

**Programma di attività ai sensi del Reg. CEE n° 2080/05 per le campagne di
commercializzazione 200/06 – 207/2008**

Relazione tecnico scientifica relativa alla convenzione UNAPROL con il Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti, sezione di tecnologie e biotecnologie degli alimenti, Università di Perugia

Responsabile scientifico: Prof. Maurizio Servili

1. INTRODUZIONE.

L'innovazione tecnologica nel settore olivicolo, vista sia in campo agronomico che tecnologico, volta al miglioramento delle proprietà salutistiche e sensoriali del prodotto, riveste un'importanza strategica nella valorizzazione delle produzioni di oli extravergini di oliva di alta qualità che vedono, in prima fila gli oli di produzione nazionale, ottenuti da cultivar tradizionali italiane. In questo contesto, va osservato che i markers espressione della qualità degli oli extra vergini di oliva sono sempre più riconducibili a parametri strumentali che vanno oltre i termini relativi alla mera qualità merceologica, codificata dai regolamenti Europei. Le norme Europee, infatti, fanno riferimento ad aspetti principalmente legati alla genuinità degli oli estratti dalle olive; elemento questo che, pur rappresentando un elemento di grande interesse anche nei riguardi della sicurezza alimentare, non si traduce, nella maggior parte dei casi, in un elemento di scelta da parte di un consumatore. Questo è particolarmente vero nei riguardi di quella tipologia di consumatore che si mostra sempre più proteso all'utilizzo di prodotti ben caratterizzati sia dal punto di vista sensoriale che salutistico. In questo contesto alcuni componenti minori dell'olio vergine di oliva di alta qualità, quali le sostanze volatili ed in componenti fenolici possono rappresentare dei marker di qualità per quegli oli extravergini di oliva che potremmo definire di eccellenza, cioè per quei prodotti che legano agli aspetti relativi alla qualità merceologica altri fattori compositivi che li rendono sensorialmente e salutisticamente di livello superiore rispetto ai comuni oli extravergini commerciali. In questo contesto è bene avere idee chiare circa l'impatto che alcune variabili di processo di natura tecnologica possono avere sulla composizione in sostanze fenoliche e volatili degli oli extravergini di oliva.

Va quindi ricordato che i composti fenolici idrofili rappresentano i componenti ad attività antiossidante più esclusivi degli oli extravergini di oliva. Infatti, si deve considerare che le

altre sostanze antiossidanti proprie di questi particolari oli quali i tocoferoli e i carotenoidi possono essere presenti anche in altri oli vegetali o grassi animali.

Le sostanze fenoliche idrofile si originano durante il processo di estrazione meccanica dell'olio dai glicosidi secoiridoidi presenti nel frutto dell'oliva quali l'oleuropeina, la demetiloleuropeina ed il ligustroside. L'olio extra vergine di oliva contiene infatti diverse classi di composti fenolici idrofili quali i fenil-acidi, fenil-alcoli e diversi derivati dei secoiridoidi come la forma dialdeidica dell'acido elenoico legata al 3,4-DHPEA, o p-HPEA (3,4-DHPEA-EDA o p-HPEA-EDA), un isomero dell'oleuropeina aglicone e del ligustroside aglicone (3,4-DHPEA-EA, p-HPEA-EA), che sono i più concentrati composti fenolici dell'olio vergine di oliva. Inoltre, sono presenti anche composti appartenenti alla classe dei lignani quali l'acetossipinoresinolo ed il pinoresinolo. Per maggiore comprensione va anche puntualizzato che il composto indicato come p-HPEA-EDA è stato di recente riportato nella letteratura internazionale con il nome di "Oleocantale" (1).

Per quel che concerne le proprietà salutistiche va osservato come, sulla base della ormai vasta letteratura prodotta a livello nazionale ed internazionale su questo argomento, il ruolo attribuito ai composti fenolici idrofili dell'olio extravergine di oliva riguarda la prevenzione delle patologie cardiovascolari ed alla prevenzione di alcune forme tumorali. In questo contesto va precisato come i risultati ottenuti nei riguardi della prevenzione delle malattie cardiovascolari quali eteriosclerosi ed infarto sono state dimostrate anche da valutazioni condotte "in vivo" su modello animale e sull'uomo mentre gli studi relativi alla prevenzione di alcuni tumori quali il tumore del colone e della mammella sono stati condotti per buona parte "in vitro". In ogni caso la vasta letteratura prodotta pone in evidenza le proprietà bioattive in particolare dei derivati dei secoiridoidi quali il 3,4-DHPEA-EDA ed il p-HPEA-EDA (1).

Gli aspetti sensoriali dell'olio extra vergine di oliva sono strettamente legati ai fenoli idrofili, dal punto di vista gustativo, in quanto sono composti d'impatto per le note sensoriali di "piccante" ed "amaro", mentre le sostanze volatili sono alla base dell'aroma dell'olio. Sulle sostanze fenoliche è bene precisare che c'è una relazione diretta tra le note sensoriali di piccante ed amaro, percepite dal consumatore, e l'attività biologica di questi composti. In altre parole i composti responsabili della prevenzione di alcune malattie cardiovascolari e che, sembrano essere coinvolti anche nella prevenzione di alcune forme tumorali, sono le stesse che, a livello sensoriale, trasmettono le note di "piccante" ed "amaro." Parliamo in particolare dei derivati dell'oleuropeina, demetiloleuropeina e ligustroside quali il 3,4-DHPEA-EDA ed il p-HPEA-EDA detto anche Oleocantale. Per quanto concerne le sostanze responsabili dell'aroma dell'olio un ruolo predominante è giocato dai componenti originati dall'attività della

lipossigenasi che comprendono aldeidi sature ed insature a C5 ed a C6, relativi alcoli ed esteri. Questi componenti, che sono di stretta derivazione tecnologica sono decisivi nella definizione delle note aromatiche di “fruttato erbaceo fresco” Fruttato erbaceo maturo” e “floreale” (2).

Le qualità sensoriali e salutistiche dell’olio vergine di oliva sono fortemente influenzate dalle condizioni tecnologiche di produzione ed un ruolo fondamentale è giocato in particolare dalle fasi di frangitura e gramolatura. Queste variabili di processo vanno però inquadrare nel complesso ambito nazionale che prevede un elevato numero di cultivar tradizionali ancora in produzione con differenze compositive della materia prima molto marcate. Ciò comporta il che la tecnologia estrattiva deve essere adattata alla composizione della materia prima al fine di ottenere oli di elevata qualità salutistica ma, al tempo stesso, apprezzati dal consumatore anche sul piano sensoriale.

Da qui la necessità di avere conferma delle differenze compositive del frutto con particolare riferimento alla distribuzione delle attività enzimatiche endogene della drupa ed alla relativa composizione fenolica. Su tali conoscenze si devono basare infatti scelte tecnologiche di base relative alle condizioni di frangitura e di gramolatura.

L’attività di ricerca svolta durante il primo anno di attività ha riguardato l’effetto dei diversi sistemi di frangitura sui markers strumentali relativi alla qualità sensoriale e salutistica degli oli vergini di oliva.

2. MATERIALI E METODI.

2.1. Materiali.

Sono state utilizzate partite di olive (100 kg ognuno) appartenenti a cultivar *Frantoio* e *Coratina* a due diversi stadi di maturazione valutati come indice di pigmentazione secondo *Pannelli et al.* (3). Al momento della lavorazione sono state prelevate aliquote di olive congelate in azoto liquido e liofilizzate. Sulle olive liofilizzate si è proceduto alla separazione delle parti costitutive (polpa, nocciolo e mandorla) Sui liofilizzati veniva valutata sia la frazione fenolica che le attività enzimatiche secondo le metodologie di seguito riportare.

2.2. Estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva.

100 kg di olive tal quali e denocciolate venivano lavorate con un impianto Rapanelli comprendente un decanter a basso consumo d'acqua mod.400 ECO/G. La frangitura veniva effettuata utilizzando diverse tipologie di frangitori, in particolare, un frangitore a martelli (tradizionale), un frangitore a coltelli, un frangitore a basso numero di giri ed un denocciolatore. La gramolatura è stata condotta per 30 minuti ad una temperatura di 25 ° C. Gli oli provenienti dai diversi sistemi di frangitura sono stati separati utilizzando il decanter sopra indicato, filtrati e conservati a 13 °C prima di essere sottoposti ad analisi.

Durante la lavorazione sono state prelevate aliquote di paste frante e paste gramolate, sia tal quali che denocciolate. Le frazioni raccolte erano congelate in N₂ liquido, e in seguito liofilizzate.

Metodi analitici

Valutazione dei parametri merceologici degli oli. La valutazione della qualità merceologica degli oli è stata eseguita determinando l'acidità, il numero dei perossidi, gli indici spettrofotometrici, facendo riferimento a quanto stabilito a riguardo dal regolamento UE n.1989/03 (4).

Valutazione dei polifenoli totali e degli ortodifenoli degli oli. La concentrazione dei polifenoli totali e quella degli *o*-difenoli espressa come mg/kg, è stata valutata con metodo colorimetrico secondo *Montedoro et al.* (5).

Valutazione dei composti fenolici

Valutazione quali-quantitativa delle frazioni fenoliche delle parti costitutive del frutto, delle paste gramolate e dei relativi oli. Dalle olive intere liofilizzate si è proceduto alla separazione del nocciolo e della mandorla. Per l'estrazione dei composti fenolici da polpa, mandorla,

nocciolo, e paste gramolate, è stato messo a punto il seguente metodo: campioni di polpa e mandorla (3 g), noccioli, pasta franta e pasta gramolata (5 g) venivano omogeneizzati per 1 min con metanolo/acqua 80% per due volte. L'omogenato è stato centrifugato a 5000 rpm per 10 min e, recuperato il surnatante, poi è stato concentrato fino ad un volume di 10 ml dal quale è stato prelevato 1ml, passato in cartuccia tipo SPE ed eluito con 50 ml di metanolo. Il solvente è stato poi evaporato completamente. Il residuo è stato solubilizzato con 5 ml di metanolo ed evaporato nuovamente. L'estratto così ottenuto è stato ripreso con 1ml di metanolo, dosato e poi filtrato con filtri da siringa in PVDF 0,2 µm. Per quello che concerne la strumentazione, la colonna e le condizioni di eluizione, si è fatto riferimento al lavoro di *Servili et al.* (6).

L'estrazione dei composti fenolici dall'olio è stata eseguita facendo riferimento al lavoro di *Montedoro et al.* (7), mentre per l'analisi HPLC l'unica differenza introdotta consisteva nell'utilizzo di una colonna Spherisorb ODS1 250 x 4,6 mm con diametro delle particelle di 5 µm.

Per la valutazione dei lignani contenuti in polpa, nocciolo dell'oliva e paste frante e gramolate, è stata utilizzata la colonna Spherisorb ODS1 250 x 4,6 mm con diametro delle particelle di 5 µm. La strumentazione HPLC era costituita da un sistema mod 1100 della Agilent Technologies composto da pompa quaternaria completa di degassatore, autocampionatore, comparto colonne termostato, rivelatore a fotodiodi UV-Vis e rivelatore di fluorescenza, il tutto controllato da ChemStation con la quale è stata eseguita l'elaborazione dei dati cromatografici (Palo Alto CA. USA).

Attività enzimatiche La valutazione delle attività enzimatiche, quali la Polifenolossidasi (PPO), perossidasi (POD), e lipossigenasi (LPO) sulle parti costitutive del frutto e sulle paste dopo frangitura e gramolatura è stata condotta previa ottenimento di una polvere acetonica secondo la procedura riportata in precedenti lavori (8).

Valutazione dei composti volatili

Valutazione dei composti volatili sulla mandorla, sulle paste frante e gramolate e oli.

Dalle olive intere si è proceduto alla separazione della mandorla. La mandorla (2 g) è stata miscelata con carbonato di calcio in rapporto uno/uno per bloccare le attività enzimatiche e stoccata in congelatore a meno 20 ° C. La stessa procedura è stata utilizzata per le paste frante e gramolate. La valutazione dei composti volatili è stata effettuata attraverso gas cromatografia.

È stato utilizzato un Gas-cromatografo Varian 4000 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) fornito di un iniettore split/splitless mod 1079 accoppiato ad un detector di massa Varian Saturn 3 (Varian, Walnut Creek, CA, USA). Per la separazione dei composti, si è utilizzata una colonna capillare in silice fusa DB-Wax-ETR avente una lunghezza di 50 m, 0,32 mm ID ed 1 µm di spessore del film (J & W Scientific, Folsom, CA, USA). Il gas di trasporto impiegato è stato elio ad una pressione di 15 psi con una velocità di flusso costante di 1.7 mL/min ed una velocità lineare di 30,7 cm/sec misurati entrambi a 35° C.

La temperatura del forno GC è stata impostata secondo il seguente programma: temperatura iniziale 35°C, mantenuta per 8 min., poi aumentata fino a 45°C con un incremento di 1,5°C/min, quindi aumentata fino a 150°C con un incremento di 3°C/min, aumentata fino a 180°C con un incremento di 4°C/min di ed infine portata a 210°C con un incremento di 3,6°C/min e mantenuta su questi livelli per 14,51 min: in queste condizioni, il tempo totale dell'analisi è stato di 80 min. L'iniettore è stato sempre mantenuto a 250°C. La temperatura della linea di trasferimento verso il detector di massa è stata fissata a 220°C (9).

Analisi sensoriale

Analisi sensoriale degli oli vergini di oliva L'analisi sensoriale descrittiva quantitativa è stata condotta da un panel addestrato di 8 persone. I campioni di olio venivano posti in bicchieri di assaggio chiari (10g) ed erano analizzati a temperatura ambiente. E' stata utilizzata una scheda di valutazione con scala geometrica strutturata, rappresentata da una linea di 10 cm di lunghezza. I descrittori utilizzati dal panel erano: fruttato, erbaceo, carciofo, fieno, mela verde,

floreale, pomodoro, per gli aspetti relativi agli aromi, mentre pungente, amaro e dolce erano usati per descrivere il gusto (9).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE.

3.1. - Distribuzione della composizione fenolica e delle attività enzimatiche sulle parti costitutive delle drupa.

Per valutare l'apporto delle parti costitutive del frutto sulla composizione fenolica e sulle attività enzimatiche che interagiscono sulla sintesi degli aromi e sulla composizione fenolica dell'olio, sono state prese in esame due cultivar quali la Coratina ed il Frantoio.

3.1.1. Analisi della composizione fenolica delle diverse parti costitutive della drupa.

Dai dati analitici riportati in Tabella 1 che illustrano la valutazione quali-quantitativa della composizione delle diverse parti costitutive dei frutti delle cultivar *Frantoio* e *Coratina* possono essere riportate alcune considerazioni relative all'apporto delle diverse parti costitutive del frutto sulla composizione fenolica complessiva delle paste di oliva ottenute dopo il processo di frangitura o denocciolatura. Va osservato intanto che la parte del frutto a più alta concentrazione fenolica risulta essere la polpa che contiene tra il 93% ed il 97% della composizione fenolica totale del frutto, con variazioni per lo più dovute all'effetto varietale. I maggiori componenti fenolici riscontrabili nella polpa sono i secoiridoidi glucosidi, con particolare riferimento all'oleuropeina, demetiloleuropeina ed al ligustroside. La loro concentrazione è fortemente influenzata dalla cultivar come si osserva dai dati riportati in Tabella 1. Un altro componente particolarmente significativo in termini di concentrazione della polpa è il verbascoside. Anche questo composto risulta essere ampiamente influenzato nella sua concentrazione dal fattore varietale; va però osservato che, allo stato attuale delle conoscenze, non sembra avere un ruolo importante nella definizione della composizione fenolica degli oli vergini di oliva. Infatti, non risulta essere un precursore dei composti fenolici dell'olio come invece lo sono i secoiridoidi glucosidi. L'apporto delle altre parti costitutive del frutto in termini di secoiridoidi e verbascoside, risultano essere di limitata importanza (Tabella1) si deve però osservare come la mandorla oltre a possedere un bassissimo livello di oleuropeina, demetiloleuropeina e verbascoside sia invece caratterizzata, come osservato già in precedenti lavori (Servili et al. 1999) dal nuzhenide che rappresenta di fatto il composto fenolico contenuto nella mandorla a maggiore concentrazione. Si deve però considerare come, anche per questo composto, non sono note interazioni importanti con la composizione fenolica dell'olio. Infatti, non può essere considerato, allo stato attuale delle conoscenze, quale precursore dei secoiridoidi agliconi contenuti dell'olio vergine di oliva.

L'esame HPLC per via fluorimetrica della composizione in lignani delle stesse parti del frutto Tabella 2 permette di evidenziare che mentre il (+)-1-acetossipinoresinolo è localizzato principalmente nella polpa, il (+) pinoresinolo si trova a livelli di concentrazione superiori, riferiti per grammo di peso secco nel nocciolo. La mandorla, invece, è priva di entrambe le frazioni. Questi composti subiscono una riduzione in relazione alla maturazione ma in forma nettamente più contenuta se confrontata a quanto osservato per i secoiridoidi (dati non mostrati). Si deve inoltre osservare che, a livello tecnologico soltanto i lignani contenuti nella polpa possono essere considerati importanti nella definizione del contenuto in tali sostanze del relativo olio. Infatti, anche i sistemi che prevedono la frangitura integrale del frutto non spingono l'effetto meccanico al punto tale da rendere disponibili per il rilascio nell'olio, anche i lignani contenuti nel nocciolo.

Tabella 1. Distribuzione dei Secoridoidi e Cinnamil Derivati (mg/100g) nelle diverse parti costitutive della drupa.

CULTIVAR		3,4 DHPEA	<i>p</i> -HPEA	Nüzhenide	Verbascoside	Ligustroside Glucoside	Oleuropeina	Demetiloleuropeina	
CORATINA	Polpa	I stadio	33,0 ± 3,3	14,9 ± 1,48* -	± -	2921,1 ± 293,1	246,4 ± 0,8	1127,4 ± 112,3	1080,9 ± 109,0
		II stadio	24,3 ± 2,4	15,0 ± 1,5 -	± -	2563,0 ± 256,4	83,6 ± 0,6	845,5 ± 84,5	1010,3 ± 101,2
	Nocciolo	I stadio	10,2 ± 1,2	5,4 ± 0,6 -	± -	27,1 ± 2,8	- ± -	117,4 ± 11,8	51,7 ± 5,2
		II stadio	10,4 ± 1,1	3,1 ± 0,3 -	± -	14,8 ± 1,5	- ± -	110,0 ± 10,9	41,8 ± 4,1
	Mandorla	I stadio	3,6 ± 0,4	27,8 ± 2,8	908,4 ± 90,9	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
		II stadio	3,1 ± 0,3	25,6 ± 2,6	871,1 ± 87,2	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
FRANTOIO	Polpa	I stadio	14,6 ± 1,4	- ± -	- ± -	296,0 ± 29,5	167,2 1,0	3652,0 ± 364,9	- ± -
		II stadio	11,7 ± 1,2	- ± -	- ± -	274,6 ± 27,5	75,0 0,4	2893,9 ± 290,1	- ± -
	Nocciolo	I stadio	7,8 ± 0,8	- ± -	- ± -	73,9 ± 7,5	- ± -	199,8 ± 20,1	- ± -
		II stadio	8,0 ± 0,8	- ± -	- ± -	61,8 ± 6,2	- ± -	152,9 ± 15,1	- ± -
	Mandorla	I stadio	3,6 ± 0,4	18,0 ± 1,8	732,6 ± 73,5	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -
		II stadio	5,9 ± 0,6	13,7 ± 1,4	645,5 ± 65,1	- ± -	- ± -	- ± -	- ± -

* I valori indicati rappresentano la media e la deviazione standard calcolate su tre misure replicate

Tabella 2. Distribuzione dei lignani (mg/100 g) nelle diverse parti costitutive della drupa.

CULTIVAR			(+)-1-Acetossipinoresinolo	(+)-Pinoresinolo
CORATINA	Polpa	I stadio	43,2 ± 0,44*	3,2 ± 0,0
		II stadio	28,1 ± 0,3	1,4 ± 0,0
	Nocciolo	I stadio	18,3 ± 0,2	42,3 ± 0,5
		II stadio	13,6 ± 0,2	38,2 ± 0,4
	Mandorla	I stadio	- ± -	- ± -
		II stadio	- ± -	- ± -
FRANTOIO	Polpa	I stadio	56,4 ± 0,5	4,8 ± 0,0
		II stadio	36,2 ± 0,4	3,4 ± 0,0
	Nocciolo	I stadio	9,5 ± 0,1	48,2 ± 0,4
		II stadio	8,4 ± 0,1	45,0 ± 0,5
	Mandorla	I stadio	- ± -	- ± -
		II stadio	- ± -	- ± -

* I valori indicati rappresentano la media e la deviazione standard calcolate su tre misure replicate

3.1.2. - Distribuzione delle PPO, POD ed LPO nelle parti costitutive della drupa

Al fine di studiare l'apporto delle parti costitutive della drupa in termini d'attività enzimatiche coinvolte nella produzione aromatica e nella definizione del contenuto fenolico degli oli vergini di oliva, la distribuzione della PPO, POD ed LPO è stata studiata nella cultivar Coratina e Frantoio. I risultati riportati nelle Tabelle 3,4 e 5 evidenziano come ci sia una notevole differenziazione, in termini di distribuzione enzimatica relativa alle parti costruttive del frutto. Si può, infatti, osservare come mentre la PPO risulta essere presente pressoché in forma esclusiva nella polpa, la POD, al contrario, mostra elevate attività nella mandorla per entrambe le cultivar studiate. Il dato della LPO, valutata per via spettrofotometrica, e quindi relativa all'incremento a 232 nm dovuto alla formazione di perossidi per via enzimatica, a partire dall'acido linolenico, sembra evidenziare invece una distribuzione differenziata tra la polpa e la mandorla con una netta prevalenza della prima frazione sulla seconda. Questi risultati sembrano essere particolarmente interessanti in quanto confermano alcuni dati preliminari ottenuti dagli stessi autori (10) lavorando su altre cultivars di interesse nazionale ed, al tempo stesso, sembrano giustificare quanto detto in premessa circa l'incidenza della frangitura sulla qualità dell'olio vergine di oliva. Infatti, i risultati ottenuti valutando la distribuzione della POD mostrano come questa, essendo fortemente contenuta nella mandorla, potrebbe essere limitata nel suo trasferimento alle paste di olive in fase di gramolatura, in funzione della tipologia di frangitura operata.

Per meglio evidenziare l'apporto delle parti costitutive sulla via delle lipossigenasi non soltanto dal punto di vista della produzione di perossidi ma anche per quanto riguarda la formazione di aromi, aliquote di polpa e di mandorla, opportunamente frantumate, sono state analizzate via GC-MS per studiare la formazione di aromi. I risultati ottenuti, riportati in Tabelle 6 e 7 sono particolarmente interessanti in quanto evidenziano come le due frazioni del frutto sembrano avere una attività enzimatica differenziata nei riguardi della via della lipossigenasi. Infatti, si può osservare come la produzione aromatica della mandorla sia decisamente inferiore a quella della polpa, in particolare per quanto riguarda la produzione di aldeidi insature a C6, componenti di base dell'aroma di fruttato erbaceo fresco degli oli vergini di oliva di alta qualità. La mandorla sembra produrre invece alcoli a C6. Dai suddetti dati si può supporre che il livello di idroperossido-liasi e di alcodeidrogenasi nella polpa e nella mandorla siano differenziati, elemento questo che potrebbe spiegare la diversa produzione aromatica. Altro assetto molto interessante di questa tipologia di risultati è che l'apporto della mandorla in termini di produzione aromatiche dei componenti responsabili dell'aroma di fruttato erbaceo dell'olio è marginale o addirittura negativo. Infatti, come riportato in

precedenti lavori (1,11), la produzione di alcoli a C6 saturi ed insaturi sembra essere legato non alla nota di erbaceo fresco ma a quella di erbaceo maturo, sicuramente meno apprezzata da parte del consumatore.

Tabella 3. Attività della PPO nelle diverse parti costitutive del frutto.

	U/mg p.s.	Contributo % dell'attività totale della PPO
FRANTOIO		
Polpa	15,45 ± 1.20*	100
Seme	-	0
CORATINA		
Polpa	4,8 ± 0,10	100
Seme	-	0

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

Tabella 4. Attività della POD nelle diverse parti costitutive del frutto.

	U/mg p.s.		Contributo % dell'attività totale della POD	
FRANTOIO				
Polpa	27,35	± 0.21*	59,20	± 0,46
Seme	210,40	± 2,83	40,80	± 0,55
CORATINA				
Polpa	13,10	± 0,71	41,84	± 2,26
Seme	209,45	± 8,41	58,16	± 2,34

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

Tabella 5. Attività della LPO nelle diverse parti costitutive del frutto.

	U/mg p.s.	Contributo % dell'attività totale della LPO
FRANTOIO		
Polpa	2,26 ± 0,2*	81,95 ± 7,26
Seme	6,01 ± 0,80	18,05 ± 2,40
CORATINA		
Polpa	2,67 ± 0,32	81,80 ± 9,80
Seme	7,16 ± 0,87	18,20 ± 2,21

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

Tabella 6. Concentrazione (mg/g) dei composti volatili dello spazio di testa di seme e polpa di olive di Cv. Frantoio .

	SEME			POLPA		
Aldeidi						
2-Pentenale (<i>E</i>)	0,28	±	0,03*	0,74	±	0,06
Esanale	6,39	±	0,55	2,97	±	0,04
2-Esenale (<i>E</i>)	1,22	±	0,46	51,35	±	1,94
2,4-Esadienale (<i>E,E</i>)	0,10	±	0,02	0,49	±	0,02
Alcoli						
1-Pentanololo	0,54	±	0,01	0,57	±	0,08
2-Penten-1-olo (<i>E</i>)	0,03	±	0,00	0,19	±	0,00
1-Penten-3-olo	0,42	±	0,04	2,07	±	0,03
1-Esanolo	0,68	±	0,02	0,34	±	0,02
3-Esen-1-ol (<i>E</i>)	0,01	±	0,00	0,01	±	0,00
3-Esen-1-ol (<i>Z</i>)	0,22	±	0,00	0,79	±	0,03
2-Esen-1-ol (<i>Z</i>)	37,40	±	0,18	24,93	±	1,24

Tabella 7. Concentrazione (mg/g) dei composti volatili dello spazio di testa di seme e polpa di olive di Cv. *Coratina* .

	SEME		POLPA	
Aldeidi				
2-Pentenale (<i>E</i>)	0,16	± 0,02	0,78	± 0,01
Esanale	4,38	± 1,40	3,22	± 1,51
2-Esenale (<i>E</i>)	0,13	± 0,03	44,48	± 0,16
2,4-Esadienale (<i>E,E</i>)	0,00	± 0,00	0,52	± 0,07
Alcoli				
1-Pentanolo	0,39	± 0,06	0,23	± 0,01
2-Penten-1-olo (<i>E</i>)	0,02	± 0,00	0,63	± 0,04
1-Penten-3-olo	0,50	± 0,03	5,45	± 0,15
1-Esanolo	0,31	± 0,06	0,74	± 0,04
3-Esen-1-ol (<i>E</i>)	0,01	± 0,00	0,03	± 0,00
3-Esen-1-ol (<i>Z</i>)	0,16	± 0,02	1,93	± 0,10
2-Esen-1-ol (<i>Z</i>)	14,21	± 2,64	68,82	± 3,35

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

3.1.4. Effetto del processo di frangitura sulla qualità degli oli vergini di oliva.

Sulla base delle informazioni ottenute dalla valutazione della distribuzione in composti fenolici ed attività enzimatiche del frutto, si è voluto studiare come la fase di frangitura, operata utilizzando diversi tipi di frangitore possa avere un impatto sull'attivazione degli enzimi diversamente distribuiti nelle parti costitutive e nel rilascio nell'olio dei composti fenolici. Il principio ispiratore che ha guidato la scelta dei frangitori studiati è stato quello di utilizzare macchine caratterizzate da un diverso impatto sulle parti costitutive del frutto. In particolare si sono messi a confronto frangitori ad effetto indifferenziato sulle parti costitutive quali i frangitori tradizionali a martelli con altre tipologie, tipo il frangitore a coltelli ed il frangitore a basso numero di giri che operano sui tessuti delle diverse parti costitutive del frutto per taglio e non per percussione. Il processo di taglio si dovrebbe tradurre in una energica degradazione dei tessuti della polpa alla quale si unisce però un basso impatto sul nocciolo e soprattutto sulla mandorla. Queste diverse tipologie di frangitori sono state poi messe a confronto con il processo di denocciolatura, considerato per il suo particolare modo di operare, il più selettivo nei riguardi della degradazione dei tessuti del nocciolo e della mandorla.

Sono stati valutati oltre ai parametri relativi alla qualità merceologica alcuni aspetti strettamente legati alla qualità sensoriale e salutistica dell'olio vergine di oliva quali i composti fenolici e la frazione volatile. I dati relativi alle valutazioni merceologiche (Tabelle 8 e 9) evidenziano che non ci sono variazioni significative relative al metodo di frangitura sull'acidità libera e sul K 270, differenze che si osservano invece sul K232 e sul numero di perossidi. Infatti si può osservare come, per entrambi questi valori, ci sia un trend in calo passando dal metodo di frangitura tradizionale, a martelli, ai sistemi che agiscono per taglio, quali il frangitori a coltelli e quello a ridotto numero di giri, per arrivare ad avere i valori più bassi sugli oli provenienti da olive denocciolate. Va osservato che, i sistemi che agiscono per taglio nella fase di frangitura, ed ovviamente, in forma maggiore, la denocciolatura, riducono la degradazione della mandorla limitando, conseguentemente, il rilascio nelle paste di olive, in fase di gramolatura, nell'attività enzimatica in essa contenuta. In questo contesto, i dati riguardanti ai perossidi sembrano suggerire che l'attività enzimatica contenuta nella mandorla e valutata come LPO, per via spettrofotometrica, si limiti alla produzione di perossidi in quanto, contenendo la mandorla un basso livello di idroperossido-liasi, i perossidi che si formano per l'attività della LPO restano in tale stato, senza essere trasformati cioè in composti volatili, modificando quindi nell'olio sia il numero di perossidi che il K232.

Ciò detto i risultati più rilevanti riguardano la frazione fenolica. Infatti i composti fenolici totali (Figure 1 e 2) risultano avere i valori più bassi sugli oli ottenuti con i frangitori a martelli e più elevati in quelli prodotti per denocciolatura. I frangitori a basso numero di giri ed il frangitore a coltelli evidenziano valori intermedi. I dati relativi alla composizione in tocoferoli, invece, non mostrano differenze significative tra le varie tesi testate (Figure 1 e 2).

Per quanto riguarda i risultati relativi all'analisi dei singoli composti fenolici, effettuata per HPLC, (Tabelle 10 e 11) si può osservare come i composti più direttamente influenzati dal sistema di frangitura siano i derivati dell'oleuropeina e della demetilioleuropeina, oltre ai derivati del ligustroside quali il p-HPEA-EDA (oleocantale). Va invece evidenziato come le variazioni relative ai lignani siano molto più contenute. Questo aspetto conferma come il ridotto trasferimento nelle paste di olive della POD, presente nella mandorla, durante la fase di frangitura si traduca in una riduzione dell'ossidazione dei composti fenolici con maggior evidenza per i derivati dell'oleuropeina e del ligustroside che possono essere considerati substrati di elezione sia per la PPO che per la POD.

Il quadro aromatico degli oli evidenzia una differenziazione netta tra gli oli ottenuti per denocciolatura e quelli prodotti utilizzando il frangitore a martelli. In particolare si osserva come gli oli prodotti a partire da paste denocciolate contengano un maggior livello di aldeidi

insature a C6 ed un ridotto contenuto di alcoli insaturi a C6 derivanti dalla via delle lipossigenasi. I risultati ottenuti sugli oli e riportati in Tabella 12 confermano quindi, quanto visto in precedenza dai dati ottenuti dalle paste frante e dall'analisi della produzione aromatica differenziata del tegumento della polpa e del seme, circa la diversa attività dei singoli enzimi, facenti parte della via della LPO, contenuti nelle diverse parti costitutive.

La composizione volatile degli oli provenienti dai frangitori a coltelli e lento, non sembrano invece fornire indicazioni univoche circa il loro impatto sui componenti dell'aroma dell'olio.

L'analisi sensoriale descrittiva quantitativa, riportata in Figura 3 relativo al solo confronto tra gli oli con caratteristiche strumentali estreme e cioè quelli ottenuti mediante frangitore a martelli e quelli relativi alla denocciolatura, conferma alcuni aspetti visti a livello di analisi strumentale in particolare per quanto riguarda la nota di "piccante" ed "amaro" relativa ai composti fenolici e ed alla nota di "erbaceo" relativa alle aldeidi insature a C6. Si osserva, infatti, come gli oli denocciolati, caratterizzati da una elevata concentrazione di derivati dei secoiridoidi e di aldeidi insature a C6, evidenziano anche il più alto livello delle note sensoriali di "piccante", "amaro" ed "erbaceo". Un ulteriore aspetto di indagine ha riguardato il colore degli oli. In questo contesto va osservato che i sistemi di frangitura più energici, tipo il frangitore a martelli hanno permesso di ottenere olio più ricchi di clorofilla (dati non mostrati) se confrontati con i frangitori operati sui tessuti delle olive per "taglio". Questo elemento è giustificato dal fatto che i sistemi che agiscono per "taglio" evidenziano una bassa efficienza sulla degradazione delle cellule della buccia, contenenti la clorofilla, rispetto ai frangitori tradizionali a martelli.

4. CONCLUSIONI

Nel primo anno oltre alla valutazione di alcuni aspetti compositivi del frutto, considerati critici per lo studio dell'effetto del processo tecnologico sulla qualità del prodotto, si è proseguito, su alcune cultivar di interesse nazionale, lo studio di una delle fasi tecnologiche che maggiormente incidono sui parametri di qualità salutistica e sensoriale degli oli vergini di oliva e cioè la frangitura. I risultati ottenuti hanno evidenziato delle differenze relative alla composizione degli oli che mostrano gli scarti maggiori nel confronto tra i dati ottenuti mediante l'uso del frangitore a martelli e quelli relativi ad oli prodotti da paste denocciolate. Le differenze più consistenti si sono osservate a carico della frazione fenolica.

I frangitori che agiscono sui tegumenti del frutto per effetto di "taglio" anziché per percussione hanno mostrato un comportamento intermedio tra martelli e denocciolatura nei riguardi dei marker di qualità degli oli prodotti. Questo aspetto risulta importate da un punto di vista

applicativo in quanto la denocciolatura, seppure interessante sul piano della qualità degli oli e su quello, non meno strategico della valorizzazione dei prodotti secondari dell'estrazione meccanica, si traduce tuttavia in una riduzione delle rese all'estrazione. Elemento questo che, in determinate condizioni di prezzo dell'olio, possono rendere il processo non economicamente applicabile.

I risultati ottenuti con i frangitori a basso numero di giri ed a coltelli permettono invece di conseguire rese all'estrazione simili a quelle ottenute con un frangitore a martelli.

Ciò detto va affermato che il sistema di frangitura deve essere adattato alla tipologia di oliva da trasformare e mirato alla qualità di olio da ottenere. Riguardo all'ottenimento di oli eccellenza dal punto di vista qualitativo, va considerato che la corretta scelta del sistema di frangitura più idoneo alla cultivar ed allo stato di maturazione dell'oliva è solamente un dei parametri critici del processo estrattivo. Un ruolo fondamentale è, infatti, giocato dalle condizioni di gramolatura. Le scelte operative applicate in questa fase permettono, in molto più incisivo di quanto non possa fare la frangitura, di ottimizzare il contenuto in composti fenolici ed in sostanze volatili dell'olio al fine di definire le variabili di processo più idonee in relazione alle forti differenze compositive della materia prima tipiche delle cultivar di olivo Nazionali. Questa ulteriore fase del progetto verrà sviluppata durante il secondo anno di attività.

Tabella 8. Effetto dei differenti tipi di frangitura sui parametri merceologici di base degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Frantoio* a due stadi di maturazione.

	CV Frantoio							
	Primo stadio				Secondo stadio			
	Martelli	Denoccolato	Coltelli +pref.	Lento	Martelli	Denoccolato	Coltelli +pref.	Lento
ACIDITA' %	0.33	0.39	0.36	0.32	0.41	0.37	0.36	0.37
NUMERO DI PEROSSIDI meq O2/Kg	6.98	4.67	6.25	5.59	9.65	7.28	7.80	7.28
K232	1.479	1.336	1.428	1.42	1.358	1.425	1.587	1.424
K270	0.113	0.103	0.114	0.104	0.107	0.112	0.0124	0.012
Δ -K	-0.0015	-0.002	-0.0015	-0.0015	-0.0015	-0.0005	-0.0549	-0.05355

Tabella 9. Effetto dei differenti tipi di frangitura sui parametri merceologici di base degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Coratina* a due stadi di maturazione.

	CV Coratina							
	Primo stadio				Secondo stadio			
	Martelli	Denoccolato	Coltelli +pref.	Lento	Martelli	Denoccolato	Coltelli +pref.	Lento
ACIDITA' %	0.26	0.29	0.22	0.24	0.31	0.29	0.24	0.24
NUMERO DI PEROSSIDI meq O2/Kg	3.52	2.76	4.28	3.31	8.45	3.69	6.29	5.21
K232	1.57	1.449	1.496	1.533	1.586	1.386	1.41	1.375
K270	0.142	0.142	0.132	0.146	0.122	0.114	0.112	0.098
Δ -K	-0.0045	-0.0035	-0.003	-0.0035	-0.004	-0.002	-0.002	-0.002

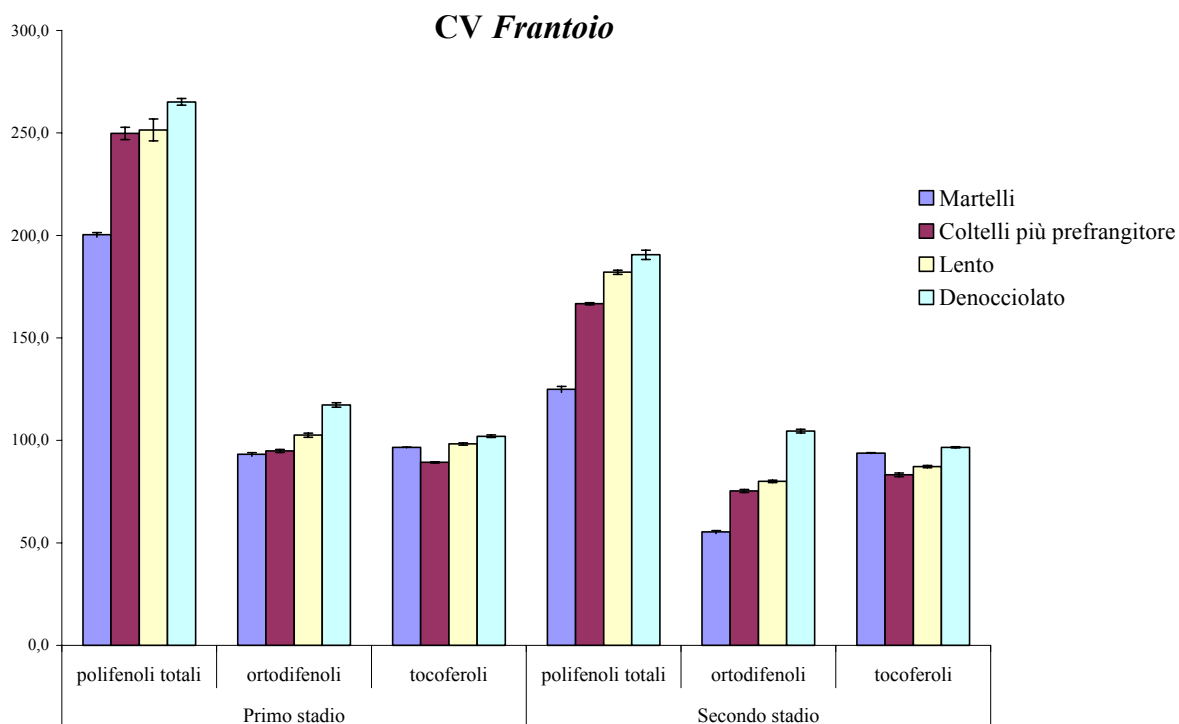


Figura 1. Effetto di differenti tipi di frangitura sulla composizione dei tocoferoli e dei polifenoli totali (mg/kg) degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Frantoio* a due stadi di maturazione.

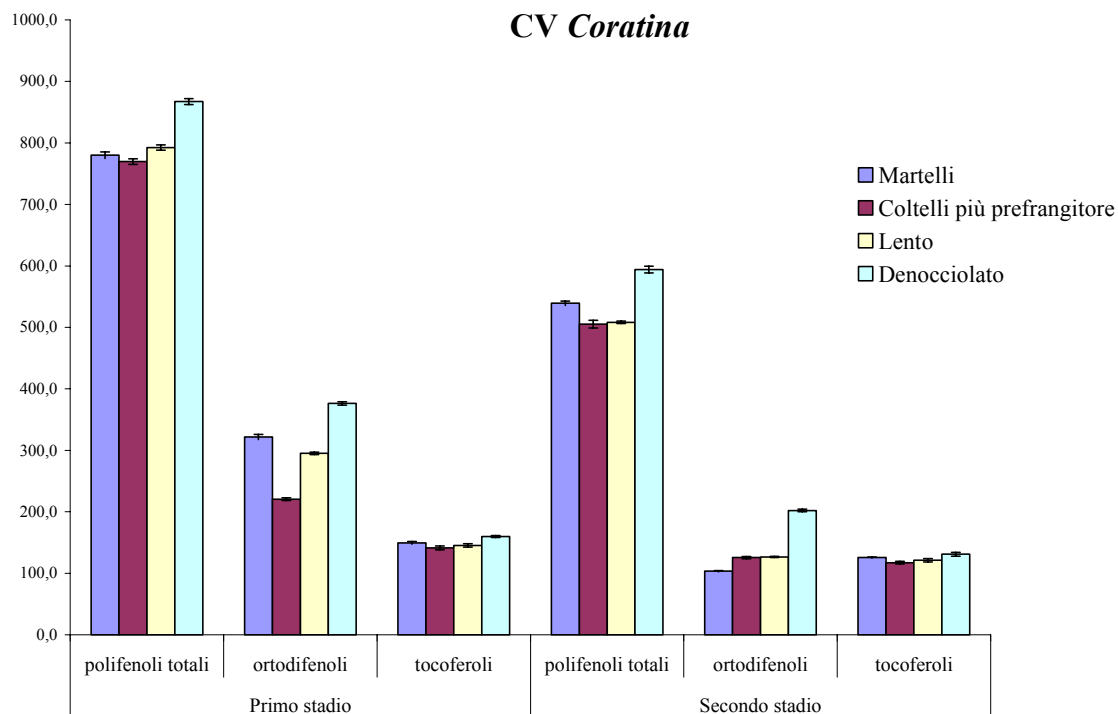


Figura 2. Effetto di differenti tipi di frangitura sulla composizione dei tocoferoli e dei polifenoli totali (mg/kg) degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Coratina* a due stadi di maturazione.

Tabella 10. Effetto dei differenti tipi di frangitura sulla composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Frantoio* a due stadi di maturazione.

	<i>CV Frantoio</i>															
	Primo stadio						Secondo stadio									
	Martelli		Denoccolato		coltelli + pref		Lento		Martelli		Denoccolato		coltelli + pref		Lento	
3,4 DHPEA	1.0	± 0.02	8.0	± 0.06	0.5	± 0.0	2.2	± 0.0	3.4	± 0.15	4.2	± 0.15	1.1	± 0.0	1.1	± 0.3
p-HPEA	11.2	± 0.70	19.8	± 0.03	12.8	± 0.0	16.0	± 0.2	8.4	± 0.30	7.5	± 0.30	13.4	± 0.0	13.8	± 0.3
3-4 DHPEA-EDA	71.8	± 1,9*	98.8	± 1.00	78.8	± 0.1	89.6	± 1.6	35.7	± 1.21	51.6	± 4.21	40.8	± 0.1	44.0	± 1.9
p-HPEA-EDA	54.3	± 0.83	55.4	± 0.90	58.7	± 0.2	60.1	± 0.8	32.2	± 1.50	40.5	± 3.70	39.2	± 0.0	45.2	± 0.9
Acetossipinoresinolo	31.0	± 0.01	43.7	± 1.21	41.9	± 0.0	39.4	± 0.5	26.3	± 1.05	30.9	± 0.22	29.1	± 0.0	31.4	± 0.1
Pinoresinolo	9.8	± 0.07	15.3	± 0.03	11.9	± 0.0	13.8	± 0.3	6.6	± 0.39	8.3	± 0.64	7.6	± 0.0	8.7	± 0.6
3-4 DHPEA-EA	76.0	± 1.10	94.3	± 0.99	93.6	± 0.4	98.5	± 1.2	54.8	± 1.90	65.8	± 4.31	54.6	± 0.3	58.3	± 1.1

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard

Tabella 11. Effetto dei differenti tipi di frangitura sulla composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva ottenuti da cultivar *Coratina* a due stadi di maturazione

	<i>CV Coratina</i>															
	Primo stadio						Secondo stadio									
	Martelli		Denoccolato		coltelli +pref		Lento		Martelli		Denoccolato		coltelli +pref		Lento	
3,4 DHPEA	3.1	± 0.05	4.4	± 0.03	3.1	± 0.0	4.8	± 0.1	4.1	± 0.02	4.2	± 0.23	1.0	± 0.0	3.5	± 0.0
p-HPEA	2.6	± 0.11	2.9	± 0.30	3.9	± 0.1	4.0	± 0.1	4.5	± 0.02	4.9	± 0.23	2.7	± 0.0	8.1	± 0.0
3-4 DHPEA-EDA	452.7	± 1.49	593.5	± 1.99	558.8	± 0.2	563.3	± 0.9	347.0	± 2.81	356.7	± 0.92	350.0	± 0.1	352.0	± 0.5
p-HPEA-EDA	129.0	± 0.50	150.0	± 3.51	140.3	± 0.2	149.5	± 1.3	79.0	± 1.81	102.9	± 0.15	86.5	± 0.1	98.3	± 0.1
Acetossipinoresinolo	17.0	± 0.59	24.4	± 0.20	23.1	± 0.1	25.8	± 0.6	15.7	± 0.90	21.7	± 0.10	22.1	± 0.0	22.4	± 0.1
Pinoresinolo	28.5	± 0.99	32.2	± 0.10	21.5	± 0.0	23.0	± 0.2	16.0	± 0.90	25.3	± 0.10	15.3	± 0.1	12.0	± 0.0
3-4 DHPEA-EA	127.1	± 0.88	147.2	± 6.82	129.5	± 0.7	133.5	± 0.1	94.1	± 0.51	124.1	± 5.31	89.5	± 0.6	95.9	± 0.3

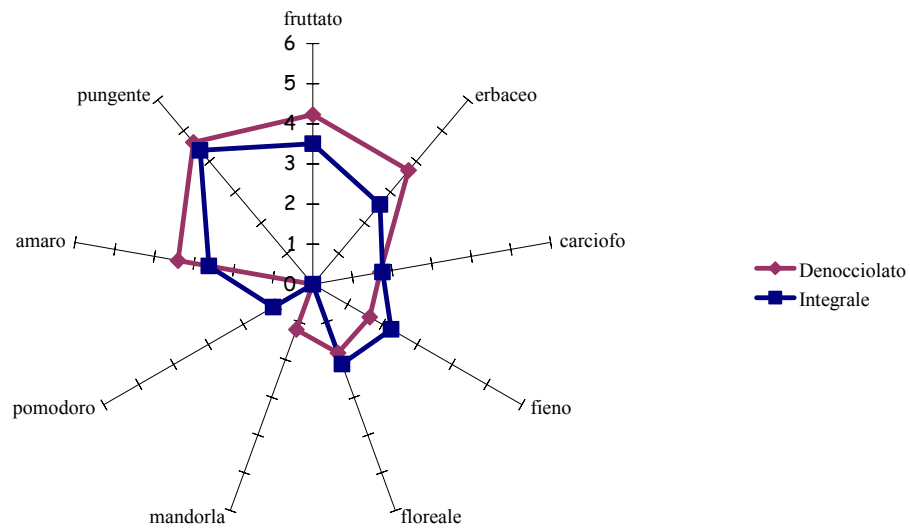
*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard

Tabella 12. Effetto della denocciolatura sulla concentrazione dei composti volatili dell'olio vergine di oliva (mg/Kg).

	<i>CORATINA</i>		<i>FRANTOIO</i>	
	DENOCCIOLATO	TRADIZIONALE	DENOCCIOLATO	TRADIZIONALE
aldeidi				
2-Pentenale- trans	49,4 ± 1,7*	33,0 ± 1,0	35,7 ± 2,6	39,6 ± 2,5
Esanale	877,5 ± 28,50	698,6 ± 57,0	748,4 ± 4,1	834,0 ± 7,9
2-Esenale-trans	33.362,1 ± 64,3	24.083,5 ± 134,1	27.866,1 ± 133,3	24.005,9 ± 90,7
2,4-Esadienale-trans,trans	385,3 ± 7,9	258,4 ± 33,0	256,4 ± 6,1	200,2 ± 22,2
alcoli				
1-Pentanolo	17,1 ± 1,1	98,5 ± 2,1	20,7 ± 1,6	95,4 ± 1,9
2-Penten-1-olo-trans	23,0 ± 2,3	22,7 ± 0,8	12,7 ± 2,0	36,3 ± 1,5
1-Penten-3-olo	324,7 ± 0,8	335,8 ± 1,2	114,5 ± 4,6	285,9 ± 5,6
1-Esanolo	348,5 ± 10,4	1.495,1 ± 24,9	405,0 ± 3,3	1.456,9 ± 1,1
3-Esen-1-olo-trans	7,1 ± 0,1	37,1 ± 2,1	21,4 ± 2,2	44,7 ± 0,4
3-Esen-1-olo-cis	212,9 ± 3,5	252,4 ± 7,31	163,6 ± 6,0	243,1 ± 3,7
2-Esen-1-olo-cis	35.293,8 ± 446,3	169.138,7 ± 3.748,1	64.461,1 ± 653,0	199.119,9 ± 2.059,1

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard

CV Frantoio



CV Coratina

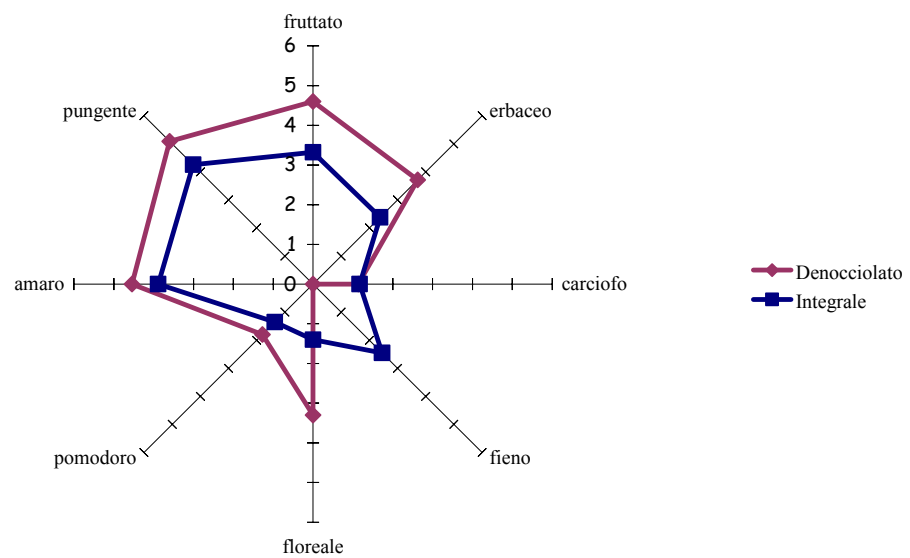


Figura 3. Effetto della denocciolatura sul profilo sensoriale dell'olio vergine di oliva.

4. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Servili M., Selvaggini R., Esposito S., Taticchi A., Montedoro GF., Morozzi G. "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil." *J. Chromatogr. A*, 2004, 1054, 113-127.
- (2) Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro GF. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality *J. Chromatogr. A*, 1054, 17-31.
- (3) Pannelli G., Servili M., Selvaggini R., Baldioli M., Montedoro G.F. (1994) Effect of agronomic and seasonal factors on olive (*Olea europaea* L.) production and on the qualitative characterization of the oil. *Acta Horticulturae*, 356, 239-243.
- (4) Regolamento UE 1831 del novembre 2003 modificante il Regolamento (CEE) n. 2568/91 Gazzetta Ufficiale L. 295/57 13/11/2003.
- (5) Montedoro GF., Cantarelli C. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*. 1969, 46, 115-124.
- (6) Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Macchioni A., Montedoro G.F. (1999) HPLC evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D and 2D-NMR characterization. *J Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 873-882.
- (7) Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Miniati E. (1992) Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1571-1576.
- (8) Begliomini A.L., Montedoro GF., Servili M., Petruccioli M., Federici F. (1995) Oxidoreductases from tomato fruit: inhibitory effect of fungal glucose oxidase. *J. Food biochem.*, 19, 161-173.
- (9) Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Montedoro GF. (2001) . Headspace composition of virgin olive oil evaluated by solid phase microextraction: relationships with the oil sensory characteristics. In: *Food Flavors and Chemistry*, Spanier, A.H. Shahidi, F. Parliament, T.H. Mussiman, C. Ho C.T. Trantas Contis, E. Eds. The Royal Society of Chemistry Publishers, Cambridge, U.K. pp. 236-247.
- (10) Servili M., Taticchi A., Esposito S., Urbani S., Selvaggini R., Montedoro GF. (2007). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7028-7035.
- (11) Servili M., Baldioli M., Begliomini A.L., Selvaggini R., Montedoro GF. (2000) The phenolic and volatile compounds of virgin olive oil: relationships with the endogenous oxidoreductases during the mechanical oil extraction process. In: *Flavour and Fragrance*

Chemistry. Lanzotti V. and Taglialatela-Scafati O. eds. Kluwer Academic Publishers.
Netherlands, pp. 163-173