



*Consiglio Nazionale delle Ricerche*

**I.S.A.Fo.M.**

**ISTITUTO PER I SISTEMI AGRICOLI E FORESTALI DEL  
MEDITERRANEO**

**U.O.S Olivicoltura di Perugia**

**Via Madonna Alta 128 - 06128 Perugia**

**RELAZIONE FINALE 2008/09**

**Studio delle anomalie della frazione sterolica  
negli oli vergini di oliva pugliesi**

**Tel.** (+39) 075-5014 511  
**Fax** (+39) 075-5014 547  
C.F. 80054330586  
P.I. 02118311006



# **RELAZIONE FINALE SULL'ATTIVITA' DI RICERCA E SPERIMENTAZIONE IN MERITO ALLO "STUDIO DELLE ANOMALIE DELLA FRAZIONE STEROLICA NEGLI OLI VERGINI DI OLIVA PUGLIESI"**

## **PREMESSA**

Nell'ambito del programma di attività ai sensi del Regolamento CE 2080/05, l'ISAFOM-CNR UOS Olivicoltura di Perugia è stato incaricato di effettuare azioni di ricerca e sperimentazione in merito allo "Studio delle anomalie della frazione sterolica negli oli vergini di oliva pugliesi".

L'indagine, ormai giunta alla terza annualità, è stata condotta su campioni di olio di oliva vergine ottenuti dalle cultivar di "Cellina di Nardò" ed "Ogliarola Leccese" ricadenti nelle aree della Penisola Salentina. L'analisi complessiva dei risultati ci ha permesso di ottenere informazioni su una serie di fattori che possono influire sulla comparsa dell'anomalia sterolica, espressa principalmente con valori di  $\beta$ -sitosterolo totale inferiori al 93% (limite stabilito dal Reg. CE n. 656/95 e 2472/97 per un olio vergine di oliva) e conseguentemente programmare opportune strategie di intervento per migliorare la qualità delle produzioni di olio di oliva pugliese.

Il monitoraggio ha riguardato principalmente i seguenti aspetti:

- Agronomico: è stata analizzata l'influenza dello stadio di maturazione delle olive e del sistema di raccolta utilizzato (albero- terra);
- Stoccaggio delle olive prima della molitura: è stata valutata l'influenza di lunghi periodi di permanenza dei frutti in frantoio prima della lavorazione;
- Genetico: è stato proseguito il monitoraggio di cloni di "Cellina di Nardò" individuati nei precedenti anni di sperimentazione, per valutare se tali genotipi, non affetti da anomalia, avrebbero riconfermeranno la loro composizione sterolica, al fine di selezionare quelli con il più elevato contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale nell'ottica di rendere possibile l'allestimento di un campo varietale per disporre di materiale autoctono superiore da utilizzare come piante madri.

## **MATERIALI E METODI**

### ***Campionamento***

Il campionamento ha riguardato oli e drupe provenienti dalla Penisola Salentina.

I 90 campioni di olio sono stati prelevati dal personale tecnico dell'APROL di Lecce presso frantoi situati in diversi comuni della Provincia di Lecce e ricadenti nelle sei zone oggetto di indagine degli anni precedenti. Gli oli sono costituiti da miscele di Cellina di Nardò ed Ogliarola Leccese ottenuti da frutti raccolti in tre epoche diverse: periodo iniziale della campagna olivicola 2008/2009 (prima decade di novembre), periodo intermedio (prima decade di dicembre) e periodo finale (prima

decade di gennaio) per valutare l'effetto della maturazione della drupa sulla comparsa di anomalie della frazione sterolica. Per ogni epoca di raccolta sono stati reperiti numero 30 campioni di cui metà ottenuti da olive raccolte da terra e metà da olive raccolte dall'albero. Presso le Aziende Agrarie "Monte Piccioli", "Scarpa Esterina" e "Merico Cosimo" sono stati anche prelevati oli ottenuti da piante allevate in irriguo.

Nell'Allegato 1 è riportato l'elenco dei campioni di olio vergine di oliva con le relative informazioni.

Il personale incaricato dell'APROL di Lecce ha inoltre effettuato, nel mese di dicembre, il prelievo di 12 campioni di frutti da piante di "Cellina di Nardò" individuate nel biennio precedente e ritenute più interessanti per assenza di anomalie ed alti contenuti di  $\beta$ -sitosterolo totale (Allegato 2).

Un campione di frutti pari a circa 4 Kg per ogni clone selezionato, una volta pervenuto presso la nostra struttura, è stato prontamente molito con un molino sperimentale, gramolando le paste per un tempo di 30 minuti ad una temperatura ottimale di circa 27°C. Inoltre una parcella di queste olive è stata conservata in cassonetti areati per 9 giorni ed in un ambiente fresco prima di essere lavorata.

### ***Determinazione degli Steroli***

- Estrazione della frazione sterolica.

La metodica è stata dettagliatamente descritta nella precedente relazione.

- Preparazione dei trimetilsilileteri.

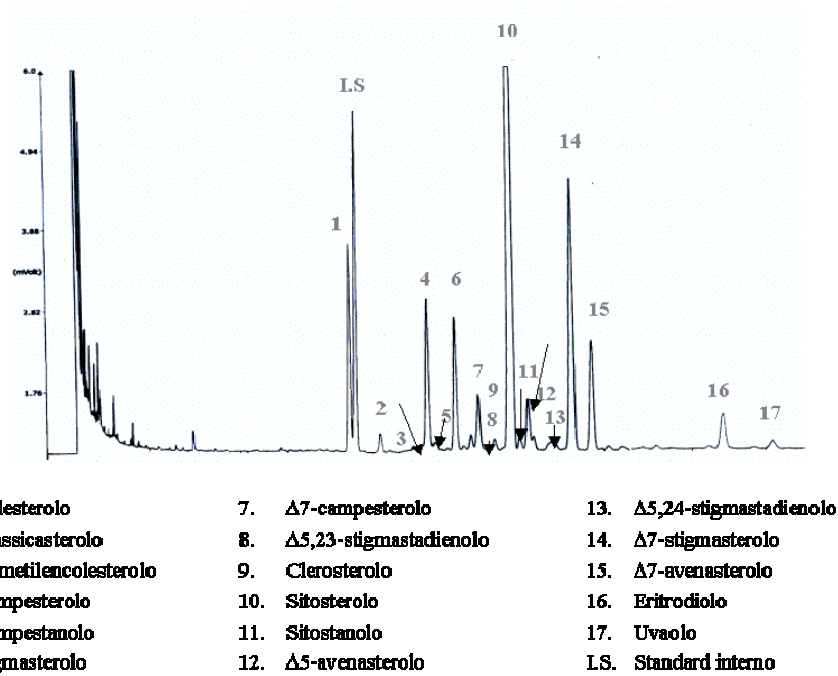
Nella provetta contenente la frazione sterolica si aggiunge il reattivo per la sililazione, costituito da una miscela di piridina-esametildisilazano-trimetilclorosilano 9:3:1 (V/V/V) in ragione di 50  $\mu$ l per ogni milligrammo di steroli, evitando ogni assorbimento di umidità dopo cauta agitazione per favorire la completa solubilizzazione degli steroli. Si lascia riposare per almeno 15 minuti a temperatura ambiente, quindi si centrifuga per alcuni minuti. La soluzione limpida è pronta per l'analisi.

- Analisi gas cromatografica.

La determinazione della composizione percentuale degli steroli avviene tramite analisi gas cromatografica utilizzando una colonna capillare ed operando alle seguenti condizioni:

- temperatura della colonna: 260°C  $\pm$  5°C
- temperatura dell'iniettore: 280°C
- temperatura del rivelatore: 290°C
- velocità lineare del gas di trasporto: elio 20 + 35 cm/s
- rapporto di splittaggio: da 1:50 a 1:100

L'identificazione dei singoli picchi viene effettuata in base ai tempi di ritenzione e per paragone con miscele di TMSE degli steroli, analizzate nelle medesime condizioni. Gli steroli vengono eluiti secondo l'ordine riportato nel cromatogramma della figura 1



**Figura 1.** Cromatogramma relativo alla frazione sterolica di un campione di olio di oliva.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Negli Allegati 3, 4, 5 vengono riportate la composizione percentuale della frazione sterolica, la percentuale di  $\beta$ -sitosterolo totale e il contenuto di steroli totali dei campioni di olio, ottenuti da frutti derivanti da oliveti non irrigati, prelevati nei tre momenti della campagna olivicola 2008/2009. Nelle tre epoche di maturazione considerate, sono state rilevate alcune anomalie nel contenuto percentuale di  $\beta$ -sitosterolo totale e tutte si sono originate esclusivamente in oli ottenuti da olive raccolte da terra. La comparsa del fenomeno ha riguardato il 36,1% dei campioni da frutti cascolati; la data intermedia di raccolta è quella in cui si è registrato il maggior numero di anomalie.

Gli oli derivanti da frutti raccolti dall'albero, in nessun caso, hanno mostrato alterazioni della frazione sterolica e nell'83.3% dei casi la percentuale di  $\beta$ -sitosterolo totale è risultata superiore al corrispettivo olio proveniente da olive cascolate (Allegato 6).

Dai risultati ottenuti appare evidente come la pratica di raccolta delle olive da terra abbia influenzato negativamente il contenuto percentuale in  $\beta$ -sitosterolo totale. La diminuzione di questo parametro negli oli ottenuti da frutti cascolati che, in alcuni casi, ha portato alla comparsa di anomalie, può essere spiegata con l'attivazione di processi di perossidazione lipidica a carico dei costituenti delle membrane cellulari della drupa e quindi degli stessi steroli che può essere accelerata dallo stato di degradazione dei frutti causata dal contatto con il terreno.

Nell' Allegato 7 vengono riportati i valori del contenuto di steroli totali e del  $\beta$ -sitosterolo totale in funzione della maturazione della drupa. Dai dati è emersa una generale tendenza alla diminuzione degli steroli totali con il procedere della maturazione, in particolare se vengono messi a confronto i campioni di novembre e quelli di gennaio. Questo decremento è in accordo con quanto osservato l'anno precedente e confermato da studi presenti in letteratura (Gutiérrez et al., 1999; Salvador et al., 2001).

In merito al contenuto percentuale di  $\beta$ -sitosterolo totale si può notare, anche in questo caso, una generale tendenza al decremento con l'avanzare del grado di maturazione dei frutti; infatti in circa il 62% dei casi il quantitativo percentuale registrato nei campioni di novembre subisce una significativa diminuzione nell'ultima data di prelievo (Allegato 7).

Il periodo di raccolta influisce inoltre sulla percentuale del  $\Delta$ -5-avenasterolo (Allegato 8). Nel 79% dei casi i valori minimi si registrano nella prima data di prelievo e subiscono un aumento tra la seconda e la terza data, evidenziando un incremento di questo sterolo con il procedere della maturazione in accordo con i risultati ottenuti da altri ricercatori (Frega & Lercker, 1985; Gutierrez et al., 1999). Il  $\beta$ -sitosterolo, nel 58% dei campioni analizzati ha mostrato una nella terza data di prelievo una generale tendenza alla diminuzione. Per gli altri steroli (Clerosterolo, Sitostanolo,  $\Delta$ -5-

24 Stigmastadienolo), che concorrono a determinare il contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale, non si evidenziano andamenti particolari legati alla maturazione.

Nell'Allegato 9 vengono presentati i dati relativi all'effetto dell'irrigazione sulla percentuale del  $\beta$ -sitosterolo totale confrontando gli oli ottenuti presso tre aziende che dispongono di oliveti di "Cellina di Nardò" ed "Ogliarola leccese" allevati in asciutto ed in irriguo. Dall'analisi dei dati si evince come la comparsa di anomalie nella percentuale di  $\beta$ -sitosterolo totale si manifesti solo nei campioni ottenuti da frutti raccolti da terra e come tale anomalia sia più frequente nel periodo intermedio della raccolta (dicembre) come quanto già evidenziato per i 72 oli analizzati.

Tra l'asciutto e l'irrigato non sono state evidenziate differenze in relazione alla comparsa di anomalie, in quanto il fenomeno si manifesta in entrambe le tipologie di campioni. Dai dati pluviometrici forniti dal Centro Meteo del Salento e Puglia emerge come le piogge siano state particolarmente abbondanti nei mesi di novembre e dicembre 2008, raggiungendo valori medi di mm di pioggia caduta di circa 2 o 3 volte superiori rispetto a quelli del 2007 (Allegato 10). Quindi l'eccessiva piovosità registrata nell'attuale campagna olearia ha annullato il parametro discriminante tra l'asciutto ed irriguo, in quanto anche gli oliveti non irrigati hanno ricevuto un'abbondante quantità di acqua che li ha equiparati a quelli irrigati, condizionando i dati ottenuti.

La valutazione dell'incidenza del fattore genetico sulla comparsa di anomalie della frazione sterolica è stata effettuata analizzando gli oli provenienti dai cloni di "Cellina di Nardò" individuati e selezionati nei precedenti anni di sperimentazione.

I risultati delle analisi hanno evidenziato che in 4 campioni si sono verificate alterazioni della composizione sterolica, per gli altri le percentuali di  $\beta$ -sitosterolo totale variano del 93,0% al 95,2% (Allegato 11). La comparsa di anomalie e i valori borderline emersi quest'anno possono essere stati causati dal cattivo stato fitosanitario delle olive. Comunque questi cloni verranno automaticamente esclusi dal processo di selezione che riguarderà esclusivamente quelli che hanno mantenuto elevate percentuali di  $\beta$ -sitosterolo totale (maggiori del 94%) come i cloni 2,3,9 e 10.

Una parcella di olive per ogni clone di Cellina di Nardò è stata utilizzata per la valutazione dell'influenza del tempo di stoccaggio sul contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale. Le olive sono state conservate in cassonetti areati per 9 giorni prima di procedere alla seconda molitura (T1). I dati riportati nell'Allegato 12 evidenziano che tutti i campioni hanno subito una diminuzione nel contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale in funzione del prolungato tempo di stoccaggio che va dagli 0.1 agli 1.3 punti percentuali. Oltre agli oli già anomali al T0, si è verificata la comparsa di anomalie in altri 4 cloni (clone 1, 5, 6 e 8) che già in partenza avevano una bassa percentuale di questo parametro.

Questi dati sono un'ulteriore conferma del fatto che un prolungato tempo di stoccaggio delle olive influisce negativamente sulla composizione della frazione sterolica ed è un fattore da tenere in particolare considerazione soprattutto per quegli oli che, seppur ottenuti in tempi brevi, presentano bassi valori di  $\beta$ -sitosterolo totale.

## CONCLUSIONI

La ricerca, ormai al suo terzo ed ultimo anno di attività, ha permesso di ottenere informazioni in merito all' influenza di alcuni parametri sulla comparsa di anomalie nella frazione sterolica degli oli vergini di oliva pugliesi. E' risultato evidente che la manifestazione del fenomeno non è espressione dell'azione di un solo fattore ma la combinazione di più eventi, quali stadio di maturazione del frutto, modalità di raccolta, clima, disponibilità idrica e prolungati tempi di stoccaggio delle olive. Il monitoraggio ha reso possibile approfondire i diversi aspetti e definire corrette strategie di intervento per migliorare la qualità degli oli vergini di oliva salentini per il parametro considerato.

- ❖ Dall'analisi complessiva dei risultati ottenuti in questo triennio di sperimentazione è emerso che le anomalie si sono verificate quasi esclusivamente negli oli ottenuti da olive cascolate. Nei frutti raccolti da terra, il prolungato contatto con il terreno ed uno stato fitosanitario non ottimale ha favorito l'attivazione di processi di perossidazione lipidica a carico dei costituenti delle membrane cellulari della drupa e quindi degli stessi steroli, causando così una diminuzione del contenuto in  $\beta$ -sitosterolo totale.
- ❖ La valutazione dell'effetto dell'irrigazione sulla variazione compositiva della frazione sterolica, come riflesso sullo stato di umidità del suolo, sembra indicare una tendenza a favorire la comparsa di anomalia negli oliveti irrigati in quanto l'umidità presente nel terreno ha favorito la macerazione dei frutti cascolati con conseguente disgregazione cellulare e diminuzione dei composti sterolici appartenenti alla classe del  $\beta$ -sitosterolo totale. Mentre lo scorso anno è stata evidenziata una maggiore incidenza di anomalie negli oli ottenuti da olive raccolte da terra in oliveti irrigati, quest'anno non sono emerse differenze significative tra l'irrigato e l'asciutto essendo i suoli da cui provenivano entrambi le tipologie di campioni ad alto contenuto di umidità. Infatti la campagna olivicola 2008/2009 nei mesi di novembre e dicembre è stata caratterizzata da abbondanti piogge che hanno raggiunto valori medi di mm di acqua caduta di circa 2 o 3 volte superiori a quelli del 2007. Quindi l'eccessiva piovosità potrebbe aver annullato il parametro discriminante tra l'asciutto ed irriguo, in quanto anche gli oliveti non irrigati hanno ricevuto un'abbondante quantità di acqua che li ha equiparati a quelli irrigati condizionando i dati ottenuti.

- ❖ Questo periodo eccezionalmente piovoso, associato ad altri fattori oggetto della nostra indagine, sembrerebbe aver favorito la comparsa di anomalie anche in quelle zone della Penisola Salentina (zone 2-4) non interessate negli anni precedenti e la concentrazione del fenomeno nel periodo intermedio della raccolta (dicembre).
- ❖ I risultati relativi all'influenza dello stadio di maturazione della drupa sul contenuto di steroli totali, del  $\beta$ -sitosterolo e del  $\beta$ -sitosterolo totale hanno mostrato una generale tendenza alla diminuzione di questi tre parametri in particolare se vengono messi a confronto i campioni di novembre e quelli di gennaio. Il periodo di raccolta ha influito anche sulla percentuale del  $\Delta$ -5-avenasterolo determinandone un incremento con il procedere della maturazione in accordo con i risultati ottenuti da altri ricercatori. Per gli altri steroli che concorrono a determinare il contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale non sono state evidenziate variazioni definite legate alla maturazione.
- ❖ Lo studio ha permesso inoltre di accertare che un prolungato tempo di stoccaggio delle olive prima della lavorazione influisce negativamente sulla composizione della frazione sterolica determinando in alcuni casi la comparsa di anomalie anche in quegli oli che, ottenuti da frutti conservati per breve tempo, presentavano un contenuto in  $\beta$ -sitosterolo totale più che accettabile.
- ❖ Relativamente allo studio sul fattore genetico, i risultati delle analisi effettuate nel triennio di sperimentazione hanno permesso di individuare cloni di Cellina di Nardò esenti da anomalia e caratterizzati da un elevato e costante contenuto di  $\beta$ -sitosterolo totale.

I cloni individuati potranno essere propagati per l'allestimento di appositi campi sperimentali al fine di selezionare materiale autoctono migliorato da reintrodurre negli oliveti salentini.

Perugia, 24/03/2009

*Responsabile scientifico*  
(Dott. Maurizio Patumi)

## **BIBLIOGRAFIA**

Gutierrez F., Jimenez B., Ruiz A. & Albi M.A. (1999). "Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1106-1110.

Salvador M.D., Aranda F & Fregapane G. (2001). "Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crops seasons." *Food Chemistry*, 73, 45-53.

Frega N. & Lercker G. (1985). "La composizione dei lipidi della drupe di olivo durante la maturazione Nota II. La frazione in saponificabile". *Agrochimica*, 29, 310-320.