, L.A., Maslov, L.N., **1998**. Study of antiarrhythmic effect of rhodiola extract and n-tyrosol on experimental arrhythmia models. *Eksp. Klin. Farmakol.*, 61, pp. 37-40.
- <sup>133</sup> Circosta, C., et al., **1990**. Activite Â cardiac vasculaire de jeunes pousses et de feuilles de *Olea europaea L.* et de l'oleuropeine. *Plant. Med. Phytother.*, 24, pp. 264-277.

- <sup>134</sup> Petroni, A., et al., **1995**. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.*, 78, 151-160.
- <sup>135</sup> Trovato, A., et al., **1993**. Hypoglycemic activity of different extracts of *Olea europaea* L. in the rats. *Plant Med. Phytother.*, 26, pp. 300-308.
- <sup>136</sup> Kiritsakis, A., Markakis, P., **1987**. Olive oil: a review. *Adv. Food Res.*, 31, pp. 453-483.
- <sup>137</sup> Relazione Tecnica delle attività svolte dall'unità operativa dell'Università mediterranea di Reggio Calabria. Studio dell'attitudine alla trasformazione sia in verde che in nero delle principali cultivar di olive da tavola siciliane.
- <sup>138</sup> Fernandez-Diez, M.J., **1983**. Olives. In: G. Reed, (Ed.), *Food and feed production with microorganisms*. Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL, pp. 379-397.
- <sup>139</sup> Panagou, E. Z., & Tassou, C.C., **2006**. Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiol.*, 23, pp.738-746.
- <sup>140</sup> Garrido-Fernández, A., **1997a**. Effect of processing conditions on lactic acid bacteria growth in table olive fermentation. *Actes Colloq. LACTIC 97 lactic acid bacteria*, 277-316.
- <sup>141</sup> Panagou, E.Z., Tassou, C.C. and Katsaboxakis, C.Z., **2003**. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the Conservolea cultivar by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agricul.* 83, 667-674.
- <sup>142</sup> Garrido-Fernández, A., Fernández-Diez, M.J. and Adams, M.R., **1997b**. *Table olives: Production and Processing*. Chapman & Hall, London.
- <sup>143</sup> Kawatomary, T., Vaughn, R.H., **1956**. Species of *Clostridium* associated with zapatera spoilage. *Food Res.*, 21, pp. 481-490.
- <sup>144</sup> Plastourgos, S., Vaughn, R.H., **1957**. Species of *Propionibacterium* associated to zapatera spoilage of olives. *Appl. Microbiol.*, 5, pp. 267-271.
- <sup>145</sup> Fleming, H.P., et al., **1969**. Vapour analysis of fermented Spanish-type green olives by gas chromatography. *J. Food Sci.*, 34, pp. 419-422.
- <sup>146</sup> González Cancho, F., et al., **1980**. Formation of propionic acid during storage of green table olives responsible microorganisms. *Grasas Aceites*, 31, pp. 245-250.
- <sup>147</sup> Montaña, A., et al., **1996**. 4-hydroxycarboxylic acid as a substrate for cyclohexanocarboxylic acid production during the zapatera spoilage of Spanish style green table olives. *J. Food Prot.*, 59, pp.657-662.
- <sup>148</sup> McFeeters, R.F., **2004**. Fermentation microorganisms and flavour changes in fermented foods. *J. Food Sci.*, 69, pp. 35-37.
- <sup>149</sup> Kalua, C.M., et al., **2007**. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem.*, 100(1), pp. 273-286.
- <sup>150</sup> Koprivnjak, O., Conte, L., & Totis, N., **2002**. Influence of olive fruit storage in bags on oil quality and composition of volatile compounds. *Food Tech. and Biotech.*, 40, 129.
- <sup>151</sup> Ruiz, J.J., et al., 2005. Quantitative analysis of flavour volatiles detects differences among closely related traditional cultivars of tomato. *J. of Sc. Food and Agr.*, 85, pp. 54-60.
- <sup>152</sup> Sabatini, N., & Marsilio, M., **2008**. Volatile compounds in table olives. *Olea europea* L., Nocellara del Belice cultivar. *Food Chem.*, 107, pp. 1522-1528.
- <sup>153</sup> Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., et al., **1994**. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. & Env. Microbiol.*, pp. 2059-2064.
- <sup>154</sup> Sabatini et al, **2009**. An investigation on molecular partition of aroma compounds in fruit matrix and brine medium of fermented table olives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* Volume 10, Issue 4, pp. 621-626
- <sup>155</sup> Angerosa, F., et al., **2000**. Virgin olive oil odour notes, their relationship with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.*, 68, pp. 283-287.
- <sup>156</sup> Kiritsakis, A.K., **1998**. Flavour components of olive oil – A review. *J. of American Oil Chemist's Society*, 75, pp. 673-681.
- <sup>157</sup> Ridolfi, M., et al., **2002**. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J. of Agr. and Food Chem.*, 50, pp. 835-839.

- <sup>158</sup> Salas, J.J., **2004**. Characterization of alcohol acyltransferase from olive fruit. *J. of Agr. and Food Chem.*, 52, pp. 3155-3158.
- <sup>159</sup> Salas, J.J., et al., **2000**. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other olive fruits. *Progress in Lipid Research*, 39, pp. 151-180.
- <sup>160</sup> Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., Lanza, C.M., Moschetti, G., Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol.*, **2009**, doi: 10.1016/j.fm.2009.09.010.
- <sup>161</sup> www.faostat.fao.org
- <sup>162</sup> www.istat.it
- <sup>163</sup> Bignami, C., Scossa, A. and Vagnoni, G., **2003**, Evaluation of old Italian apple cultivars by means of sensory analysis, *Acta Hort.*, 598:85-90
- <sup>164</sup> Limongelli, F., and Testoni, A., **1984**, Annurca Bella del Sud e Annurca Rossa del Sud, *Atti IVTPA*, 7:139-149
- <sup>165</sup> Lo Bianco, R., M. Policarpo, L. Di Marco, **2004**, Fruit quality of 'Annurca' apple selections in the Sicilian hinterland, *Proceedings of the VII Scientific Days - Annual Meeting of the Italian Horticultural Society, Naples, Italy*
- <sup>166</sup> Borrelli C., **2004**, Mela Annurca, una bontà premiata dall'Igp, *Frutticoltura*, 2:60-61
- <sup>167</sup> Forte V., **1975**. Annurca: una mela da salvare. *Frutticoltura* n. 7-8:23-25
- <sup>168</sup> Fiorito G., **1950**. Annurche e Sergenti nei melai della Campania. *Italia Agricola* n. 1:33-40
- <sup>169</sup> Dimick, P.S., Hoskin, J.C., **1983**. Review of apple flavor. *State of the art. CRC Rev. Food. Sci. Nutr.* 18, 387-409.
- <sup>170</sup> Rizzolo, A., Polesello, A. And Polesello, S., **1992**. Use of headspace CGC to study the development of volatile compounds in fresh fruits. *J. High Resolut. Chromatogr.* 15(7), 472-477.
- <sup>171</sup> Lopez, M.L., Lavilla, M.T., Riba, M., Vendrell, M., **1998<sup>a</sup>**. Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. *J. Food Qual.* 21, 155-166.
- <sup>172</sup> Lavilla, T., Puy, J., Lopez, M.L., Recasens, I., Vendrell, M., **1999**. Relationships between volatile production, fruit quality, and sensory evaluation in 'Granny Smith' apples stored in different controlled atmosphere treatments by multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3791-3803.
- <sup>173</sup> Echeverria, G., Fuentes, M.T., Graell, J., Lopez, M.L., **2003**. Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of 'Fuji' apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* 84, 5-20.
- <sup>174</sup> Lopez, M.L., Lavilla, T., Recasens, I., Riba, M., Vendrell, M., **1998<sup>b</sup>**. Influence of different oxygen and carbon dioxide concentrations during storage on production of volatile compounds by 'Starking Delicious' apples. *J. Agric. Food Chem.* 46, 634-643.
- <sup>175</sup> Sanz, C., Olias, J.M., Perez, A.G., **1997**. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Tomas-Barberan, F.A., Robins, R.J. (Eds.), *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Clarendon Press, Oxford, U.K, 125-155.
- <sup>176</sup> Cunningham, D.G., Acree, T.E., Barnard, R.M., And Braell, P.A., **1986**. Charm Analysis of Apple Volatiles, *Food Chem.* , 19, 137-147.
- <sup>177</sup> Brackmann, A., Streif, J., Bangerth, F., **1993**. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118, 243-247.
- <sup>178</sup> Olias, J. M.; Sanz, L. C.; Rios, J. J.; Perez, A. G., **1992**. Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in 'Golden Delicious' apples. *J. Agric. Food Chem.* 40, 266-270.
- <sup>179</sup> Girard, B.; Lau, O. L., **1995**. Effect of maturity and storage on quality and volatile production of 'Jonagold' apples. *Food Res. Int.* 28, 465-471.
- <sup>180</sup> Buttery, R.G., **1993**. Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruits. In: Acree, T.E., Teranishi, R. (Eds.), *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*, ACS Professional Reference Book, Washington, 259-286.
- <sup>181</sup> Fellman, J.K., Mattinson, D.S., Bostick, B.C., Mattheis, J.P., Patterson, M.E., **1993**. Ester biosynthesis in 'Rome' apples subjected to low oxygen atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 3, 201-214.

- <sup>182</sup> Takeoka G.R., Buttery R.G. And Flath Ra, **1992**, Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *J Agric Food Chem* 40, 1925–1929.
- <sup>183</sup> Echeverria, G., Fuentes, T., Graell, J., Lara, I., Lopez, M.L., **2004**. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biol. Technol.* 32, 29–44.
- <sup>184</sup> Farina V., Avellone G., Filizzola F., Misseri G., **2002**, I composti volatili nei frutti di melo: la SPME-GC/MS nello studio della componente aromatica, *Atti VI Giornate scientifiche SOI, Spoleto, 23-25 Aprile, volume I:295-296*
- <sup>185</sup> Lo Scalzo, R., Testoni, A. and Genna, A., **2001**, 'Annurca' apple fruit, a southern Italy apple cultivar: textural properties and aroma composition, *Food Chem.*, 73:333-343
- <sup>186</sup> Vanoli M., Visai C. and Rizzolo A., **1995**. The influence of harvest date on volatile Composition of 'Starkpur Golden' apples. *Postharvest Biology and Technology* 6, 225–234.
- <sup>187</sup> Alavoine F., Crochon M., Fady C., Fallot J., Moras P., Pech J.L., **1988**, *Methodes pratique d'analyse a cura di Franco Alvisi, Cemagref*
- <sup>188</sup> Pino, J.A.; Marbot, R., Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 5880-5882.
- <sup>189</sup> Whetstine, M.E.C.; Cadwallader, K.R.; Drake, M.A., Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in cheddar cheese, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 3126-3132
- <sup>190</sup> Komes, D.; Ulrich, D.; Lovric, T., Characterization of odor-active compounds in Croatian Rhine Riesling wine, subregion Zagorje, *Eur. Food Res. Technol.*, **2006**, 222, 1-7.
- <sup>191</sup> Takeoka, G.R.; Buttery, R.G.; Teranishi, R.; Flath, R.A.; Güntert, M., Identification of additional pineapple volatiles, *J. Agric. Food Chem.*, 1991, 39, 10, 1848-1851.
- <sup>192</sup> Hashizume M.; Gordon M.H.; Mottram D.S., Light-induced off-flavor development in cloudy apple juice, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 22, 9177-9182
- <sup>193</sup> Osorio, C.; Alarcon, M.; Moreno, C.; Bonilla, A.; Barrios, J.; Garzon, C.; Duque, C., Characterization of Odor-Active Volatiles in Champa ( *Campomanesia lineatifolia* R. & P.), *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 509-516
- <sup>194</sup> Pinto, A.B.; Guedes, C.M.; Moreira, R.F.A.; de Maria, C.A.B., Volatile constituents from headspace and aqueous solution of genipap (*Genipa americana*) fruit isolated by the solid-phase extraction method, *Flavour Fragr. J.*, **2006**, 21, 488.
- <sup>195</sup> Moreira, R.F.A.; Trugo, L.C.; Pietroluongo, M.; de Maria, C.A.B., Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* species) honeys, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 7616-7621.
- <sup>196</sup> Berard, J.; Bianchi, F.; Careri, M.; Chatel, A.; Mangia, A.; Musci, M., Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of "Fontina Valle d'Aosta", a protected designation of origin Italian cheese, *Food Chem.*, **2007**, 105, 293-300
- <sup>197</sup> Nielsen, G.S.; Larsen, L.M.; Poll, L., Formation of aroma compounds during long-term frozen storage of unblanched leek (*Allium ampeloprasum* Var. *Bulga*) as affected by packaging atmosphere and slice thickness, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1234-1240.
- <sup>198</sup> Suárez, M.; Duque, C., Volatile constituents of lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 8, 1498-1500.
- <sup>199</sup> Mondello, L.; Dugo, P.; Basile, A.; Dugo, G., Interactive use of linear retention indices, on polar and apolar columns, with a MS-library for reliable identification of complex mixtures, *J. Microcolumn Sep.*, **1995**, 7, 6, 581-591
- <sup>200</sup> Takeoka, G.; Butter, R.G., Volatile constituents of pineapple (*Ananas Comosus* [L.] Merr.) in Flavor Chemistry. Trends and Developments, Teranishi, R.; Buttery, R.G.; Shahidi, F., ed(s)., *American Chemical Society, Washington, DC*, **1989**, 223-237.
- <sup>201</sup> Varming, C.; Petersen, M.A.; Poll, L., Comparison of isolation methods for the determination of important aroma compounds in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice, using nasal impact frequency profiling, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 1647-1652
- <sup>202</sup> Chen, C.-C.; Kuo, M.-C.; Hwang, L.S.; Wu, J.S.-B.; Wu, C.-M., Headspace components of passion fruit juice, *J. Agric. Food Chem.*, **1982**, 30, 1211-1215
- <sup>203</sup> Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G., Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and



- comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 970, 225-234.
- <sup>204</sup> Fröhlich, O.; Duque, C.; Schreier, P., Volatile constituents of curuba (*Passiflora mollissima*) fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 2, 421-425.
- <sup>205</sup> Ledauphin, J.; Saint-Clair, J.-F.; Lablanquie, O.; Guichard, H.; Fournier, N.; Guichard, E.; Barillier, D., Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 5124-5134
- <sup>206</sup> Humpf, H.-U.; Schreier, P., Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 10, 1830-1832
- <sup>207</sup> Peng, C.T., Prediction of retention indices. V. Influence of electronic effects and column polarity on retention index, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 903, 117-143
- <sup>208</sup> Riu-Aumatell, M.; Lopez-Tamames, E.; Buxaderas, S., Assessment of the Volatile Composition of Juices of Apricot, Peach, and Pear According to Two Pectolytic Treatments, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 7837-7843
- <sup>209</sup> Ha, J.K.; Lindsay, R.C., Mass spectra of butyl esters of volatile branched-chain and other fatty acids occurring in milkfat and meat lipids, *J. Food Comp. Anal.*, **1989**, 2, 118-131.
- <sup>210</sup> Tressl, R.; Friese, L.; Fendesack, F.; Köppler, H., Studies of the volatile composition of hops during storage, *J. Agric. Food Chem.*, **1978**, 26, 6, 1426-1430.
- <sup>211</sup> Baser, K.H.C.; Özek, T.; Demirci, B.; Kürkcüoğlu, M.; Aytac, Z.; Duman, H., Composition of the essential oils of *Zosima absinthifolia* (Vent.) Link and *Ferula elaeochytris* Korovin from Turkey, *Flavour Fragr. J.*, **2000**, 15, 371-372
- <sup>212</sup> Boti, J.B.; Koukoua, G.; N'Guessan, T.Y.; Casanova, J., Chemical variability of *Conyza sumatrensis* and *Microglossa pyrifolia* from Côte d'Ivoire, *Flavour Fragr. J.*, **2007**, 22, 27-31
- <sup>213</sup> Umamo, K.; Hagi, Y.; Nakahara, K.; Shoji, A.; Shibamoto, T., Volatile chemicals identified in extracts from leaves of Japanese mugwort (*Artemisia princeps* Pamp.), *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 3463-3469.
- <sup>214</sup> Bicchi, C.; Rubiolo, P.; Marschall, H.; Weyerstahl, P.; Laurent, R., Constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser essential oil, *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, 40-46
- <sup>215</sup> Robert P. Randriamiharisoa, Emile M. Gaydou, Composition of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) essential oil from Madagascar, *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35 (1), pp 62-66
- <sup>216</sup> K. Jarvinen, H. Suomalainen, *Clin Exp Allergy*, **2001**, 31:978.
- <sup>217</sup> S. Dreborg, *Pediatric Allergy and Immunology*, **1995**, 6:22.
- <sup>218</sup> A. Host, *Annals of allergy, asthma & immunology*, **2002**, 89:33.
- <sup>219</sup> M. Eggesbon, G. Botten, R. Halvorsen, P. Magnus, *Allergy*, **2001**, 56:393.
- <sup>220</sup> H. Meisel, H. Frister, *J. Dairy Res.*, **1989**, 56:343.
- <sup>221</sup> C. De la Reguera, *Arch. Inst. Immunol.*, **1981**, 127:979
- <sup>222</sup> S. Kitagawa, S. Zhang, Y. Harari, G A. Gastro, *Am. J. Med. Sci*, **1995**, 310:183.
- <sup>223</sup> H. Gall, C.M. Kalveran, H. Sick, W. Sterry, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1996**, 97:1304.
- <sup>224</sup> S. Sharma, P. Kumar, C. Betzel, T.P. Singh, *J. of Chrom. B*, **2001**, 756:183.
- <sup>225</sup> S. Elsayed, D.J. Hill, T.V. Do, *Scandinavian Journal of Immunology*, **2004**, 60:486.
- <sup>226</sup> H.A. Sampson, J.M. James, J. Bernhisel-Broadbent, *J. Pediatr.* **1992**, 90:463.
- <sup>227</sup> I. Selo, G. Clement, H. Bernard, J. Chatel, C. Creminon, G. Peltre, J. Wal, *Clin. Exp. Allergy*, **1999**, 29:1055.
- <sup>228</sup> D. De Boissieu, P. Matarazzo, C. Dupont, *J. Pediatr.* **1997**, 131:744.
- <sup>229</sup> G.H. Docena, R. Fernandez, F.G. Chirido, C.A. Fossati, *Allergy* **1996**, 51:412.
- <sup>230</sup> A. Carroccio, F. Cavataio, G. Montaldo, D. D'Amico, L. Alabrese, G. Iacono, *Clin. Exp. Allergy* **2000**, 30:1597.
- <sup>231</sup> A. Carroccio, F. Cavataio, G. Iacono, *Clin. Exp. Allergy*, **1999**, 29:1014.
- <sup>232</sup> R. Wolter, *Riv. SIDI*, **1996**, 2:27.
- <sup>233</sup> V. Dell'Orto, E. Salimei, V. Bontempo, F. Fantuz, P.M. Toppino, G. Contarino, F. Locci, *J. Dairy Sci.*, **1994**, 77:347.
- <sup>234</sup> F. Bonomi, S. Iametti, E. Pagliarini, G. Solaroli. *J. Dairy Res.* **1993**; 61: 419-422.

- 
- <sup>235</sup> J. Godovac-Zimmerman, D. Shaw, A. Conti, H. McKenzie. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1987**; 368: 427-433.
- <sup>236</sup> M. Ikeguchi, S. Kato, A. Shimizu, S. Sugai, *Proteins* **1997**; 27: 567-575.
- <sup>237</sup> J. Jollès, A. Donda, P. Amiguet, P. Jollès, *FEBS Lett.* **1984**; 176: 185-188.
- <sup>238</sup> S. Kaminogawa, H. A. McKenzie, D. C. Shaw, *Biochem. Int.* **1984**; 9: 539-546.
- <sup>239</sup> V. Cunsolo, R. Saletti, V. Muccili, S. Foti, *J. Mass Spectrom.* **2007**; 42: 1162-1174.
- <sup>240</sup> S. Visser, R. Jenness, R. J. Mullin, *Biochem. J.* **1982**; 203: 131-139.
- <sup>241</sup> B. Ochirkhuyag, J. M. Chobert, M. Dalgalarondo, T. Haertle, *Lait* **2000**; 80: 223-235.
- <sup>242</sup> S. Iametti, G. Tedeschi, E. Oungre, F. Bonomi, *J. Dairy Res.* **2001**; 68: 53-61.
- <sup>243</sup> A. S. Egitto, L. Miclo, C. López, A. Adam, J. M. Girardet, J. L. Gaillard, *J. Dairy Sci.* **2002**; 85: 697-706.
- <sup>244</sup> T. Lenasi, I. Rogelj, P. Dovc, Equus caballus s1-casein mRNA, submitted (June 2001) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- <sup>245</sup> D. Milenkovic, P. Martin, G. Guerin, C. Leroux *Gen. Sel. Evol.* **2002**; 34: 509-519.
- <sup>246</sup> J. M. Girardet, L. Miclo, S. Florent, D. Mollè, J.G. Gaillard, *Proteomics* **2006**; 6: 3707-3717.
- <sup>247</sup> M. Kussmann, E. Nordhoff, H.R. Nielsen, S. Haebel et al., *Journal of Mass Spectrom.*, **1997**, 32:593-601
- <sup>248</sup> H. Erdjument-Bromage, M. Lui, L. Lacomis, A. Grewal et al., *J. Chromatogr. A*, **1998**, 826:167-181
- <sup>249</sup> J. Gobom, E. Nordhoff, E. Mirgorodskaya, R. Ekman, P. Roepstorff., *J. Mass Spectrom.*, **1999**, 34:105-116
- <sup>250</sup> R. Siciliano, B. Rega, A. Amoresano, P. Pucci, *Anal. Chem.*, **2000**, 72:408-415
- <sup>251</sup> W. Eigel, *Int. J. Biochem.* **1977**, 8: 187.
- <sup>252</sup> W. Eigel, *Int. J. Biochem.* **1981**, 13: 1081.
- <sup>253</sup> W. Gordon, M. Groves, R. Greenberg, S. Jones, E. Kalan, R. Peterson, R. Townsend, *J. Dairy Sci* **1972**, 55: 261.
- <sup>254</sup> M. Groves, W. Gordon, E. Kalan, S. Jones, *J. Dairy Sci* **1973**, 56: 558.
- <sup>255</sup> P. Guinot Thomas, M. Al Ammoury, Y. Le Roux, F. Laurent, *Int. Dairy Journal* **1995**, 5: 685.