

Sommario

Riassunto	3
Abstract	5
1. Introduzione	7
1.1 Definizione dei concetti di qualità dell'olio.....	7
1.2 Composizione chimica e proprietà fisiche dell'olio di oliva	11
1.2.1 Composizione in acidi grassi ed idrocarburi	12
1.2.2 Composti antiossidanti	13
1.2.3 Composti organici volatili	17
1.3 Breve descrizione del processo di trasformazione delle olive in olio ..	21
1.4 L'olio velato: aspetti chimico fisici	26
1.5 Il separatore centrifugo verticale	27
1.5.1 Il coefficiente di ripartizione olio-acqua	34
1.6 Aspetti teorici della filtrazione dell'olio di oliva	35
1.7 Le tipologie di filtro più utilizzate.....	37
1.8 La filtrazione e la qualità dell'olio extra-vergine di oliva	40
1.9 Lo stripping per la rimozione dell'ossigeno disciolto	43
2. Scopo della tesi.....	45
3. Materiali e Metodi	47
3.1 Prove relative alla convenzione di ricerca con Nuevo Manantial.....	47
3.2 Prove relative alla misura 124.....	49
3.3 Descrizione del pre-filtro in acciaio	50
3.4 Metodi impiegati	54
3.4.1 Determinazione dell'acidità libera	54
3.4.2 Determinazione del numero di perossidi.....	54
3.4.3 Determinazione delle costanti spettrofotometriche	55
3.4.4 Determinazione della composizione in acidi grassi	56
3.4.5 Determinazione del contenuto di acqua	56
3.4.6 Determinazione del contenuto in tocoferoli	57
3.4.7 Determinazione del contenuto in clorofille.....	57
3.4.8 Determinazione dei biofenoli	58
3.4.9 Determinazione dei composti volatili	58
3.4.10 Panel test	60
3.4.11 Determinazione dei solidi sospesi	62
3.4.12 Determinazione della torbidità	63
3.4.13 Analisi del colore.....	63
2.5 Condizioni di conservazione	63
2.6 Condizioni di stripping.....	66
2.7 Analisi statistica.....	67

3. Risultati	68
3.1 Effetti del separatore centrifugo verticale sulla qualità dell'olio	68
3.2 Effetti della filtrazione su olio proveniente dal decanter	79
3.2.1 Effetti della filtrazione su olio appena prodotto.....	80
3.2.2 Effetti della filtrazione a cartoni durante la conservazione	85
3.3 Addizione di uno step di sgrossatura ad un filtro pressa	100
3.3.1 Test di messa a punto del sistema.....	100
3.3.2 Prove operative con filtro-pressa precedute da pre-filtro.....	103
3.4 Effetti qualitativi dell'addizione del pre-filtro durante la conservazione degli oli.....	111
3.5 Effetti dello stripping in corrente di azoto.....	117
3.5.1 Primo batch di prove: oli provenienti dal separatore	117
3.5.2 Secondo batch di prove: oli provenienti dal decanter	138
Conclusioni.....	153
Bibliografia.....	155

Riassunto

L'olio di oliva in uscita dal decanter non si presenta limpido, bensì tipicamente velato. Esso contiene delle parti solide sospese derivanti dalle drupe ed una certa quantità di acqua. Le sospensioni si organizzano in formazioni colloidali e si comportano come dei “nano-reattori”, che hanno una notevole superficie di scambio, danno luogo a reazioni idrolitiche e possono provocare rapidamente la comparsa di difetti.

Quando si effettua un'operazione di filtrazione, sia questa statica o dinamica, per illimpidire e stabilizzare l'olio, sono proprio queste sospensioni che si intende rimuovere. L'allontanamento, totale o parziale, di queste componenti è normalmente effettuato mediante il separatore centrifugo verticale che, a fronte di indubbi vantaggi operativi, ha però alcuni effetti negativi sulla qualità del prodotto quali il dilavamento dei biofenoli e l'aggiunta di ossigeno disciolto. In particolare la presenza di questo ossigeno può accorciare notevolmente la shelf-life del prodotto. Per migliorare la conoscenza degli effetti prodotti da questo tipo di centrifugazione sono stati condotti degli specifici test su cultivar Coratina ed Arbequina. Tali cultivar non sono ad oggi state studiate sotto questo aspetto, sebbene siano estremamente diffuse nell'olivicoltura mondiale e presentino rispettivamente un'elevata ed una bassa concentrazione di biofenoli, la classe di composti presente nell'olio e maggiormente affetta dal dilavamento da parte dell'acqua di processo del separatore e dall'addizione di ossigeno disciolto. Nei test compiuti sono stati valutati sia gli effetti negativi provocati dal separatore centrifugo verticale, sia i benefici provocati dall'allontanamento, con la tecnica dello stripping, di parte dell'ossigeno disciolto.

In alternativa al separatore centrifugo verticale, nei piccoli frantoi è talvolta effettuata la filtrazione dell'olio proveniente dal decanter con filtro-pressa. Tale pratica appare più rispettosa della qualità degli oli, ma presenta alcune limitazioni economiche legate alle perdite di olio nei setti filtranti ed al loro costo di acquisto e di smaltimento. Tali setti infatti trattengono una parte dell'olio trattato che non può essere recuperate e sono riutilizzabili, ma devono essere sostituiti e smaltiti al termine di ciascun ciclo di filtrazione. Nel corso della presente tesi alcuni

miglioramenti sono stati ottenuti mediante la progettazione di un sistema di pre-filtrazione a cartucce in acciaio da anteporre al filtro-pressa. Queste cartucce sono lavabili e riutilizzabili per molti cicli di filtrazione. Il sistema è stato dimensionato sulla portata del decanter ed è capace di operare in linea con il processo di estrazione dell'olio. E' pertanto in grado di sostituire il separatore centrifugo verticale. La parte in acciaio ritiene, per azione superficiale, la maggior parte dei solidi sospesi, mentre il filtro-pressa ritiene, per effetto di profondità, l'acqua ed i solidi di dimensioni più piccole. In questo modo si è ottenuto un allungamento del ciclo di filtrazione, in quanto la quantità di olio trattabile per ciclo è risultata quasi raddoppiata. Conseguentemente i costi relativi all'acquisto ed allo smaltimento dei setti, nonché quelli legati alla quantità di olio ritenuto si sono quasi dimezzati. Gli effetti sulla qualità dell'olio dell'aggiunta di questo step di pre-filtrazione sono stati valutati immediatamente dopo il trattamento e durante la shelf-life. L'addizione del pre-filtro non ha provocato, nelle condizioni operative scelte, differenze qualitative sul prodotto.

La tecnologia dello stripping per allontanare l'ossigeno disciolto è stata testata sia sugli oli provenienti dal separatore centrifugo verticale, sia sugli oli filtrati in uscita dal decanter. In entrambi i casi è stato somministrato in continuo un gas inerte nella tubazione che conduceva l'olio al recipiente di stoccaggio che ha permesso di dimezzare la concentrazione di ossigeno presente. Sugli oli trattati con il separatore questa tecnica ha garantito una prevenzione delle ossidazioni, migliorando la qualità del prodotto nel tempo. Sugli oli filtrati direttamente dopo il decanter, probabilmente a causa della minore quantità di ossigeno presente nell'olio, lo stripping non ha restituito effetti particolarmente marcati.

Abstract

The olive oil coming from decanter is not clear, but veiled. It contains suspended solids deriving from drupes, as well as a certain amount of water. These suspensions usually organize in colloidal forms, and act as “nano-reactors”. In fact, they have a large reactive surface and they cause hydrolytic reactions which result in sensorial defects.

These suspensions are removed from olive oil with static or dynamic filtrations, performed to make the product more clear and stable. Usually, the removal (total or partial) of these components is carried out with a vertical centrifuge. This machine represents the standard in olive oil extraction as it has many operative advantages. It also has several negative effects on olive oil quality. It decreases the biophenols concentration, and adds dissolved oxygen to the product. Particularly, the latter effect is responsible for a considerable shelf-life reduction. In order to improve the knowledge on the effects of vertical centrifugation we realized some tests on Coratina and Arbequina cultivars. These cultivars are largely grown in the world. In spite of this, there is a lack of research from this perspective. Furthermore, they have, respectively, high and low biophenols contents, which is the main chemical class damaged by the use of processing water in the centrifuge, and by the dissolved oxygen addition. The tests evaluate the negative effects of vertical centrifuge, as well as the advantages of the stripping technique for the removal of dissolved oxygen.

In small olive mill, producing high quality olive oils, to avoid the vertical centrifuge the filtration directly from decanter is performed with filter-presses. This practice seems to be careful of olive oil quality. However, it shows some practical limits due to the oil trapped in the filter sheets (product losses), and to their purchase and disposal costs. In fact, these sheets retain a part of the processed oil, which is not recoverable, and they have to be substituted and disposed at the end of every filtration cycle. During the present thesis work some improvement are obtained with the design of a steel pre-filter to place before the filter-press. The pre-filter works with three steel cartridges, which are washable and re-usable for many filtration cycles. The pre-filter is sized according to the decanter

flow rate and can work on-line with the olive oil extraction process. Furthermore, it can substitute the vertical centrifuge in terms of operative capacity. The steel cartridges retain, with a surface action, the most part of the suspended solids, while the filter-press retains the residual solids and the water with an in-depth action. In this way, the quantity of processed olive oil is almost double for every filtration cycle. Hence, the sheets purchase and disposal costs, and the losses in trapped olive oil are almost reduced by half. The effects on olive oil quality of the steel pre-filter addition have been evaluated immediately after the treatment and during the olive oil shelf-life. We found that the steel pre-filter does not cause any detrimental effect on quality, in the chosen operative conditions.

The stripping technology for dissolved oxygen removal has been tested for olive oil coming from the vertical centrifuge and for olive oil coming from the decanter. In both cases an inert gas was continually distributed during the transfer of the product to the storage tank. It halves in both cases the dissolved oxygen concentration in the treated olive oils. In the oils coming from the vertical centrifuge, stripping prevents part of the oxidations, improving the product quality during the storage. Instead, the use of stripping for oils filtered directly from decanter, did not have the same clear results. This could be due to the lower dissolved oxygen concentration in these olive oils.

1. Introduzione

1.1 Definizione dei concetti di qualità dell'olio

Esistono tanti concetti di qualità dell'olio di oliva, che includono numerosi aspetti legati alla produzione, alla commercializzazione ed all'utilizzo di questo prodotto. Le “principali” di queste qualità sono: la qualità legale, la qualità organolettica, la qualità nutrizionale e salutistica e la qualità ambientale.

La legge definisce gli oli vergini di oliva come quelli “ottenuti dal frutto dell'olivo solo mediante processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni che non causano alterazioni dell'olio, e che non hanno subito alcun trattamento diverso dal lavaggio, decantazione, centrifugazione e filtrazione”, distinguendo questi da quelli ottenuti “mediante solvente o con coadiuvanti ad azione chimica o biochimica o con processi di riesterificazione e qualsiasi miscela con oli di altra natura” (REG. CEE 2568/91). E' pertanto la normativa che discrimina in primo luogo gli oli di qualità diversa sulla base del procedimento con cui sono ottenuti. I primi prendono il nome di oli vergini e, fra questi, quello di qualità più elevata è denominato “olio extravergine di oliva”. I parametri analitici ed organolettici che un olio deve rispettare per potersi fregiare della dicitura “extravergine” sono riportati in tabella 1, 2 e 3.

Tabella 1: principali limiti analitici e di valutazione organolettica per gli oli extravergini.

Parametro	Valore
Acidi grassi liberi (%)	≤ 0.8
Numero dei perossidi (meqO ₂ /kg)	≤ 20
Cere (mg/kg)	≤ 250
Acidi saturi in posizione 2 del trigliceride (%)	≤ 1.5
Stigmastadiene (mg/kg)	≤ 0.15
Differenza ECN42 HPLC e ECN42 (Calcolo teorico)	≤ 0.2
K232	≤ 2.50
K270	≤ 0.22
Delta K	≤ 0.01
Mediana del difetto	$= 0$
Mediana del fruttato	> 0

Tabella 2: limiti relativi alla composizione in acidi grassi per gli oli extravergini

Composizione acidica	Valore
Miristico (%)	≤ 0.05
Linolenico (%)	≤ 1.0
Arachidico (%)	≤ 0.6
Eicosanoico (%)	≤ 0.4
Beenico (%)	≤ 0.2
Lignocerico (%)	≤ 0.2
Somma degli isomeri transoleici (%)	≤ 0.05
Somma degli isomeri translinoleici e translinolenici	≤ 0.05

Tabella 3: limiti relativi alla composizione in steroli per gli oli extravergini

Composizione in steroli	Valore
Colesterolo (%)	≤ 0.5
Brassicasterolo (%)	≤ 0.1
Campesterolo (%)	≤ 4.0
Stigmasterolo (%)	$\leq \text{Camp}$
Betasitosterolo (%)	≥ 93
Delta-7-stigmasterolo (%)	≤ 0.5
Steroli totali (mg/kg)	≥ 1000
Eritrodiolo e Uvaolo (%)	≤ 4.5

Come riportato in Tabella 1, la normativa prevede dei requisiti organolettici minimi per gli oli extravergini: mediana del fruttato maggiore di zero e mediana del difetto uguale a zero. Per la determinazione di queste mediane è previsto l'assaggio mediante panel test e la compilazione di una scheda da parte di un gruppo composto, generalmente, da 8 assaggiatori. La scheda di valutazione che deve essere compilata da ciascun assaggiatore è suddivisa in due macro sezioni: la valutazione dei difetti e la valutazione degli attributi positivi. I difetti riconosciuti sono:

- Riscaldamento e Morchia: sono due flavour che derivano dalla non corretta conservazione delle olive prima della frangitura, ad esempio olive ammassate o comunque conservate in condizioni tali da soffrire fermentazioni anaerobiche (Riscaldamento), o dall'olio rimasto in contatto con fanghi di decantazione, che possono anch'essi dar luogo a fermentazioni (Morchia).
- Muffa e Umidità: sono flavour legati a drupe su cui si erano sviluppati funghi e lieviti a causa della conservazione delle olive in ambienti umidi per periodi prolungati.
- Avvinato: (o inacetito, o acido, o agro) è l'odore legato a processi di fermentazione aerobica delle olive o di resti di pasta di olive che portano alla formazione di etanolo, etil-acetato ed acido acetico.
- Metallico: gli oli ricordano all'assaggio il metallo. E' caratteristico di

quegli oli che sono stati tenuti in contatto con superfici metalliche non trattate correttamente durante la macinatura, gramolatura e lo stoccaggio.

- Rancido: dovuto ad un intenso processo ossidativo subito dagli oli
- Altri: da specificare da parte degli assaggiatori. Fra questi un difetto comune prende il nome di Cotto (o Stracotto), caratteristico degli oli estratti a temperature troppo elevate.

Gli attributi positivi riportati nelle schede di assaggio sono invece tre:

- Fruttato: che rappresenta l'insieme delle sensazioni olfattive, dipendenti dalla varietà delle olive e caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi. Il fruttato si distingue in “verde” e “maturo”, quando le sensazioni olfattive ricordano rispettivamente quelle dei frutti verdi e maturi.
- Amaro: che è il sapore elementare percepito dalle papille caliciformi che formano la V linguale
- Piccante: che è la sensazione tattile pungente che può essere percepita in tutta la cavità orale ed in gola.

Questo tipo di scheda di valutazione è stata sviluppata principalmente con l'obiettivo di mettere in evidenza gli eventuali difetti di un olio e riconoscere un extravergine da un olio di categoria merceologica inferiore. Per evidenziare gli attributi positivi dell'olio di oliva sono state sviluppate altre schede che riportano le sensazioni olfattive maggiormente apprezzate negli oli. Queste schede non sono state standardizzate dalla normativa, come nel caso delle schede di valutazione precedentemente descritte, e riportano in genere distinzioni più fini, ad esempio “frutta a guscio” o “verdura”.

Oltre alle proprietà organolettiche, all'olio di oliva sono attribuiti numerosi effetti benefici sulla salute dell'uomo. Fra questi si possono elencare: la riduzione del rischio di insorgenza di diabete di tipo 2 (Salas-Salvado et al., 2011), dell'insorgenza di infarti ed ictus (Samieri et al., 2011) e di altri benefici legati alle malattie cardiovascolari (Marin et al., 2011), del manifestarsi dell'osteoporosi (Saleh & Saleh, 2011), la protezione dalla depressione (Sánchez-Villegas, 2011) e la protezione dal morbo di Alzheimer (Abuznait et al., 2013; Grossi et al., 2013).

All'olio di oliva è stato infine riconosciuta dall'EFSA (European Food

Safety Authority) la possibilità di riportare in etichetta un health claim specifico che avvisa il consumatore che “i polifenoli dell’olio di oliva contribuiscono alla protezione dei lipidi del sangue dallo stress ossidativo” (EFSA, 2011). Un olio che contiene al suo interno concentrazioni idonee dei composti che determinano questi effetti benefici possiede pertanto una qualità salutistica. Tutte le qualità di cui abbiamo parlato sono legate alla peculiare composizione chimica dell’olio di oliva.

1.2 Composizione chimica e proprietà fisiche dell'olio di oliva

L’olio di oliva è un grasso vegetale alimentare. A temperatura ambiente è un liquido di colore verde o giallo e la sua densità a 20 °C è di 0.917 kg/dm³. Come vedremo in seguito, la densità è una delle proprietà fisiche dell’olio di oliva maggiormente utilizzate nel processo di estrazione, in quanto sia all’interno del decanter, sia all’interno del separatore centrifugo verticale, l’olio è recuperato per effetto della differente densità. La densità dell’olio decresce linearmente all’aumentare della temperatura ed empiricamente è stata ricavata la seguente formula:

$$\rho = (925.59 - 0.41757 T)/1000$$

dove ρ è appunto la densità in Kg/dm³ e T la temperatura in °C. Nel range di temperature in cui l’olio di oliva si trova più frequentemente durante il processo produttivo o durante la filtrazione la densità varia fra gli 0.9235 kg/dm³ a 5 °C e gli 0.9089 kg/dm³ a 40 °C (Peri, 2014).

Una seconda grandezza fisica che ha effetti durante il processo di trasformazione dell’olio di oliva è la sua viscosità. Questa grandezza influenza anche le proprietà sensoriali dell’olio in quanto è spesso percepita come “spessore” dagli assaggiatori. La viscosità è, in generale, una indicazione della resistenza di un liquido a fluire se sottoposto ad uno sforzo di taglio. Anche la viscosità può essere prevista mediante un’equazione ricavata empiricamente:

$$\mu = 1.55 \cdot 10^{-7} \cdot \exp(32167/8.314 T)$$

dove μ è la viscosità espressa in centipoise (cP), mentre T è la temperatura, stavolta espressa in K (Bonnet et al., 2011). Nel range 5 °C - 40 °C la viscosità dell’olio decresce da 155 cP a 38 cP. Tale alta viscosità

richiede basse velocità di flusso. Questo al fine di evitare la formazione di turbolenze che inglobano e disperdono ossigeno all'interno dell'olio di oliva, con effetti negativi sulla stabilità del prodotto nel tempo e sulle caratteristiche sensoriali.

1.2.1 Composizione in acidi grassi ed idrocarburi

Dal punto di vista chimico l'olio di oliva è principalmente composto da trigliceridi, che rappresentano dal 97% al 99% del peso complessivo del prodotto. Sebbene la composizione in acidi grassi dei trigliceridi sia influenzata da molti fattori, ad esempio cultivar, tecniche agronomiche, condizioni pedoclimatiche, ecc., i composti maggiormente rappresentati sono l'acido oleico (55.0% - 83.0%), l'acido linoleico (3.5% - 21.0%) e l'acido palmitico (7.5% - 20.0%) e sono rispettivamente un acido monoinsaturo, un acido polinsaturo ed un acido saturo. La prevalenza dell'acido oleico all'interno dell'olio di oliva lo caratterizza e lo differenzia dagli altri oli vegetali come gli oli di semi, dove prevalgono gli acidi polinsaturi. La composizione in acidi grassi dell'olio di oliva è infine utilizzata a fini di caratterizzazione ed autenticazione dell'origine geografica in quanto l'interazione genotipo-ambiente sembra influenzare fortemente questo parametro (Bosque-Sendra et al., 2012). Il principale cambiamento chimico ed organolettico che avviene nell'olio di oliva durante la conservazione è legato all'auto-ossidazione degli acidi grassi che determina il processo di irrancidimento. L'auto-ossidazione avviene per mezzo di una reazione fra ossigeno ed acidi grassi insaturi, in forma libera o in forma esterificata sul trigliceride. La reazione avviene in tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. La prima fase necessita della presenza di catalizzatori quali luce, metalli e calore che attivano l'acido grasso. Tale attivazione avviene mediante la rimozione di un radicale idrogeno da un atomo di carbonio adiacente ad un doppio legame. Conseguentemente la molecola dell'acido grasso si trova ad avere un radicale carbonio sull'atomo da cui l'idrogeno è stato tolto. Questo radicale allilico è stabilizzato per risonanza da uno shift del doppio legame e dalla formazione di un radicale analogo e simmetrico al precedente. La presenza di una o più insaturazioni pertanto favorisce

questo processo auto-ossidativo. Il radicale allilico può adesso reagire con la molecola di ossigeno andando ad addizionarsi sul carbonio radicalico e lasciando una forma $-C-O-O$ radicalica. Tale forma è in grado di rimuovere un idrogeno da un carbonio di un altro acido grasso adiacente ad un doppio legame formando un gruppo $C - O - O - H$ (cioè un idroperossido) ed un nuovo radicale allilico. La reazione si propaga così a catena. Quando la concentrazione di idroperossidi è particolarmente elevata questi reagiscono fra loro dando composti a catena più corta che portano alla formazione del difetto di rancido. La reazione termina in due modi possibili: mediante la reazione fra due radicali allilici e mediante la reazione con composti antiossidanti, che nell'olio di oliva possono essere tocoferoli o biofenoli (Valitutti et al., 1999).

Oltre alla peculiare composizione acidica, l'olio di oliva contiene una percentuale compresa fra l'1% ed il 3% di composti "minori" che lo distinguono. Fra questi, il più abbondante dal punto di vista quantitativo è lo squalene, presente in concentrazioni comprese fra i 2 g/kg ed i 9 g/kg e rappresenta da solo circa il 90% dei composti idrocarburici contenuti negli oli. Lo squalene è un idrocarburo insaturo formato da 30 atomi di C ed è un precursore di steroli, acidi biliari ed ormoni sessuali. L'olio di oliva presenta concentrazioni di questo composto superiori rispetto agli altri oli vegetali. L'olio contiene inoltre concentrazioni comprese fra gli 1 g/kg ed i 2.5 g/kg di fitosteroli. Fra questi il più abbondante risulta essere il beta-sitosterolo che è presente in concentrazioni superiori al 90% degli steroli totali. Questo composto è ritenuto essere importante per la salute in quanto sembra ostacolare l'assorbimento del colesterolo nell'intestino.

1.2.2 Composti antiossidanti

All'interno dell'olio di oliva sono presenti numerosi composti antiossidanti, sia polari, sia apolari. Le loro proprietà antiossidanti sono legate alla capacità di bloccare una reazione radicalica, come mostrato in figura 1.

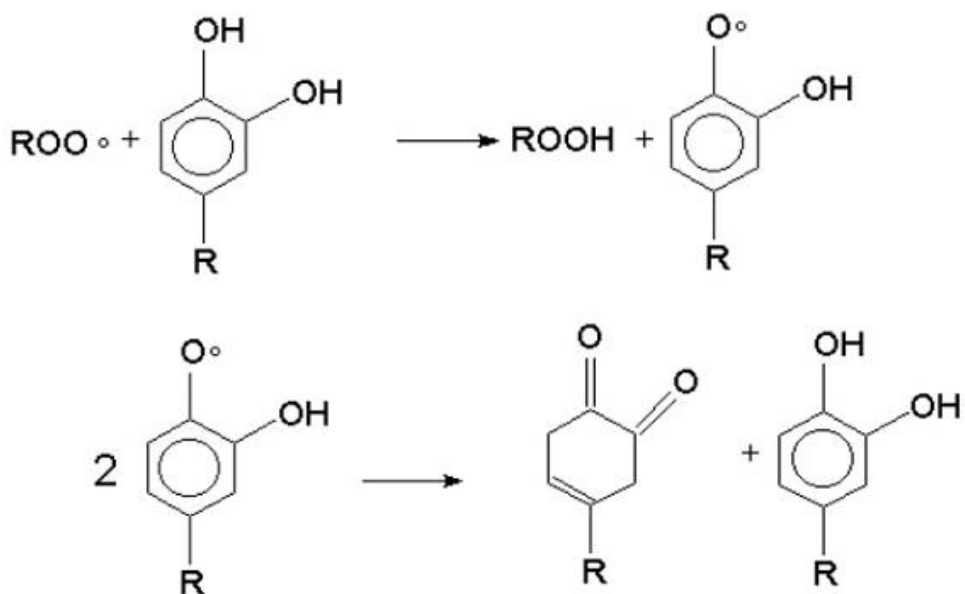


Figura 1: principio di funzionamento dei composti antiossidanti.

Questi composti agiscono per idrogeno donazione, ovvero interrompono la reazione a catena donando un atomo di idrogeno ai radicali perossidi. La stabilità del composto che si viene a formare è data dalla delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'anello e sull'atomo del gruppo – OH. La capacità antiossidante dei composti dell'olio è quindi legata ai due gruppi –OH che possiedono e che conferiscono a queste molecole la capacità reagire due volte con i radicali dando strutture chinoidi coniugate molto stabili.

Fra i composti antiossidanti apolari il più rappresentato è l'alfa-tocoferolo (vitamina E), contenuto in concentrazioni generalmente comprese fra i 150 mg/kg ed i 250 mg/kg. Questo composto è estremamente efficiente nel bloccare le ossidazioni causate dall'ossigeno singoletto. Tale ossigeno si forma nell'olio in presenza di clorofilla che trasferisce l'energia della luce incidente all'ossigeno tripletto (comportamento pro-ossidante). La clorofilla dell'olio agisce invece come antiossidante in assenza di radiazione luminosa (Psomiadou & Tsimidou, 2002).

Fra gli antiossidanti polari invece rivestono particolare importanza i

composti fenolici (o biofenoli). I composti appartenenti alla classe dei biofenoli appartengono a quattro sottogruppi: alcoli e acidi fenolici, flavonoidi, lignani e secoiridoidi (Goulas et al., 2012).

Gli acidi fenolici che si ritrovano nell'olio di oliva sono derivati dell'acido cinnamico e dell'acido idrossibenzoico, ed i più abbondanti sono: acido caffeico, acido gallico, acido vanillico ed acido p-cumarico (Ryan et al., 1999). I flavonoidi presenti nell'olio di oliva sono invece composti come la luteolina e l'apigenina (Bouaziz et al., 2004). I lignani sono invece composti come il pinoresinolo e l'1-acetossipinoresinolo (Lopez et al., 2008). I secoiridoidi sono una classe di composti peculiare dell'olio di oliva, sono rappresentati dall'acido elenolico e dai suoi derivati, e vi si possono trovare sia nella forma libera, come accade per il tirosolo e per l'idrossitirosolo, sia nella forma di esteri derivanti da glucosidi, come l'oleoeuropeina, il ligustroside e il verbascoside. Gli alcoli fenolici principali sono pertanto, secondo la nomenclatura IUPAC, il 4-(2-Idrossietil)-1,2-benzendiolo (3,4-DHPEA o idrossitirosolo) e il 4-(2-idrossietil)-fenolo (p-DHPEA o tirosolo); questi sono presenti in concentrazioni piuttosto basse in oli di recente produzione, ma la loro frazione tende ad aumentare nel periodo di conservazione a causa dell'idrolisi dei composti secoiridoidi che li contengono (Montedoro et al., 1992).

Le forme glucosidiche di oleoeuropeina, dimetiloleoeuropeina e ligstroside, originano poi le forme agliconiche di oleuropeina e ligstroside quali 3,4-DHPEA-EDA (forma dialdeidica aperta dell'acido decarbossimetilelenolico legato al 3,4- diidrossifeniletanolo), p-HPEA-EDA (forma dialdeidica aperta dell'acido decarbossimetilelenolico legato al p-idrossifeniletanolo) e 3,4-DHPEA-EA (oleuropeina aglicone). Nella drupa sono presenti prevalentemente secoiridoidi di natura glucosidica, che vengono convertiti nell'olio a secoiridoidi agliconici. Oleuropeina e dimetiloleuropeina glucosidiche sono precursori del 3,4-DHPEA-EDA, il ligstroside invece origina il p-HPEA-EDA. L'impatto sul profilo sensoriale di questi composti è legato alle note di amaro e piccante in particolare al 3,4- DHPEA-EDA ed al 3,4-DHPEA-EA è stata attribuita la nota amara (Tovar et al., 2001), mentre al p-HPEA-EDA sono state riconosciute anche sensazioni di piccante (Andrewes et al., 2003).

L'oleoeuropeina, inoltre, si degrada col passare del tempo ad idrossitirosolo (composto non amaro), in tal modo si arriva ad un cambio di sapore dell'olio. All'interno della classe dei secoiridoidi avvengono alcune reazioni di degradazione, si passa quindi da composti a maggior peso molecolare a composti con peso molecolare più basso. Queste reazioni, sia di natura enzimatica che non, sono classificabili essenzialmente come idrolisi ed ossidazioni. Tali reazioni avvengono durante il processo di trasformazione e sono strettamente influenzate sia dal trattamento fisico meccanico sia dalle condizioni di lavorazione. I secoiridoidi glucosidici (oleuropeina, dimetiloleuropeina e ligstroside) possono essere infatti idrolizzati ad agliconi ad alto peso molecolare quali 3,4-DHPEA-EA e p-DHPEA-EA. In questa fase le reazioni di idrolisi sono catalizzate dall'enzima -glucosidasi. I composti ottenuti sono o ulteriormente idrolizzabili alle loro forme dialdeidiche e da queste poi a forme dialdeidiche dei carbossimetil agliconi a medio peso molecolare (3,4-DHPEA-EDA e p-DHPEAEDA). Una ulteriore idrolisi ci restituirà i gli alcoli fenolici quali il 3,4-DHPEA ed il p-DHPEA. Tutte le sostanze con peso molecolare inferiore o uguale a quello degli agliconi sopracitati sono inoltre ossidabili sia con reazioni enzimatiche mediante polifenolossidasi e perossidasi, sia con reazioni squisitamente chimiche mediante sostanze radicaliche presenti nel mezzo. Al fine di ottenere un olio qualitativamente pregiato, le reazioni di idrolisi sono inizialmente considerate positivamente in quanto gli agliconi a medio peso molecolare che si formano possiedono le sopracitate proprietà sensoriali ed antiossidanti. Inoltre la forma agliconica presenta una maggiore affinità alla fase lipidica rispetto a quella glicosidica e pertanto sposta il coefficiente di ripartizione acqua-olio verso questa seconda fase, andando quindi ad aumentare la concentrazione di questi composti nell'olio stesso durante la fase estrattiva.

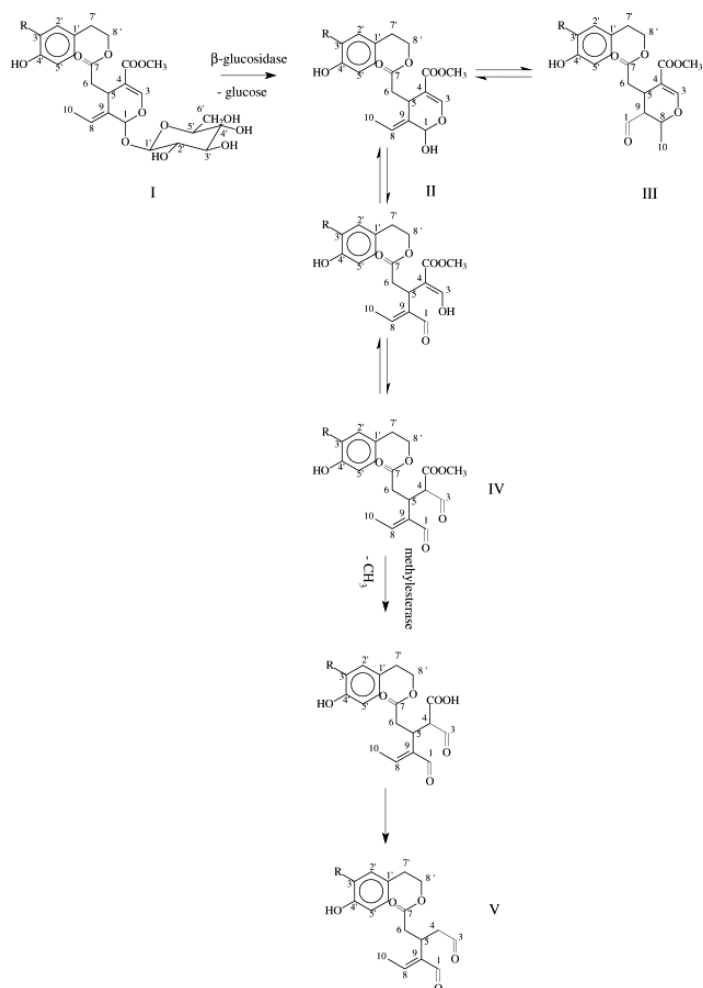


Figura 2: Probabile meccanismo di azione della β -glucosidasi da Servili et al. (2004)

Le reazioni di ossidazione, le quali avvengono principalmente durante la fase di gramolazione, portano ovviamente ad una diminuzione del patrimonio antiossidante dell'olio.

1.2.3 Composti organici volatili

Nell'olio sono presenti anche numerosi composti volatili i quali

chimicamente appartengono a varie classi: composti carbonilici, alcoli, esteri ed idrocarburi. La formazione di questi composti è legata a varie vie metaboliche; tra cui le più importanti sono la via della lipossigenasi, il metabolismo degli acidi grassi, la conversione a partire da amminoacidi, la fermentazione di zuccheri, l'autossidazione e la rottura omolitica dei 13 idroperossidi. Fra tutti i composti identificati nell'olio di oliva, alcuni sono associati ad attributi positivi: l'1-penten-3-one (amaro, piccante, erbaceo, pomodoro), il cis-2-penten-1-ol (fruttato, mandorla), il trans-2-hexenal (erbaceo, mela), il cis-3-hexenil-acetate (noce, fiori, banana), il trans-2-pentenal (noce), l'hexanal (mandorla, noce, banana), l'hexil-acetate (noce, piccante), l'1-penten-3-ol (dolce, fruttato), l'hexan-1-ol (pomodoro) e il trans-2-hexen-1-ol (dolce, fiori). Altri invece sono associati a caratteristiche sensoriali sgradevoli come il 2-methyl butanal (malto, cereali), il 3-methyl butanal (malto, cereali), il 2-methylpropan-1-ol (dolce aromatico), il 2-(+)-3-methyl-propan-1-ol (avvinato, legnoso) ed il propanoic acid (acido, piccante) (Luna et al., 2006).

Parlando di oli di qualità, la via di formazione di questi composti che riveste la maggiore importanza è quella della lipossigenasi (LOX pathway). Di particolare importanza per l'aroma sono i composti a 5 e 6 atomi di carbonio, con menzione speciale per le aldeidi con catena lineare, sia sature sia insature. Questi composti sono prodotti appunto con la LOX pathway a partire dagli acidi linoleico e linolenico. La formazione di composti di questo tipo avviene per via enzimatica a partire da acidi grassi insaturi quali l'acido linoleico (LA) e l'acido linolenico (LnA). Si ha una prima reazione catalizzata dalla lipossigenasi (LOX) stessa, che porta alla formazione del 9- e del 13-idroperossido dell'acido linoleico e dell'acido linolenico. Un secondo enzima, la idroperossido liasi (HPL), catalizza la rottura della molecola C18 in 3 aldeidi C6 di cui una insatura. L'aldeide insatura è in equilibrio fra la forma cis-3 e la più stabile trans-2. L'enzima alcoldeidrogenasi (ADH) può inoltre ridurre tali composti nell'alcol corrispondente. Ulteriori modificazioni a carico di queste molecole possono essere introdotte grazie all'alchil acetil transferasi (AAT), capace di produrre esteri. In figura 3 sono schematicamente riportati i passaggi sopra elencati per la formazione dei composti a 6 atomi di carbonio che possiamo ritrovare nella parte destra dell'immagine.

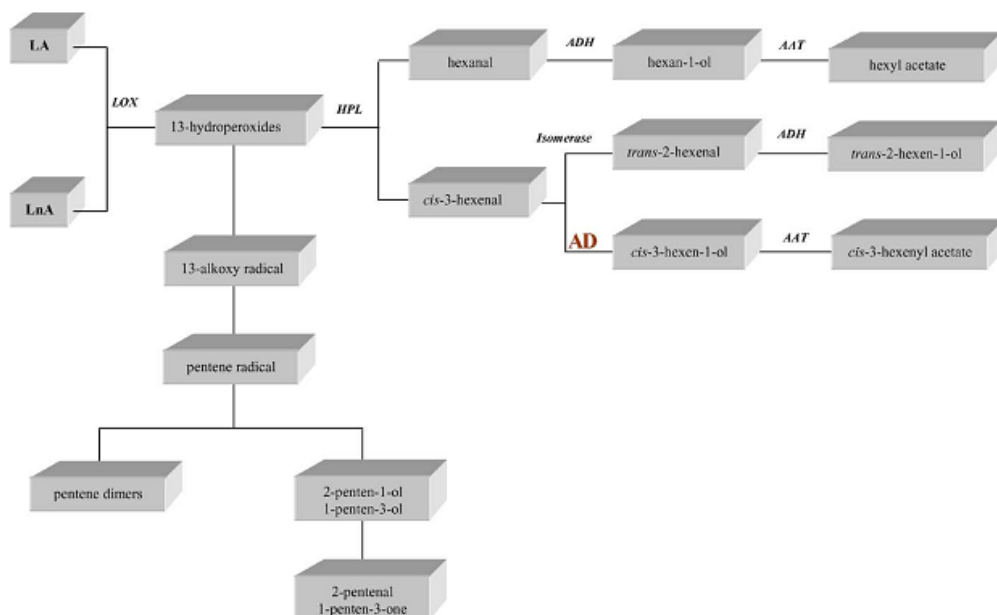


Figura 3: schematizzazione della via della lipossigenasi per la produzione di composti a 5 e 6 atomi di carbonio. Da Angerosa et al. (2004).

Per quanto riguarda la biosintesi dei composti C5 il substrato di riferimento è solo l'acido linolenico ed a partire dal 13-idroperossido si può formare, secondo una certa costante di equilibrio, un alcossiradiale che si stabilizza nell'1,3- pentene radicale. Questo prodotto può dimerizzare e formare un prodotto a 10 atomi di carbonio noto come pentene dimero, oppure andare ad associarsi ad un idrossiradiale presente nel mezzo per formare due alcoli a 5 atomi di carbonio, ossia il 2-penten-1-olo e l'1-penten-3-olo. Questi ultimi due composti possono essere ossidati per via enzimatica ai corrispettivi composti carbossilici, ossia un'aldeide, il 2-pentenale, ed un chetone, l'1-penten-3-one. La via della conversione degli amminoacidi restituisce invece composti generalmente poco apprezzati dal punto di vista sensoriale. Questi composti sono stati correlati in maniera particolare ad amminoacidi quali valina, leucina ed isoleucina. È da precisare che, solitamente, si formano composti di questo tipo quando abbiamo a che fare con materiali di partenza danneggiati, in cattivo stato sanitario o malconservati. Per quanto riguarda poi i parametri relativi al processo estrattivo si nota come

temperature elevate o tempi lunghi possano favorire queste vie biosintetiche (Angerosa et al., 2004).

Gli attributi negativi sono codificati da regolamento CEE e sono legati principalmente a processi di lipolisi, che inizia quando l'olio è ancora nei frutti, e di ossidazione, che invece ha luogo a partire da quando l'olio è prodotto. In particolare i difetti più frequenti negli oli sono 4: riscaldamento, morchia, avvinato e rancido. Il riscaldamento è legato alla conservazione delle olive ammassate in ambienti ricchi di umidità ed all'azione di micro-organismi appartenenti al genere *Aspergillus* e ad ascomiceti come *Penicillium notatum*. Questi hanno la capacità di ossidare gli acidi grassi liberi e formare metil chetoni volatili come il 2-eptanone ed il 2-nonanone. In queste condizioni possono svilupparsi anche alcuni lieviti (*Candida*, *Pichia*, *Saccharomices*). Gli oli con il difetto di riscaldamento presentano, nel proprio profilo aromatico, composti a 8 atomi di carbonio che non appaiono nel profilo di oli privi del difetto. Inoltre in questi oli si ha una ridotta concentrazione di E-2-esenale ed una maggiore quantità di esanale. Questo avviene a causa dell'azione degli enzimi fungini su tali composti (Schnurer et al. , 1999).

Un difetto simile al riscaldamento, ma legato alle fermentazioni che avvengono negli oli, è quello di morchia. I micro-organismi coinvolti cambiano a seconda della lunghezza della conservazione in quanto si ritrovano batteri dei generi *Aerobacter* ed *Escherichia* all'inizio, mentre prendono il sopravvento i generi *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Serratia* in tempi più lunghi. Negli oli con questo difetto si ritrovano concentrazioni più elevate di esteri come il butanoato di etile, il propanoato di etile e l'acetato di butile, oltre alla serie di acidi organici da 2 atomi di carbonio (acetico) ad 8 atomi (acido ottanoico).

Il terzo difetto legato a fermentazioni è quello di avvinato, dovuto a batteri lattici ed acetici. I principali composti legati all'attività metabolica dei micro-organismi, in questo caso, sono etanolo, acetato di etile ed acido acetico, oltre all'1,3-butandiolo e la serie degli acidi da 2 a 7 atomi di carbonio.

Il difetto legato all'ossidazione è invece il rancido. Si caratterizza per la presenza di aldeidi prodotte dall'ossidazione degli acidi grassi insaturi: 2-ottenale, 2-eptenale e 2-decenale, considerati i composti a maggiore

impatto per la generazione di questo difetto. L'ossidazione produce anche aldeidi saturi come: esanale, nonanale, ottanale, pentanale e eptanale (Morales et al., 2005).

1.3 Breve descrizione del processo di trasformazione delle olive in olio

Il processo di trasformazione delle olive in olio avviene in sei step principali, che hanno un marcato effetto sulle caratteristiche qualitative dell'olio. Le prime operazioni sono preparatorie e consistono nel conferimento, nel lavaggio e nella defogliazione delle olive. Successivamente queste vengono frantumate per l'ottenimento di una pasta (frangitura), che è poi rimescolata al fine di aumentare la dimensione delle gocce di olio (gramolazione). La pasta è infine centrifugata, prima con una centrifuga orizzontale per la separazione dell'olio dalla parte solida e dall'acqua e, in un secondo momento con una centrifuga verticale, per un ulteriore illimpidimento. Nell'ultimo step del processo l'olio è filtrato.

La fase di frangitura ha subito, negli ultimi trenta anni, un'evoluzione che ha comportato un cambiamento nel modo di estrarre l'olio in quanto si è passati da sistemi di frangitura discontinui, quali le molazze, ai frangitori continui a martelli ed a dischi. Questa fase rappresenta una criticità per la qualità dell'olio estratto meccanicamente in quanto, durante questo processo, si attiva il patrimonio enzimatico endogeno, quindi le vie metaboliche della beta-glicosidasi e della lipossigenasi. Tali vie sono alla base delle caratteristiche organolettiche e della qualità salutistica dell'olio vergine di oliva. Se da un lato la frangitura determina l'avviamento di queste vie metaboliche "positive", dall'altro attiva anche i complessi enzimatici che hanno un'attività negativa quali le polifenolossidasi e le perossidasi. Tali enzimi catalizzano le reazioni di ossidazione che avvengono durante la successiva fase di gramolatura. Questi enzimi sono distribuiti in forma diversa nelle parti costitutive della drupa; in particolare, le perossidasi e le lipasi sono maggiormente contenute nella mandorla, le polifenolossidasi sono presenti quasi esclusivamente nel mesocarpo, mentre le lipossigenasi sono diffuse in tutte le parti costitutive del frutto.

I frangitori ad oggi maggiormente utilizzati sono macchine di modesto ingombro, con capacità lavorativa di circa (1,5-2,0 ton/h), caratterizzate dalla continuità del lavoro di frantumazione. Gli organi frangenti, formati in lega metallica, possono essere a rulli dentati o scanalati, che ruotano in senso opposto con diversa velocità angolare oppure possono essere costituiti da martelli fissi o snodati montati su un disco metallico ruotante ad alta velocità (1000- 3500 giri al minuto), all'interno di una griglia forata che regola la granulometria della pasta di olive. Il tutto è avvolto da un cilindro opportunamente sagomato. Tra i frangitori continui vanno annoverati i frangitori a martelli che sono stati storicamente i primi ad essere introdotti in alternativa alle molazze. Queste macchine hanno alcuni grossi vantaggi che sono da ricondurre alla elevata capacità lavorativa, al basso ingombro ed ai bassi costi di impianto. Nel contempo, però, presentano alcuni inconvenienti che riguardano il forte effetto emulsionante sulla pasta di olive prodotta ed un incremento della sua temperatura, dovuto a fenomeni di attrito. L'innovazione tecnologica in fase di frangitura va verso l'uso di macchine di tipo continuo ma con l'introduzione di corpi battenti che aggiungono all'effetto di percussione, tipico dei frangitori a martelli, quello di taglio. Questo può tradursi in una riduzione della degradazione del tegumento della mandorla e quindi in una limitata attivazione delle perossidasi endogene in essa contenute. In questo contesto, si inquadra l'introduzione di altri sistemi di frangitura quali il frangitore a denti ed il frangitore a coltelli. Quest'ultimo esercita un effetto di frangitura selettivo sulle parti costitutive del frutto operando un'efficiente degradazione della polpa ed una ridotta azione frangente sia sulla buccia che sulla mandorla (Caponio et al., 2003).

Un altro punto critico del processo di estrazione meccanica dell'olio è rappresentato dalla gramolatura. Le gramolatrici sono costituite essenzialmente da una vasca in acciaio inox munita di una camicia esterna per la circolazione dell'acqua e contenente all'interno uno o più bracci sagomati, deputati ad un lento rimescolamento della pasta di olive. A seconda dell'orientamento dell'asse di rotazione, queste macchine possono essere classificate in miscelatori orizzontali e verticali, anche se, in base a ragioni tecniche ed economiche, quelli orizzontali sono più spesso utilizzati (Cini et al. 2006, Migliorini et al. 2008). L'operazione di

lento rimescolamento, unitamente al riscaldamento della pasta (25-35 °C) provoca la rottura dell'emulsione acqua-olio, consentendo alle goccioline oleose di riunirsi in gocce più grosse che si separano più facilmente dalla fase acquosa nel successivo processo di estrazione. Anche nella fase di gramolatura si verificano forti modificazioni a carico dei componenti minori. Il risultato è strettamente connesso alla gestione simultanea di due variabili: la temperatura e la durata dell'operazione. Numerosi lavori sono stati condotti per studiare l'effetto della variazione di questi due parametri sulla composizione fenolica ed aromatica degli oli vergini d'oliva. E' noto che le condizioni di gramolazione possono modificare le concentrazioni della componente fenolica (Ranalli et al. 2001, Servili et al. 2003) degli oli e di conseguenza, errate condizioni di miscelazione possono compromettere le proprietà salutistiche e organolettiche del prodotto.

Le elevate temperature ed il prolungamento del tempo di gramolatura determinano un abbattimento della concentrazione in sostanze fenoliche ed una riduzione del contenuto in composti organici volatili dell'olio. Durante la fase di gramolatura, infatti, la concentrazione di queste sostanze diminuisce consistentemente nelle paste, negli oli e nei sottoprodotti dell'olio, proporzionalmente al tempo ed alla temperatura di processo. La perdita di questi composti, imputabile alla combinazione di un'ossidazione enzimatica e di una autocatalitica, si traduce, come precedentemente descritto, in una perdita del valore salutistico dell'olio ed in una modificazione delle sue caratteristiche gustative.

Generalmente, la resa di estrazione dell'olio aumenta con l'aumentare del tempo di gramolazione pasta di olive, tuttavia, questo incremento determina la perdita di alcune caratteristiche nutrizionali se lo spazio di testa delle gramole contiene ossigeno. Molti autori hanno studiato l'effetto del tempo di gramolazione sulla resa di estrazione dell'olio (Aguilera et al. 2010, Hermoso Fernandez et al., 1998; Kalua et al. 2007). In particolare Amirante et al. (2001) hanno studiato l'influenza del tempo di gramolazione (30, 45 e 60 min) a tre diverse temperature (27, 32 e 35 °C) sulle rese di estrazione dell'olio. Le curve della resa di estrazione in funzione del tempo, e delle tre temperature, hanno mostrato una distribuzione a campana. Questi risultati indicano, che inizialmente l'aumento di del tempo di gramolazione migliora la resa di estrazione per

l'azione di enzimi endogeni in grado di degradare le pareti cellulari ma dopo aver raggiunto il massimo valore la curva di resa di estrazione diminuisce con l'aumentare del tempo di gramolazione a causa della formazione di emulsioni per l'azione di mescolamento. Questi risultati erano in accordo con Ranalli et al. (2003) che hanno registrato un calo dei rendimenti della resa in olio a partire da 60 a 75 min. L'effetto della temperatura sulla qualità dell'olio prodotto è stato approfondito da diversi autori (Angerosa et al, 2001;. Kalua et al, 2006.; Lercker et al, 1999;. Parenti & Spugnoli, 2002; Parenti et al. 2008; Ranalli et al, 2001.; Servili et al., 2003). Gli studi riportano però risultati e opinioni contrastanti. Infatti alcuni hanno trovato concentrazioni polifenoliche maggiori nell'olio gramolato a temperatura maggiore (Boselli et al. 2009, Parenti et al. 2000), mentre altri hanno trovato una relazione inversa tra temperatura e concentrazione dei polifenoli (Angerosa et al, 2001; Servili et al, 2003b; Kalua et al. 2007). Inoltre un eccessivo riscaldamento della pasta di olive può comportare altri effetti, quali la perdita di composti volatili. Va quindi puntualizzato come la corretta gestione di questi parametri sia uno degli aspetti più importanti del rapporto tra tecnologia e qualità degli oli vergini di oliva. Ad ogni modo, le elevate temperature, così come i lunghi tempi di gramolatura compromettono irrimediabilmente l'assetto aromatico e fenolico degli oli, traducendosi in una perdita della nota aromatica di fruttato ed in una drastica riduzione della concentrazione in sostanze fenoliche.

Per quanto riguarda la separazione dell'olio dalle altre componenti presenti nel sistema (acqua e sansa), diversi sono i principi utilizzati: pressione, centrifugazione, filtrazione selettiva o tensione superficiale. I primi due metodi risultano essere impiegati autonomamente, perché esaustivi, mentre il terzo è abbinato alla pressione o alla centrifugazione. Attualmente, nei paesi mediterranei, la maggior parte dell'olio vergine di oliva viene estratto per centrifugazione. L'idea di sfruttare la centrifugazione diretta del prodotto della frangitura delle olive per separarne l'olio risale alla fine del XIX secolo, quando si diffusero le prime centrifughe nei vari campi dell'industria alimentare. Nel settore oleario, quest'idea determina un nuovo indirizzo nell'estrazione che si contrappone alla pressione della pasta del sistema classico di lavorazione.

Va però osservato come i primi brevetti operativi risalgono al 1956 con il brevetto Corteggiani, seguito nei primi anni sessanta, da una serie di aziende produttrici di macchine olearie. La macchina, definita anche decanter, è composta da un tamburo conico ad asse orizzontale all'interno del quale ruota, a velocità leggermente inferiore, un cilindro a vite senza fine che, funzionando come coclea, allontana la parte solida. Negli ultimi anni si è verificata una notevole evoluzione tecnologica di questo sistema di estrazione al fine di ridurre la quantità di acqua utilizzata nella lavorazione. Sotto quest'ultimo aspetto, le centrifughe possono essere classificate in tre gruppi:

- centrifughe tradizionali a tre fasi (acqua, olio e sansa), caratterizzate da una quantità d'acqua di diluizione compresa tra 0,5 e 1,0 m³ per ton. di olive;
- centrifughe a due fasi (olio e sansa umida), che possono lavorare senza aggiunta di acqua e non producono acque di vegetazione come sottoprodotto del processo di estrazione dell'olio;
- centrifughe a tre fasi che necessitano di un basso livello di acqua di addizione (dette in maniera impropria decanter a due fasi e mezzo), compreso tra 0,2 e 0,3 m³ per ton.

Le centrifughe tradizionali a tre fasi permettono la separazione dell'olio dall'acqua di vegetazione, producendo sansa vergine con umidità compresa tra il 50% ed il 55%. Il procedimento prevede una diluizione delle paste per facilitare la separazione olio-acqua di vegetazione, con un rapporto di diluizione compreso tra 1:0,5 ad 1:1 e cioè da 50 a 100 litri di acqua di fonte per 100 kg di pasta da centrifugare. Questo comporta, oltre all'accumulo di grandi quantità di acqua di vegetazione da smaltire (70-120 litri di acqua di vegetazione per 100 kg di pasta di olive), una riduzione della qualità dell'olio principalmente dovuta al dilavamento, operato dall'acqua aggiunta, dei composti fenolici presenti all'interno dell'olio, con riduzioni imponenti di questa frazione. L'evoluzione di questa macchina ha portato alla produzione di centrifughe a due fasi ed a "due fasi e mezzo". Gli oli estratti usando questi nuovi sistemi sono caratterizzati da una concentrazione fenolica più alta rispetto a quelli estratti con il tradizionale processo di centrifugazione, poiché si riduce la perdita di questi composti idrofili nelle acque di vegetazione.

1.4 L'olio velato: aspetti chimico fisici

L'olio di oliva in uscita dal decanter non si presenta limpido, bensì velato. Esso contiene delle parti solide sospese derivanti dalle drupe ed una certa quantità di acqua. Il contenuto di acqua che si ritrova negli oli appena prodotti è approssimativamente dello 0,5% in peso. La parte solida è composta da una frazione non trascurabile di azoto (0,6% sul peso secco) molto probabilmente di natura proteica. Inoltre contiene polifenoli, fosfolipidi e zuccheri presenti come glicosidi o legati alle proteine stesse. Chimicamente questi composti hanno carattere anfifilico, quindi presentano una parte affine alla fase lipidica e una parte polare più affine alla fase acquosa. Tali composti, tendono ad aggregarsi all'interfaccia fra l'acqua dispersa e l'olio. In questo modo tali aggregati possono esporre la parte più affine ai lipidi verso l'olio ed inglobare l'acqua, per minimizzare i contatti fra la fase polare e l'olio stesso. Si vengono così a formare delle associazioni colloidali che hanno la forma di “reverse micelles” o di lamelle, conformazioni favorite dal punto di vista energetico, che conferiscono all'olio appena prodotto il tipico aspetto velato (Papadimitriou et al., 2013). Le “reverse micelle” hanno questo nome perché presentano un nucleo idrofilico stabilizzato da un singolo strato di tensioattivi, al contrario di quanto avviene normalmente per le micelle. Le dimensioni di questo nucleo, quindi delle micelle, solitamente crescono all'aumentare del contenuto di acqua. Tali micelle sono aggregati dinamici che si muovono seguendo i moti browniani dell'olio e possono scambiare il loro contenuto acquoso. Dato che le micelle presentano un'alta superficie di scambio fra olio ed acqua, e su tale superficie è permessa la coesistenza di composti chimici solubili in acqua ed in olio, queste si comportano in maniera molto efficiente da “nano-reattori”. Le lamelle sono invece strati consecutivi di acqua ed olio separati da un layer di tensioattivi opportunamente orientati (Xenakis et al., 2010). L'effetto del mantenimento in sospensione di queste sostanze sulla qualità dell'olio è discusso nel paragrafo 1.9.

1.5 Il separatore centrifugo verticale

Il separatore centrifugo verticale è la tecnologia più diffusa per l'illimpidimento dell'olio mosto proveniente dal decanter. Praticamente ogni frantoio che lavora in continuo è dotato di questo dispositivo. Il separatore illimpidisce l'olio allontanando dalla fase liquida molte delle impurità presenti, grazie alla differenza di peso specifico. Il principio fisico di funzionamento consiste nella diminuzione del tempo di sedimentazione che si ottiene sostituendo all'accelerazione gravitazionale un'accelerazione centrifuga fornita dalla macchina. Infatti la velocità di sedimentazione con l'accelerazione gravitazionale è regolata dalla legge di Stokes:

$$V_c = d^2 (ps_1 - ps_2) g / 18\eta$$

dove:

- V_c è la velocità di sedimentazione
- d è il diametro equivalente delle particelle da rimuovere
- $ps_1 - ps_2$ la differenza di peso specifico delle sostanze da separare
- g è l'accelerazione gravitazionale (9.81 m/s^2)
- η è la viscosità della fase liquida

Nel separatore verticale il termine g è sostituito dalla velocità angolare di rotazione della centrifuga al regime di n giri al minuto elevato al quadrato, moltiplicato per il raggio della centrifuga. L'equazione di Stokes per il calcolo della velocità di sedimentazione nel separatore centrifugo verticale diviene quindi:

$$V_c = d^2 (ps_1 - ps_2) (2\pi n / 60)^2 r / 18\eta$$

I separatori centrifughi lavorano a velocità di rotazione approssimativamente di 6000-6500 giri al minuto attorno al proprio asse. Le particelle da separare si muovono perpendicolarmente al piano di decantazione e si depositano rapidamente sulla parete del recipiente. La velocità di rotazione di esercizio consente una sedimentazione fino a 20000 volte più rapida di quella ottenibile con l'accelerazione gravitazionale, con evidenti vantaggi dal punto di vista della capacità operativa. La centrifuga, dopo una breve fase di lag dovuta al riempimento della camera di lavoro con il liquido da illimpidire, lavora in

continuo ed è in grado, mediante l'abbassamento di un otturatore a comando idraulico, di “sparare” (nel gergo di frantoio l'operazione prende il nome di sparo) all'esterno i sedimenti separati. All'interno del corpo centrale è presente un rotore ad asse verticale che permette la centrifugazione del liquido di processo. Il rotore è dotato di un tubo centrale di alimentazione che porta una serie di dischi verticali sovrapposti e fissati l'uno all'altro a una distanza di circa 1 mm. In prossimità dell'asse di rotazione questi dischi sono forati a formare dei canali verticali. I dischi svolgono diverse funzioni: riducono le possibili turbolenze del liquido di processo introdotto nel tamburo, riducono lo spazio radiale che le particelle di solido devono percorrere per raggiungere la camera di raccolta e fanno percorrere al liquido separato un percorso lontano dalle particelle solide. Tutti questi aspetti migliorano la velocità di sedimentazione e la qualità della chiarifica.

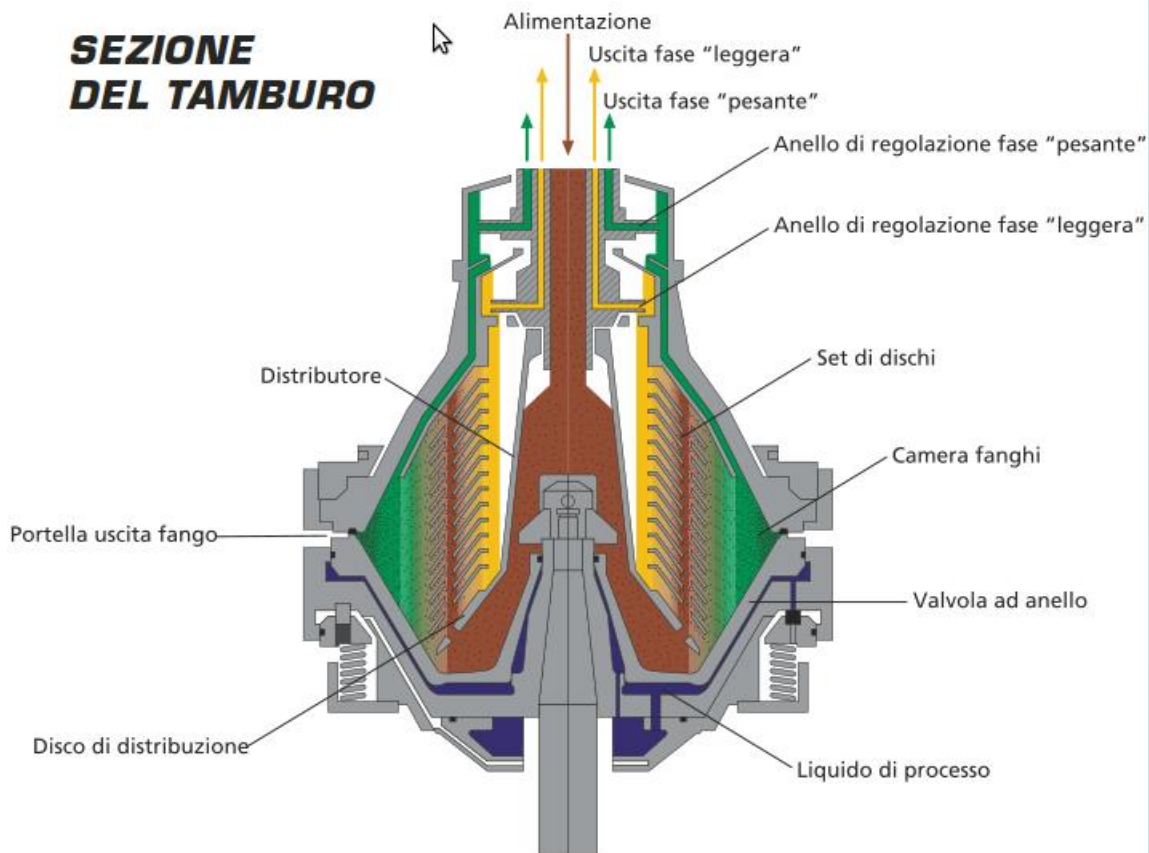


Figura 4: schema della sezione di un separatore centrifugo verticale del gruppo Pieralisi

Pertanto l'olio viene introdotto in continuo nel tamburo mediante il tubo di alimentazione assiale posto alla sommità del tamburo stesso ed accelera fino ad arrivare alla velocità di rotazione di esercizio. Per effetto della forza centrifuga risale attraverso gli spazi conici della pila di dischi e si separa. Una pompa centripeta lo invia alla tubazione di uscita. Tale pompa è posta all'uscita del liquido, nella parte superiore del tamburo, ed è composta da alcune palette elicoidali fisse e da una parte esterna a "chiocciola" rotante. L'energia cinetica del liquido che urta le palette è convertita in energia di pressione (3-6 bar) che spinge l'olio nella condotta di uscita.

I principali parametri tecnici di questo tipo di centrifughe sono:

- portata nominale: la capacità massima di flusso (L/h) che la centrifuga può raggiungere operando con acqua;
- volume della camera dei fanghi: volume di accumulo (L) dei solidi decantati;
- portata oraria: quantità di prodotto chiarificato ottenibile da una torbida. Può essere stimata con la seguente relazione ed è in funzione della portata nominale e del volume della camera dei fanghi:

$$Q = VPn / t\Delta s$$

dove Q è la portata oraria, V è il volume della camera dei fanghi, Pn la portata nominale, t è l'intervallo fra gli “spari” e Δs la percentuale dei solidi sospesi separati;

- portata effettiva: minore o uguale alla portata oraria. Minore se l'alimentazione si arresta durante gli spari ed uguale se questo non avviene;
- fattore di portata: si calcola in base al numero di giri del tamburo, al numero di dischi, al loro diametro ed al loro angolo di inclinazione. Serve per il confronto di centrifughe con caratteristiche simili (De Vita, 1997).

A fronte dei vantaggi operativi presentati, ossia dell'alta capacità operativa e del buon grado di chiarifica degli oli trattati, il separatore verticale è tuttavia un elemento a cui è imputata una riduzione della qualità dell'olio di oliva.

In primo luogo è prassi far lavorare i separatori aggiungendo acqua all'olio da estrarre. Questo comporta una minore quantità di polifenoli ed orto-difenoli negli oli. Infatti l'aggiunta di acqua abbassa la concentrazione di questi composti nelle acque di vegetazione diluendole. Conseguentemente la concentrazione di queste molecole è diminuita negli oli a causa del coefficiente di ripartizione all'equilibrio che deve essere rispettato (vedi paragrafo 1.6.1). Come conseguenza riduce inoltre il tempo di induzione negli oli così trattati (Di Giovacchino et al., 1994).

In secondo luogo il separatore centrifugo verticale, nonostante tutte le precauzioni progettistiche prese per evitare sbattimenti dell'olio processato, addiziona e discioglie una quantità di ossigeno di circa 5.18 mg/L (SD=0.78 mg/L). Infatti, come riportato in Parenti et al. (2007), alla

fine del normale processo di estrazione in continuo, l'olio presenta circa 8.62 mg/L (SD=0.63 mg/L) di ossigeno disciolto al proprio interno, mentre, escludendo il separatore la concentrazione finale è di 3.44 mg/L (SD=0.78 mg/L). Inoltre gli oli prodotti con il separatore centrifugo verticale presentano una concentrazione di 8.70 meqO₂/kg (SD=0.48 meqO₂/kg), mentre gli altri di 5.99 meqO₂/kg (SD=0.37 meqO₂/kg). Nello stesso lavoro è dimostrata la correlazione fra la concentrazione di ossigeno disciolto negli oli ed il loro numero di perossidi, come riportato in figura 5.

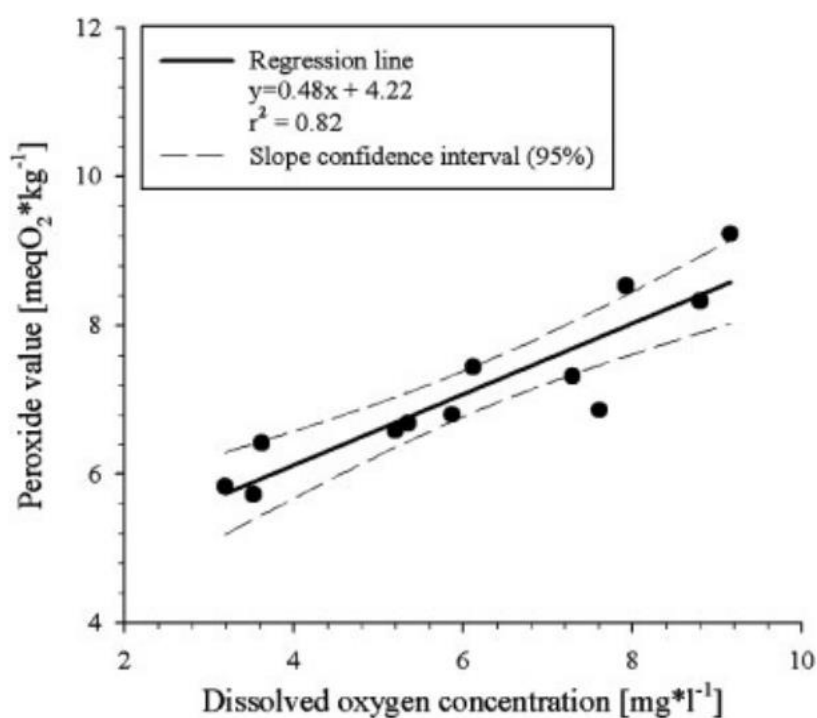


Figura 5: Regressione lineare fra ossigeno disciolto negli oli e numero di perossidi (da Parenti et al., 2007)

Questa correlazione indica la forte influenza sullo stato ossidativo dell'olio che è ascrivibile all'ossigeno disciolto e che la riduzione del numero di perossidi è imputabile alla minor concentrazione di ossigeno disciolto. Dopo pochi giorni (circa 2) l'ossigeno disciolto non si ritrova negli oli, e la sua concentrazione è circa 0, in quanto è consumato rapidamente dall'olio stesso. Uno shelf-life test ha inoltre mostrato l'effetto nel tempo di una maggiore concentrazione iniziale di ossigeno disciolto (Figura 6).

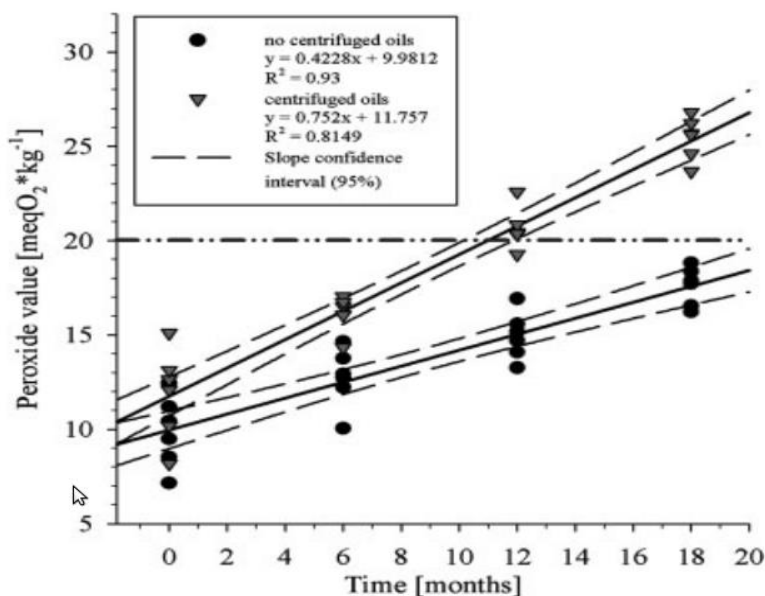


Figura 6: numero di perossidi di oli centrifugati e non centrifugati in funzione del tempo. La linea tratteggiata e puntata indica il valore limite legale stabilito dal regolamento EC 2568/91 (da Masella et al., 2009) .

In entrambi i casi si ha un incremento lineare del valore dei perossidi durante la conservazione, ma a parità di tempo lo stato ossidativo dell'olio centrifugato appare peggiore. Le pendenze delle due rette sono infatti significativamente diverse e, mentre il centrifugato raggiunge il limite legale (20 meqO₂/kg – EC2568/91) dopo circa 12 mesi, il non centrifugato non lo raggiunge in 18 mesi. E' pertanto ragionevole ipotizzare che l'ossigeno disciolto aggiunto dal separatore possa funzionare come starter per le successive reazioni di autossidazione.

Per quanto riguarda gli altri parametri qualitativi degli oli di oliva il

separatore ha effetto su K232, e singoli fenoli. Il K232 ne risulta generalmente aumentato ed i fenoli singoli diminuiti. Il separatore è inoltre in grado di rimuovere una certa quantità di acqua (Masella et al., 2009). Il decremento qualitativo dovuto all'azione dell'ossigeno disciolto è stato confermato mediante centrifugazione in atmosfera inerte (Masella et al., 2012). Inoltre, al separatore centrifugo può essere imputato anche un incremento di temperatura dell'olio trattato, quantificabile in circa 1 °C ed una riduzione dei composti responsabili delle note di “foglia verde”, quali il trans – 2 esenale (Altieri et al., 2014).

Gli effetti negativi del separatore sono stati testati, ma ulteriori conferme a queste indicazioni sono necessarie vista l'importanza di questo step, che, ad oggi, appare irrinunciabile. Considerati però questi effetti negativi, sono state proposte e testate delle soluzioni alternative a questo processo.

Altieri e collaboratori (2014) hanno proposto un sistema basato sulla sedimentazione per l'illimpidimento dell'olio. In breve il sistema consiste in una coppia di colonne di separazione in serie all'interno delle quali l'olio si separa per gravità. Ogni colonna di questo prototipo era alta 2 m ed aveva un diametro interno di 0.27 m, per un volume totale di 114 L. L'olio mosto è introdotto nelle colonne con una portata di circa 1 L/min, ed una pompa regolata sulla portata in ingresso rimuoveva l'olio in uscita. Dopo circa 90 minuti di tempo di sedimentazione l'olio mosto nella prima colonna risultava separato in una parte composta da residui solidi ad alta densità e acqua ed una parte flottante sulla superficie di olio pulito e residui solidi a bassa densità. L'olio pulito è prelevato ad una quota di circa 40 mm al di sotto del pelo libero e trasferito nella seconda colonna. Dopo altri 90 minuti (quindi 3 ore in totale) l'olio è suddiviso in una frazione (circa 90% in volume) di olio pulito ed in una di olio mista a residui solidi e acqua. Quest'ultima è inviata ad un separatore centrifugo per il recupero dell'olio residuo. Questo sistema ha impedito l'aumento del numero di perossidi e del valore dell'indice spettrofotometrico K232 ascrivibile al separatore.

Tuttavia questo sistema non è stato capace di raggiungere il grado di illimpidimento ottenuto con il separatore centrifugo e richiede una grande quantità di tempo di permanenza dell'olio al suo interno (circa 3 ore) risultando, almeno nella conformazione proposta, difficilmente

applicabile ad alcune realtà elaiotecniche.

Considerata l'importanza operativa del separatore è necessario ampliare la conoscenza degli effetti negativi prodotti. Gli studi fino ad oggi compiuti riguardano su poche cultivar, la conservazione è stata esplorata in maniera limitata e nessun panel test per la valutazione dei difetti a norma della legislazione italiana ed europea è stato compiuto.

Nel corso della presente tesi si è scelto di ampliare la base di conoscenze sui danni prodotti dal separatore centrifugo verticale analizzando due cultivar: Coratina e Arbequina. Tali cultivar non sono ad oggi state studiate sotto questo aspetto, sebbene siano estremamente rilevanti per l'olivicoltura mondiale e presentino rispettivamente un'elevata ed una bassa concentrazione di biofenoli, la classe di composti presente nell'olio maggiormente affetta dal dilavamento dell'acqua di processo del separatore e dall'azione dell'ossigeno disciolto.

1.5.1 Il coefficiente di ripartizione olio-acqua

Il coefficiente di ripartizione, o costante di ripartizione, è definito come il rapporto fra l'attività di una certa specie chimica (A) in fase organica ed in fase acquosa:

$$(K^{\circ}_D)_A = a_{A,org}/a_{A,aq}$$

Il valore del coefficiente non varia con la composizione, ma dipende dalla scelta dello stato standard, della temperatura e della pressione. Tale coefficiente descrive quindi la quantità di materia che, in condizioni di equilibrio, si trova in ciascuna delle due fasi.

Nel caso dell'olio di oliva, la costante di ripartizione più usata è quella olio-acqua. Durante il processo di estrazione, i composti presenti all'interno dell'oliva si distribuiscono fra le tre fasi presenti: acqua, olio e sansa. La quantità di ciascun composto che dalla frazione solida è trasferita alla fase liquida è funzione della sua solubilità in ciascuna delle due componenti di questa fase, mentre la parte che si ritrova effettivamente all'interno dell'olio di oliva dipende dal coefficiente di ripartizione.

I coefficienti di ripartizione per alcuni composti fenolici presenti nell'olio di oliva sono riportati nella tabella 4, tratta da Rodis et al. (2002).

Tabella 4: Coefficienti di ripartizione olio acqua di alcuni antiossidanti predetti con il metodo UNIFAC (da Rodis et al., 2002)

antioxidant	Kp (25 °C)	Kp (45 °C)	Kp (65 °C)
oleuropein	0.0012	0.0034	0.0087
3,4-DHPEA	0.0004	0.0012	0.0026
protocatechuic acid	0.0250	0.0430	0.0580
tyrosol	0.0970	0.1510	0.2220
caffeic acid	0.3600	0.5920	0.7970
3,4-DHPEA-EDA	0.1870	0.2990	0.4130
3,4-DHPEA-EA	11.8000	16.5000	20.0400

I valori bassi di Kp associati a questi composti mostrano come la diluizione effettuata ad opera dell'acqua di processo aggiunta dal separatore centrifugo verticale possa essere dannosa per la qualità dell'olio di oliva.

1.6 Aspetti teorici della filtrazione dell'olio di oliva

La filtrazione è probabilmente la tecnica di separazione solido-liquido più semplice e più diffusa. Tale tecnica consiste nel forzare una sospensione attraverso un mezzo poroso in grado di trattenerne la parte solida, lasciandosi invece attraversare dalla componente liquida, che risulterà chiarificata. Per la stabilizzazione dell'olio di oliva la filtrazione non è al momento usata come alternativa al separatore centrifugo verticale, ma è piuttosto un'operazione che è effettuata in aggiunta a quest'ultimo. Esistono due diversi modelli teorici per la filtrazione: di superficie e di profondità. Il primo è il caso dello "scolapasta". Il mezzo filtrante è dotato di pori di dimensioni inferiori alle particelle solide contenute nel prodotto da filtrare, che pertanto vengono trattenute. Nella filtrazione di profondità invece la componente solida è separata da quella liquida grazie alle interazioni fra il mezzo filtrante ed i solidi sospesi stessi, che sono ritenuti principalmente grazie a adsorbimento superficiale ed attrazioni elettrostatiche. In questo caso le dimensioni dei pori del mezzo sono maggiori delle dimensioni dei solidi trattenuti. La suddivisione in filtri di superficie e di profondità è una semplificazione di quanto avviene nella realtà dove solitamente si verificano contemporaneamente entrambi i

modelli teorici descritti. Ad esempio, lo strato di particelle solide che si depositano su un filtro di superficie esercita un'azione di profondità sempre maggiore, man mano che aumenta di spessore (Peri C., 1983).

Da un punto di vista teorico, la velocità con cui avviene il processo di filtrazione, definita come quantità di filtrato (V) lavorata per unità di tempo (θ), è regolato dall'equazione di Hagen-Poiseuille:

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{d\theta} = \frac{\Delta P}{\mu (\alpha w V / A + r)}$$

dove A è l'area del filtro, ΔP è la differenza di pressioni ai due lati del mezzo filtrante, μ è la viscosità, α la resistenza dovuta al filtrato che si è accumulata nel mezzo, w il contenuto in peso per unità di volume dei solidi nel filtrato ed r è la resistenza del mezzo filtrante. Dall'equazione si può notare che la forza motrice che permette la filtrazione di una miscela solido-liquido è la differenza di pressione fra le due parti del mezzo filtrante (ΔP), che, in teoria, è proporzionale alla velocità con cui il processo avviene. Nella pratica, a causa delle caratteristiche fisico-meccaniche del residuo solido dell'olio di oliva, incrementi di pressione non sono linearmente associati ad incrementi della velocità di filtrazione. Sempre dalla formula si nota l'importanza del corretto dimensionamento del filtro, quindi della corretta determinazione della superficie filtrante (A). Nei filtri-pressa comunemente diffusi nei frantoi toscani, il dimensionamento della superficie A è effettuato tramite il posizionamento del numero appropriato di setti filtranti necessari al completamento dell'operazione. In questo caso la velocità con cui la filtrazione procede è più che proporzionale all'aumento della superficie A, in quanto, oltre ad una maggiore area a disposizione, si ha una più lenta colmatazione del mezzo filtrante. Un altro parametro da considerare per la filtrazione è la temperatura della miscela da filtrare. Questa non appare direttamente nell'equazione di Hagen-Poiseuille, ma influenza fortemente la viscosità. Maggiore è la temperatura e minore è la viscosità dell'olio da filtrare. Per comprendere l'importanza di questo parametro basta pensare che, a parità delle altre condizioni, la filtrazione di un olio a 30 °C avviene a velocità circa doppia rispetto a quella di un olio a 15 °C (Bonnet et al., 2011). Tuttavia per l'olio di oliva la temperatura corretta di filtrazione dovrebbe essere compresa fra i 17 °C, in quanto al di sotto si hanno flussi troppo

lenti, ed i 27 °C, in quanto al di sopra di questa temperatura l'olio può essere danneggiato. Il parametro che maggiormente fa variare la portata in uscita al filtro durante l'operazione è invece α . Tale parametro è minimo all'inizio del processo ed aumenta progressivamente fino a far terminare il ciclo di filtrazione a causa di una troppo bassa velocità. Questo effetto è causato dal progressivo aumento della quantità di solidi sul mezzo filtrante (Peri C., 2014).

1.7 Le tipologie di filtro più utilizzate

La filtrazione dell'olio di oliva è effettuata allo scopo di rimuovere dall'olio acqua e piccole parti della polpa delle drupe che sono rimaste in sospensione ed è pertanto necessario utilizzare strumenti che siano in grado di svolgere questa duplice funzione. Per questa ragione si sono diffuse diverse tipologie di filtri. Nelle piccole realtà si utilizzano prevalentemente filtri a cotone o filtri-pressa, mentre nelle realtà più grandi le tecnologie più diffuse sono i filtri tangenziali e quelli ad alluvionaggio continuo.

Il filtro più semplice è il filtro a cotone (o filtro alla barese) in cui l'olio è introdotto in un recipiente recante sul fondo uno o più strati di fibra tessile. L'olio limpido è raccolto in un secondo recipiente posto a quota inferiore rispetto al primo. Questo tipo di filtrazione avviene grazie all'azione della gravità. Il filtro alla barese è una soluzione economica e facile da realizzare artigianalmente in azienda. L'inconveniente principale di questa filtrazione è legato ai tempi molto lunghi richiesti. Infatti la differenza di pressione fra le due parti del filtro è bassa ed è data dalla forza di gravità e dalla pressione idrostatica della colonna di olio e la superficie filtrante è limitata. Durante questa operazione l'olio è esposto all'ossigeno e, conseguentemente al rischio di ossidazione.

Il più comune tipo di filtro impiegato nelle piccole e medie realtà produttive dell'olio di oliva è il filtro-pressa. Questi filtri sono composti da una serie di camere piate poste verticalmente le une accanto alle altre. Le camere sono costituite da un piatto che ha funzione di supporto e di alimentazione/distribuzione dell'olio torbido sulla superficie del setto filtrante. Per evitare perdite di olio all'aumento della pressione, camere e

setti vengono fatti aderire fra loro tramite una vite centrale e due piastre metalliche. Il filtro è dimensionato scegliendo l'appropriato numero di setti filtranti, che hanno solitamente forma quadrata e lato compreso fra i 20 cm ed i 120 cm (Sutherland, 2008). Il filtro è generalmente alimentato con una pompa ad alta prevalenza. Il liquido torbido, attraverso il collettore di entrata posto sulla testata del filtro, passa nella condotta di alimentazione, risultante dall'accostamento delle singole piastre. Da qui, attraverso la rete di canali posta sulle piastre, il prodotto viene diffuso sulla superficie del setto filtrante. Grazie al gradiente di pressione (ΔP), il liquido attraversa il setto stesso e defluisce lungo la superficie drenante della piastra opposta, dalla quale è scaricato nella condotta di uscita. Le piastre lavorano quindi in parallelo, fungendo alternativamente da piastre di alimentazione della torbida e piastre di raccolta del filtrato: il prodotto alimenta le singole piastre indipendentemente l'una dall'altra ed entra in ogni piastra contemporaneamente; altrettanto vale per lo scarico del filtrato. L'alimentazione del torbido può avvenire, in relazione alle caratteristiche costruttive, dall'alto o dal basso, mentre, lo scarico del filtrato, dallo stesso lato di alimentazione della torbida o dal lato opposto. La versatilità di questi filtri permette anche di eseguire, due o più filtrazioni, di diversa finezza, contemporaneamente sullo stesso apparecchio. Inoltre, per mezzo di piastre di deviazione è possibile eseguire, ad esempio, due filtrazioni in serie con cartoni filtranti di diversa porosità, in modo che nella prima sezione del filtro venga eseguita una prefiltrazione e nella seconda la filtrazione fine. In questi casi di doppia filtrazione la problematica maggiore è il dimensionamento relativo delle due sezioni, che deve essere tale da evitare il colmataggio di una sezione prima che sia esaurita la capacità filtrante dell'altra. Si dovrà, quindi, porre particolare attenzione nella scelta dei mezzi filtranti più idonei, nonché nella adeguata ripartizione delle due superfici filtranti. La scelta più adatta dipenderà dai casi specifici e sarà dettata principalmente dall'esperienza pratica; un'indicazione di massima, comunque, potrebbe essere quella di destinare il 60% della superficie filtrante totale alla prefiltrazione, mentre, il rimanente 40% alla filtrazione di finitura. I cartoni filtranti che sono utilizzati con i filtro-pressa appartengono alla categoria dei filtri di profondità e sono costituiti prevalentemente da

cellulosa. Il materiale di partenza è pertanto la cellulosa da legno che, grazie a trattamenti fisico-chimici di digestione e purificazione, dà luogo ad una polvere molto fluida, dotata di una inerzia molto elevata ed idonea agli usi alimentari. Questo materiale favorisce, grazie al lieve carattere elettronegativo, la ritenzione di ioni metallici ossidanti, quali Fe^{3+} e Cu^{2+} , contribuendo a stabilizzare il liquido trattato nei confronti di eventuali ossidazioni. Assieme alla cellulosa i setti filtranti sono aggiunti di diatomee che hanno invece effetto brillantante sugli oli trattati (Masella, 2002).

Su scala più grande la tecnologia più affermata è quella dei filtri ad alluvionaggio. Inoltre, recentemente, si sta diffondendo la filtrazione tangenziale a membrana.

I filtri ad alluvionaggio sono molto utilizzati nell'olio di oliva perchè la sospensione da trattare contiene solidi, essenzialmente di natura colloidale, che danno luogo a depositi fortemente comprimibili. In questo tipo di filtri, i coadiuvanti di filtrazione vengono aggiunti in continuo alla sospensione da trattare ed hanno la specifica funzione di conferire al deposito rigidità e porosità tali da ottenere buone permeabilità, garantendo maggiori portate nel corso di tutto il ciclo di filtrazione. In molti casi lo stesso uso dei coadiuvanti è indispensabile per effettuare una filtrazione con deposito, per quelle sospensioni molto diluite i cui solidi, di per sé, non darebbero luogo ad un deposito consistente. Si tratta, in questi casi, di filtrazioni chiarificanti effettuate, appunto, mediante la tecnica dell'alluvionaggio. Spesso la tecnica dell'alluvionaggio è combinata con quella "a prepanello". Si provvede, cioè, a costituire sul supporto di filtrazione, in un'operazione preliminare, un prepanello che svolge funzioni di ancoraggio e di sicurezza (assicura che particelle fini del soprastante deposito non inquinino il filtrato). Il ciclo di filtrazione può essere suddiviso in tre fasi: formazione del prepanello, filtrazione ad alluvionaggio vera e propria, scarico e smaltimento del pannello.

La filtrazione a membrana è una pratica molto diffusa per gli oli di semi, che recentemente è stata proposta anche per l'olio extra-vergine di oliva. Questa permette di migliorare alcune criticità degli altri sistemi di filtrazione quali le perdite di olio all'interno dei mezzi filtranti, eliminandone l'uso e, conseguentemente i problemi relativi al loro

smaltimento. Inoltre, negli oli filtrati ad alluvionaggio è comune il ritrovamento di alcuni coadiuvanti di filtrazione, cosa che non avviene negli oli filtrati a membrana. Oltre alla soluzione di questi problemi, la filtrazione a membrana permette di rimuovere le tracce di metalli pesanti, come rame, manganese e ferro che a volte contaminano gli oli (Bottino et al., 2004). I filtri a membrana sono tipici filtri di superficie, caratterizzati da un'elevata efficienza di ritenzione alle più basse porosità e, quindi, particolarmente adatti per filtrazioni sterilizzanti, che richiedono tolleranze minime, nonché per processi di ultrafiltrazione ed osmosi inversa.

1.8 La filtrazione e la qualità dell'olio extra-vergine di oliva

La filtrazione è una delle fasi più dibattute e controverse del processo di trasformazione delle olive in olio. Se da una parte molti consumatori apprezzano l'aspetto velato degli oli appena prodotti, dall'altra, con il passare del tempo, gli oli non filtrati formano un deposito sul fondo della bottiglia che, al contrario, è poco gradito. Il dibattito più acceso è, tuttavia, quello relativo agli effetti della filtrazione sulla stabilità degli oli. Se da un lato è consolidata la conoscenza che cambiamenti sulla composizione in acidi grassi degli oli non sono prodotti dalla filtrazione (Lozano-Sanchez et al., 2012), dall'altro questa operazione modifica la composizione chimica e produce cambiamenti sulla concentrazione dei componenti minori (Lozano-Sanchez et al., 2010). Alcuni studi attribuiscono agli oli non filtrati una minore stabilità ed una maggiore suscettibilità ad alterazioni. Un olio velato contiene infatti acqua ed enzimi che, nel corso della conservazione, possono alterare il profilo sensoriale del prodotto. Il Consiglio Oleicolo Internazionale (COI) identifica nello 0,2% di contenuto il valore massimo, al di sopra del quale è sconsigliabile commercializzare un olio di oliva (IOOC, 2009). Dal punto di vista qualitativo alcuni studi hanno attribuito associato ad oli non filtrati una maggiore ossidazione, quantificabile mediante il più alto valore del numero di perossidi e del K232 (Brenes et al., 2001). Questi parametri sono stati imputati alla presenza nelle parti solide che rimangono in sospensione di enzimi ossidativi (Georgalaki et al., 1998,

Vaglimigli et al., 2001) e di esterasi e glicosidasi (Brenes et al., 2001). Gli enzimi ossidativi responsabili del deterioramento degli oli non filtrati sono stati indentificati come appartenenti alle classi delle lipossigenasi e delle polifenolossidasi. La filtrazione degli oli, a causa della rimozione degli enzimi sopra citati e dell'acqua riduce pertanto l'idrolisi, quindi la progressiva disgregazione dei secoiridoidi, composti ritenuti responsabili di alcuni degli effetti benefici degli oli extra-vergine di oliva. Oltre a preservare la componente fenolica (di cui i secoiridoidi fanno parte) la filtrazione ritarda la degradazione della componente grassa, quindi l'aumento dell'acidità libera e la comparsa del difetto di rancido (Fregapane et al., 2006).

Tuttavia, esiste una parte di letteratura che attribuisce agli oli non filtrati una maggiore resistenza ai fenomeni ossidativi. L'acqua e le particelle solide sospese infatti possono contenere composti con funzione antiossidante, quindi, la filtrazione potrebbe causare una riduzione della stabilità degli oli (Lerker et al., 1994; Frega et al., 1999). Inoltre, dalle osservazioni su di un sistema modello ottenuto emulsionando l'olio di oliva, Ambrosone et al. (2002) hanno concluso che la presenza di acqua dispersa riduce la velocità delle ossidazioni. Hidalgo e collaboratori (2001 e 2002) hanno puntualizzato che le tracce di composti peptidici presenti, possono anch'esse avere un ruolo stabilizzante. Le osservazioni su una minore stabilità degli oli filtrati sono riprese nuovamente in Tsimidou et al. (2005) ed in Papadimitriou et al. (2013).

Dal punto di vista delle classi chimiche dei composti che vengono rimosse appare evidente l'azione della filtrazione sulle cere. Queste sono direttamente correlabili alla torbidità degli oli e quindi sono rimosse (Parenti et al., 2008). Anche la concentrazione dei pigmenti è diminuita dall'azione dei filtri. In particolare è stato dimostrato che la filtrazione a membrana può ridurre la presenza di questi pigmenti portandogli da un testimone contenente 5.5 mg/kg di clorofille ad un prodotto filtrato che ne presenta concentrazioni comprese fra i 4.4 mg/kg e gli 0.8 mg/kg (Bottino et al., 2008). I composti antiossidanti lipofili non sono invece influenzati dal trattamento della filtrazione (Brenes et al., 2001; Fregapane et al., 2006).

La rimozione degli antiossidanti polari dagli oli è stata già parzialmente

discussa ed è il principale fondamento del filone di pensiero che sostiene la maggiore stabilità degli oli non filtrati. Koidis e Boskou (2006) hanno spiegato con la rimozione dell'acqua causata dalla filtrazione la riduzione del contenuto in fenoli totali. Alcuni autori evidenziano invece addirittura un aumento del contenuto fenolico se l'olio è filtrato con carta ed è addizionato di solfato anidro di sodio. Questo incremento è spiegato dall'evidenza che in una matrice polare come l'olio non filtrato, l'affinità dei fenoli al solvente di estrazione (acqua/metanolo, 60/40 v/v) impiegato per le analisi all'HPLC sia minore e che pertanto, la parziale eliminazione dell'acqua durante la filtrazione permetta una maggiore disponibilità dei composti fenolici per il solvente di estrazione stesso (Bakhouch et al., 2014).

Infine la filtrazione influenza l'aroma degli oli. Pochi studi sono stati compiuti sugli effetti della rimozione della componente solida sospesa e dell'acqua sui composti organici volatili contenuti nell'olio di oliva. Bottino et al., (2008) hanno quantificato questi effetti in una perdita del 57% minimo e del 72% massimo di composti carbonilici a catena media o corta (da 5 a 13 atomi di carbonio). In particolare la riduzione avviene a carico delle aldeidi. Bubola et al., (2012) riporta gli stessi cambiamenti nella concentrazione in aldeidi di Bottino et al. (2008) e puntualizza che anche i chetoni ed i composti a 5 atomi di carbonio sono suscettibili di rimozione.

I microrganismi presenti nel corso della conservazione dell'olio di oliva sono inoltre determinanti per la qualità finale del prodotto e si trovano sulle particelle solide e sulle gocce di acqua presenti all'interno dell'olio di oliva (Ciafardini e Zullo, 2002). In particolare i microrganismi si sono dimostrati responsabili di incrementi nel corso della conservazione della percentuale di acidi grassi liberi (Ciafardini et al., 2006) e dell'aumento del numero di perossidi (Gomez-Rico et al., 2008). La filtrazione è in grado di allontanare i microrganismi dall'olio di oliva e di rimuovere l'acqua e le parti solide che ne consentono lo sviluppo. Data la velocità di sviluppo di lieviti, muffe e batteri che sono stati ritrovati negli oli è inoltre consigliabile che l'allontanamento della componente microbica avvenga il prima possibile, limitando così il rischio di insorgenza di difetti organolettici.

1.9 Lo stripping per la rimozione dell'ossigeno disciolto

Una delle operazioni unitarie più diffuse in ingegneria chimica, quando si vuole trasferire un gas disciolto in un liquido ad una fase gassosa, è quella dello stripping. Questa tecnica è usata, ad esempio, quando si vogliono rimuovere le frazioni volatili della benzina uscente dalla distillazione primaria del petrolio. La miscela gassosa attraversa il liquido che si intende trattare e, nel corso del suo percorso, si arricchisce nel soluto, mentre la fase liquida si impoverisce progressivamente. Per la corretta esecuzione di questa tecnica è importante assicurare un efficace contatto fra le fasi ed, in particolare, una estesa superficie all'interfaccia. In questo caso il sistema, che non si trova nello stato di equilibrio termodinamico, tende a portarvisi, rimuovendo la fase gassosa dal liquido.

La solubilità dei gas all'interno dei liquidi, quindi la solubilità dell'ossigeno all'interno dell'olio, aumenta all'aumentare della pressione parziale del gas e diminuisce all'aumentare della temperatura. In generale la quantità di gas che si rimuove con lo stripping è regolata dalla legge di Henry (per soluzioni ideali, molto diluite):

$$p_a = H c_a$$

dove p_a è la pressione parziale del gas in fase gassosa, c_a è la concentrazione del gas nella fase liquida ed H è la costante di Henry, che dipende dalla coppia soluto solvente e dalla temperatura. Quindi se una fase liquida ed una fase gassosa non all'equilibrio sono poste in contatto, esse competeranno per il soluto e si genererà un flusso di materia tanto più grande quanto più il sistema è lontano dall'equilibrio.

I trasferimenti di materia coinvolti fanno riferimento al modello del doppio film. Questo modello presuppone la presenza, in ognuna delle due fasi nelle vicinanze dell'interfase, di un film stagnante o in moto laminare. Oltre questo film, sempre in ciascuna delle due fasi, si suppone un moto turbolento che omogenizza le concentrazioni. E' nella superficie di interfase che si vengono a formare le condizioni per il soddisfacimento della legge di Henry e le condizioni sono supposte all'equilibrio. Oltre questa fase il trasferimento di materia dalla fase liquida al film stagnante è descritto dalla legge di Fick:

$$N_s = -D_L dC_s/dz$$

in cui N_s è il flusso del soluto, D_L è la diffusività del soluto in fase liquida, dC_s è la variazione infinitesima di concentrazione fra due punti posti a distanza dz . Date le difficoltà nella determinazione dello spessore z si preferisce ricorrere ad una determinazione di un coefficiente k_L effettuata mediante analisi dimensionale ed uso di numeri adimensionali. Il coefficiente k_L sarà dato dal rapporto D_L/z_L ed è un coefficiente empirico di trasferimento di massa che trasforma la legge di Fick in:

$$N_s / k_L = (c - c_i).$$

Allo stesso modo per il gas (con k_G coefficiente di trasferimento gassoso) possiamo scrivere:

$$N_s / k_G = (p_i - p),$$

L'operazione di rimozione del soluto per mezzo dello stripping è descritta dal bilancio di massa:

$$G * Y_{in} + L * X_{in} = G * Y_{us} + L * X_{us}$$

In cui G è la portata molare del gas ed L è la portata molare del solvente, mentre Y_{in} e Y_{us} sono i rapporti molari del soluto in ingresso ed uscita e X_{in} e X_{us} i rapporti molari del soluto in fase liquida.

Per quanto riguarda l'uso dello stripping per la rimozione dell'ossigeno disciolto presente negli oli un primo tentativo è stato compiuto da Ottaviani et al. (2001) che, in scala laboratorio, ha correlato la presenza di ossigeno disciolto negli oli alla formazione di radicali liberi ed è stata in grado di rimuovere questo ossigeno insufflando azoto all'interno del mezzo. Su scala frantoio e valutando anche gli effetti qualitativi dovuti al processo, sono stati compiuti dei test da Masella et al. (2010).

Lo stripping è stato in grado di ridurre in maniera significativa il numero di perossidi a spese di alcuni composti fenolici e di alcune molecole organiche volatili fra cui il E-2-esenale, il composto organico volatile presente in maggiore quantità negli oli ed associato a descrittori positivi. Tale riduzione in aromi non è stata percepita dagli assaggiatori nei test triangolari di confronto effettuati. La tecnica dello stripping appare pertanto promettente per la diminuzione degli effetti negativi legati alla presenza di ossigeno disciolto, ma necessita di essere studiata in maniera più approfondita.

2. Scopo della tesi

In elaiotecnica, l'ultima fase della produzione dell'olio extra vergine di oliva prevede l'eliminazione dell'acqua di vegetazione e l'illimpidimento. Nella maggior parte dei piccoli e medi frantoi per questa operazione viene utilizzata una centrifuga denominata separatore verticale.

Alcuni studi hanno tuttavia mostrato come questa macchina possa produrre alcuni effetti negativi sulla qualità del prodotto. Tali effetti negativi sono legati principalmente al dilavamento dei composti chimici affini all'acqua che sono presenti nell'olio ed all'addizione/discioglimento di ossigeno al prodotto. Il separatore centrifugo verticale, a fronte di questi "danni" è però una macchina dotata di alta capacità operativa, che è in grado di allontanare dall'olio di oliva gran parte dell'acqua e dei solidi sospesi. Ad oggi i lavori che mettono in evidenza gli effetti negativi dell'utilizzo del separatore sono pochi e non considerano in maniera approfondita l'azione della macchina sulle componenti minori degli oli, soprattutto durante la sua conservazione. E' necessario pertanto ampliare le conoscenze sugli effetti prodotti dal separatore centrifugo sulla qualità del prodotto, allo scopo di riuscire a quantificare i sopracitati effetti negativi sull'olio, consentendo all'utilizzatore della macchina di valutare i benefici operativi ed i rischi per la qualità del prodotto. In particolare è necessario approfondire gli aspetti legati alla shelf-life dell'olio, in quanto sia le componenti soggette a dilavamento, sia quelle soggette ad ossidazione sono considerate estremamente importanti per la stabilità dell'olio nel tempo.

Per limitare gli effetti negativi prodotti dal separatore centrifugo verticale sono possibili molti approcci e, nel presente lavoro, ne sono valutati due:

- l'eliminazione della centrifuga verticale con l'invio ad un filtro-pressa dell'olio proveniente dal decanter;
- la rimozione dell'ossigeno disciolto addizionato nel processo mediante un trattamento di stripping.

Con la filtrazione si evitano entrambi gli effetti negativi prodotti dal separatore centrifugo verticale: l'addizione di ossigeno all'olio ed il

dilavamento delle componenti polari. Questa soluzione è praticata in alcuni piccoli frantoi in cui l'olio è trattato con filtri-pressa ed appare rispettosa della qualità del prodotto. Presenta tuttavia alcune limitazioni di natura economica ed operativa. Infatti, l'olio che esce dal decanter è ricco di acqua e solidi sospesi ed esercita rapidamente un effetto colmatante sui setti filtranti. Tali setti non sono riutilizzabili e ritengono una notevole quantità di olio al loro interno. Dato che l'olio è più carico di componenti da rimuovere, la durata del ciclo di filtrazione, fino alla colmatazione, risulta essere più breve e, conseguentemente, i costi legati all'acquisto ed allo smaltimento dei setti e quelli associati alle perdite di olio intrappolato nel filtro divengono più importanti. Per allungare la durata del ciclo di filtrazione, limitando questi inconvenienti, sono state separate le fasi necessarie per l'illimpidimento del prodotto: un pre-filtro in acciaio, da anteporre al filtro-pressa, sarà deputato al trattenimento di gran parte della frazione solida, mentre i setti filtranti in cellulosa saranno deputati prevalentemente al trattenimento della parte acquosa. La separazione delle fasi dell'operazione, trattandosi di olio di elevata qualità, dovrà necessariamente essere valutata sulla base degli effetti che produrrà sulla qualità del prodotto.

Il trattamento di stripping permetterebbe invece da un lato di continuare ad utilizzare il separatore centrifugo, allontanando l'ossigeno disciolto negli oli. In questo modo, non si possono però salvaguardare quei composti che sono dilavati per effetto dell'acqua di processo. Anche in questo caso esistono alcuni studi che hanno mostrato dei benefici legati a questo trattamento, ma i dati necessitano di essere corredati con gli effetti che si hanno durante la conservazione dell'olio sui componenti antiossidanti, che risultano essere maggiormente colpiti dalla presenza di ossigeno negli oli. Inoltre gli studi precedentemente pubblicati sull'applicazione di questa pratica agli oli hanno rilevato un allontanamento di alcuni composti organici volatili riscontrabile nelle analisi chimiche, ma non percepito dagli assaggiatori. Tale aspetto appare particolarmente importante per l'olio di alta qualità e necessita di essere indagato.

3. Materiali e Metodi

I test contenuti nel presente lavoro di tesi sono stati effettuati nel corso di due progetti di ricerca distinti. Il primo progetto è una convenzione di ricerca stipulata con l'azienda Nuevo Manantial, che ha per oggetto lo studio degli effetti del separatore centrifugo verticale, della filtrazione e del trattamento di stripping sulla qualità dell'olio di oliva. Il secondo progetto è stato finanziato dal bando misura 124 del Programma di Sviluppo Rurale (PSR) 2007-2013 della Regione Toscana, promosso e coordinato da GAL-Start srl. In questo progetto si è sviluppato un pre-filtro in grado di migliorare le performance operative dei filtri-prensa e si è nuovamente testato gli effetti dello stripping sulla qualità dell'olio. Tali prove trattano entrambe della fase di stabilizzazione dell'olio extravergine di oliva, ma sono state mantenute separate fra loro, considerate le rilevanti differenze nelle condizioni al contorno e perché si sono focalizzate su aspetti diversi della fase finale di produzione. Nel presente capitolo Materiali e Metodi si lascia inalterata la suddivisione nei due distinti progetti di ricerca, descrivendo il modo di operare e corredando il lavoro con una sezione finale che descrive i metodi impiegati in entrambi i progetti.

3.1 Prove relative alla convenzione di ricerca con Nuevo Manantial

Le prove sperimentali sono state condotte nei giorni dal 23 al 27 aprile 2013 presso la Nuevo Manantial SA, Rocha, Uruguay. Gli oli erano stati prodotti nel corso della settimana precedente all'esecuzione dei test. Le cultivar scelte sono state Arbequina e Coratina, per rappresentare la prima una varietà di olive a basso contenuto fenolico e ad alto contenuto di composti organici volatili, e la seconda una varietà ad alto contenuto fenolico (Aparicio & Luna, 2002).

Agli oli delle due varietà è stato fatto (in tre repliche) un secondo trattamento in separatore centrifugo verticale e sono stati posti a confronto oli processati una sola volta come nella normale prassi

elaiotecnica ed oli processati due volte. Il significato di questo secondo passaggio può essere cercato nel tentativo di isolare l'effetto che un separatore centrifugo verticale produce sull'olio. Inoltre, è prassi comune nei frantoi trattare una seconda volta nel separatore oli ritenuti non sufficientemente limpidi. Questa prova, come risultato accessorio, quantifica gli effetti prodotti nell'esecuzione di tale prassi. Per queste ragioni il separatore centrifugo è stato utilizzato con le stesse modalità con cui è fatto normalmente operare nell'azienda che ha ospitato le prove: 6300 rpm, con scarico dei solidi automatico ed intermittente. L'acqua di processo è stata addizionata con una portata pari al 25% dell'olio introdotto all'interno del separatore. Le caratteristiche tecniche del separatore sono: potenza del motore 5.5 kW e capacità operativa di 2700 l/h.

L'ossigeno disciolto è stato misurato in flusso con un sensore InPro 6850i (Mettler Toledo, Italia). Il sensore ha capacità di determinazione di concentrazione di ossigeno in olio di 0.1 parti per bilione (ppb), ma ai fini delle nostre indagini è stato utilizzato alla sensibilità di 0.1 parti per milione (ppm).

Le analisi chimiche condotte sugli oli sono state le seguenti: acidi grassi liberi, K232, K270, delta K, numero di perossidi, tocoferoli, biofenoli totali ed HPLC, clorofille ed umidità. Sui blend delle tre bottiglie è stata compiuta "una tantum" l'analisi della composizione acidica percentuale, al fine di caratterizzare gli oli di Arbequina e Coratina prodotti in quello specifico areale. L'analisi non è stata ripetuta perchè non si hanno ragioni di supporre differenze in questo parametro legate alla conservazione o al trattamento nell'intervallo di tempo ed alle condizioni sperimentali. Sui blend, per ogni punto di conservazione è stato inoltre eseguito un panel test che ha condotto alla redazione di un'analisi descrittiva degli oli.

Gli stessi oli sono successivamente stati filtrati oppure filtrati e strippati ed è stato nuovamente misurato l'ossigeno disciolto prima e dopo il trattamento. Allo stesso modo sono state condotte sugli oli così trattati le stesse analisi precedentemente elencate e le bottiglie sono state poste in conservazione assieme alle altre.

Le condizioni di stripping e di conservazione sono descritte in seguito in questo capitolo in quanto sono state mantenute costanti sia per le prime

che per le seconde prove.

3.2 Prove relative alla misura 124

Queste prove si sono svolte nel corso delle campagne olearie 2012 e 2013 presso il frantoio cooperativo OLCAS, Carbonile di Pelago (FI).

Durante la campagna 2012 sono stati realizzati i primi test per la realizzazione e la messa a punto del sistema di filtrazione, che è stato prodotto alla fine del mese di novembre. I primi test effettuati hanno avuto come obiettivo l'individuazione dei parametri ottimali di filtrazione. Visto il periodo e la scarsa disponibilità di cultivar di olive tipiche dell'areale toscano sono state usate per questi test, oltre alle olive Frantoio, anche le cv Peranzana, Itrana e Coratina, acquistate in altre regioni italiane. In particolare sono stati effettuati test su Frantoio e Coratina in data 28 novembre 2012, e test su Itrana, Peranzana e Frantoio dal 10 al 14 dicembre 2012. Sono state eseguite filtrazioni e registrate le performance operative del filtro ed al termine di queste prove l'impianto è stato concepito come descritto nel paragrafo seguente. In queste prove il filtro è stato messo a punto per funzionare sia con, sia senza stripping.

Durante la campagna 2013 sono state condotte le prove operative tenendo conto dei parametri messi a punto nel corso della campagna precedente. I test sul filtro sono stati suddivisi in due parti: prove operative ed effetti del filtro sulla qualità dell'olio. Per effettuare le prove qualitative sono state realizzate tre masse omogenee di olio di oliva cv Frantoio, che sono state prelevate direttamente dal decanter e filtrate con il metodo tradizionale (filtro-pressa), con il sistema innovativo messo a punto e con lo stesso sistema dotato di stripping. Gli oli sono stati caratterizzati immediatamente dopo il trattamento ed imbottigliati in bottiglie da 0.5 l, con il 15% di spazio di testa privo di olio. Gli oli sono stati posti in conservazione e sono state analizzate tre bottiglie per ciascuna replica di ciascun trattamento ad intervalli regolari di 45 giorni. Su questi oli sono state effettuate le seguenti analisi: acidi grassi liberi, numero di perossidi, K232, K270, delta K, tocoferoli, biofenoli, clorofille ed aromi in triplo, mentre i panel test sono stati eseguiti sui blend nell'impossibilità di assaggiare un numero così elevato di campioni.

Per quanto riguarda le prove operative, queste sono state effettuate nelle date 6-7 novembre e 2 dicembre 2013. La filtrazione è stata effettuata su oli appena prodotti a partire da 5 diversi mix di olive appartenenti, in varie proporzioni, alle cultivar Frantoio, Moraiolo e Leccino. Per ogni olio prodotto è stata campionata un'aliquota prima della filtrazione come controllo. Successivamente la massa è stata inviata sia ad un filtro dotato di sistema di pre-filtrazione e filtro-pressa, sia allo stesso filtro-pressa, bypassando il pre-filtro. In entrambi i casi il filtro-pressa è stato equipaggiato con 11 cartoni di cellulosa (V8 Cordenons). Le caratteristiche di questi filtri dichiarate dal produttore sono riportate in tabella 5:

Tabella 5: caratteristiche della carta da filtro impiegata nelle prove

Grammatura (g/m ²)	Spessore (mm)	Porosità (μm)	Portata acqua (l/min/m ²)
1050	3.75	12	160

I parametri chimici posti a confronto sono i seguenti: acidità, numero di perossidi, K232, K270, delta K, tocoferoli, biofenoli, composizione acidica, umidità, impurezze, sostanza solida ed aromi.

3.3 Descrizione del pre-filtro in acciaio

Il filtro messo a punto nel presente lavoro è composto di due diversi filtri: un filtro in acciaio ed un tradizionale filtro-pressa, collocati in serie, quindi uno di seguito all'altro ed alimentati da un'unica pompa. Il filtro in acciaio è composto da tre campane in acciaio contenti delle cartucce anch'esse di acciaio.



Figura 7: pre-filtro in acciaio usato nei test effettuati presso il frantoio OLCAS

La porosità delle tre cartucce impiegate nelle prove è stata di $40\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$ e $5\ \mu\text{m}$ ($1\ \mu\text{m}$ equivale ad $1/1000$ di millimetro). L'olio mosto entra nella cartuccia con porosità maggiore ed esce da quella con porosità minore. Per filtrazione superficiale le griglie in acciaio ritengono tutti i solidi che hanno dimensione maggiore della porosità e la frazione di acqua in essi contenuta.



Figura 8: cartuccia in acciaio impiegata nel corso delle prove.

La porosità delle cartucce è stata scelta sulla base degli studi di Koidis e collaboratori (2008) che hanno dimostrato che la maggior parte dei solidi sospesi negli oli hanno dimensioni comprese fra i 5 μm ed i 60 μm . L'olio in uscita dalle cartucce è inviato al filtro-prensa che, essendo dotato di setti filtranti in cellulosa, ritiene l'acqua e, per azione di profondità le parti solide che il filtro in acciaio non è stato capace di trattenere. Questi filtri sono costituiti da una serie di piastre e di setti filtranti che sono alternati fra loro. Le piastre diffondono sul setto filtrante l'olio torbido da un lato, mentre dall'altro recuperano l'olio limpido e lo convogliano nel tubo di uscita del filtro. Lo schema di funzionamento di questo tipo di filtri (tratto da Peri, 1983) è riportato in figura 9.

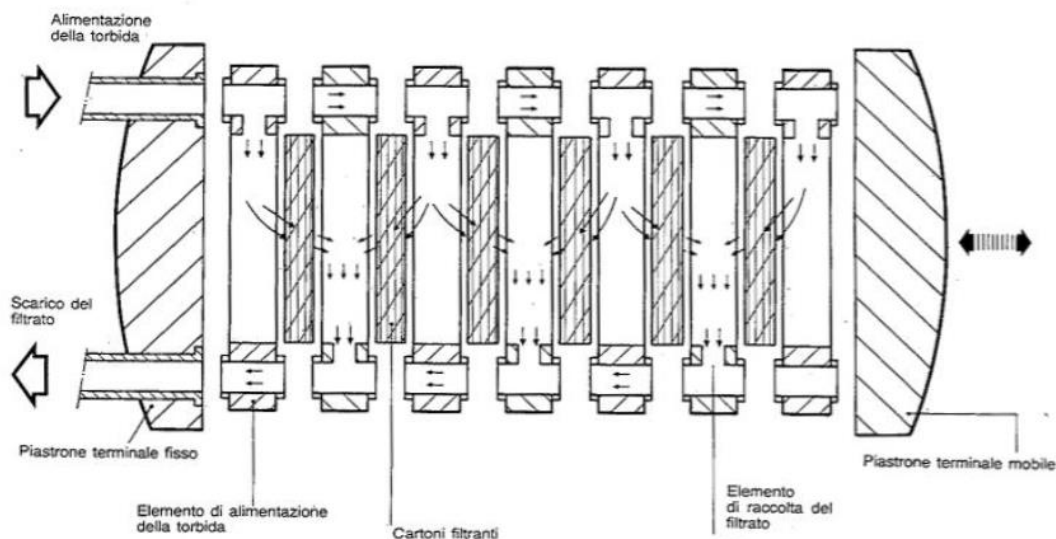


Figura 9: schematizzazione del funzionamento di un filtro-pressa (da Peri, 1983)

Al filtro si può aggiungere un iniettore di gas che permette di effettuare la tecnica dello stripping in corrente di azoto al fine di allontanare l'ossigeno disciolto.

L'assetto finale del sistema testato è schematizzato in figura 10.



Figura 10: schema riassuntivo del sistema di filtrazione messo a punto durante i test.

L'olio prelevato dal decanter è prima filtrato con tre cartucce in acciaio, poi è inviato ad un filtro-pressa che trattiene l'acqua e le parti più piccole. Il sistema per lo stripping è stato utilizzato a valle del filtro in alcune prove.

3.4 Metodi impiegati

Di seguito sono riportate le metodiche utilizzate per la determinazione dei parametri oggetto di studio.

3.4.1 Determinazione dell'acidità libera

Per la determinazione della percentuale di acidi grassi liberi abbiamo utilizzato il metodo seguente. La misura indica il tenore degli acidi grassi liberi nell'olio di oliva espresso mediante acidità calcolata in modo convenzionale. Una aliquota della sostanza da analizzare viene disciolta in una miscela di solventi e successivamente titolata mediante una soluzione di idrossido di sodio. La quantità di tale aliquota è scelta a seconda del numero di acidità presunto, nel nostro caso circa 10 g. L'aliquota è stata diluita con 100 ml di soluzione etere dietilico – etanolo (etere dietilico - etanolo al 95 % (V/V), miscela 1 - 1 in volume). Sono stati aggiunti circa 0,3 ml di fenolftaleina (soluzione di 10 g/l in etanolo al 95-96 % (V/V)), utilizzata come indicatore, ed è stata effettuata la titolazione con una soluzione di idrossido di sodio (Soluzione titolata di NaOH all'incirca 0,1 mol. La concentrazione esatta della soluzione di idrossido di sodio deve essere nota e verificata immediatamente prima dell'uso), mantenendo in agitazione il campione, fino al raggiungimento del punto di viraggio.

3.4.2 Determinazione del numero di perossidi

Con questa analisi si determina il quantitativo di sostanze presenti nel campione che ossidano una soluzione acquosa satura di recente preparazione di ioduro di potassio nelle condizioni di seguito descritte. 2,5 g di olio sono posti in un pallone da 250 ml con collo smerigliato, preventivamente asciugati e riempito di gas secco inerte (azoto). L'olio è successivamente sciolto in 10 ml di cloroformio e 15 ml di acido acetico glaciale. A questa soluzione è aggiunto 1 ml di ioduro di potassio. Il

pallone viene poi tappato ed agitato per circa 1 minuto, dopodichè è lasciato riposare al buio per 5 minuti. Trascorso questo lasso di tempo sono aggiunti 75 ml di acqua distillata e 3-4 gocce di soluzione di amido (soluzione/dispersione acquosa 10 g/l). La titolazione è effettuata con tiosolfato di sodio (0.01 N soluzione acquosa) che determina la quantità di iodio precedentemente aggiunto e liberato durante il periodo di riposo del campione.

3.4.3 Determinazione delle costanti spettrofotometriche

L'esame spettrofotometrico nell'ultravioletto può fornire indicazioni sulla qualità di una sostanza grassa, sul suo stato di conservazione e sulle modificazioni indotte da processi tecnologici. Gli assorbimenti alle lunghezze d'onda previste nel metodo sono dovuti alla presenza di sistemi dienici e trienici coniugati. I valori di tali assorbimenti sono espressi come estinzione specifica $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (estinzione di una soluzione della sostanza grassa all'1 % nel solvente prescritto, in spessore di 1 cm) convenzionalmente indicata con K , (detto anche coefficiente di estinzione) 0.25 g dell'olio in esame sono posti in un matraccio da 25 ml e portati a volume con isottano (2,2,4 trimetilpentano spettrofotometricamente puro: in riferimento all'acqua distillata deve avere trasmittanza non inferiore al 60% a 220 nm e non inferiore al 95% a 250 nm). Verrà determinata l'estinzione della soluzione alle lunghezze d'onda prescritte in riferimento al solvente puro. Verranno poi calcolate le estinzioni specifiche:

$$KI = E_i/c_s$$

Dove KI è il coefficiente di estinzione specifica, E_i è l'estinzione misurata alla specifica lunghezza d'onda, c è la concentrazione della soluzione letta (g/100 ml) ed s è lo spessore della cuvetta (percorso ottico, in cm).

Il delta K si calcola sulla base della seguente formula:

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

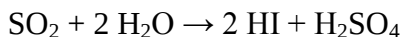
dove K_m è l'estinzione alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento (270 nm).

3.4.4 Determinazione della composizione in acidi grassi

Gli acidi grassi sono stati determinati come metil esteri dopo trattamento alcalino (FAMEs, Fatty Acid Methyl Esters - metodo ufficiale previsto dal regolamento EEC 2568/91 e successive modifiche). In breve la matrice olio è trattata sciogliendo 0.1 g di olio in 2 ml di n-eptano ed 1 ml di idrossido di potassio 2 N disciolto in metanolo. Dopo la separazione delle due fasi della miscela la parte a densità minore è stata analizzata con gascromatografo (GC-2010 Plus, Shimadzu Corporation, Japan) equipaggiato con autocampionatore, iniettore split/splitless, e ionizzatore a fiamma (Flame Ionization Detector – FID). Gli analiti sono stati separati mediante una colonna capillare con fase stazionaria composta dall'88% di Cyanopropylaryl-polyxilosane (HP88 – Agilent: 60 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm spessore del film). Come carrier gas è stato usato He: portata 0.89 ml/min, rapporto di split 1/50 v/v. Il volume di campione iniettato è stato di 1 µL. La rampa di temperature impostata è stata la seguente: 180 °C per 20 min, incrementi di 5 °C/min fino a 220 °C e 220 °C per 5 min. La temperatura del FID e dell'iniettore sono state entrambe impostate a 250 °C. I dati provenienti dal gascromatografo sono stati analizzati col software LabSolutions – GC solution Analysis Version 2.32.00 (Shimadzu, Japan). La composizione in acidi grassi è stata espressa come percentuale in peso sul totale degli acidi grassi presenti (g/100g FAME).

3.4.5 Determinazione del contenuto di acqua

Il contenuto di acqua presente negli oli è stato determinato mediante il metodo messo a punto dal chimico tedesco Karl Fischer. La titolazione effettuata si basa sull'ossidazione dell'anidride solforosa ad opera dello iodio riportata nella reazione sottostante:



La titolazione viene condotta in un solvente anidro, generalmente metanolo, in presenza di una base (imidazolo) capace di neutralizzare l'acido solforico prodotto dalla reazione e di creare una soluzione tampone che stabilizzi il pH su valori ottimali per lo svolgersi della reazione, compresi tra 5 e 7. L'acqua negli oli è stata pertanto determinata

con il kit analitico 37858 HYDRANAL ® - Moisture Test Kit from Fluka Analytical seguendo le istruzioni per l'uso.

3.4.6 Determinazione del contenuto in tocoferoli

Il contenuto in tocoferoli è stato determinato mediante cromatografia liquida HPLC secondo il metodo ISO 9936:2006. In breve: 1 g di campione è stato disciolto in 10 ml di eptano ed analizzato per la determinazione del contenuto dei singoli tocoferoli con un cromatografo HPLC-FLD Agilent 1200 Series system. Le lunghezze d'onda utilizzate sono state 295 nm per l'eccitazione e 330 nm per la rilevazione. La separazione è stata ottenuta per mezzo di una colonna 250 mm x 4.6 mm i.d., 100 Å, Luna Silica column (Phenomenex). La fase mobile usata è stata la seguente: t-butil-metilestere / eptano (5:95, v/v) in "isocratic elution mode". Il flusso di eluente è stato impostato a 1 ml/min e le analisi sono state condotte a 25 °C. Il volume di iniezione è stato di 10 µm e la durata di ciascuna analisi 40 min. I tocoferoli separati sono stati quantificati in mg per kg di olio.

3.4.7 Determinazione del contenuto in clorofille

Le clorofille sono state determinate seguendo la metodologia descritta da Pokorny et al., (1995). Secondo questa metodologia, sui campioni di olio, dopo filtrazione, è stata quindi effettuata la lettura spettrofotometrica diretta dell'assorbanza alle lunghezze d'onda di 630, 670 e 710 nm. Per ricavare la concentrazione delle clorofille totali è stata quindi applicata la seguente formula:

$$T_{\text{chlo}} = (345,3 (A_{670} - (A_{630} - A_{710})/2))/L$$

In cui:

T_{Chlo} = concentrazione in clorofille totali, espressa come mg*kg⁻¹ di feofitina

A₆₃₀ = valore di assorbanza (AU) a 630 nm;

A₆₇₀ = valore di assorbanza (AU) a 670 nm;

A₇₁₀ = valore di assorbanza (AU) a 710 nm;

L = percorso ottico (mm)

3.4.8 Determinazione dei biofenoli

Il contenuto in biofenoli è stato determinato secondo la metodologia COI/T.20/Doc.n°29 del Novemebre 2009. I biofenoli sono stati estratti a partire da 2 g di olio di oliva disciolti in 5 ml di soluzione metanolo-acqua (80-20, v/v). Lo standard interno usato è stato l'acidoiringico. 20 µl di estratto sono stati iniettati in HPLC-DAD (Agilent 1200 series system), equipaggiato con colonna LiChrospher® 100-RP18 (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm di diametro delle particelle). Il DAD per la rilevazione dei composti separati è stato settato a 280 nm. La fase mobile usata è stata composta da acido fosforico (0.2%) come eluente A e metanolo-acetonitrile 1/1 (v/v) come eluente B. La portata della fase mobile è stata di 1 ml/min, per una durata dell'analisi di 80 min. La composizione della fase mobile è stata variabile ed è riportata in tabella 6:

Tabella 6: composizione della fase mobile in funzione del tempo

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	96	4
27.5	65.6	34.4
35	65.6	34.4
40	50	50
45	40	60
60	0	100
70	0	100
80	96	4

3.4.9 Determinazione dei composti volatili

Le sostanze organiche volatili sono state determinate con tecnica HS-SPME-GC-MS (Head Space Solid Phase Micro Extraction Gas Chromatography Mass Spectrometry). Sono stati pesati 4.3 g di olio di oliva ai quali sono stati aggiunti 0.1 g di standard interno. Il tutto è stato posto in una vial da 20 ml coperta con setto in PTFE/Silicone. Lo

standard interno è costituito da una miscela di 11 composti, ciascuno nella concentrazione di 75 mg/kg: 3,4-dimetilfenolo, 2-metil-4-pentanololo, acido esanoico (d11), 1-butanolo (d10), acetato di etile (d8), toluene (d8), esanoato di etile (d11), acido acetico-2-2-2 (d3), 6-cloro-2-esanone, 3-ottanone, trimetil-acetaldeide. Dopo un tempo di 5 minuti di equilibratura, la fibra (50/30 µm DVB/CAR/PDMS, Supelco) è stata esposta per 20 min nello spazio di testa del campione. Le condizioni di esposizione sono state: temperatura 40 °C, orbital shaking 500 rpm. La fibra è stata successivamente desorbita per 2 min nell'iniettore in modalità splitless a 260 °C. Dopo ogni desorbimento la fibra è stata sottoposta al trattamento di "fiber back out" per 15 min allo scopo di evitare fenomeni di trascinamento di composti fra campioni successivi. L'identificazione dei composti volatili è stata effettuata mediante la separazione effettuata dal GC accoppiato ad uno spettrometro di massa quadrupolare (Trace GC-MS Thermo Fisher Scientific) equipaggiato con colonna capillare ZB-FFAP (Zebron, 30m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm spessore del film). La rampa di temperatura è stata così impostata: 36 °C per 10 min, incremento di 4 °C/min fino al raggiungimento di 156 °C, incremento di 10 °C/min da 156 °C a 260 °C e decremento a 250 °C in 1 min. La temperatura di 250 °C è stata mantenuta per 2 min. Come carrier gas è stato usato l'He a portata costante di 0.8 ml/min. La temperatura della fonte di ioni e della transfer line è stata impostata a 250 °C. Il rilevatore di massa è stato fatto operare in scan mode nel range 30-330 amu a 1500 amu/sec. L'energia di ionizzazione elettronica di impatto è stata di 70 eV. I composti sono stati identificati per comparazione con il loro spettro di massa e con il tempo di ritenzione tabulato.

La quantificazione è stata effettuata sulla base di una calibrazione linear least square del rapporto fra l'area dell'analita e quella dello standard interno di riferimento plottata in funzione della concentrazione dell'analita (mg/kg). I criteri per l'accettabilità della calibrazione sono stati: intercetta della retta prossima a zero e R^2 del modello >0.995. La concentrazione (C; mg/kg) del campione in rapporto allo standard (S) è stata determinata nel seguente modo:

$$C = (S - \text{intercetta } y) / \text{coefficiente angolare}$$

Per ogni standard è stato preparato un set di sei matrici a concentrazioni

differenti dalle quali è stata costruita la curva di calibrazione. Le concentrazioni sono state ottenute diluendo la soluzione madre con olio di oliva raffinato, verificato come privo degli analiti. Il range di concentrazioni di calibrazione per ciascun analita è stato scelto sulla base delle concentrazioni attese (da letteratura) nell'olio di oliva.

3.4.10 Panel test

L'analisi sensoriale degli oli è stata effettuata per mezzo di un panel compost da otto assaggiatori addestrati. Sono state compilate due schede: una è quella prevista dalla normativa (descritta nel regolamento CEE 2568/91 e successive modifiche); una seconda è invece stata sviluppata per mettere in evidenza gli eventuali attributi positivi degli oli.

La prima delle due schede è composta di due parti: percezione dei difetti e percezione degli attributi positivi. Nella sezione relativa ai difetti sono elencati i sei difetti più frequenti negli oli di oliva, più la voce "altro" nel caso fosse presente un difetto non riconducibile a nessuna delle voci precedenti. Ad ogni difetto è associata una linea continua di lunghezza 10 cm sulla quale ogni assaggiatore è tenuto a segnare l'intensità del difetto. L'estremità sinistra rappresenta l'assenza del difetto, mentre l'estremità destra rappresenta una sensazione fortissima. Perché un olio sia considerato extra-vergine è necessario che la mediana delle schede degli otto assaggiatori sia zero per ciascun difetto.

Foglio di profilo (ad uso dell'assaggiatore)	
PERCEZIONE DEI DIFETTI	INTENSITÀ
Riscaldamento	_____
Muffa-umidità	_____
Avvinato-inacetito	_____
Morchia	_____
Metallico	_____
Rancido	_____
Altri (precisare)	_____
PERCEZIONE DEGLI ATTRIBUTI POSITIVI	
Fruttato	_____
Amaro	_____
Piccante	_____
<u>Nome dell'assaggiatore:</u> _____ <u>Codice del campione:</u> _____	
<u>Data:</u> _____	

Figura 11: scheda di assaggio utilizzata per i test sensoriali

La sezione relativa agli attributi positivi è composta da tre voci: fruttato, amaro e piccante e corredata con le tre linee di intensità con il medesimo funzionamento delle precedenti. Fra queste, per l'extra-verginità di un olio è necessario che la mediana della voce fruttato sia maggiore di zero.

La scheda di assaggio prevista dal regolamento CEE è molto focalizzata sulla individuazione dei difetti e difetta nella descrizione degli attributi positivi. Per questa ragione è stata utilizzata anche la seconda scheda, sviluppata dal laboratorio chimico merceologico della camera di commercio di Firenze e pensata per la descrizione di oli di qualità.

In tale scheda sono mantenute inalterate le linee continue di 10 cm, ma sono approfonditi gli attributi positivi. La sezione fruttato è suddivisa in cinque sottosezioni: oliva (matura ed acerba), frutta a guscio, frutta (banana e mela), verdura ed erba. La sottosezione frutta a guscio contiene le voci: noce, pinolo, mandorla secca e mandorla fresca. La sottosezione

verdura contiene le voci: pomodoro, melanzana, cardo/carciofo. La sottosezione erba contiene le voci: erba fresca, erbe aromatiche, foglia di pomodoro, foglia di olivo. La sezione amaro è suddivisa in sole due sottosezioni: oliva e legno. Sono inoltre presenti le voci: piccante, astringente/tannico, fluidità, armonia e voto. Nella casella voto si riporta un numero da zero a dieci che indica il gradimento complessivo dell'olio.

I Selezione degli Oli Extra vergini di Oliva DOP e IGP della Toscana
 Campagna olearia 2011-2012

Percezione degli attributi positivi

Intensità di percezione

fruttato:		
erbaceo:		
specificare:		
frutto a guscio:		
specificare:		
fruttato:		
specificare:		
verdenza:		
specificare:		

erbaceo:

specificare:

erbaceo:

specificare:

piccante:

astringente/tannico:

fluidità:

gradimento complessivo di valutazione:

Disarmato

Armonico

notezze complessive

Data:

Assaggiatore:

Completato:

Capo posti

pag.1

Figura 12: scheda di assaggio utilizzata per lo studio degli attributi qualitativi positivi degli oli oggetto di studio.

3.4.11 Determinazione dei solidi sospesi

La determinazione dei solidi sospesi è stata eseguita mediante la determinazione delle impurità descritta nei metodi NGD (Norme Grassi e Derivati, metodo C7, 1976). Il metodo descrive come impurità tutte le sostanze insolubili in etere di petrolio, eccetto l'acqua e le sostanze volatili, quindi i solidi sospesi. Il metodo si basa sul discioglimento in etere di petrolio della sostanza grassa, sulla successiva filtrazione della soluzione e sulla pesatura dopo essiccamento del filtro. Sono stati prelevati circa 10 g di olio ed a questi sono stati aggiunti 200 ml di etere di petrolio. Il tutto è stato scaldato a 30-35 °C e mantenuto sotto

agitazione fino alla dissoluzione della sostanza grassa. Il contenitore è stato poi coperto e mantenuto per 5 ore a 20 °C. Successivamente è stata eseguita una filtrazione su filtro liscio preventivamente essiccato e tarato in pesafiltro. Il filtro è stato poi accuratamente lavato con etere di petrolio per eliminare gli eventuali residui di sostanza grassa. Il filtro è stato infine essiccato a 105 °C fino a peso costante. La percentuale di impurità si ricava dalla seguente espressione:

$$SS_{(\%)} = (m_1/m) * 100$$

dove SS sono i solidi sospesi o le impurità, m_1 è il peso delle impurità ed m è la massa di olio prelevate. Il metodo è pensato per fornire risultati con due cifre decimali.

3.4.12 Determinazione della torbidità

La determinazione della torbidità è stata eseguita mediante lettura spettrofotometrica a 630 nm. Come riportato in Peri (1973) i metodi turbidimetrici si basano infatti sull'effetto Tyndall, per cui le particelle disperse in una soluzione, avendo indice di rifrazione diverso da quello del liquido, provocano la diffusione della luce. Un turbidimetro misura la diminuzione dell'intensità della luce che attraversa il campione che è proporzionale al fenomeno della diffusione ed al numero di particelle disperse. Questa misura può essere effettuata quindi anche con un comune spettrofotometro. Nel caso dell'olio, che è colorato, la misura deve essere effettuata ad una lunghezza d'onda a cui corrisponde il minimo assorbimento del colore, quindi 630 nm.

3.4.13 Analisi del colore

Le analisi per la determinazione del colore dei cartoni esausti sono state effettuate su fotografie di porzioni dei cartoni stessi. I parametri L, a^* e b^* sono stati ricavati tramite il software Gimp.

2.5 Condizioni di conservazione

Gli oli sono stati posti in bottiglie di vetro scuro di capacità di 0.5 l. Per le

prove effettuate in Uruguay, ma con le analisi eseguite in Italia, questi sono stati conservati per il trasporto al riparo dalla luce, chiuse in apposite scatole di cartone, ed al riparo dall'azione dell'ossigeno, bottiglie chiuse e ben tappate (fatta eccezione per l'ossigeno presente nello spazio di testa delle bottiglie stesse). Inoltre per proteggere le bottiglie dagli sbalzi termici sono state rivestite con uno spessore minimo di 3 cm di polistirolo, avente funzione coibentante (conducibilità termica 0.04 W/mK).

Una volta giunte in Italia le bottiglie sono state poste in camere di conservazione appositamente costruite allo scopo di simularne la vita su uno scaffale della GDO. Le bottiglie sono state illuminate con una coppia di luci al neon (Philips, modello Master TL-D 90 Graphica, 35 W/390) con spettro di emissione nel visibile riportato in figura 13.

Queste lampade sono inoltre caratterizzate da una scarsa emissione nella regione spettrale ultravioletta. Le camere in questione sono state appositamente rivestite con materiale riflettente per omogenizzare il più possibile la quantità di energia luminosa ricevuta dai singoli campioni. Data l'impossibilità di porre tutti i campioni all'interno di un'unica camera, ad ognuna delle varietà in conservazione è dedicata una apposita struttura. Questo al fine di ridurre le differenze entro varietà causate dall'eventuale differente intensità luminosa prodotta dalle lampade alogene. Inoltre all'interno della camera le bottiglie sono state disposte in ordine completamente casuale, per non rendere sistematici gli effetti di eventuali zone a minore intensità luminosa (o effetti di bordo) che si possono venire a creare per le ragioni più disparate. Ad ogni prelievo le bottiglie sono nuovamente randomizzate.

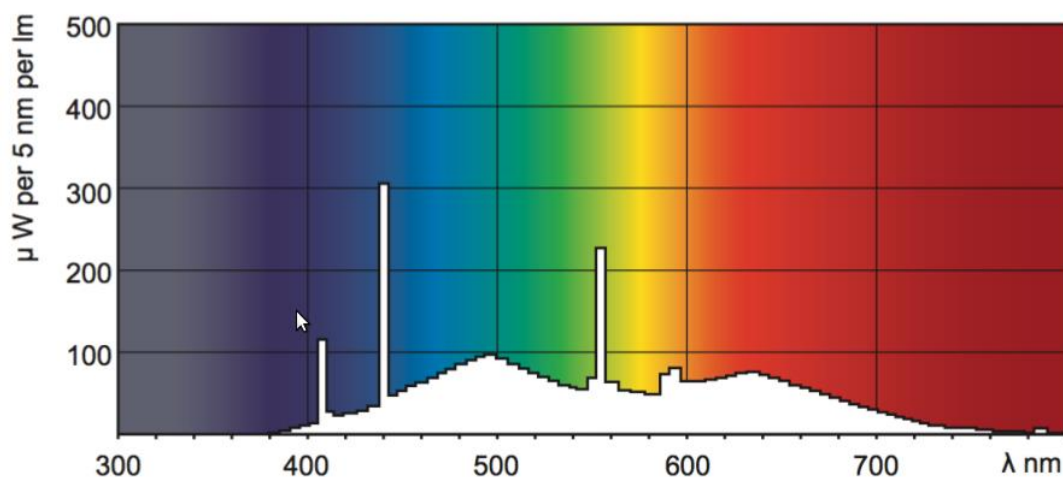


Figura 13: fotometria dei neon impiegati in conservazione

Il vetro delle bottiglie utilizzate riportava uno spettro di assorbimento della radiazione luminosa riportato in figura 14.

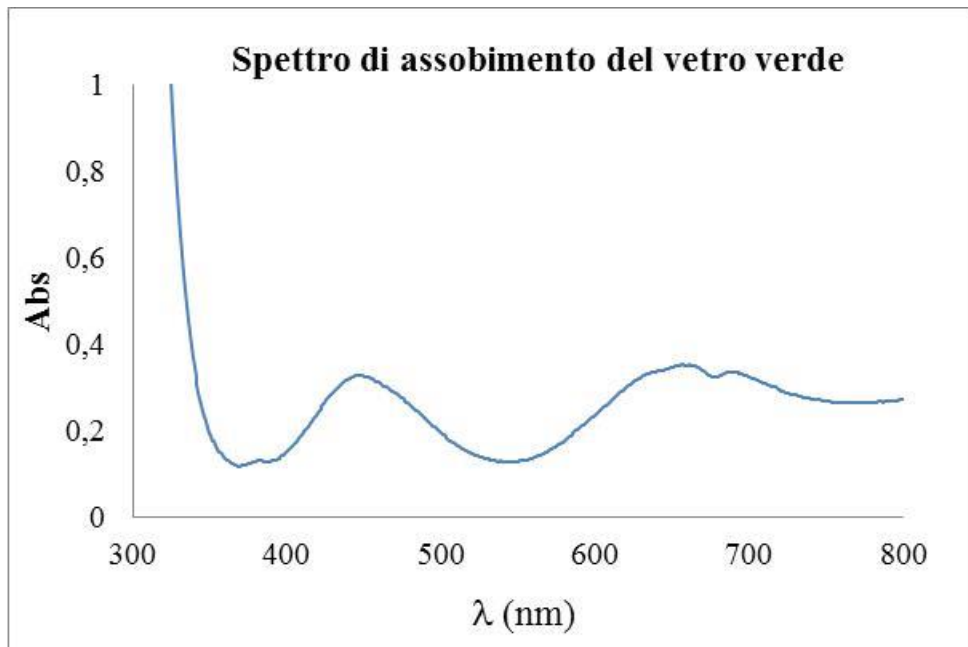


Figura 14: spettro di assorbimento del vetro delle bottiglie utilizzate nello shelf-life test

Le analisi per la valutazione degli effetti prodotti dal separatore durante la conservazione sono state effettuate ad agosto 2013 e ad ottobre 2013 per entrambe le cultivar. Inoltre è stato analizzato un terzo punto in dicembre 2013 solamente per la coratina.

2.6 Condizioni di stripping

Il trattamento di stripping è stato effettuato nella tubazione che collega il filtro al recipiente di raccolta dell'olio prima dell'imbottigliamento. Tale tubazione presentava lunghezza di 15 m e 0.20 m di diametro interno. Il gas scelto per la rimozione dell'ossigeno disciolto è stato l'azoto (certificato alimentare) somministrato con una portata di 17 l/min. L'introduzione del gas nella tubazione è stato effettuato a mezzo dell'iniettore in acciaio inox (Zaninox, Italia) rappresentato in figura 15.



Figura 15: iniettore utilizzato per l'introduzione dell'azoto nel trattamento di stripping.

L'iniettore è dotato di due ingressi, uno per il gas di stripping ed uno per l'olio di oliva. Il gas è diffuso all'interno del liquido mediante una doppia candele porosa che ne riduce la dimensione delle bolle, aumentando la superficie di scambio con liquido-gas.

2.7 Analisi statistica

L'effetto del trattamento in separatore e l'effetto del trattamento di stripping nelle prove eseguite in Uruguay sono stati valutati mediante test t a due code. Per ciascuna delle due cultivar oggetto di studio sono state eseguite tre repliche per trattamento. Il confronto è stato effettuato per ogni cultivar in ogni tempo di conservazione. Anche per il confronto operativo fra i due filtri è stato effettuato un test t a due code fra le cinque repliche oggetto di studio. I confronti fra olio mosto ed olio filtrato, fra le due tipologie di filtro e fra stripping e controllo sono stati valutati nel tempo mediante ANOVA a due vie, seguita da Tukey post-hoc test. Il software statistico utilizzato è stato R versione 3.1.2.

3. Risultati

3.1 Effetti del separatore centrifugo verticale sulla qualità dell'olio

Gli oli che sono stati processati per due volte nel separatore verticale hanno presentato un sensibile decremento qualitativo rispetto a quelli prodotti in maniera tradizionale, che hanno pertanto subito un solo passaggio all'interno della centrifuga, sia dal punto di vista analitico, sia dal punto di vista sensoriale.

Gli oli trattati avevano una concentrazione di ossigeno disciolto iniziale pari a 1.8 ppm e 0.7 ppm rispettivamente per Arbequina e Coratina. Dopo il secondo passaggio in separatore la concentrazione negli oli è arrivata a 6.7 ppm (Arbequina) e 6.3 ppm (Coratina). Tale aggiunta di ossigeno disciolto causata dal separatore è in linea con le osservazioni di Parenti et al. (2007) che quantificavano un'aggiunta di circa 5 ppm.

La temperatura degli oli in ingresso al separatore era 18 °C, mentre quella in uscita di 22 °C nel caso di Arbequina e di 21 °C per Coratina, quindi la temperatura si è incrementata rispettivamente di 4 °C e di 3 °C, valori in entrambi i casi ben superiori all'incremento di circa 1 °C di Alteri et al. (2014).

Sia nel punto di agosto, sia nel punto di ottobre, per entrambe le varietà considerate, dal set di analisi chimiche effettuate si può evidenziare un aumento del valore di assorbanza a 232 nm e del numero di perossidi, associato con una diminuzione in composti antiossidanti polari ed apolari (biofenoli e tocoferoli) e di pigmenti (clorofille) negli oli che hanno subito il doppio passaggio nel separatore centrifugo verticale rispetto agli altri oli.

Per quanto riguarda il primo punto i risultati sono riportati nelle tabelle 7 ed 8.

Tabella 7: In tabella si riportano i valori medi dei 3 campioni analizzati e fra parentesi la deviazione standard. La riga p riporta la probabilità che la popolazione trattata sia uguale alla popolazione di controllo. C rappresenta l'olio che ha subito il normale processo produttivo, mentre S indica l'olio che ha subito un doppio passaggio in separatore.

		Acidità (%)	N° perossidi (meqO2/kg)	K232	K270	Delta K	Umidità (%)
Arbequina	C	0.39 (0.01)	7.00 (0.79)	1.94 (0.01)	0.09 (0.01)	0.000 (0.000)	0.16 (0.01)
	S	0.36 (0.01)	8.73 (0.15)	2.14 (0.01)	0.09 (0.00)	0.000 (0.000)	0.13 (0.01)
p	-	0.01	0.05	0.008	0.43	0.99	0.05
Coratina	C	0.84 (0.01)	3.10 (0.20)	1.53 (0.02)	0.11 (0.01)	0.000 (0.000)	0.17 (0.02)
	S	0.78 (0.01)	5.53 (0.06)	1.76 (0.04)	0.11 (0.01)	0.000 (0.000)	0.14 (0.01)
p	-	0.01	0.004	0.01	1	0.43	0.01

I valori di acidità presentano differenze minime, anche se statisticamente significative, nei due trattamenti considerati ed, in entrambi i casi, l'olio con il doppio passaggio nel separatore verticale presenta valori di acidità libera inferiori. Inoltre il separatore, con un secondo trattamento è in grado di rimuovere una ulteriore piccola quantità di acqua dagli oli. In entrambe le cultivar infatti è rimosso lo 0.03% di acqua. Per quanto riguarda la Coratina sono stati misurati valori molto alti. Tale osservazione è spiegabile con il meccanismo di azione delle lipasi e con il coefficiente di ripartizione olio – acqua degli acidi grassi liberi che sono dotati di testa idrofila. Questa classe di enzimi idrolizza sono gli acil lipidi emulsionati ed è attiva all'interfaccia fra acqua ed olio. Il meccanismo di azione di questi enzimi può essere così sintetizzato: la testa idrofobica della lipasi è legata mediante interazioni idrofobiche all'olio, mentre il sito attivo dell'enzima si allinea e si lega alla molecola

di substrato. Mediante alcuni residui ammino-acidici recide il legame estereo del trigliceride liberando nell'olio l'acido grasso. Uno schema di questo meccanismo di azione è riportato da Brockerhoff (1974 – figura 16)

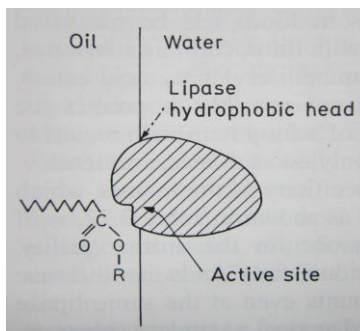


Figura 16: Modello ipotetico di ancoraggio di una lipasi all'interfaccia acqua olio (da Brockerhoff, 1974)

Dato questo meccanismo di azione è ipotizzabile associare nel nostro contesto l'acidità al contenuto di umidità dei nostri oli. Come già trattato nell'introduzione, nell'olio di oliva i sedimenti colloidali in sospensione formano sistemi a “reverse micelles”. Tali sistemi, forniscono un'enorme area all'interfaccia fra acqua ed olio, rappresentando dei siti ideali per l'attività della lipasi (Tsai & Chiang, 1991). Per una valutazione accurata dell'effetto dell'umidità sull'attività della lipasi sarebbe pertanto necessaria la quantificazione della distribuzione dei diametri delle gocce d'acqua disperse e dei residui solidi in sospensione. Tuttavia una correlazione fra acidità ed umidità può essere comunque stabilita.

La pendenza di queste rette è significativamente diversa da zero ($p < 0.05$) per entrambe le cultivar. I valori di varianza spiegati dalla correlazione (R^2) sono di 0.65 per Arbequina e di 0.77 per Coratina.

I valori relativi ai perossidi sono risultati, concordemente con il resto della letteratura esistente, inferiori nei campioni separati una sola volta rispetto a quelli separati due volte. Infatti, in Coratina gli oli doppiamente

centrifugati presentano una concentrazione di 5.53 meqO₂/kg, contro i 3.10 meqO₂/kg dei processati normalmente ed in Arbequina di 8.73 meqO₂/kg, contro 7.00 meqO₂/kg. Questo risultato costituisce un'ulteriore conferma che il contatto fra ossigeno atmosferico dovuto all'uso del separatore centrifugo verticale rappresenta una importante fonte di alterazioni ossidative. Lo stesso trend è riscontrabile dalla lettura spettrofotometrica a 232 nm. Il separatore aumenta il valore del K232 in tutti gli oli analizzati: in Arbequina si passa da valori medi di 1.94 a valori medi di 2.14, mentre in Coratina da 1.53 a 1.76. Il separatore innalza pertanto il valore del K232, avvicinandolo, nel caso di Arbequina al valore limite legale per gli oli extravergini di 2.5.

Non ci sono differenze significative per i parametri K270 e delta K.

Tabella 8: In tabella si riportano i valori medi dei 3 campioni analizzati in Agosto 2013 e fra parentesi la deviazione standard. La riga p riporta la probabilità che la popolazione trattata sia uguale alla popolazione di controllo. C rappresenta l'olio che ha subito il normale processo produttivo, mentre S indica l'olio che ha subito un doppio passaggio in separatore.

		Tocoferoli (ppm)	Biofenoli (ppm)	Clorofille (ppm)
Arbequina	C	222 (7)	187 (4)	8.3 (2.3)
	S	199 (4)	140 (2)	3.0 (0.0)
p	-	0.07	0.008	0.06
Coratina	C	255 (3)	370 (5)	9.0 (1.0)
	S	240 (10)	253 (12)	6.3 (0.6)
p	-	0.09	0.002	0.02

Il contenuto in composti antiossidanti apolari (tocoferoli) risulta influenzato in maniera statisticamente significativa negli oli di Arbequina dove si ha una riduzione di circa 10%. Anche negli oli di Coratina si ha una riduzione nel contenuto di questi composti (di circa il 6%), che è però solamente tendenziale. Ad oggi questi sono gli unici dati disponibili relativi all'ossidazione dei tocoferoli dovuta al separatore centrifugo

verticale. Anche il contenuto in clorofille risulta ridotto dall'azione del separatore centrifugo verticale, in accordo con le osservazioni di Altieri et al., (2014), ma in contrasto con quanto osservato da Masella et al. (2012 e 2009).

Il contenuto di biofenoli risulta anch'esso ridotto dall'azione dell'acqua di processo utilizzata nell'operazione, come osservato da Di Giovacchino et al., (1994). In Coratina si ha un abbattimento del 32% circa dei composti fenolici, mentre in Arbequina del 25%. Il separatore diminuisce la concentrazione di 15 composti fenolici in Arbequina e di 7 composti in Coratina. In particolare Coratina presenta una concentrazione molto elevata di idrossitirosolo (56 mg/kg) e tirosolo (43 mg/kg), indice di reazioni idrolitiche del legame estereo che scindono queste frazioni fenoliche dal resto delle molecole di secoiridoidi (Brenes et al., 2001). Dopo il trattamento del separatore la concentrazione dei due composti è portata rispettivamente a 15 mg/kg e 18 mg/kg. Questi composti rappresentano 66 mg/kg dei 116 mg/kg rimossi, quindi circa il 57%. Seppure di entità minore questa riduzione si riscontra anche in Arbequina, dove la concentrazione di 7 mg/kg di idrossitirosolo e di 6 mg/kg di tirosolo è portata a 1 mg/kg e 3 mg/kg. Questa riduzione è dovuta ai piccoli valori di coefficiente di ripartizione fra olio ed acqua (Kow) che questi composti presentano; ad esempio per il tirosolo Kow vale 0.077 (Rodis et al., 2002). La stessa spiegazione può essere data per la diminuzione della concentrazione osservata negli altri composti. Fra i composti fenolici a peso molecolare più elevato si rilevano, nella sola Arbequina, differenze significative nelle due forme aldeidica ed idrossilica (ossidata e non ossidata) dell'aglicone oleuropeina. Negli oli trattati con il separatore si hanno inoltre minori concentrazioni delle forme dialdeidiche degli agliconi di decarbossimetiloleuropeina e di decarbossimetilligstroside (Figura 17). E' probabilmente la maggiore solubilità che deriva dalla presenza delle forme aldeidiche ed idrossiliche ad aver determinato un più elevato depauperamento di queste sostanze. E' stata misurata inoltre una concentrazione maggiore di lignani negli oli di controllo.

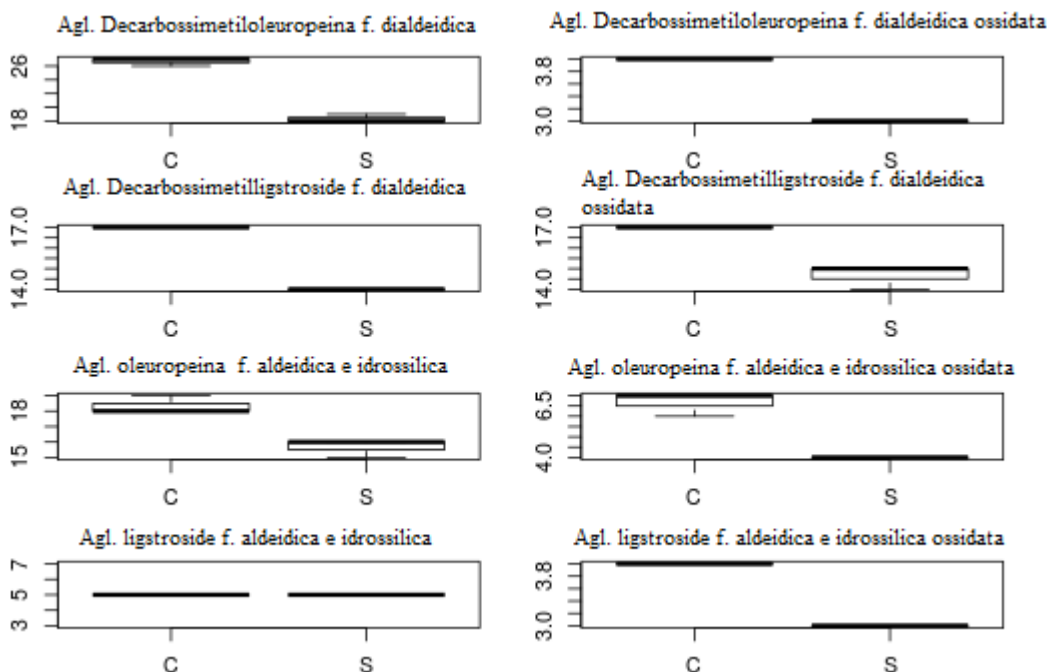


Figura 17: concentrazioni, espresse in mg/kg delle forme agliconiche aldeidiche ed aldeidiche ed idrossiliche dei secoiridoidi negli oli di controllo (C) e separati (S)

I composti rimossi dalla Coratina, sono praticamente gli stessi, con la sola aggiunta dell'idrossitirosilacetato.

Il separatore centrifugo verticale ha mostrato inoltre degli effetti sulla componente aromatica, che risulta essere ridotta dall'azione della centrifuga. Prima del trattamento, infatti, entrambi gli oli presentano valori di Fruttato di circa 3.50 (3.60 per Arbequina e 3.45 per Coratina), mentre dopo il separatore i valori sono di 2.70 per Arbequina e di 3.15 per Coratina. Questo risultato concorda con le osservazioni di Alteri et al. (2014) e di Masella et al. (2009) i quali, pur non avendo fatto panel test, riportano concentrazioni significativamente inferiori di composti organici volatili associati alle note di Fruttato. Masella et al. (2012) invece, centrifugando in atmosfera inerte, anziché alle normali condizioni di presenza di ossigeno, non riporta variazioni in questo tipo di composti. Questa differenza suggerisce che, nel corso della centrifugazione, la riduzione in composti organici volatili (quindi nel nostro caso nell'aroma

di fruttato) sia da imputare in qualche modo all'effetto dell'ossigeno atmosferico sull'olio. Infatti, nel corso dell'operazione, una notevole quantità di aria è emulsionata all'interno dell'olio di oliva a causa dell'alta velocità di rotazione della centrifuga e dell'incremento della superficie di scambio olio-aria causata dalla formazione di sottili film di olio sui dischi metallici rotanti del separatore.

La riduzione dell'amaro negli oli dovuta al separatore centrifugo verticale è concorde con la riduzione nel contenuto in costituenti fenolici, composti che conferiscono questa caratteristica all'olio di oliva, come documentato in letteratura (Visioli et al., 2002). In entrambe le cultivar infatti si è osservato un dimezzamento dell'indicatore dell'amaro nelle schede descrittive, passando da valori mediani di 0.8 a 0.4 nell'Arbequina e da valori di 2.95 a valori di 1.55 nella Coratina. Come atteso, la cultivar a maggior contenuto fenolico si è dimostrata più amara rispetto a quella a minor contenuto. Inoltre, una correlazione tendenziale fra contenuto in acidi fenolici ed amaro può essere intuita ($p=0.0844$).

I derivati dei secoidiridoidi sono infine responsabili della sensazione di piccante, tuttavia un decremento sensibile in questa sensazione è osservabile solamente nella cultivar a minor contenuto fenolico in cui si è passati da uno score di 2.3 ad uno score di 1.2. In Coratina non si sono registrate differenze apprezzabili.

Negli oli di Arbequina non sono emersi difetti sensoriali. Negli oli di Coratina invece entrambi i trattamenti presentavano il difetto di Riscaldamento, con intensità diverse, ovvero 2.80 per il separato una sola volta e 1.60 per il doppiamente separato. Anche per il Riscaldamento, come per il Fruttato, sono responsabili composti organici volatili quali, ad esempio, il 2-metilpropilbutanoato o l'acido butanoico (Morales et al., 2005). Negli oli di Coratina sono inoltre stati rilevati difetti di Avvinato nell'olio separato una sola volta e di Rancido nell'olio separato due volte. Una comparsa precoce del difetto di Rancido è coerente con il peggior stato ossidativo di questi oli (Tabella 9).

Tabella 9: Mediane degli attributi sensoriali emerse dai panel test. C rappresenta gli oli di controllo, mentre S gli oli trattati con il separatore.

		Fruttato	Amaro	Piccante	Riscaldo	Avvinato	Rancido
Arbequina	C	3.60	0.80	2.30	0.00	0.00	0.00
	S	2.70	0.40	1.20	0.00	0.00	0.00
Coratina	C	3.45	2.95	2.70	2.80	0.90	0.00
	S	3.15	1.55	2.75	1.60	0.00	0.35

Le stesse analisi sono state ripetute nel mese di ottobre 2013 ed hanno sostanzialmente confermato le indicazioni tratte da quelle di agosto.

I valori di acidità non mostrano stavolta differenze significative in entrambe le cultivar. È da notare però che, mentre nel punto precedente i valori di acidità libera inferiori erano associati agli oli separati, in questo batch di analisi i valori superiori sono entrambi associati ai campioni doppiamente separati. In Arbequina inoltre la differenza sul contenuto in idroperossidi risulta accentuata. Infatti, mentre i campioni differivano inizialmente di 1.73 meqO₂/kg, dopo due mesi circa differiscono di 3.64 meqO₂/kg. L'andamento del valore dei perossidi appare invece stabile in Coratina, dove la differenza in agosto era di 2.43 meqO₂/kg ed in ottobre di 2.63 meqO₂/kg. I valori di K232 sono risultati stabili rispetto al batch di analisi precedenti in entrambe le cultivar. Il valore di K270 invece è risultato incrementato sia in Coratina, sia in Arbequina, arrivando rispettivamente a 0.135 e 0.125 (Tabella 10).

Tabella 10: In tabella si riportano i valori medi dei 3 campioni analizzati e fra parentesi la deviazione standard. La riga p riporta la probabilità che la popolazione trattata sia uguale alla popolazione di controllo. C rappresenta l'olio che ha subito il normale processo produttivo, mentre S indica l'olio che ha subito un doppio passaggio in separatore.

		Acidità (%)	N° perossidi (meqO2/kg)	K232	K270	Delta K
Arbequina	C	0.39 (0.02)	6.66 (0.85)	1.94 (0.04)	0.12 (0.01)	0.002 (0.001)
	S	0.42 (0.01)	10.3 (0.75)	2.17 (0.08)	0.13 (0.01)	0.002 (0.000)
p	-	0.19	0.03	0.05	0.23	0.42
Coratina	C	0.92 (0.03)	3.90 (0.44)	1.54 (0.01)	0.13 (0.00)	0.001 (0.001)
	S	0.87 (0.01)	6.53 (0.31)	1.78 (0.01)	0.14 (0.00)	0.002 (0.000)
p	-	0.23	0.02	0.001	0.34	0.18

I valori misurati relativi ai composti antiossidanti: tocoferoli, biofenoli totali e clorofille sono riportati in tabella

Tabella 11: In tabella si riportano i valori medi dei 3 campioni analizzati in Ottobre 2013 e fra parentesi la deviazione standard. La riga p riporta la probabilità che la popolazione trattata sia uguale alla popolazione di controllo. C rappresenta l'olio che ha subito il normale processo produttivo, mentre S indica l'olio che ha subito un doppio passaggio in separatore.

		Tocoferoli (ppm)	Biofenoli (ppm)	Clorofille (ppm)
Arbequina	C	162 (1)	181 (3)	3.3 (0.6)
	S	158 (2)	143 (4)	2.0 (0.0)
p	-	0.04	0.009	0.06
Coratina	C	211 (3)	355 (2)	6.1 (0.0)
	S	187 (2)	253 (4)	4.3 (0.0)
p	-	0.05	0.001	0.001

In entrambe le cultivar la principale variazione si è avuta nella diminuzione del contenuto totale di tocoferoli negli oli. In Arbequina si sono degradati 60 mg/kg di vitamina E nella prassi produttiva normale e 41 mg/kg nei test che hanno subito un doppio trattamento in separatore. In Coratina queste perdite sono state rispettivamente di 44 mg/kg e di 53 mg/kg. Tale consumo di questi composti antiossidanti è dovuta principalmente alla foto-ossidazione indotta in questa categoria di composti dalla luce. È infatti nota da tempo l'attività di neutralizzazione dell'ossigeno singoletto dell' α -tocoferolo (Foote, 1979) ed è stata largamente descritta nell'olio di oliva (Pirisi et al., 1998). A fronte del consumo di composti antiossidanti lipidici, nei campioni oggetto della nostra sperimentazione, si è avuto un valore stabile nel contenuto di biofenoli totali. Questo consumo in tocoferoli, in contrasto con la stabilità dei composti antiossidanti polari, che si viene a formare quando l'olio è esposto alla luce è riportata in Psomiadou & Tsimidou (2000). Pure rimanendo valide le differenze significative fra olio separato una sola e due volte, l'ammontare totale di questi composti non si è modificato rimanendo né in Arbequina, né in Coratina. Baldioli et al., (1996) descrivono nel RANCIMAT un comportamento esattamente inverso, che

mostra un'instabilità negli oli correlabile con il contenuto di fenoli totali, ma non con il contenuto in tocoferoli. Considerato l'ambiente fortemente ossidante dello strumento usato, si può concludere che i tocoferoli proteggono l'olio contro le foto-ossidazioni, mentre i composti fenolici agiscono contro l'effetto dell'ossigeno atmosferico.

L'ossigeno dello spazio di testa della bottiglia è verosimilmente consumato nelle prime ore di vita dell'olio, che non sono state monitorate con le analisi. Dopo questo primo periodo, non si evidenziano diminuzioni nel contenuto totale di polifenoli (Psomiadou & Tsimidou, 2000). Infatti, sia in Arbequina, sia in Coratina il contenuto in questi composti è stabile. Dal primo al secondo punto di conservazione i polifenoli in Arbequina passano da 187 mg/kg a 151 mg/kg e da 140 mg/kg a 143 mg/kg, variazioni che non si fatica ad attribuire alla variabilità fra i campioni.

Lo stesso può essere detto per Coratina: nel doppiamente separato si hanno 253 mg/kg nel mese di agosto e lo stesso valore nel mese di ottobre. Il testimone passa invece da 370 mg/kg a 355 mg/kg.

Idrossitirosole e tirosole non aumentano nel corso della conservazione e non diminuiscono, al pari di tutti gli altri composti presenti. Non si rilevano infatti variazioni degne di nota nel profilo in composti antiossidanti polari di questi oli. Queste osservazioni sono concordi con quelle di Brenes et al. (2001).

Le clorofille, in quanto estremamente fotolabili, diminuiscono fra il primo ed il secondo punto, in particolare nel testimone che presentava concentrazioni maggiori. In Arbequina si arriva a contenuti di 2-3 mg/kg, mentre in Coratina, il testimone mantiene una concentrazione maggiore di pigmenti (6.1 mg/kg, contro 4.3 mg/kg). Dato che le clorofille hanno effetto pro-ossidante in presenza di luce e portano all'autossidazione degli acidi grassi e che la formazione di ossigeno singoletto (che va a depauperare il contenuto in tocoferoli) può essere attribuita negli oli per circa l'80% alla foto-ossidazione delle clorofille (Rawls & Van Santen, 1970), una sorta di bilancio che tenga in considerazione contenuto in clorofille, tocoferoli e presenza della sensazione di rancido può essere intuito. Entrambi i trattamenti su Arbequina hanno mostrato il difetto di Rancido, con intensità differenti: un valore di 1.5 è stato attribuito al tal

quale, che presentava una dote maggiore di composti antiossidanti lipofili e di clorofille. Il maggior consumo (fotolisi) delle clorofille (5 mg/kg in meno fra i due punti) si associa al maggior consumo in tocoferolo. Il doppiamente separato invece presenta una mediana del Rancido di 2.5 punti, associata ad un contenuto minore in tocoferoli. Inoltre il basso contenuto in clorofille ha indotto una minore ossidazione degli antiossidanti lipofili. La Coratina conferma queste osservazioni: il difetto di rancido negli oli doppiamente separati è già presente nel primo batch di analisi ed è associato al minor contenuto in composti antiossidanti lipofili. Risulta però poco chiara, in questo caso, l'azione della luce sulle clorofille che sono moderatamente depauperate. Il difetto di Rancido è molto intenso nel mese di ottobre di questi oli (3.0 per gli oli del testimone e 3.5 per quelli con doppio passaggio in separatore). Anche in questo caso, l'alta dotazione in composti antiossidanti polari non è servita per proteggere l'olio di oliva dalla comparsa di questo difetto. Gli attributi positivi risultano coperti in questi oli dai difetti presenti.

3.2 Effetti della filtrazione su olio proveniente dal decanter

Considerati gli effetti negativi all'olio di oliva provocati dall'utilizzo del separatore centrifugo verticale, in alcuni frantoi di piccole dimensioni, particolarmente votati all'alta qualità, si sta diffondendo la pratica di escludere quest'ultima centrifugazione e di filtrare direttamente l'olio proveniente dal decanter (olio mosto).

Dato che questa modalità di lavoro è molto recente non esistono test che mostrino, nel tempo, gli andamenti qualitativi dell'olio prodotto con impianti a ciclo continuo, ma non trattato con il separatore centrifugo verticale. Non esistono inoltre test che valutino gli effetti sulla qualità dell'olio mosto della filtrazione, né prove operative su filtri che si trovano a dover trattare un olio in condizioni di maggior contenuto di acqua e di maggior carico in solidi sospesi, quindi in condizioni più "difficili" che nella normale prassi operativa.

3.2.1 Effetti della filtrazione su olio appena prodotto

Come già riportato nell'introduzione, nella normale prassi operativa, l'opportunità di filtrare o meno l'olio di oliva è dibattuta in letteratura, con una prevalenza della fazione che propende per effettuare questa pratica. Nelle prove di seguito riportate si confrontano gli effetti qualitativi che la filtrazione produce su oli non processati dal separatore centrifugo verticale, quindi in condizioni di minor concentrazione di ossigeno disciolto, maggiore concentrazione di composti idrosolubili, contenuto di solidi sospesi ed acqua. Essendo molto recente la procedura di prelevare l'olio dal decanter non esistono dati sul decorso, durante la conservazione, dei parametri chimici e sensoriali di questi prodotti.

Le descrizioni analitiche a confronto degli oli mosti appena prodotti e dei rispettivi oli filtrati sono riportate in tabella 12.

Tabella 12: confronto fra i parametri analitici misurati alla produzione degli oli. La p riportata indica la probabilità che non ci siano differenze fra gli oli filtrati e gli oli mosto.

	Mosto	Filtrato	p
Acidità (%)	0.26 (0.03)	0.22 (0.03)	0.25
Perossidi (meqO ₂ /kg)	3.87 (0.47)	4.53 (0.87)	0.33
K232	1.71 (0.15)	1.77 (0.14)	0.06
K270	0.14 (0.03)	0.15 (0.02)	0.18
Delta K	-0.005 (0.001)	-0.005 (0.001)	0.18
Tocoferoli (mg/kg)	197 (12)	196 (13)	0.53
Clorofille (mg/kg)	19 (4)	18 (4)	0.18
Polifenoli (mg/kg)	337 (45)	313 (46)	0.05
Umidità (%)	0.24 (0.12)	0.07 (0.01)	0.04

Coerentemente con gli articoli riscontrabili in letteratura, non ci sono differenze significative tra campioni di olio filtrato e non filtrato dal punto di vista dell'acidità nelle analisi effettuate subito dopo la filtrazione. Gli

oli hanno entrambi valori abbastanza bassi di acidità: 0.26% e 0.22%. Anche per il parametro “numero di perossidi” non si ritrovano differenze. Infatti il prodotto non filtrato presenta una media di 3.87 meqO₂/kg, mentre il prodotto filtrato di 4.53 meqO₂/kg. Questa differenza (p=0.33) di 0.66 meqO₂/kg appare abbastanza limitata, anche se coerente con la possibile maggiore formazione di perossidi legata all’esposizione all’aria nel filtro. Il K232 aumenta negli oli filtrati (p=0.06), sempre presumibilmente a causa dell’ossidazione sopra descritta. Questo è incrementato dalla filtrazione di 0.06 punti. La probabilità associata all’uguaglianza fra le tesi è, in questo caso, di 0.06. I due principali parametri indice di stress ossidativo hanno in questi test lo stesso verso in quanto presentano valori più alti, evidenziando che, in effetti, un lieve stress ossidativo iniziale può avvenire nel filtro-pressa. Tale stress determina un tendenziale incremento di K232 e di numero di perossidi che appare irrilevante, vista la sua esigua entità, per la qualità dell’olio, ma comunque esiste. Gli altri due parametri spettrofotometrici, K270 e delta K, non mettono in evidenza differenze legate al trattamento. Il contenuto di acqua risulta essere significativamente inferiore negli oli filtrati, in quanto uno degli scopi della filtrazione è proprio la rimozione dell’acqua dispersa dall’olio che avviene a causa della cellulosa. Il cambiamento di questo parametro testimonia che le filtrazioni sono state condotte correttamente.

Per quanto riguarda i composti antiossidanti, la filtrazione non produce effetti negativi sulla concentrazione di tocoferoli. Questa osservazione conferma quanto asserito nella review di Lozano-Sanchez et al., (2010). Nei nostri campioni non si rilevano nemmeno perdite per quanto riguarda la concentrazione di clorofille. Si rileva una minore quantità di composti fenolici negli oli filtrati (p=0.05). Infatti in media gli oli filtrati presentano circa 24 mg/kg di biofenoli in meno dei corrispettivi oli mosto. La riduzione nella concentrazione di questi composti è imputabile alla rimozione dell’acqua residua dall’olio effettuata dalla cellulosa (p=0.04) ed al coefficiente di ripartizione di queste sostanze sbilanciato a favore della fase acquosa.

Dall’analisi dei singoli biofenoli, in sette composti sono state messe in luce differenze (p<0.10). In particolare si può notare come i composti a

minore peso molecolare siano trattenuti nella cellulosa che costituisce il filtro. Il comportamento di questi composti, in particolare di idrossitirosolo, tirosolo, vanillina, si può spiegare con il loro coefficiente di ripartizione fra acqua e olio che mostra la loro maggiore affinità con la fase acquosa che è rimossa dal filtro (Rodis et al., 2002).

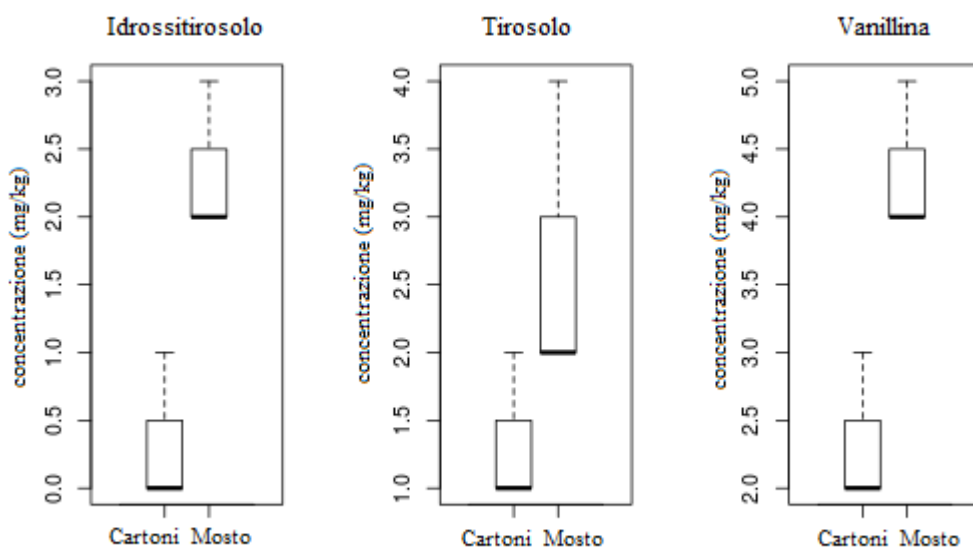


Figura 18: confronto fra le concentrazioni di biofenoli a basso coefficiente di ripartizione olio/acqua negli oli filtrati e negli oli mosto.

La loro ritenzione è descritta in Lozano-Sanchez et al. (2011) che prende in considerazione due diversi preparati commerciali per la filtrazione: *Filtracel* e *Vitacel*. *Filtracel* è una carbossimetilcellulosa al sodio, mentre *Vitacel* è anch'essa una cellulosa di composizione non specificata nella scheda tecnica dal produttore. Un differente comportamento ritentivo per questi composti è descritto: solo idrossitirosolo e vanillina fra i composti a basso peso molecolare sono ritenuti da entrambi i tipi di cellulosa. La rimozione selettiva di alcuni composti piuttosto che di altri da parte di alcune cellulose, appare un fenomeno da approfondire. La possibilità di rimuovere dal mezzo composti indesiderati, lasciando nell'olio la quasi totalità dei composti graditi cambiando il coadiuvante di filtrazione può essere un possibile ambito di sviluppo per la filtrazione dell'olio di oliva.

Fra i composti a maggiore peso molecolare gli agliconi in forma aldeidica ed idrossilica ossidata sia di oleuropeina, sia di ligstroside sono trattenuti dalla cellulosa. Dal punto di vista chimico è possibile che i gruppi maggiormente idrofilici (alcol) abbiano giocato un ruolo fondamentale, dato che gli stessi composti in forma dialdeidica non presentano differenze.

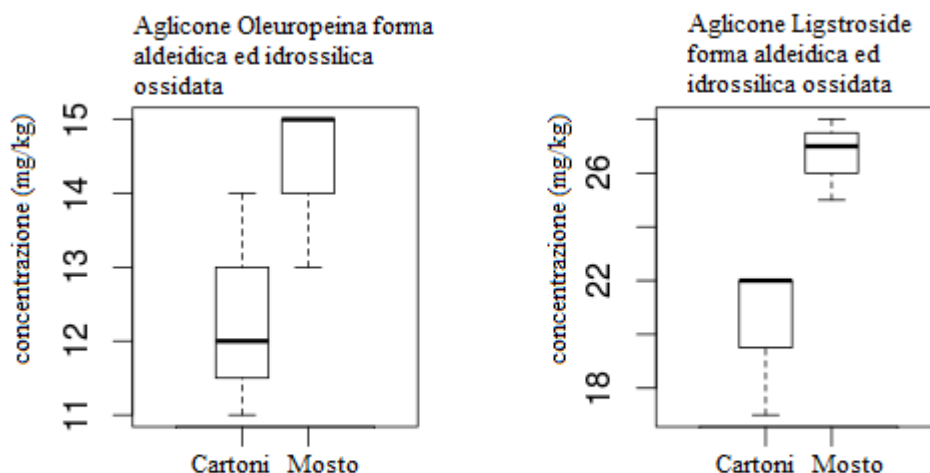


Figura 19: concentrazione delle forma aldeidiche ed idrossiliche ossidate degli agliconi di oleuropeina e di ligstroside negli oli mosto e negli oli filtrati.

Infine anche alcuni composti a minore affinità con la fase acquosa risultano trattenuti dalla cellulosa: luteolina e pinoresinolo. La luteolina appartiene alla classe dei flavonoidi e, fra questi è uno fra i composti più affini alla fase olio ($\log P_{ow} = 3.22$; Rothwell et al., 2005), mentre il pinoresinolo appartiene alla classe dei lignani ($P_c = 1.10$; Sacchi et al., 2002).

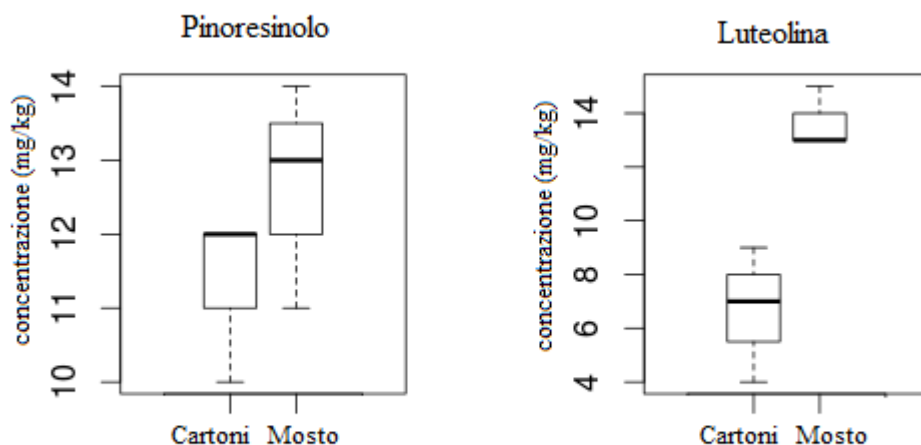


Figura 20: concentrazioni di composti con coefficiente di ripartizione favorevole alla fase apolare negli oli mosto e negli oli filtrati.

Il contenuto di composti organici volatili negli oli varia da un minimo di 24 mg/kg ad un massimo di 38 mg/kg. Gli oli non filtrati in questo caso sono dotati di una quantità maggiore di questi composti ($p=0.04$), in una percentuale compresa fra l'1% ed il 17%, confermando le osservazioni di Bubola et al. (2012) per oli provenienti dal separatore centrifugo e successivamente filtrati. Per quanto riguarda i composti organici volatili presi singolarmente, differenze fra le tesi ($p<0.10$) sono state ritrovate in sei composti (Figura 21).

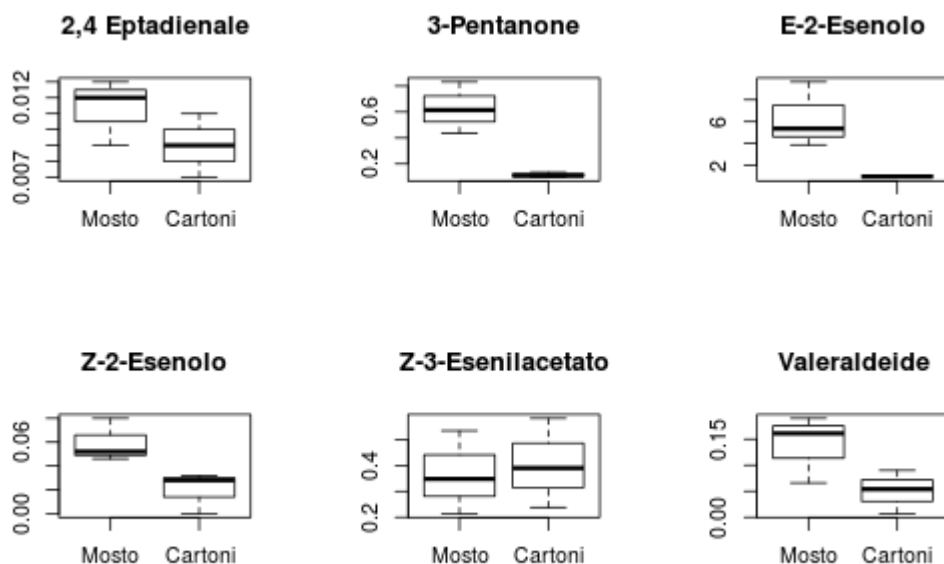


Figura 21: composti organici volatili con concentrazioni (esprese in mg/kg) differenti ($p < 0.10$) fra olio mosto e olio filtrato

Dei sei composti mostrati in figura, cinque hanno concentrazioni più elevate negli oli mosto ed uno, lo Z-3-esenilacetato, negli oli filtrati. Gli esteri acetato sono solitamente associati, negli oli, a difetti di avvinato. Anche negli oli mosto la molecola 2,4 eptadienale presente in maggiori concentrazioni è associata ad un difetto: quello di rancido (Morales et al., 1997). Gli altri composti presenti in maggiore quantità negli oli mosto sono associati invece a sensazioni positive “verdi” (Kalua et al., 2007). Nei test triangolari che sono stati effettuati per la valutazione degli effetti della filtrazione, dopo un mese dal trattamento, 4 campioni su 5 sono stati ritenuti diversi dagli assaggiatori. La caratteristica discriminante però non è stata associata alla minore intensità delle note aromatiche, bensì sul fatto che negli oli non filtrati è stato evidenziato il difetto di riscaldamento.

3.2.2 Effetti della filtrazione a cartoni durante la conservazione

Durante la conservazione degli oli sono apparsi più evidenti i benefici dell'operazione di filtrazione. L'acidità libera negli oli è cresciuta

linearmente nel tempo per l'olio mosto, mentre è rimasta costante per gli oli filtrati. Infatti il coefficiente angolare è maggiore di zero per l'olio mosto ($p=0.01$), mentre è uguale a zero per l'olio filtrato a cartoni ($p=0.83$). Nell'olio mosto si è passati da una media iniziale dello 0.26% di acido oleico libero ad una media finale dello 0.33%. Questo incremento indica delle reazioni di idrolisi avvenute negli oli, ma il valore finale di acidità libera dell'olio mosto è comunque accettabile per un olio extravergine.

Tabella 13: acidità libera espressa in percentuale di acido oleico negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	0.28 (0.05)	0.19 (0.01)	0.10
Febbraio	0.24 (0.07)	0.15 (0.02)	0.12
Aprile	0.29 (0.10)	0.17 (0.01)	0.18
Maggio	0.32 (0.03)	0.19 (0.03)	0.02
Luglio	0.33 (0.07)	0.20 (0.01)	0.11

Lo stress ossidativo dovuto alla filtrazione è riscontrabile mediante un valore più alto nel contenuto di idroperossidi, che era stato osservato alla produzione degli oli, diviene marcato nel corso della conservazione. Essendo in ambiente impermeabile all'ingresso di nuovo ossigeno, la differenza in questo parametro è rimasta pressoché invariata nel corso dell'intera vita degli oli oggetto di studio. La differenza è statisticamente significativa in tutti i punti di conservazione

Tabella 14: numero di perossidi espresso in milliequivalenti di ossigeno per kg negli oli filtrati con filtro-prensa e con filtro-prensa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	4.13 (0.61)	6.00 (0.31)	0.03
Febbraio	4.41 (1.07)	6.77 (1.13)	0.002
Aprile	4.41 (1.00)	6.27 (0.80)	0.006
Maggio	3.72 (0.62)	5.60 (0.54)	0.02
Luglio	3.57 (0.23)	5.40 (0.66)	0.02

Concordemente con quanto osservato per il parametro dei perossidi, la differenza iniziale osservata per il K232 rimane pressoché inalterata per tutti i punti di conservazione. Questi due parametri indice di stress ossidativo si comportano alla stessa maniera, evidenziando che il lieve stress ossidativo iniziale permane durante la conservazione, ma non comporta conseguenze più gravi per la qualità dell'olio nel tempo.

Tabella 15: K232 negli oli filtrati con filtro-prensa e con filtro-prensa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	1.63 (0.07)	1.69 (0.07)	0.002
Febbraio	1.62 (0.06)	1.79 (0.06)	0.05
Aprile	1.59 (0.06)	1.67 (0.11)	0.15
Maggio	1.62 (0.07)	1.73 (0.06)	0.007
Luglio	1.57 (0.04)	1.64 (0.08)	0.11

Anche il parametro K270, che subito dopo la produzione degli oli non aveva mostrato differenze fra i trattamenti presenta valori leggermente più alti negli oli filtrati durante la conservazione. Questo parametro è usato di solito per la misura dei cheto-dieni coniugati prodotti dall'ossidazione dei lipidi poli-insaturi ed è pertanto anche questo una misura diretta delle

reazioni di ossidazione secondarie (Marquez-Ruiz et al., 2008). In entrambi i casi siamo però ancora lontani dal limite di legge per gli oli extra-vergini di 0.22.

Tabella 16: K270 negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	0.13 (0.02)	0.13 (0.01)	0.34
Febbraio	0.13 (0.01)	0.15 (0.01)	0.03
Aprile	0.13 (0.00)	0.15 (0.01)	0.20
Maggio	0.14 (0.01)	0.16 (0.01)	0.07
Luglio	0.16 (0.01)	0.16 (0.02)	0.42

I valori di delta K sono invece minori negli oli filtrati fino al batch analizzato in Aprile, successivamente non ci sono differenze fra i due trattamenti. Anche per questo parametro in entrambi i casi siamo ben lontani dal limite legale per gli extra-vergini di 0.01.

Tabella 17: delta K negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	-0.003 (0.000)	-0.004 (0.001)	< 0.001
Febbraio	-0.000 (0.000)	-0.003 (0.001)	0.02
Aprile	-0.000 (0.000)	-0.002 (0.001)	0.08
Maggio	0.001 (0.000)	0.001 (0.001)	0.89
Luglio	0.002 (0.001)	0.001 (0.001)	0.27

Non ci sono differenze significative per quanto riguarda i composti antiossidanti lipofili, anche se nei batch di analisi di gennaio e febbraio, gli oli filtrati presentano valori tendenzialmente più alti di tocoferoli.

Tabella 18: concentrazione di tocoferoli in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	175 (12)	187 (14)	0.07
Febbraio	166 (6)	173 (6)	0.10
Aprile	160 (11)	169 (4)	0.40
Maggio	170 (8)	171 (3)	0.85
Luglio	147 (10)	150 (5)	0.69

Le clorofille diminuiscono durante la conservazione degli oli in entrambe le tesi. Tuttavia negli oli mosto la concentrazione di clorofille diminuisce più lentamente. Questo potrebbe essere dovuto alla riduzione dell'intensità luminosa provocata dalle particelle in sospensione che possono diffrangere ed assorbire la radiazione incidente. Valori paragonabili di concentrazione delle clorofille si hanno ad esempio in aprile per l'olio mosto ed in gennaio per gli oli filtrati. Ulteriori approfondimenti di questo fenomeno potrebbero essere necessari.

Tabella 19: concentrazione di clorofille in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	18 (4)	13 (4)	0.01
Febbraio	16 (2)	7 (3)	0.004
Aprile	13 (4)	4 (1)	0.04
Maggio	4 (3)	2 (1)	0.13
Luglio	0 (0)	0 (0)	-

Il contenuto in biofenoli è maggiore durante la conservazione negli oli sottoposti a filtrazione, ma aumenta nel tempo per entrambi gli oli. Tale comportamento può essere sia positivo, sia negativo per la qualità dell'olio a seconda della causa dell'aumento di tali composti.

Tabella 20: concentrazione di biofenoli in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Mosto	Filtrato	p
Gennaio	332 (28)	352 (46)	0.12
Febbraio	332 (69)	343 (55)	0.28
Aprile	366 (49)	371 (51)	0.16
Maggio	379 (46)	396 (50)	0.03
Luglio	359 (98)	399 (52)	0.30

Per questa ragione è necessario andare ad analizzare l'andamento di ciascuno dei composti rilevati dal metodo analitico.

Per quasi tutti i composti ed in quasi tutti i punti di conservazione esistono differenze fra la tesi non filtrata e quella filtrata. Fra i composti fenolici le maggiori differenze di comportamento sono riscontrabili per il tirosolo e per l'idrossitirosolo. Gli oli mosto presentano concentrazioni molto più elevate di questi fenoli, a conferma della più intensa attività idrolitica che hanno subito. Infatti, mentre le concentrazioni crescono negli oli mosto da circa zero a quasi 60 mg/kg per l'idrossitirosolo e a circa 40 mg/kg per il tirosolo, negli oli filtrati la concentrazione di questi composti rimane stabile. Questo avviene principalmente a causa della rimozione dell'acqua che inibisce le reazioni di idrolisi, rendendo quindi più stabile la frazione dei secoiridoidi (Figura 22).

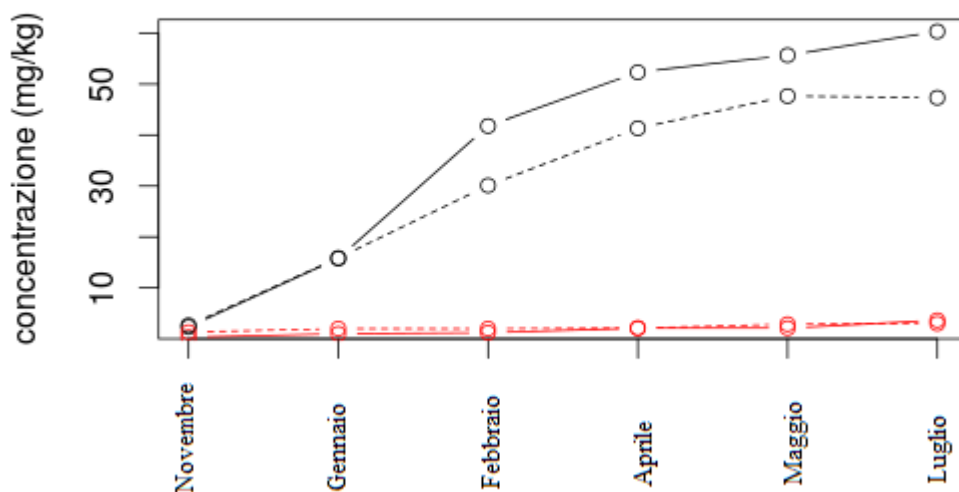


Figura 22: concentrazione di tirosolo (linea tratteggiata) ed idrossitirosolo (linea continua) negli oli mosto (colore nero) e negli oli filtrati (colore rosso)

A conferma delle minori idrolisi subite dalla frazione dei secoiridoidi, l'oleuropeina, composto caratteristico dell'olio ad alto peso molecolare, è mantenuta in maggiore quantità negli oli filtrati rispetto al relativo olio mosto.

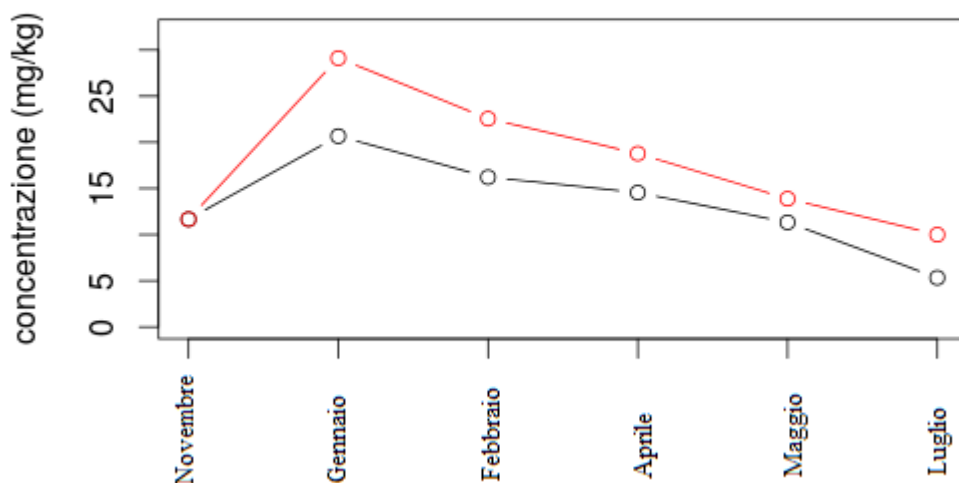


Figura 23: concentrazione di oleuropeina nell'olio mosto (in nero) e nell'olio filtrato (in rosso)

Altre differenze significative sono state misurate nelle forme agliconiche derivate da oleuropeina e ligstroside. Per tutte queste forme, eccetto che per la forma ossidata dell'aglicone ligstroside in forma aldeidica ed idrossilica, si misura una maggiore concentrazione di secoiridoidi negli oli sottoposti a filtrazione. Inoltre, lo stato più ossidato in cui si trovavano gli oli filtrati (maggiore numero di perossidi, maggiore K232, maggiore K270) sembra non aver inficiato in maniera sostanziale la frazione di antiossidanti polari, in quanto l'unico fra questi composti a maggiore concentrazione negli oli mosto è proprio una forma ossidata.

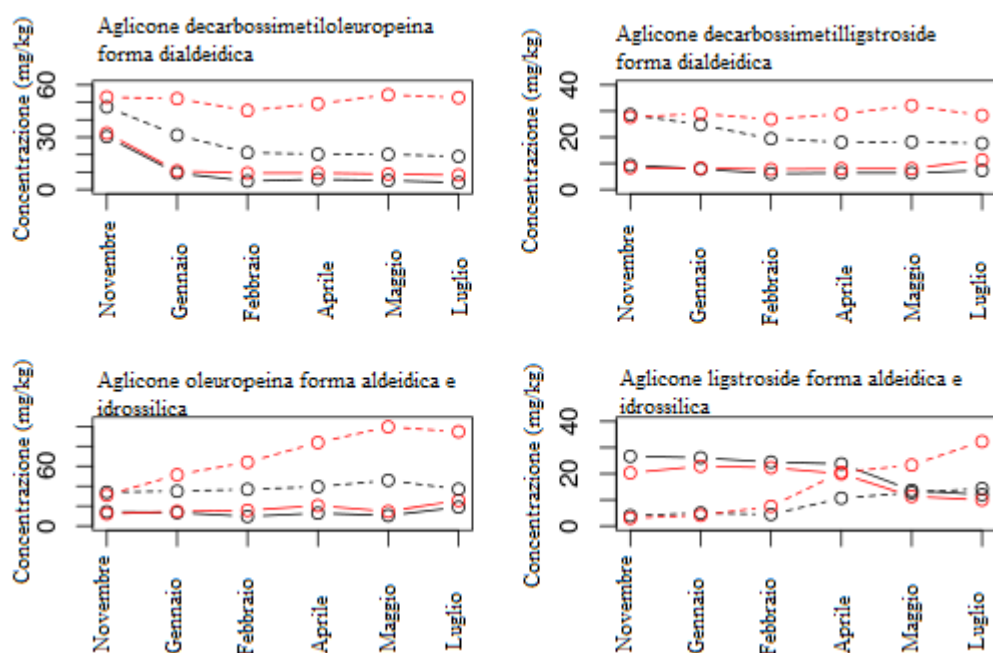


Figura 24: concentrazioni dei secoiridoidi in forma agliconica che hanno mostrato differenze significative ($p < 0.10$) durante la conservazione. In rosso gli oli filtrati ed in nero gli oli mosto. La linea continua è relativa alla forma ossidata del composto, mentre quella tratteggiata alla forma non ossidata.

Se per i secoiridoidi le differenze fra i due trattamenti sono chiare, per i lignani e per i flavonoidi non si hanno indicazioni così marcate. La luteolina, ad esempio, si ritrova in concentrazioni più alte negli oli mosto. E' possibile che l'ossidazione subita inizialmente sia andata a ridurre la concentrazione di questa molecola in particolare.

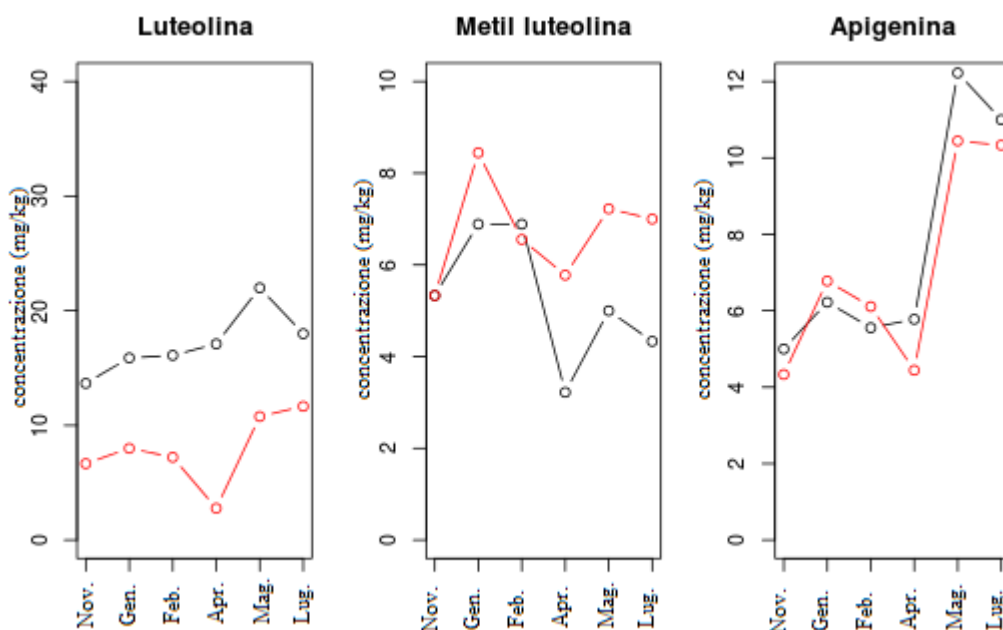


Figura 25: concentrazione di flavonoidi negli oli mosto (in nero) e negli oli filtrati (in rosso)

Le differenze maggiori fra gli oli mosto e gli oli filtrati sono tuttavia state riscontrate negli attributi sensoriali. Infatti, tutti i membri del panel test sono stati in grado di discriminare i filtrati ed i non filtrati all'analisi sensoriale che sono state messe in evidenza mediante le schede descrittive previste dal Reg. CEE 2658/91. Già nel panel test effettuato a gennaio, quindi 90 giorni dopo la produzione e la filtrazione degli oli, gli assaggiatori hanno percepito negli oli non filtrati i descrittori negativi di Riscaldamento (mediana di 1.8) e di Rancido (mediana di 2.8), mentre le mediane di entrambi i difetti sono state 0 per gli oli sottoposti a filtrazione. Viceversa gli attributi positivi sono stati trovati solamente negli oli filtrati, che sono stati descritti con mediane di Fruttato, Amaro e Piccante rispettivamente di 4.5, 4.2 e 5.5. Nel mese di gennaio gli oli prelevati direttamente dal decanter, nelle condizioni di conservazione scelte, non possedevano i requisiti per essere commercializzati come extra-vergini. Per gli oli filtrati invece il difetto si è presentato nel mese di luglio, dove nei campioni è stato riscontrato il difetto di Rancido, legato

alle condizioni di spinta foto-ossidazione in cui gli oli erano conservati. La via biochimica che porta alla formazione di attributi positivi nell'olio di oliva prende il nome di via della lipossigenasi e genera composti a 5 o 6 atomi di carbonio a partire da acidi grassi poli-insaturi. Gli oli mosto e filtrati hanno prodotto diverse quantità di questi composti. In particolare i prodotti della scissione dei 13-idroperossidi ad opera della idroperossido liasi (HPL) che hanno fatto misurare concentrazioni diverse sono lo Z-3-esenale, l'E-2-esenale e l'E-2-esenolo. Negli oli filtrati sono state ritrovate concentrazioni maggiori dei primi due composti, mentre nell'olio mosto dell'ultimo. Quindi, mentre negli oli privi di acqua e solidi sospesi agisce la reazione di isomerizzazione fra Z-3-esenale ed E-2-esenale, con l'equilibrio spostato a favore di quest'ultimo, negli oli non filtrati la via metabolica prosegue con l'intervento di un alcol deidrogenasi (ADH) che catalizza la riduzione dell'aldeide insatura nell'alcol insaturo.

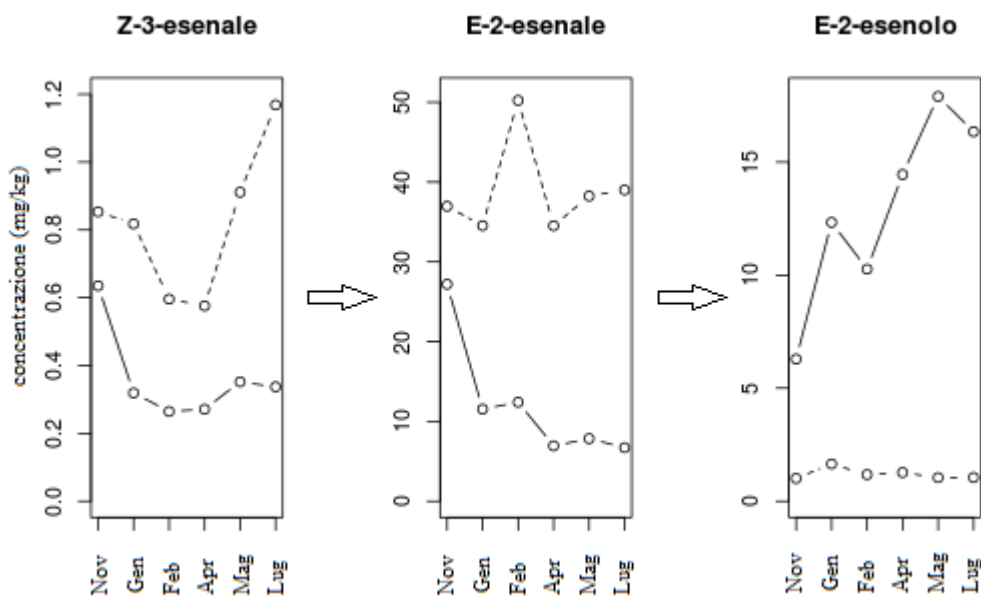


Figura 26: concentrazione di composti a 6 atomi di carbonio prodotti con la via della lipossigenasi. La linea continua è relativa agli oli non filtrati, mentre quella tratteggiata agli oli filtrati.

Una seconda via metabolica di trasformazione dello Z-3-esenale attiva e

diversa in funzione del trattamento è quella che trasforma lo Z-3-esenale in Z-3-esenolo per mezzo di un ADH e successivamente in Z-3-esenilacetato mediante catalisi di una alcol acetil transferasi (AAT). Questa via è sfavorita rispetto alla precedente, come si può notare dalle minori concentrazioni in gioco. Anche in questo caso l'attività dell'ADH è favorita negli oli mosto e si registra una diminuzione della concentrazione dell'aldeide a favore di quella dell'alcol (Figura 27).

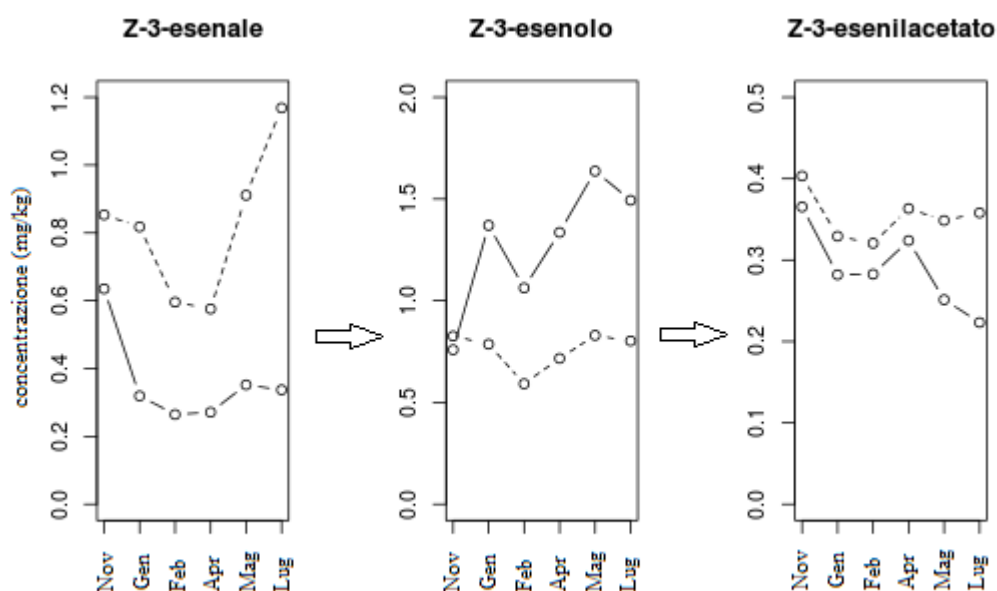


Figura 27: concentrazione di composti a 6 atomi di carbonio prodotti con la via della lipossigenasi. La linea continua è relativa agli oli non filtrati, mentre quella tratteggiata agli oli filtrati.

L'esenilacetato è invece maggiore negli oli filtrati, con concentrazioni pressochè stabili durante tutta la conservazione.

Se i 13 idroperossidi seguono la via della scissione radicalica si originano invece composti a 5 atomi di carbonio che portano alla formazione di alcoli insaturi, che sono successivamente ossidati nelle rispettive aldeidi.

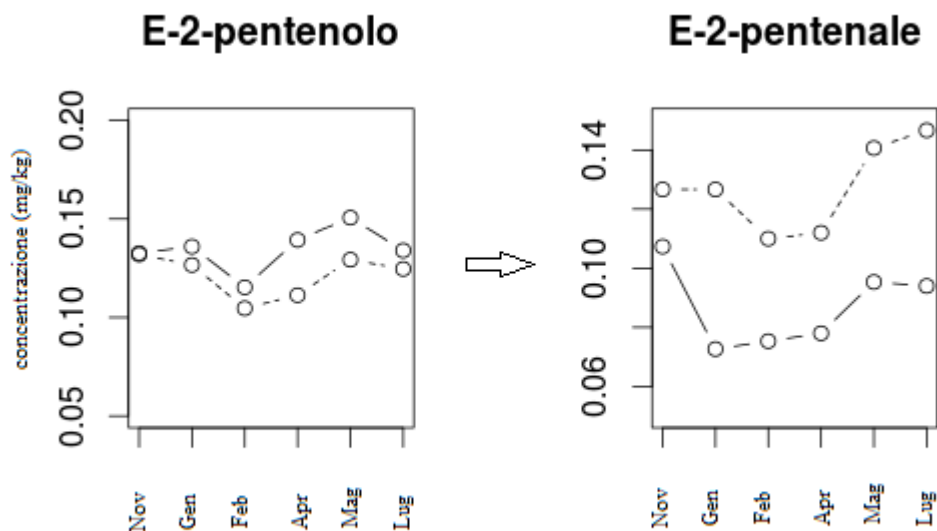


Figura 28: concentrazione di composti a 6 atomi di carbonio prodotti con la via della lipossigenasi. La linea continua è relativa agli oli non filtrati, mentre quella tratteggiata agli oli filtrati.

Negli oli mosto si ha una maggiore concentrazione di E-2-pentenolo, che è ossidato a E-2-pentenale, più concentrato negli oli filtrati, probabilmente a causa dello stato ossidativo più avanzato di questi ultimi. Coerentemente con quanto percepito dagli assaggiatori, dalle analisi cromatografiche sono differenze anche per quanto riguarda i pattern di molecole che vanno a costituire i difetti dell'olio di oliva.

Nello studio di Morales et al., (2005) sono identificati alcuni pattern di molecole che possono dar luogo ai difetti di Riscaldamento e Rancido. Il profilo aromatico associato ad oli con difetto di Riscaldamento è composto da molte molecole e non sempre i pattern molecolari che lo determinano contengono gli stessi composti chimici. Fra questi si può notare la serie di acidi organici dall'acido acetico (C2), all'acido ottanoico (C8). In questa serie, tre composti risultano differenti fra gli oli mosto e gli oli filtrati: acido propanoico, acido butirrico ed acido ottanoico, tutti a concentrazioni più elevate negli oli mosto. Il primo è presente in quantità maggiori all'inizio della conservazione degli oli, cresce fino a

raggiungere il suo massimo nel mese di Aprile, ed è successivamente consumato fino a scomparire già dopo 45 giorni dal suo massimo. Anche gli altri due acidi presentano nel tempo concentrazioni più elevate negli oli mosto (Figura 29).

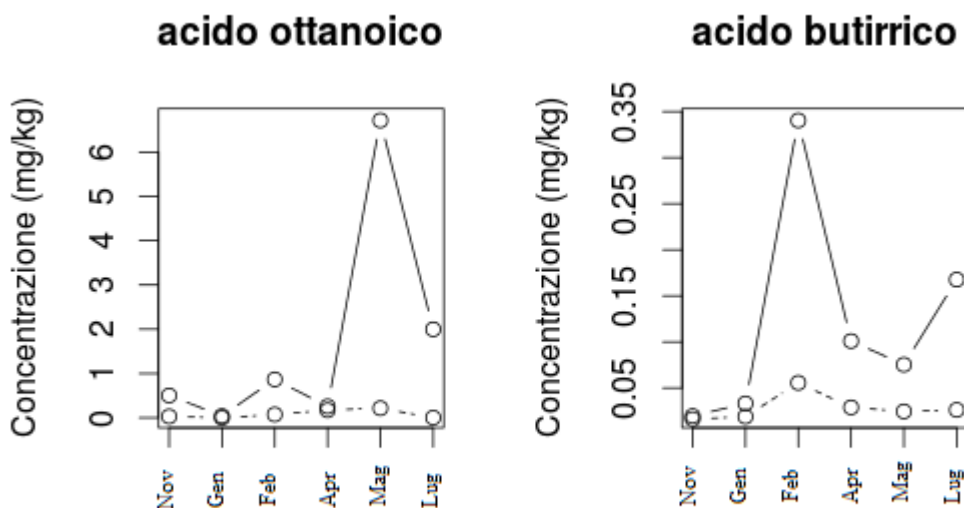


Figura 29: acidi organici che appartengono al pattern aromatico del difetto di riscaldamento negli oli filtrati (linea tratteggiata) e negli oli mosto (linea continua).

Appartengono al pattern del Riscaldamento anche composti come l'ottano ed il 2-butanone, anche questi più concentrati negli oli mosto. Nelle tesi oggetto di studio Anche il 2-fenil etanolo, che è stato associato a difetti di riscaldamento (Di Giacinto et al., 2010), si presenta in concentrazioni significativamente superiori nelle tesi non filtrate. Coerentemente con quanto affermato dal panel di assaggiatori, gli oli mosto presentano molecole che contribuiscono alla formazione del Riscaldamento a concentrazioni più elevate.

L'analisi del gruppo di composti organici volatili che compongono il difetto di rancido mostra che anche tali molecole si ritrovano a concentrazioni più elevate negli oli mosto. Appartengono a questo gruppo composti volatili da 7 a 10 atomi di carbonio quali, dieni, idrocarburi

saturi, aldeidi ed acidi. I composti ad 8 atomi di carbonio significativamente maggiori negli oli mosto sono stati l'ottano e l'acido ottanoico (già discusso anche per il riscaldamento). Fra le aldeidi, 3 hanno mostrato differenze significative: eptanale, nonanale ed E-2-decenale.

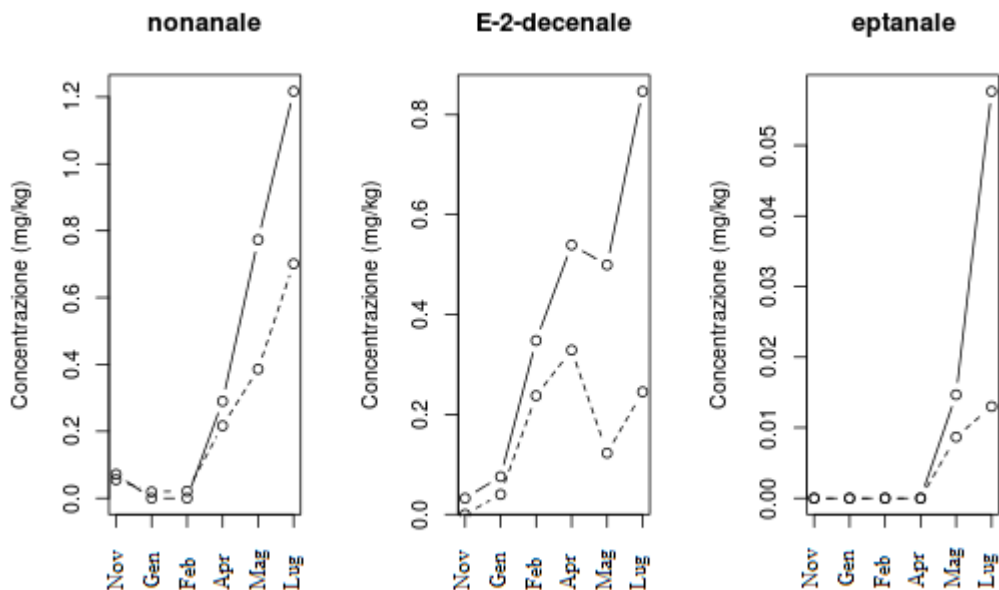


Figura 30: aldeidi alifatiche associate al difetto di rancido misurate negli oli filtrati (linea tratteggiata) e negli oli non filtrati (linea continua).

Il E-2-decenale è presente da subito in quantità maggiore negli oli mosto, mentre le altre due aldeidi iniziano a formarsi nel mese di Aprile, mantenendosi sempre a concentrazioni più basse negli oli filtrati. Anche i dieni coniugati crescono nel corso della conservazione e sono maggiori negli oli mosto. Il 2,4-eptadienale è presente in concentrazioni più elevate in questi ultimi già dal mese di gennaio, mentre il 2,4-decadienale inizia a formarsi nel mese di aprile.

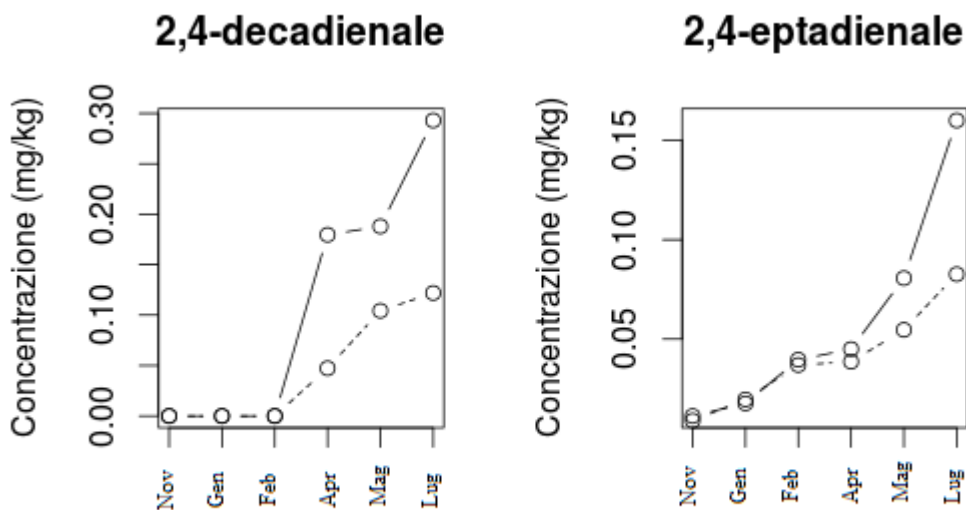


Figura 31: dieni associati al difetto di rancido misurati negli oli non filtrati (linea continua) e negli oli filtrati (linea tratteggiata)

3.3 Addizione di uno step di sgrossatura ad un filtro pressa

3.3.1 Test di messa a punto del sistema

Nel corso della campagna olearia 2012 sono stati effettuati una serie di test per la messa a punto del sistema di pre-filtrazione progettato. In primo luogo sono state effettuate delle prove per la verifica della dimensione delle particelle da ritenere. Come già precedentemente discusso, la dimensione delle particelle solide sospese, era già stata individuata da Koidis e collaboratori (2008). Sono state effettuate pertanto delle prove di filtrazione con cartucce in acciaio da 30 pollici di diversi diametri. Le porosità testate sono state di: 3, 5, 10, 20, 40 e 50 micron. La quantità di solidi trattenuti nelle diverse cartucce è stata valutata per differenza di peso fra inizio e fine ciclo di filtrazione e, nel tentativo di fare in modo che ciascuna cartuccia ritenesse la stessa quantità di solidi

sospesi è stata scelta la serie 40, 20, 5 micron. La superficie finale relativa al pre-filtro scelta per le prove è stata di 0.47 m^2 .

Successivamente è stato dimensionato il filtro-pressa a valle del pre-filtro. Le dimensioni dei setti più diffuse nelle realtà agricole toscane sono il $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ ed il $40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$, con prevalenza dei sistemi con setti di maggiore dimensione. Un primo test è stato eseguito sugli oli di cultivar Frantoio e Coratina con filtro-pressa $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ equipaggiato con 5 setti filtranti V8. Gli oli filtrati in questa maniera sono risultati ricchi di acqua (0.32% per la Coratina e 0.48% per il Frantoio). Il valore risulta inaccettabile visto il valore massimo target imposto di 0.2%. In questo caso la bassa superficie filtrante (0.2 m^2) non è stata sufficiente a trattenere tutta l'acqua contenuta nell'olio mosto filtrato. Una difficoltà nel dimensionamento corretto della superficie filtrante per il parametro umidità consiste nel non conoscere l'umidità iniziale degli oli che si vanno a trattare al momento della filtrazione in linea. Tale valore si può conoscere infatti soltanto a posteriori dopo test di laboratorio. La variabilità nel contenuto di acqua degli oli provenienti dal decanter è alta e cambia in base alle caratteristiche delle olive in ingresso ed alle condizioni operative (livelli, temperatura, portata della pompa di alimentazione, ecc.). Nelle prove su Frantoio e Coratina gli oli in uscita dal decanter risultavano molto sporchi, ricchi cioè di acqua e sospensioni. In queste prove inoltre la portata di olio mosto in alimentazione al filtro è risultata troppo elevata e la filtrazione, conseguentemente, scarsamente controllabile. Tale problematica è stata risolta dotando il motore della pompa di un inverter, che ha permesso di regolare la portata.

La superficie filtrante è stata successivamente aumentata, in primo luogo utilizzando un filtro $40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$, ed in secondo luogo aumentando il numero di setti filtranti a 7 (superficie = 1.12 m^2).

Per verificare la capacità di trattenimento dell'acqua da parte dei setti in cellulosa è stata monitorata l'umidità durante la filtrazione di un batch da 350 l di olio proveniente dal separatore centrifugo verticale.

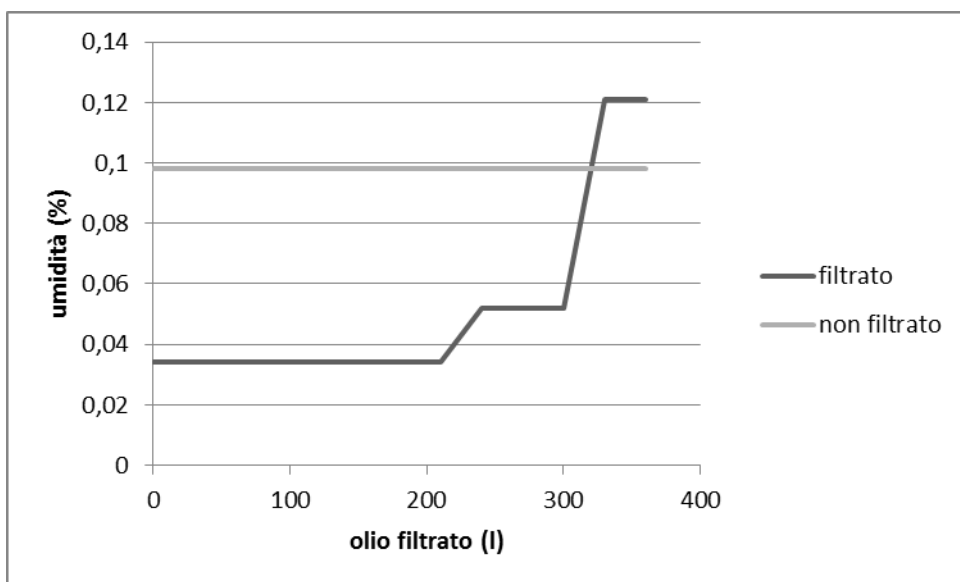


Figura 32: umidità dell'olio prima della filtrazione (in grigio) ed all'uscita del filtro dopo diverse quantità di prodotto trattato (in nero).

L'olio in ingresso stavolta presentava una bassa umidità iniziale (0.098 %), quindi già di per sé inferiore al valore massimo di 0.2% usato come target, ed un contenuto inferiore di solidi sospesi legato al fatto che tale olio proveniva dal separatore. I cartoni sono stati in grado di trattenere i 2/3 dell'acqua in ingresso per i primi 220 l di olio trattato. Successivamente la quantità di acqua trattenuta è rapidamente diminuita, per arrivare, dopo 350 l ad un valore di umidità di 0.121%, quindi superiore a quello di partenza. Si è quindi ipotizzato che, in questa ultima fase, i cartoni non solo non ritengono più acqua, ma anzi ne cedono una parte all'olio.

Durante tutti i test che sono stati effettuati in seguito l'umidità dell'olio non è più risultata essere limitante per il ciclo di filtrazione, che è stato interrotto dal raggiungimento della massima pressione di esercizio. Resta comunque importante la messa a punto di un sistema capace di misurare rapidamente, meglio se in linea con il filtro, il contenuto di acqua degli oli. L'eccesso di acqua, nel caso si ripresentasse rimane asintomatico e determinabile solo a posteriori con analisi di laboratorio. Il setto filtrante di passo V8 è stato mantenuto nel corso di tutti i test in quanto garantisce, a detta dei tecnici del frantoio che ha ospitato la sperimentazione, gli

standard qualitativi in termini di torbidità e brillantezza dell'olio desiderati dall'azienda.

3.3.2 Prove operative con filtro-prensa precedute da pre-filtro

Come precedentemente descritto, il filtro nella configurazione testata, è composto da due parti: una in acciaio che ritiene la frazione solida di dimensioni superiori a 5 μm , ed una che è costituita dal filtro-prensa già in uso nell'azienda che, grazie alla cellulosa ritiene l'acqua e la frazione solida di dimensioni inferiori ai 5 μm . La parte in acciaio effettua prevalentemente un'azione di superficie, mentre la parte in cellulosa ha invece un effetto prevalente di profondità. Le performance del filtro sono state comparate con quelle di un filtro-prensa utilizzato nelle normali condizioni operative di frantoio. Cinque oli mosto sono stati pertanto filtrati sia con un metodo, sia con l'altro. I filtri a cartoni di entrambi i sistemi sono stati equipaggiati con 11 setti filtranti (40 cm x 40 cm) V8 (Cordenons, Italia). Le caratteristiche monitorate negli oli mosto sono riportate in Tabella 21.

Tabella 21: Parametri chimici e fisici degli oli mosto. I valori riportati sono medie fra le 5 repliche $\pm$ la deviazione standard.

Acidità libera (%)	0.17 ± 0.02
Numero di perossidi (meqO_2/kg)	4.24 ± 0.65
K232	1.65 ± 0.03
K270	0.12 ± 0.02
ΔK	-0.004 ± 0.001
Tocoferoli (mg/kg)	206 ± 11
Biofenoli (mg/kg)	369 ± 40
Umidità olio (%)	0.24 ± 0.12
Solidi Sospesi (%)	0.18 ± 0.14
Torbidità (Abs 630 nm)	> 1

Il cambiamento della portata in funzione del tempo è diverso per i due

filtri. Inizialmente il filtro-prensa ha una portata maggiore di quello a step separati, a causa delle maggiori perdite di carico provocate dal filtro in acciaio posizionato davanti al filtro-prensa. Tuttavia, dopo circa 3 minuti di lavoro, la portata in uscita diviene maggiore nel filtro dotato di pre-

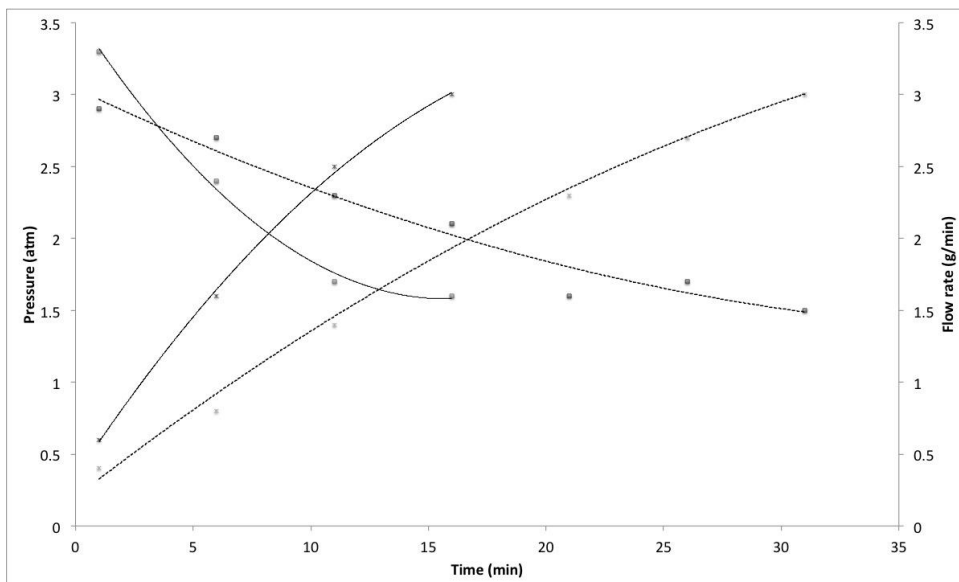


Figura 33: Andamento della pressione (primo asse verticale) e della portata (secondo asse verticale) in funzione del tempo. Le linee continue rappresentano il ciclo di filtrazione tradizionale, mentre le linee tratteggiate la configurazione con il pre-filtro. Le crocette sono relative agli incrementi di pressione, mentre i quadratini alla portata.

filtro e così rimane per tutta la durata del ciclo di filtrazione. Infatti nel tradizionale filtro-prensa la resistenza aumenta molto più velocemente, come testimoniato dal più rapido incremento di pressione letto sul manometro. Questa resistenza va a diminuire la differenza di pressione che determinava la velocità di passaggio dell'olio attraverso i setti filtranti (legge di Hagen-Poiseuille) e di conseguenza abbassa la portata in uscita dal filtro-prensa (Figura 33).

Le performance operative dei due filtri a confronto sono riassunte in tabella 22.

Tabella 22: confronto fra i parametri operativi dei due filtri. I valori sono le medie delle 5 repliche $\pm$ la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori differenti ad un test del t Student ($p < 0.05$).

Parametro	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa
Portata iniziale (g/min)	3171 $\pm$ 339 a	2831 $\pm$ 238 b
Tempo di riempimento (s)	208 $\pm$ 30 a	454 $\pm$ 11 b
Tempo di filtrazione (s)	1903 $\pm$ 293 a	4255 $\pm$ 916 b
Durata totale del ciclo (s)	2111 $\pm$ 323 a	4709 $\pm$ 927 b
Pressione di fine ciclo (atm)	3.0	3.0
Olio filtrato (kg)	78.4 $\pm$ 14.4 a	144.0 $\pm$ 16.9 b
Olio perso (kg)	4.276 $\pm$ 0.11	4.205 $\pm$ 0.20
Olio perso (%)	5.5 $\pm$ 0.7 a	2.9 $\pm$ 1.1 b
Acqua trattenuta (g)	145.2 $\pm$ 6.3 a	214.4 $\pm$ 65.5 b
Solidi sospesi trattenuti (g)	73.4 $\pm$ 32.9 a	230.0 $\pm$ 149.4 b

Nelle condizioni operative testate le durate medie dei cicli di filtrazione sono state di 35 minuti per il filtro-pressa tradizionale e di 78 minuti circa per l'assetto dotato di pre-filtro. Il tempo di riempimento medio dei due filtri è stato di circa 3 minuti e mezzo per il filtro a cartoni, mentre di 7 minuti e mezzo per il sistema a due step separati. Le due diverse durate del ciclo di filtrazione hanno determinato due quantità diverse di olio filtrato per batch. Infatti il filtro a cartoni ha filtrato una media di 78.4 kg di olio mosto, mentre con l'aggiunta delle cartucce di acciaio una media di 144 kg, quindi circa 1.8 volte il metodo tradizionale. In particolare questo comporta un consumo di 14 setti 40 cm x 40 cm per quintale di olio per il filtro-pressa ed un consumo di 7.6 setti nel nuovo sistema. Tali setti comportano per il frantoio un costo di acquisto di circa 90 c€ l'uno,

che devono, a fine ciclo di filtrazione, essere smaltiti ad un costo stimabile in circa 60 c€, sempre cadauno.



Figura 34: setti filtranti utilizzati e stoccati in un bin all'esterno dell'impianto.

La capacità operativa può essere pertanto migliorata con l'aggiunta del pre-filtro in acciaio prima di quello a cartoni.

Per quanto riguarda la capacità dei due filtri nella rimozione di acqua e solidi sospesi è possibile affermare che non c'è stata differenza nel valore finale di torbidità. Il grado di limpidezza dell'olio è rimasto costante durante tutto il ciclo, assestandosi su valori di assorbanza di circa 0.08 punti dall'inizio alla fine. Gli olii trattati contenevano quantità variabili di acqua, comprese fra lo 0.13% del primo olio e lo 0.43% dell'ultimo. Entrambi i filtri sono stati in grado di rimuovere l'acqua fino al valore di 0.07 %. Anche nella quantità di frazione solida rimossa i due filtri hanno ottenuto i medesimi risultati. Le cartucce hanno trattenuto una quantità variabile di sedimenti. In particolare quella da 40 micron ha tolto circa il 13.2% (minimo l'8% e massimo il 17.5%) dei sedimenti di dimensione maggiore di 5 micron, mentre le altre due circa il 43% ciascuna. La cartuccia che ha ritenuto la quantità maggiore di sedimenti è stata quella da 20 micron nelle prove 1, 2 e 4, mentre è stata quella da 5 micron nelle prove 3 e 5. In teoria le 3 cartucce, per massimizzare l'effetto della pre-filtrazione, dovrebbero ritenere il 33% dei solidi sospesi ciascuna, quindi nelle prove operative il filtro è stato usato in condizioni non troppo distanti dall'optimum. Solamente la prima cartuccia è rimasta

parzialmente sottoutilizzata.

Alla fine delle prove i setti filtranti sono stati analizzati per stimare la quantità di acqua e di olio che avevano trattenuto. Nel corso delle filtrazioni i cartoni hanno aumentato il loro peso da 174 g a 590 g, senza differenze fra i due sistemi. Le analisi hanno mostrato che il filtro-pressa ha ritenuto in media nei cartoni 145.2 g di acqua, mentre gli stessi cartoni, se preceduti da un pre-filtro ne hanno ritenuti 214.4 g. In teoria la quantità di acqua che i filtri avrebbero dovuto trattenere, tenuto conto della quantità di olio filtrata, avrebbe dovuto essere di 144.4 g nel filtro-pressa e di 235.4 g nell'altro sistema. È possibile che la differenza di circa 20 g fra il valore teorico e quello misurato nel filtro testato sia legato all'acqua intrappolata all'interno dei solidi sospesi trattenuti dalla griglia di acciaio. L'olio trattenuto in ciascuno dei setti filtranti è, per differenza, 388 g nel sistema a filtro-pressa e, 382 g nel sistema dove i cartoni sono preceduti dalle cartucce in acciaio. Pertanto, in conseguenza dell'allungamento del ciclo di filtrazione, l'olio perso all'interno dei setti è stato il 5.5% nel caso del filtro-pressa e del 2.9% nel caso del pre-filtro. Ogni grammo di cartone del filtro-pressa tradizionale ha trattenuto circa 0.08 g di acqua, 2.23 g di olio e 0.04 g di solido, mentre ogni grammo di cartone in preceduto dal pre-filtro in acciaio ha trattenuto 0.11 g di acqua, 2.20 g di olio e 0.12 g di solidi.

La ragione per cui i filtri si sono colmatati è diversa nei due filtri testati. Infatti il filtro a cartoni tradizionale è colmatato a causa delle particelle di dimensioni più grandi di 12 micron che si fermano sulla superficie del setto impedendo il passaggio dell'olio. Nel caso del nuovo assetto invece i setti filtranti sono colmatati per effetto di profondità in quanto la parte di dimensioni maggiori di 5 micron è ritenuta dall'acciaio. Questo cambiamento nel meccanismo di colmatazione del filtro ha permesso l'allungamento dei cicli di filtrazione.

Una conferma indiretta al diverso uso del filtro può essere ricercato nell'analisi del colore dei setti filtranti a fine ciclo. La tabella 23 riporta differenze nei valori di b^* ed a^* ($p < 0.05$). Tali coordinate fanno riferimento alla teoria dei colori opposti di Hering. In particolare a^* rappresenta l'asse di colori rosso-verde, mentre b^* l'asse blu-giallo (Weatherall & Coombs, 1992). Tonalità e saturazione del colore derivano

da queste coordinate, in quanto la tonalità equivale all'arcotangente del rapporto b^*/a^* , mentre la saturazione è calcolata mediante il teorema di Pitagora applicato agli assi a^* e b^* ed è la radice quadrata di a^* elevato al quadrato sommato a b^* al quadrato anch'esso. Tali coordinate, derivando dagli assi a^* e b^* sono pertanto anch'esse diverse ($p < 0.05$).

Tabella 23: Parametri relativi al colore dei filtri in cellulosa esausti. I valori sono medie delle 5 repliche, fra parentesi la deviazione standard. La lettera h° rappresenta l'angolo della tonalità, mentre la lettera S la saturazione. ΔE è la differenza di colore fra i filtri.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
L	65 (2)	64 (2)	0.71
a^*	20 (3)	13 (3)	0.04
b^*	9 (3)	3 (4)	0.02
h°	0.4 (0.1)	0.1 (0.2)	0.03
S	22 (4)	18 (3)	0.04
ΔE	7.9 (4.4)		-

La figura 35 mostra visivamente le differenze calcolate negli indici. La differenza di colore può essere considerata come un indice indiretto della maggior quantità di materiale trattenuto dai cartoni se usati senza pre-filtro.

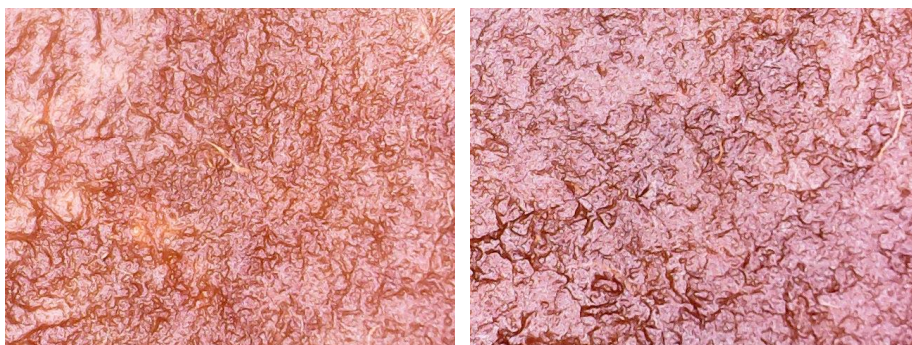


Figura 35: Differenze nel colore dei filtri esausti nel sistema a filtro-pressa (a destra) e nel sistema filtro-pressa con pre-filtro (a sinistra).

La qualità del lavoro del filtro è stata monitorata durante tutti i test per

essere sicuri di poter escludere decadimenti qualitativi dell'olio legati al nuovo trattamento. E' infatti possibile che avvengano decadimenti legati all'ossidazione dell'olio a causa del suo passaggio all'interno di una cartuccia di acciaio che ne aumenta il tempo di esposizione all'aria. Per escludere questa ipotesi sono state effettuate, pertanto, delle analisi chimiche per confrontare gli effetti dell'addizione del pre-filtro sulla qualità dell'olio (tabella 24).

Tabella 24: confronto fra i qualitativi dei due filtri. I valori sono le medie delle 5 repliche $\pm$ la deviazione standard. Nessuna differenza significativa è stata trovata.

Parametro	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa
Acidità libera (%)	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Numero di perossidi(meqO ₂ /kg)	4.0 ± 0.8	4.1 ± 0.4
K232	1.57 ± 0.60	1.76 ± 0.25
K270	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.00
ΔK	-0.004 ± 0.001	-0.005 ± 0.001
Tocoferoli (mg/kg)	207 ± 11	204 ± 12
Biofenoli (mg/kg)	359 ± 41	360 ± 30
Umidità (%)	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Solidi sospesi (%)	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.08
Torbidità (Abs 630 nm)	0.083 ± 0.024	0.080 ± 0.022

Nessuna differenza chimica legata al diverso tipo di filtro è stata trovata nei diversi oli, quindi si può affermare che nessun cambiamento qualitativo è legato all'introduzione di uno step di pre-filtrazione. Pero completezza di informazione il confronto fra i singoli composti che costituiscono la frazione dei biofenoli è riportato in tabella 25.

Tabella 25: concentrazione dei biofenoli presenti negli oli filtrati con filtro-pressa e filtro-pressa con addizione di prefiltro. I dati sono la media delle 5 prove effettuate; fra parentesi la deviazione standard.

Composto	Filtro- pressa	Pre-filtro+Filtro- pressa
Idrossitirosolo	0.33 (0.58)	0.33 (0.58)
Tirosolo	1.33 (0.58)	1.00 (0.00)
A. Vanillico + A. Caffaico	1.67 (0.58)	1.33 (0.58)
Vanillina	2.33 (0.58)	2.33 (0.58)
A. p-cumarico	1.67 (2.89)	1.33 (2.31)
Idrossitirosilacetato	1.67 (0.58)	1.67 (0.58)
A. ferulico	0.33 (0.58)	0.67 (0.58)
A. O-cumarico	0.67 (0.58)	0.33 (0.58)
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica ossidata	32.3 (11.59)	30.00 (14.93)
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica	53.00 (17.58)	49.33 (24.19)
Oleuropeina	11.67 (6.81)	13.00 (8.89)
Aglicone Oleuropeina f. dialdeidica	14.67 (5.86)	14.67 (7.77)
Aglicone decarbossimetilligstroside f. dialdeidica ossidata	8.33 (2.52)	7.33 (1.53)
Aglicone decarbossimetilligstroside f. dialdeidica	27.67 (2.08)	27.67 (0.58)
Pinoresinolo + 1-acetossipinoresinolo	11.33(1.15)	12.67 (0.58)
A. Cinnamico	8.33 (2.52)	8.00 (3.61)
Aglicone ligstroside f. dialdeidica	53.00 (6.24)	52.33 5.51)
Aglicone ligstroside f. aldeidica e idrossilica ossidata	12.33 (1.53)	11.67 (1.53)
Luteolina	6.67 (2.52)	6.33 (3.06)
Aglicone Oleuropeina f. aldeidica e idrossilica	31.00 (6.57)	28.33 (6.43)
Aglicone Oleuropeina f. aldeidica e idrossilica ossidata	20.33 (2.89)	21.00 (3.61)
Apigenina	4.33 (0.58)	4.33 (0.58)
Metil luteolina	5.33 (0.58)	5.33 (0.58)
Aglicone ligstroside f. aldeidica e idrossilica	3.00 (1.00)	3.00 (0.00)

Nessuna differenza significativa fra i trattamenti ($p < 0.05$) è stata rilevata su nessun composto fenolico immediatamente dopo la filtrazione.

Nessuna differenza significativa ($p < 0.05$) è stata inoltre riscontrata nelle concentrazioni dei composti organici volatili che costituiscono l'aroma dell'olio.

In definitiva l'aggiunta di un pre-filtro in acciaio prima di un filtro a cartoni permette di allungare la durata del ciclo di filtrazione e di trattare una quantità maggiore di olio a parità di setti consumati. Si ha quindi un minore consumo di cartoni e minori perdite di olio all'interno di questi. Nessun cambiamento qualitativo imputabile all'aggiunta del pre-filtro è stato evidenziato.

3.4 Effetti qualitativi dell'aggiunta del pre-filtro durante la conservazione degli oli

Le migliori performance operative del filtro-pressa ottenute mediante l'introduzione di uno step di sgrossatura sono applicabili alla filiera dell'olio extravergine di oliva solamente se queste non peggiorano la qualità del prodotto ottenuto. Per queste ragioni un confronto dell'andamento dei principali parametri qualitativi fra oli filtrati in maniera tradizionale ed oli filtrati con il nuovo sistema è stato effettuato. Per la valutazione degli effetti nel tempo 3 dei 5 oli utilizzati sono stati posti in camera di conservazione ed analizzati in 5 intervalli di tempo successivi, distanti fra loro 1 mese e mezzo. In questa maniera si è inteso confrontare, nel tempo, se il differente sistema di filtrazione adottato ha prodotto degli effetti che, alla produzione dell'olio non erano rilevabili, ma con l'invecchiamento del prodotto sono andati a modificare la qualità dell'olio.

Per quanto riguarda l'acidità libera non ci sono differenze fra i trattamenti nemmeno in conservazione.

Tabella 26: valori di acidità espressi in percentuale di acido oleico negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	0.19 (0.01)	0.18 (0.02)	0.34
Febbraio	0.15 (0.02)	0.14 (0.02)	0.54
Aprile	0.17 (0.01)	0.18 (0.01)	0.39
Maggio	0.19 (0.03)	0.19 (0.02)	0.86
Luglio	0.20 (0.01)	0.21 (0.03)	0.72

Il numero di perossidi rimane anch'esso uguale nel corso della conservazione degli oli. La p associata ad una uguaglianza fra i trattamenti, calcolata con metodologia two-way ANOVA è di 0.71 (Tabella 27).

Tabella 27: numero di perossidi espresso in $m_{eq}O_2/kg$ negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	6.0 (0.3)	6.4 (0.1)	0.15
Febbraio	6.8 (1.1)	7.0 (0.5)	0.74
Aprile	6.3 (0.8)	6.7 (0.6)	0.46
Maggio	5.6 (0.5)	5.9 (0.5)	0.47
Luglio	5.4 (0.7)	5.8 (0.4)	0.47

Allo stesso modo il K232, il K270 ed il delta K rimangono stabili fra i due trattamenti di filtrazione e nel tempo (Tabella 28, 29, 30).

Tabella 28: K232 negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	1.69 (0.07)	1.69 (0.08)	0.99
Febbraio	1.70 (0.06)	1.70 (0.08)	0.90
Aprile	1.69 (0.11)	1.69 (0.07)	0.80
Maggio	1.73 (0.06)	1.71 (0.07)	0.81
Luglio	1.64 (0.08)	1.65 (0.11)	0.87

Tabella 29: K270 negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	0.13 (0.01)	0.13 (0.02)	0.71
Febbraio	0.15 (0.02)	0.15 (0.02)	0.99
Aprile	0.15 (0.01)	0.15 (0.00)	0.81
Maggio	0.16 (0.01)	0.15 (0.02)	0.66
Luglio	0.16 (0.02)	0.15 (0.02)	0.84

Tabella 30: delta K negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	-0.004 (0.001)	-0.004 (0.001)	0.98
Febbraio	-0.003 (0.001)	-0.003 (0.001)	0.90
Aprile	-0.002 (0.001)	-0.002 (0.001)	0.99
Maggio	0.001 (0.001)	0.001 (0.001)	0.91
Luglio	0.001 (0.001)	0.001 (0.001)	0.65

Anche il contenuto in composti antiossidanti apolari (tocoferoli), in composti antiossidanti polari (biofenoli) ed in pigmenti (clorofille) non è influenzato dalla differente tipologia di filtrazione (Tabella 31, 32, 33)

Tabella 31: concentrazione di tocoferoli in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	187 (14)	190 (12)	0.81
Febbraio	173 (6)	169 (5)	0.43
Aprile	169 (4)	172 (6)	0.45
Maggio	171 (3)	172 (6)	0.76
Luglio	150 (5)	156 (7)	0.26

Tabella 32: concentrazione di biofenoli in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	352 (46)	327 (67)	0.39
Febbraio	343 (55)	315 (59)	0.32
Aprile	371 (51)	359 (66)	0.66
Maggio	396 (50)	357 (72)	0.20
Luglio	399 (52)	364 (86)	0.59

Tabella 33: concentrazione di clorofille in mg/kg negli oli filtrati con filtro-pressa e con filtro-pressa preceduto da pre-filtro in acciaio. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra i trattamenti”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Filtro-pressa	Pre-filtro+Filtro-pressa	p
Gennaio	13 (4)	12 (6)	0.82
Febbraio	7 (3)	6 (3)	0.58
Aprile	4 (1)	4 (1)	0.92
Maggio	2 (1)	2 (1)	0.71
Luglio	0 (0)	0 (0)	-

La frazione fenolica dei secoiridoidi, vista la sua importanza, merita un'analisi maggiormente approfondita. Durante i 9 mesi di conservazione sono poche le specie che hanno mostrato differenze fra i due trattamenti. In quattro dei cinque batch di analisi effettuate per un solo composto appartenente a questa classe sono state determinate concentrazioni più elevate nel trattamento tradizionale rispetto a quello con pre-filtro. Il composto in questione cambia da batch a batch ed è l'aglicone decarbossimetilligstroside in forma dialdeidica ossidata in gennaio, l'aglicone ligstroside in forma aldeidica ed idrossilica in febbraio, l'aglicone oleuropeina in forma aldeidica ed idrossilica ossidata in aprile e l'aglicone ligstroside in forma dialdeidica in maggio. Le differenze ($p < 0.05$) sono schematizzate nella figura sottostante.

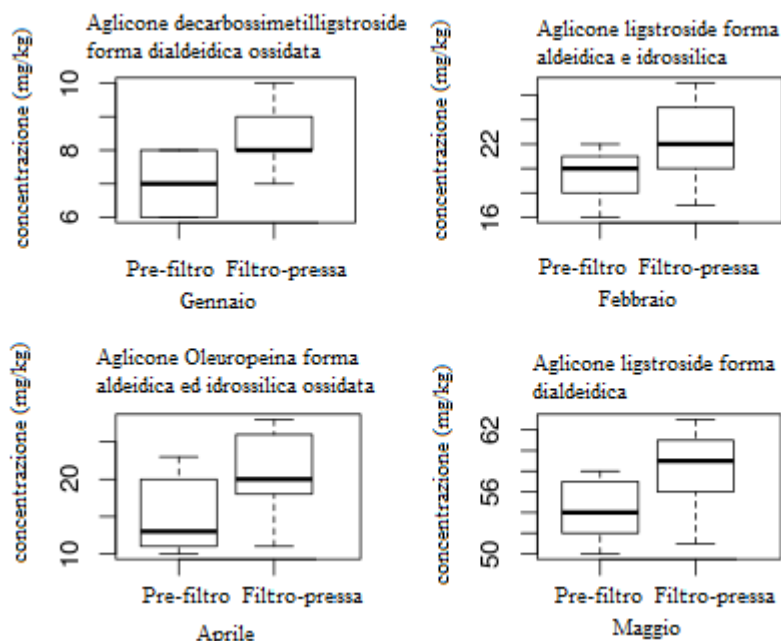


Figura 36: composti appartenenti alla classe dei secoiridoidi per i quali sono state trovate differenze ($p < 0.05$) nel corso della conservazione

Inoltre, nel mese di aprile si rilevano quantità più elevate di acido cinnamico e nel mese di maggio si riscontrano concentrazioni più elevate di tirosolo ed idrossitirosolo negli oli trattati col solo filtro-pressa. D'altro canto negli oli trattati con il pre-filtro si ritrovano maggiori quantità di acido p-cumarico in gennaio e di luteolina in aprile. In definitiva l'aggiunta di uno step di pre-filtrazione ha provocato una leggera ossidazione di alcuni biofenoli. Le differenze misurate appaiono comunque di modesta entità e non si protraggono nel tempo.

Anche per quanto riguarda la componente aromatica le differenze fra i due trattamenti sono minime: dei 60 composti target ricercati nei 5 punti di conservazione solamente quattro hanno mostrato differenze significative ($p < 0.10$). In febbraio l'esanolo è stato ritrovato a concentrazioni maggiori negli oli filtrati in maniera tradizionale, in aprile il 2,4-eptadienale ed il E-2-pentanale ed in maggio l'acido ottanoico si sono trovati ad essere più concentrati negli oli trattati con pre-filtro e filtro-pressa.

In definitiva è possibile affermare che non ci sono differenze sulla qualità

degli oli filtrati nei due modi, eccetto che una lievissima ossidazione che avviene nel pre-filtro in acciaio.

3.5 Effetti dello stripping in corrente di azoto

Gli effetti della rimozione dell'ossigeno disciolto dagli oli con la tecnologia dello stripping è stato testato, sia subito dopo il trattamento, sia durante la shelf-life del prodotto in due batterie di test a diverse condizioni operative.

Nel primo batch di prove sono stati sottoposti a stripping oli di due diverse cultivar (Arbequina e Coratina) provenienti dal separatore centrifugo verticale; nel secondo batch di prove invece il trattamento è stato effettuato su oli prelevati direttamente dal decanter (cv. Frantoio).

3.5.1 Primo batch di prove: oli provenienti dal separatore

In questo batch di prove, effettuate presso l'azienda Nuevo Manantial, tutti gli oli oggetto della sperimentazione sono stati filtrati. Il trattamento di stripping è stato applicato a valle della filtrazione a cartoni.

I risultati delle prove condotte su cultivar Arbequina sono mostrati in tabella 35. Gli oli, provenienti dal separatore centrifugo verticale, presentavano una concentrazione di ossigeno disciolto di 6.7 ppm ($T=21^{\circ}\text{C}$). Al termine dell'operazione di stripping, tale quantità è risultata approssimativamente dimezzata e portata ad una concentrazione di 3.4 ppm.

Tabella 34: Valori di acidità libera, costanti spettrofotometriche e numero di perossidi misurati negli oli di Arbequina immediatamente dopo il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Arbequina		Acidità libera (%)	K232	K270	Delta K	N° perossidi (m _{eq} O ₂ /kg)
Stripping	Media	0,34	1,91	0,10	0,001	6,83
	SD	0,01	0,03	0,00	0,000	0,50
Controllo	Media	0,36	2,1	0,09	0,000	8,23
	SD	0,02	0,02	0,01	0,001	0,15
p		0,02	0,007	0,18	0,184	0,02

Dei cinque parametri riportati in tabella, tre sono stati significativamente migliorati dall'operazione di stripping: acidità libera, K232 e numero di perossidi. L'acidità libera è passata dallo 0.34% allo 0.36%. Tale cambiamento è di scarsa entità e non comporta un miglioramento della qualità dell'olio associato all'operazione di stripping. Il numero di perossidi è stato diminuito grazie al flusso di azoto da 8.2 m_{eq} O₂/kg a 6.8 m_{eq} O₂/kg. Tale riduzione del 17% è coerente con l'osservazione di Masella et al. (2010), che in simili condizioni aveva mostrato una riduzione del valore di questo parametro del 22%. Il risultato è presumibilmente associabile alla minore formazione di radicali liberi che è strettamente correlata con l'ossigeno disciolto negli oli (Ottaviani et al., 2001). La differenza sul valore di K232 è di circa 0.15 punti di assorbanza. Entrambi gli oli trattati presentano valori elevati di questo parametro, ossia 1.91 per gli oli strippati e 2.06 per gli oli non strippati. Questa differenza non era stata rilevata nei lavori precedenti (Masella et al., 2010) perché cambiamenti in questo parametro sono associati a stati ossidativi molto avanzati in quanto il K232 invece misura la formazione di dieni coniugati, che sono prodotti terminali dell'ossidazione lipidica (Kanner & Rosenthal, 1992).

La cultivar Coratina è uscita dal filtro con una concentrazione di ossigeno disciolto di 6.3 ppm (T=21 °C), che è stata ridotta tramite stripping fino a

2.9 ppm. In questa cultivar non sono confermate la significatività viste per Arbequina sul numero di perossidi, mentre sono confermate quelle per il parametro K232.

Tabella 35: Valori di acidità libera, costanti spettrofotometriche e numero di perossidi misurati negli oli di Coratina immediatamente dopo il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Coratina		Acidità libera (%)	K232	K270	Delta K	N° perossidi (m _{eq} O ₂ /kg)
Stripping	Media	0,74	1,77	0,12	0,000	5,93
	SD	0,01	0,04	0,1	0,000	0,58
Controllo	Media	0,76	1,73	0,13	-0,000	6,53
	SD	0,03	0,05	0,01	0,001	1,10
p		0,50	0,02	0,07	0,42	0,44

L'assenza di differenze per quanto riguarda la formazione di perossidi, indicato come beneficio primario dello stripping in Masella et al. (2010), Ottaviani et al. (2001) e nel test su Arbequina precedentemente riportato, appare da sottolineare. La riduzione del K232 conferma invece l'inibizione della formazione di dieni coniugati all'interno dell'olio dovuta allo stripping.

Alcune ulteriori variazioni significative, per quanto riguarda la cultivar Arbequina, sono state rilevate sulla concentrazione dei composti antiossidanti, ed in particolare per la classe dei composti fenolici. È da evidenziare inoltre che lo stripping ha consentito di preservare un maggiore quantità di tocoferoli, la principale classe di composti antiossidanti apolari presenti nell'olio di oliva. La probabilità associata alla uguaglianza fra le due popolazioni di oli soggetti a stripping e di oli di controllo è, in questo caso, di 0.07. Non ci sono invece differenze significative invece per quanto riguarda la concentrazione in clorofille.

Tabella 36: Valori relativi alla concentrazione di Tocoferoli, Biofenoli e Clorofille misurati negli oli di Arbequina immediatamente dopo il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Arbequina		Tocoferoli (mg/kg)	Biofenoli (mg/kg)	Clorofille (mg/kg)
Stripping	Media	215	142	4
	SD	2	0	1
Controllo	Media	201	133	7
	SD	5	3	3
p		0,07	0,03	0,11

Il trattamento di stripping è stato in grado di preservare 9 mg/kg di composti biofenolici, corrispondenti a circa il 7% del totale. Questi risultati contrastano con Masella et al. (2010) che aveva notato una diminuzione dei composti appartenenti a questa classe causata dal flusso di azoto. Era stato infatti supposto che il movimento causato dal passaggio delle bolle di azoto favorisse le collisioni fra composti radicalici ed antiossidanti, determinando così un consumo maggiore della frazione fenolica. Nei test qui riportati questo non è accaduto. Si può supporre che questo sia dovuto alla maggiore portata di azoto usata in questo test rispetto al precedente (17 ml/min contro 1 ml/min). Infatti la quantità di azoto molto maggiore (17 volte) usata in questi test potrebbe aver reso meno disponibile l'ossigeno all'interno dell'olio prima che questo avesse il tempo di reagire con i composti appartenenti alla classe dei biofenoli. La maggiore concentrazione di tocoferoli è un ulteriore “indizio” a favore di questa teoria.

La cultivar Coratina non conferma i benefici associati allo stripping visti su Arbequina sui composti antiossidanti. Nessuna delle tre differenze risulta essere statisticamente significativa. Tuttavia le concentrazioni di tocoferoli, biofenoli e clorofille, come nel caso precedente, risultano essere superiori negli oli sottoposti a stripping rispetto agli oli non trattati.

Tabella 37: Valori relativi alla concentrazione di Tocoferoli, Biofenoli e Clorofille misurati negli oli di Coratina immediatamente dopo il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Coratina		Tocoferoli (mg/kg)	Biofenoli (mg/kg)	Clorofille (mg/kg)
Stripping	Media	242	245	13
	SD	5	3	6
Controllo	Media	234	238	6
	SD	4	4	1
p		0,27	0,14	0,17

Considerato che una delle carenze riscontrate in letteratura era legata alla carenza di dati sugli effetti dello stripping durante la conservazione degli oli conservati e considerati i risultati precedentemente descritti, le analisi sono state ripetute nel mese di Ottobre 2013, a 6 mesi dalla produzione. Gli oli di Arbequina confermano, dopo 6 mesi dalla produzione, i benefici dovuti allo stripping sul numero di perossidi e sul K232.

Tabella 38: Valori di acidità libera, costanti spettrofotometriche e numero di perossidi misurati negli oli di Arbequina a sei mesi dalla produzione con il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Arbequina		Acidità libera (%)	K232	K270	Delta K	N° perossidi (m _{eq} O ₂ /kg)
Stripping	Media	0,38	1,95	0,13	0,003	6,67
	SD	0,01	0,01	0,01	0,000	0,33
Controllo	Media	0,39	2,06	0,13	0,003	7,93
	SD	0,02	0,01	0,01	0,001	0,21
p		0,69	0,003	0,18	0,42	0,05

Tali parametri rimangono significativamente diversi anche durante la

conservazione. Gli oli esposti alla luce, ma correttamente tappati e privati dal contatto con l'ossigeno, non hanno visto formarsi, al proprio interno, ulteriori idroperossidi o dieni coniugati.

Anche la Coratina conferma le indicazioni tratte dal punto precedente e per la cultivar Arbequina.

Tabella 39: Valori di acidità libera, costanti spettrofotometriche e numero di perossidi misurati negli oli di Coratina a sei mesi dalla produzione con il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Coratina		Acidità libera (%)	K232	K270	Delta K	N° perossidi ($m_{eq}O_2/kg$)
Stripping	Media	0,81	1,66	0,14	0,003	4,6
	SD	0,02	0,04	0,01	0,001	0,5
Controllo	Media	0,87	1,76	0,13	0,002	6,3
	SD	0,03	0,01	0,01	0	0,3
p		0,15	0,06	0,23	0,06	0,02

Gli oli strippati hanno, anche in questo caso, una minore concentrazione di idroperossidi ed un minor valore di K232.

Il numero di perossidi negli oli di Coratina risulta essere diminuito negli oli strippati nel corso dei 6 mesi di conservazione. Infatti erano presenti in media $5.93 m_{eq}O_2/kg$ nel primo punto di conservazione e $4.60 m_{eq}O_2/kg$ dopo 6 mesi dalla produzione. La differenza fra i due punti di conservazione è significativa ad un t test ($p=0.045$). Questo comportamento è ascrivibile alla minore quantità di ossigeno presente nelle bottiglie strippate. L'ossigeno è infatti, in una bottiglia tappata, il reagente in concentrazione limitante nella reazione di auto-ossidazione degli acidi grassi, quindi di formazione degli idroperossidi. La minore quantità di ossigeno disciolto presente (a parità di ossigeno atmosferico nello spazio di testa) ha determinato un arresto più precoce della reazione di autossidazione per mancanza di un reagente ed ha impedito la formazione di nuovi idroperossidi. A conferma di questa ipotesi sono stati

effettuate le analisi sul numero di perossidi ad 8 mesi dalla data di imbottigliamento in entrambi gli oli. In questo caso la concentrazione di perossidi è arrivata in media a 5.20 $\text{m}_{\text{eq}}\text{O}_2/\text{kg}$ nel controllo ed a 4.37 $\text{m}_{\text{eq}}\text{O}_2/\text{kg}$ negli oli strippati. In questi mesi di conservazione aggiuntiva il consumo di ossigeno nelle bottiglie di controllo ha comportato anche in queste ultime la riduzione del numero di perossidi, cosa che era già avvenuta negli oli strippati. La differenza fra le concentrazioni di perossidi negli oli strippati fra i due punti di conservazione non è statisticamente significativa ($p=0.598$), mentre lo è per il controllo ($p=0.005$). Questa differenza è stata notata in Coratina, ma non in Arbequina, probabilmente a causa della maggior quantità di composti antiossidanti presenti nella prima cultivar. L'andamento di questo parametro nei 3 punti è riportato nel grafico seguente.

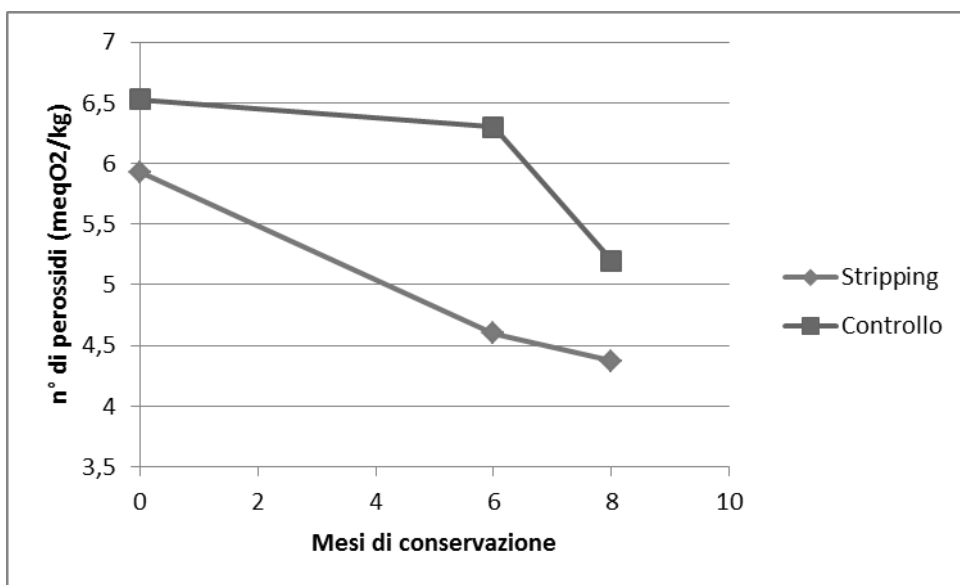


Figura 37: Andamento del numero di perossidi negli oli di Coratina sottoposti a stripping e nel controllo in funzione del tempo di conservazione. Le analisi sono state eseguite nei mesi di aprile 2013, ottobre 2013 e dicembre 2013

Il parametro spettrofotometrico K232 risulta anch'esso diverso fra gli oli trattati e quelli di controllo ($p=0.06$). Tale parametro è minore negli oli

strippati per entrambe le cultivar, sia immediatamente dopo la produzione, sia dopo 6 mesi di conservazione.

Anche le analisi dei composti antiossidanti effettuate dopo 6 mesi dalla produzione confermano le indicazioni tratte nel primo punto.

Tabella 40: Valori relativi alla concentrazione di tocoferoli, biofenoli e clorofille misurati negli oli di Arbequina dopo sei mesi di conservazione con il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Arbequina		Tocoferoli (mg/kg)	Biofenoli (mg/kg)	Clorofille (mg/kg)
Stripping	Media	159	154	2
	SD	3	2	1
Controllo	Media	150	137	2
	SD	5	8	2
P		0,02	0,04	0,42

La concentrazione di biofenoli risulta essere maggiore negli oli strippati di 17 mg/kg (11 %), così come la concentrazione di tocoferoli, maggiore negli oli strippati di 9 mg/kg (6%; $p=0.02$). Questi composti sono stati degradati durante la conservazione per effetto della luce, passando negli oli strippati da 215 mg/kg a 159 mg/kg e da 201 mg/kg a 150 mg/kg per il controllo. Una maggiore concentrazione di tocoferoli è importante durante la “vita di scaffale” di un olio: questi composti di notevole valenza nutrizionale (vitamina E) sono fotolabili. Dato che è molto difficile preservare gli oli dalla luce, un'azione tecnologica che ne riesca a conservare una maggiore quantità non può essere che positiva per la qualità di un olio.

Anche la Coratina conferma le indicazioni tratte in precedenza.

Tabella 41: Valori relativi alla concentrazione di tocoferoli, biofenoli e clorofille misurati negli oli di Coratina dopo sei mesi di conservazione con il trattamento di stripping e nel controllo. La probabilità riportata si riferisce all'ipotesi: “non ci sono differenze per il parametro provocate dal trattamento di stripping” ed è stata calcolata mediante un test t.

Coratina		Tocoferoli (mg/kg)	Biofenoli (mg/kg)	Clorofille (mg/kg)
Stripping	Media	195	246	4
	SD	3	4	1
Controllo	Media	172	240	4
	SD	5	2	0
p		0,04	0,28	0,42

I tocoferoli sono significativamente più concentrati negli oli strippati, mentre non ci sono differenze in termini di biofenoli e di clorofille.

Lo stripping è risultato quindi positivo, per la qualità dell'olio di oliva per i seguenti parametri: numero di perossidi, K232, tocoferoli e biofenoli totali. Dato che i composti biofenolici nell'olio di oliva hanno comportamenti diversi in termini di potenziale antiossidante e di caratteristiche nutrizionali e salutistiche, e considerato che si sono rilevate differenze significative sul loro contenuto totale, è importante andare ad indagare gli effetti dello stripping in corrente di azoto su ciascuno di questi composti. Tale analisi copre inoltre una carenza di dati in letteratura in quanto nessun lavoro riporta tale analisi.

I valori relativi alle analisi dei composti fenolici effettuate su Arbequina sono riportate in tabella 42.

Tabella 42: concentrazioni dei composti fenolici determinate sugli oli di Arbequina sottoposti a stripping e di controllo subito dopo la produzione . La .p è stata calcolata mediante un test t.

	Stripping		Controllo		p
	Media	SD	Media	SD	
Biofenoli (espressi in tirosolo)					
Idrossitirosolo	1,24	0,07	4,71	0,50	0,009
Tirosolo	2,55	0,03	5,38	0,43	0,007
Acido Vanillico+ Acido Caffaico	1,14	0,07	1,24	0,03	0,05
Vanillina	2,10	0,08	2,07	0,15	0,76
Acido Para-coumarico	2,52	0,08	2,14	0,10	0,02
Idrossitirosilacetato	2,90	0,08	3,05	0,13	0,23
Acido Ferulico	5,44	0,18	3,97	0,40	0,05
Acido Orto-coumarico	0,07	0,05	0,09	0,01	0,67
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica ossidata	2,96	0,27	2,73	0,14	0,42
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica	20,00	0,11	12,37	1,26	0,009
Oleuropeina	1,59	0,14	1,15	0,13	0,09
Aglicone Oleuropeina f. di aldeidica	0,57	0,05	0,72	0,33	0,44
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica ossidata	15,89	0,70	14,33	0,09	0,08
Aglicone Decarbossimetilligstroside forma dialdeidica	14,86	0,57	12,29	0,63	0,04
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo	35,36	0,08	34,54	0,69	0,16
Acido Cinnamico	0,28	0,11	0,28	0,04	0,94
Aglicone Ligstroside forma dialdeidica	1,43	0,04	1,37	0,02	0,09
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica ossidata	14,43	0,32	15,08	0,34	0,02
Luteolina	2,84	0,13	2,79	0,09	0,61
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica	5,96	0,15	4,08	0,27	0,008
Aglicone Ligstroside f, aldeidica e idrossilica ossidata	2,82	0,01	2,74	0,04	0,09
Apigenina	0,41	0,13	0,46	0,05	0,53
Metil-luteolina	0,68	0,09	0,87	0,08	0,05
Aglicone Ligstroside f.aldeidica e idrossilica	3,94	0,28	4,53	0,16	0,11

Fra i composti fenolici nove hanno mostrato differenze significative legate al trattamento. Quattro di questi composti sono più concentrati negli oli non sottoposti al trattamento di stripping, mentre cinque sono presenti in maggiore quantità negli oli strippati. I composti più abbondanti negli oli strippati sono acido p-cumarico, acido ferulico, aglicone decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica, aglicone decarbossimetilligstroside forma dialdeidica e aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica. I composti più abbondanti nel controllo sono: tirosolo, idrossitirosolo, metil luteolina ed aglicone oleuropeina forma aldeidica ed idrossilica ossidata. Tirosolo ed Idrossitirosolo rappresentano i composti finali dell'idrolisi di oleuropeina e ligstroside. La presenza in quantità superiori è indice di una frazione di composti secoiridoidi maggiormente deteriorata (Figura 38).

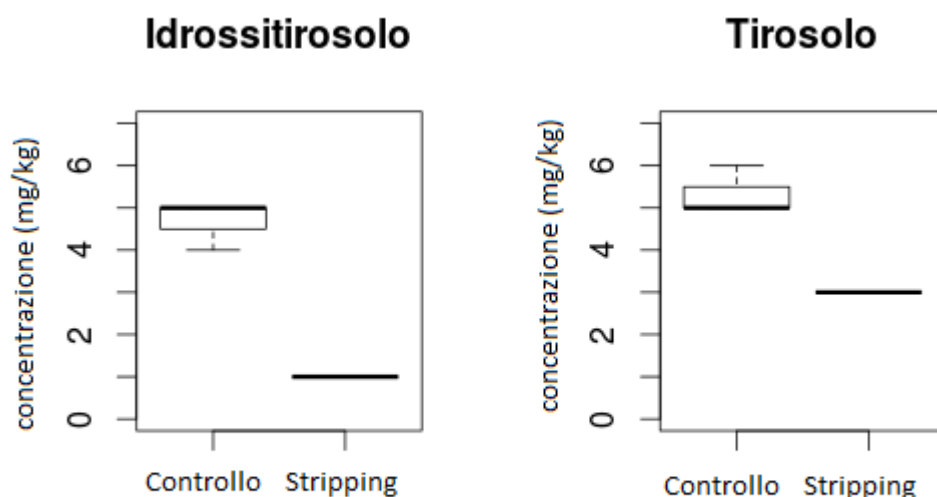


Figura 38: concentrazioni di tirosolo ed idrossitirosolo negli oli di Arbequina appena prodotti: strippati e di controllo

La metil-luteolina è un flavonoide noto per la forte attività come scavenger di radicali liberi (Cao et al., 1997) e per l'effetto stabilizzante sull'olio di oliva (Mateos et al., 2003). La forma ossidata dell'aglicone oleuropeina in forma aldeidica ed idrossilica superiore nel controllo, a

fronte della forma non ossidata dello stesso composto in concentrazione maggiore negli oli strippati (Figura 39) è indicativa della protezione dalle ossidazioni associate alla pratica testata. Nei campioni sottoposti a stripping il secoiridoide ha subito minori ossidazioni.

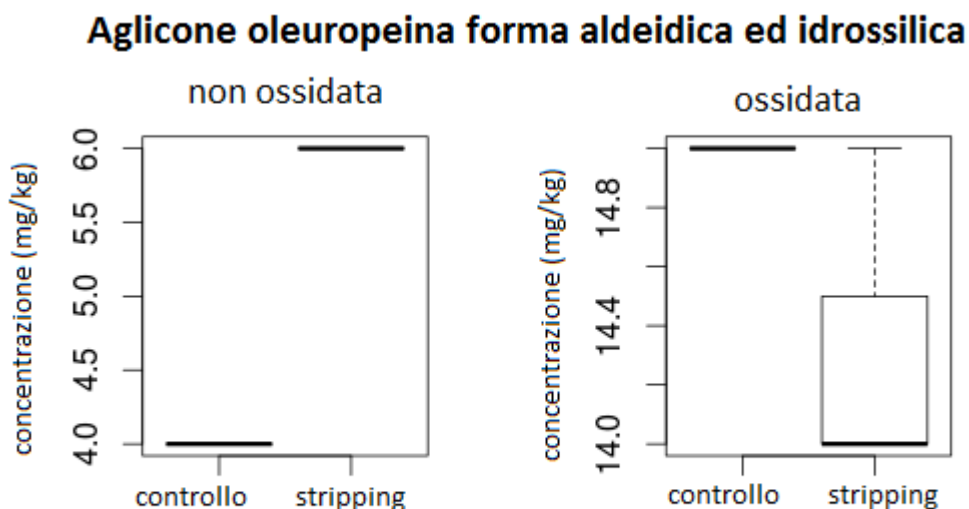


Figura 39: forme ossidate e non ossidate dell'aglicone oleuropeina in forma aldeidica ed idrossilica negli oli appena prodotti di Arbequina strippati e di controllo

Gli altri derivati dell'oleuropeina e del ligstroside presenti in concentrazioni superiori negli oli trattati sono secoiridoidi ad alto peso molecolare, considerati preziosi per la qualità ed il valore nutrizionale dell'olio di oliva.

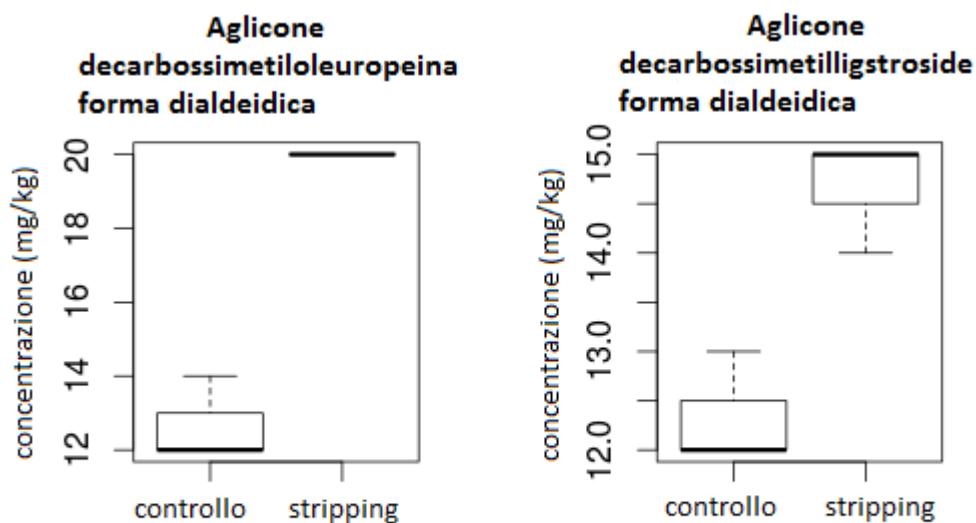


Figura 40: concentrazioni di due secoiridoidi negli oli di Arbequina strippati e di controllo al tempo zero

Infine lo stripping ha consentito una maggiore quantità di acido ferulico e di acido p-cumarico.

Nella cultivar Coratina le differenze osservate sono state meno marcate rispetto ad Arbequina. In questa cultivar anche il contenuto totale in biofenoli risultava infatti non statisticamente differente fra i trattamenti.

Tabella 43: concentrazioni dei composti fenolici determinate sugli oli di Coratina sottoposti a stripping e di controllo subito dopo la produzione. La probabilità è stata calcolata mediante un test t.

	Stripping		Controllo		p
	Media	SD	Media	SD	
Biofenoli (espressi in tirosolo)					
Idrossitirosolo	10,93	0,08	8,29	0,94	0,05
Tirosolo	14,81	0,16	14,37	0,68	0,45
Acido Vanillico+ Acido Caffeoico	1,37	0,04	1,35	0,13	0,75
Vanillina	1,14	0,15	1,26	0,03	0,39
Acido Para-coumarico	2,31	0,19	2,37	0,21	0,81
Idrossitirosilacetato	3,29	0,14	3,10	0,29	0,53
Acido Ferulico	0,20	0,04	0,38	0,08	0,02
Acido Orto-coumarico	0,06	0,02	0,10	0,03	0,07
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica ossidata	6,47	0,43	5,94	0,30	0,08
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica	21,65	0,25	21,00	0,75	0,36
Oleuropeina	2,79	0,17	2,78	0,38	0,93
Aglicone Oleuropeina f. di aldeidica	2,77	0,29	2,92	0,19	0,58
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica ossidata	15,89	0,79	17,82	0,53	0,006
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica	44,73	0,33	41,35	0,84	0,01
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo	39,46	0,42	39,08	0,61	0,08
Acido Cinnamico	4,83	0,34	4,62	0,41	0,65
Aglicone Ligstroside f. dialdeidica	0,52	0,08	0,55	0,07	0,82
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica ossidata	17,27	0,30	17,23	0,83	0,95
Luteolina	1,74	0,18	1,82	0,38	0,81
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica	20,46	0,80	19,44	0,48	0,25
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica ossidata	7,96	0,18	7,69	0,46	0,46
Apigenina	1,06	0,05	1,19	0,07	0,16
Metil-luteolina	8,79	0,09	8,84	0,41	0,85
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica	14,44	0,52	14,35	0,53	0,86

I composti differenti fra i due trattamenti con $p < 0.05$ sono stavolta quattro. Anche negli oli della cultivar Coratina il composto idrossitirosolo è maggiormente concentrato nel controllo, mentre il tirosolo non mostra differenze statisticamente significative.

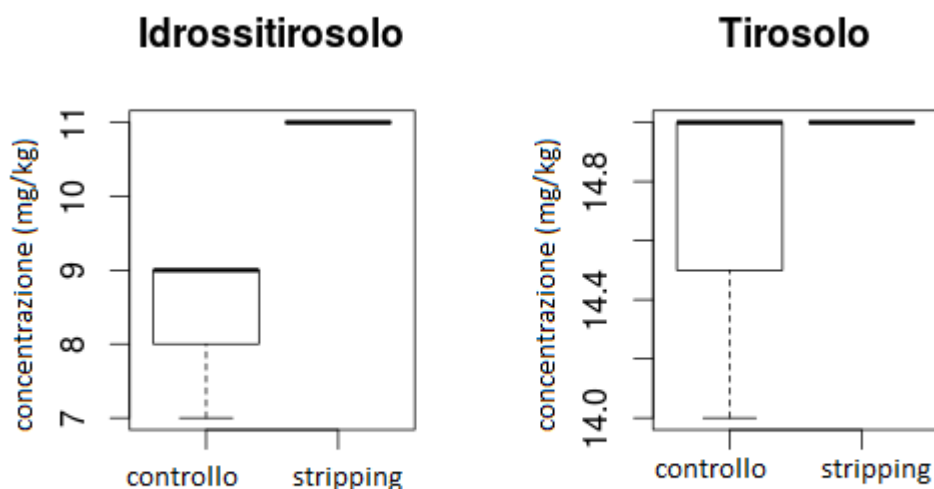


Figura 41: concentrazioni di tirosolo ed idrossitirosolo negli oli di Coratina appena prodotti: strippati e di controllo

Anche negli oli di Coratina è presente un secoiridoide che si trova nella forma ossidata in concentrazione più alta nel controllo, mentre nella forma non ossidata in concentrazione più alta nello strippato. E' stavolta l'aglicone decarbossimetilligstroside in forma dialdeidica.

Aglicone Decarbossimetilligstroside in forma Dialdeidica

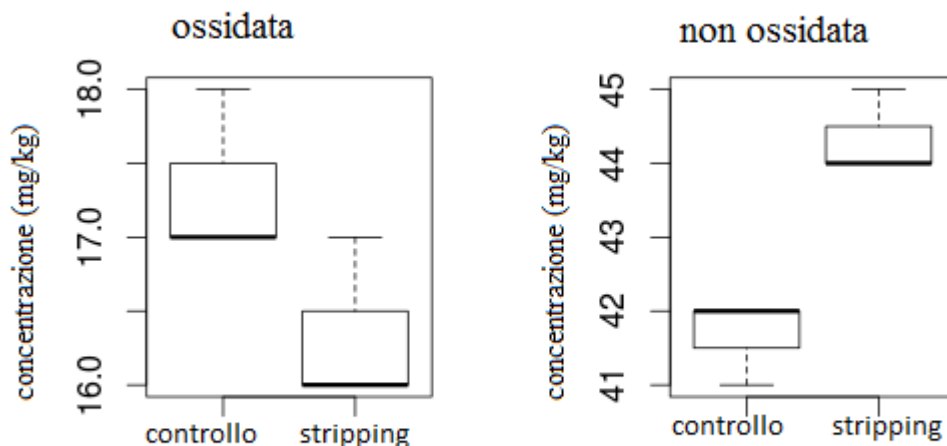


Figura 42: forme ossidate e non ossidate dell'aglicone decarbossimetilligstroside in forma aldeidica negli oli appena prodotti di Coratina strippati e di controllo

Questo conferma l'osservazione già compiuta su Arbequina sull'efficacia del trattamento di stripping nella protezione dalle ossidazioni dei secoiridoidi dovute all'ossigeno disciolto negli oli.

I risultati delle concentrazioni di composti fenolici negli oli di Arbequina del punto di conservazione di ottobre 2013 sono riportati in tabella.

Tabella 44: concentrazioni dei composti fenolici determinate sugli oli di Arbequina sottoposti a stripping e di controllo dopo sei mesi di conservazione. La probabilità è stata calcolata mediante un test t.

Biofenoli (espressi in tirosolo)	Stripping		Controllo		p
	Media	SD	Media	SD	
Idrossitirosolo	1,46	0,44	3,69	2,11	0,27
Tirosolo	2,68	0,17	4,54	1,45	0,18
Acido Vanillico+ Acido Caffeico	1,07	0,02	1,14	0,06	0,09
Vanillina	1,95	0,10	2,02	0,12	0,33
Acido Para-coumarico	5,86	0,05	4,68	1,49	0,30
Idrossitirosilacetato	0,32	0,29	0,25	0,22	0,81
Acido Ferulico	0,75	0,10	0,66	0,12	0,32
Acido Orto-coumarico	0,32	0,40	0,16	0,18	0,34
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica ossidata	2,96	0,15	2,67	0,85	0,66
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica	18,64	1,18	10,67	2,67	0,02
Oleuropeina	0,58	0,37	0,36	0,08	0,38
Aglicone Oleuropeina f. di aldeidica	0,97	0,01	0,84	0,10	0,17
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica ossidata	19,29	0,52	18,03	0,95	0,22
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica	15,73	0,46	12,19	1,05	0,01
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo	38,28	1,07	37,20	2,14	0,25
Acido Cinnamico	1,43	0,53	0,66	0,16	0,15
Aglicone Ligstroside f. di aldeidica	1,38	0,55	0,87	0,03	0,24
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica ossidata	14,96	1,59	15,47	1,45	0,29
Luteolina	2,71	0,74	2,09	1,03	0,16
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica	7,28	0,19	4,46	0,50	0,02
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica ossidata	7,25	0,21	5,92	2,43	0,41
Apigenina	0,51	0,10	2,23	3,09	0,42
Metil-luteolina	2,97	0,10	3,32	0,28	0,10
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica	4,73	0,59	3,14	0,50	0,001

Quattro secoiridoidi mostrano concentrazioni superiori negli oli sottoposti a stripping: due derivati dell'oleuropeina e due derivati del ligstroside. I composti sono aglicone ligstroside forma aldeidica ed idrossilica, aglicone oleuropeina forma aldeidica ed idrossilica, aglicone decarbossimetilligstroside forma dialdeidica e aglicone decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica. Queste differenze testimoniano ancora una volta una protezione da parte dell'azoto insufflato nell'olio della frazione di composti secoiridoidi.

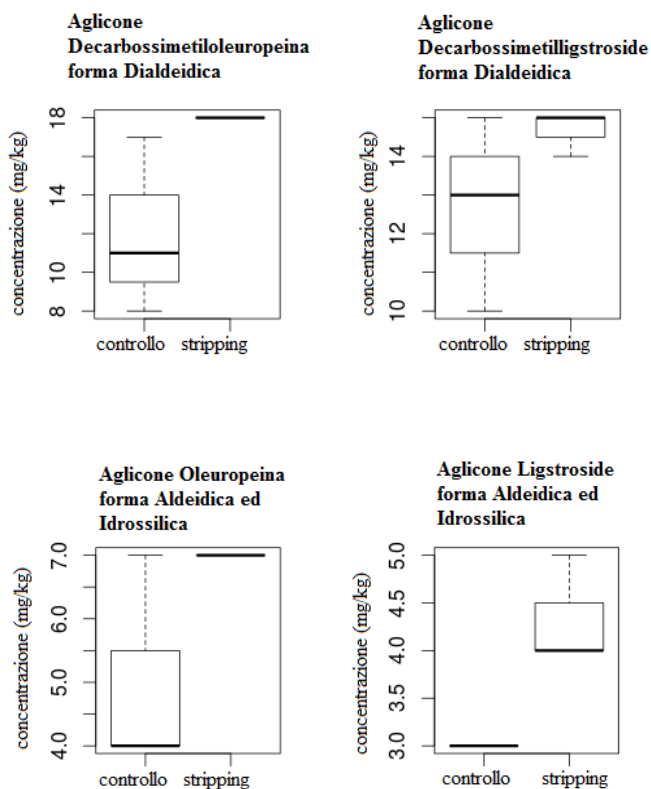


Figura 43: differenze di concentrazione di alcuni secoiridoidi negli oli di Arbequina strippati e di controllo dopo 6 mesi dalla produzione

In Coratina, per il punto di conservazione i composti che presentano differenze significative fra i trattamenti sono otto (tabella 45).

Tabella 45: concentrazioni dei composti fenolici determinate sugli oli di Coratina sottoposti a stripping e di controllo dopo sei mesi di conservazione. La p è stata calcolata mediante un test t.

	Stripping		Controllo		p
Biofenoli (espressi in tirosolo)	Media	SD	Media	SD	
Idrossitirosolo	9,15	0,87	13,54	0,47	0,03
Tirosolo	15,39	0,47	16,60	0,40	0,14
Acido Vanillico+ Acido Caffeico	1,31	0,12	1,49	0,08	0,26
Vanillina	1,08	0,06	1,10	0,02	0,59
Acido Para-coumarico	0,47	0,08	0,20	0,10	0,12
Idrossitirosilacetato	0,29	0,26	0,49	0,11	0,18
Acido Ferulico	0,22	0,11	0,14	0,02	0,33
Acido Orto-coumarico	0,09	0,01	0,11	0,06	0,57
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica ossidata	3,95	0,69	6,14	0,18	0,05
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina f. dialdeidica	19,53	1,13	20,54	0,48	0,38
Oleuropeina	2,93	2,18	3,41	0,60	0,78
Aglicone Oleuropeina f. dialdeidica	2,04	0,42	2,47	0,28	0,10
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica ossidata	18,74	0,39	18,57	1,89	0,91
Aglicone Decarbossimetilligstroside f. dialdeidica	43,43	0,84	41,72	0,54	0,05
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo	37,48	1,63	42,73	1,84	0,04
Acido Cinnamico	2,78	0,47	2,45	0,44	0,48
Aglicone Ligstroside f. dialdeidica	1,17	0,72	0,84	0,15	0,51
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica ossidata	17,76	1,09	16,75	0,67	0,31
Luteolina	2,05	0,08	1,60	0,16	0,04
Aglicone oleuropeina f. aldeidica e idrossilica	26,88	0,64	20,28	1,29	0,02
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica ossidata	4,37	1,10	8,61	0,56	0,05
Apigenina	2,51	2,29	1,49	0,26	0,51
Metil-luteolina	4,45	3,39	3,73	0,54	0,73
Aglicone Ligstroside f. aldeidica e idrossilica	27,48	2,69	15,42	2,09	0,02

Fra questi, tre sono significativamente più concentrati nel controllo: idrossitirosolo, aglicone decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica ossidata ed aglicone ligstroside forma aldeidica ed idrossilica ossidata. Per questi composti valgono le considerazioni già espresse: idrossitirosolo è un composto di idrolisi, quindi di degradazione della frazione secoiridoidica, gli altri due sono prodotti di ossidazione, quindi anch'essi di degradazione della stessa frazione.

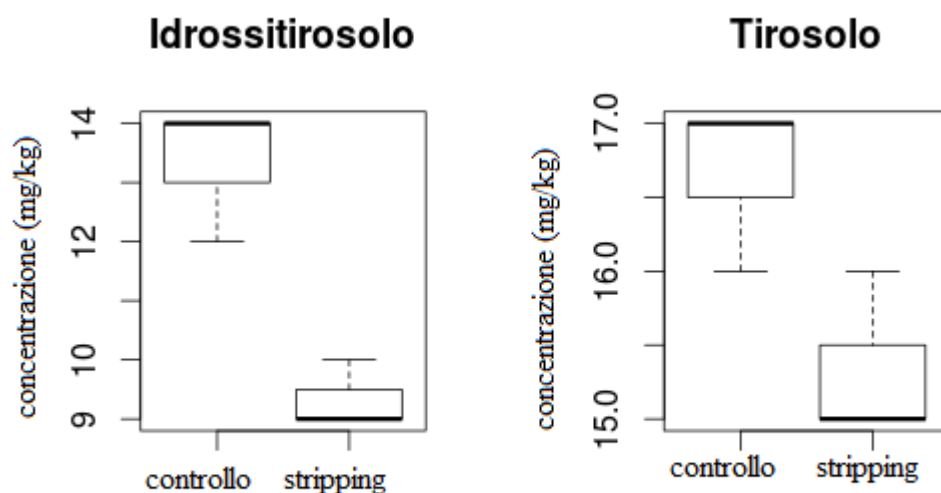


Figura 44: concentrazioni di tirosolo ed idrossitirosolo negli oli di Coratina dopo sei mesi di conservazione: strippati e di controllo

Per quanto riguarda l'aglicone ligstroside in forma aldeidica ed idrossilica si trova in concentrazioni significativamente superiori negli oli strippati nella sua forma non ossidata, mentre in concentrazioni superiori nel controllo nella sua forma ossidata, a conferma della prevenzione delle reazioni di ossidazione operata dallo stripping.

Aglicone Ligstroside in forma Aldeidica ed Idrossilica

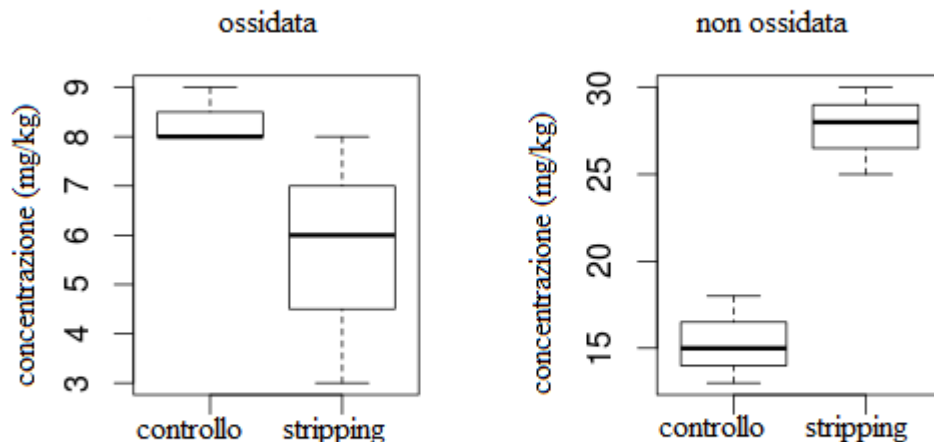


Figura 45: concentrazione dell'aglicone ligstroside in forma aldeidica ed idrossilica negli oli di Coratina dopo 6 mesi di conservazione. Il secoiridoide si trova in forma ossidata e non ossidata in concentrazioni diverse nel controllo e negli oli strappati.

Gli altri composti a concentrazione più elevata negli oli strappati sono: aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica, luteolina, pinoresinolo ed aglicone decarbossimetilligstroside forma dialdeidica. Fra questi sono presenti due secoiridoidi, i lignani ed un flavonoide.

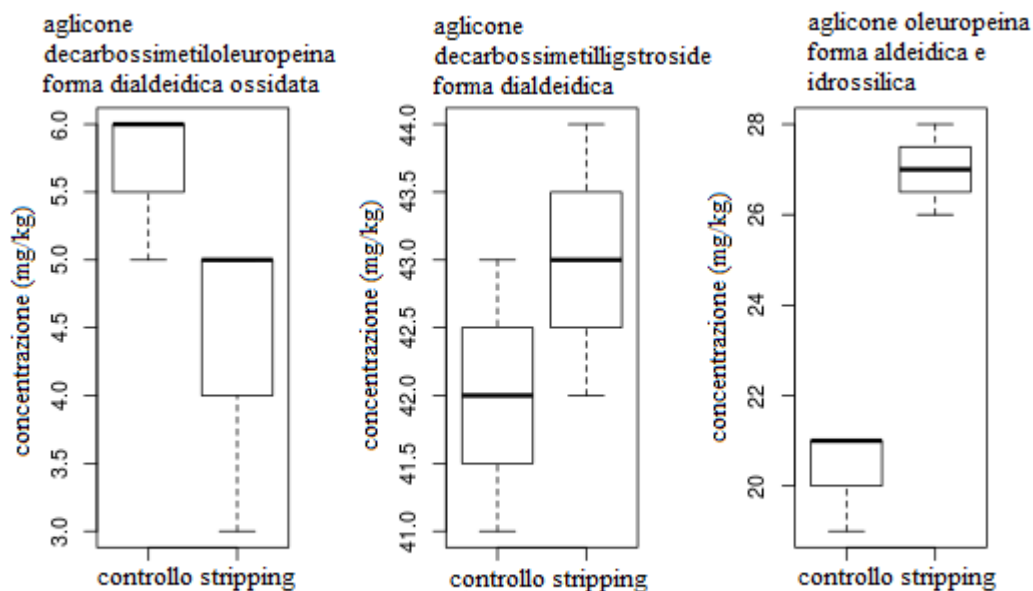


Figura 46: concentrazioni di alcuni secoiridoidi presenti negli oli di Coratina, strippati e di controllo, dopo sei mesi di conservazione.

3.5.2 Secondo batch di prove: oli provenienti dal decanter

Durante la campagna olearia 2013 sono stati condotti ulteriori test di stripping su oli provenienti da un decanter a 2 fasi. L'olio in uscita dal decanter non è privo di ossigeno disciolto ma, da precedenti lavori, è noto che questa centrifugazione apporta all'olio circa 3 mg/kg di ossigeno disciolto, per un valore medio in uscita dal decanter di 5-6 mg/kg (Parenti et al., 2007).

Ciascuno dei tre oli usati per la sperimentazione è stato raccolto in un tank per l'ottenimento di una massa omogenea, che è stata successivamente filtrata. La metà di questa massa è stata sottoposta a trattamento di stripping, mentre l'altra metà è stata utilizzata come controllo. Gli oli così ottenuti sono stati imbottigliati e posti in conservazione. Sono state effettuate 3 prove di confronto su oli di cultivar Frantoio strippati fino a dimezzare (circa) la concentrazione di ossigeno

disciolto (tabella 47). Gli oli, usciti dal filtro si trovavano in condizioni di temperatura abbastanza simili, comprese fra il minimo di 19.8 °C ed il massimo di 22.2 °C. In confronto agli oli in uscita dal separatore questi presentano concentrazioni di ossigeno più basse di circa 1 mg/kg.

Tabella 46: concentrazioni di ossigeno disciolto in mg/kg negli oli strippati e di controllo

	Controllo	Stripping
Test 1 (T=19,8 °C)	5,6	2,3
Test 2 (T=22,2 °C)	4,9	1,3
Test 3 (T=20,6 °C)	5,6	2,3

Sono di seguito analizzati, nel corso della conservazione degli oli, i principali parametri qualitativi dell'olio. I valori dell'acidità nel corso della conservazione sono riportati in tabella 48.

Tabella 47: valori di acidità espressi in percentuale di acido oleico negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	0,21 (0,02)	0,18 (0,01)	0.04
Gennaio	0,18 (0,02)	0,17 (0,01)	0.37
Febbraio	0,14 (0,02)	0,14 (0,03)	0.72
Aprile	0,18 (0,01)	0,17 (0,01)	0.39
Maggio	0,19 (0,02)	0,19 (0,03)	0.93
Luglio	0,21 (0,03)	0,19 (0,01)	0.26

L'acidità libera risulta essere bassa in tutti i campioni analizzati ed è sostanzialmente stabile nel corso della conservazione degli oli. Anche in questa sperimentazione, come nella precedente, gli oli strippati alla produzione mostrano valori di acidità libera più bassi rispetto al controllo ($p=0.04$) e, come nella precedente sperimentazione, questa differenza è di piccola entità e non è mantenuta durante la shelf-life del prodotto.

Il numero di perossidi risulta essere minore negli oli strippati rispetto agli oli semplicemente filtrati.

Tabella 48: numero di perossidi espresso in $m_{eq}O_2/kg$ negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	5.77 (0.42)	5.10 (0.50)	0.15
Gennaio	6.39 (0.13)	5.71 (0.49)	0.12
Febbraio	7.03 (0.53)	6.21 (0.81)	0.23
Aprile	6.74 (0.60)	6.20 (0.70)	0.37
Maggio	5.93 (0.49)	5.06 (0.50)	0.10
Luglio	5.76 (0.42)	5.10 (0.50)	0.15

Tutti i valori medi dei perossidi misurati negli oli sottoposti a stripping sono minori del corrispettivo valore medio degli oli di controllo. La probabilità di uguaglianza fra oli strippati e oli di controllo calcolata con una two-way ANOVA è di 0.01, mentre la probabilità di interazione tempo-trattamento è di 0.30. Tuttavia solamente nelle analisi effettuate nel mese di maggio si ha una probabilità minore dello 0.1, mentre alla partenza e nei mesi di luglio e gennaio si hanno p comprese fra 0.1 e 0.15. L'andamento dei valori dei perossidi nel tempo per ciascuno dei 3 oli oggetto di sperimentazione è riportato nella figura seguente. In tutti gli oli l'andamento del valore dei perossidi cresce fino a raggiungere il valore massimo nel punto di conservazione di febbraio e successivamente decresce.

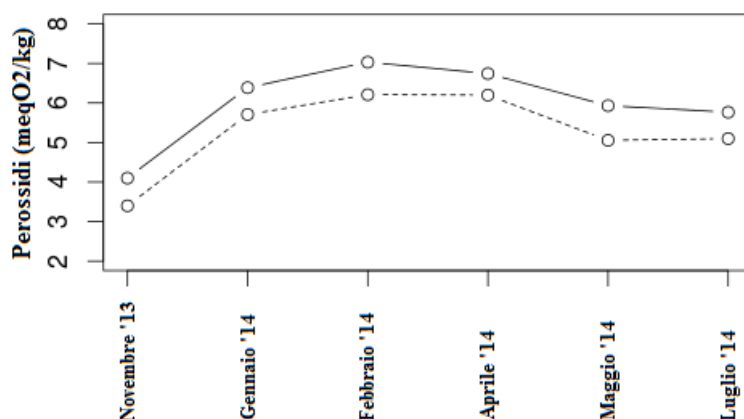


Figura 47: Andamento del numero di perossidi in funzione del tempo. La linea tratteggiata rappresenta gli oli sottoposti a stripping, mentre la linea continua gli oli di controllo.

In questo caso, come nei test precedentemente descritti, il numero di perossidi è da subito ridotto dal trattamento di stripping di circa 0,60 meq O₂/kg e tale riduzione perdura e rimane pressoché costante nel tempo: la differenza media nel punto di luglio è di 0,66 meq O₂/kg. Questi risultati confermano le indicazioni tratte nella sperimentazione precedentemente descritta ed il meccanismo con cui, in assenza della molecola di ossigeno i radicali idroperossidi decrescono perché reagiscono fra loro e con gli antiossidanti presenti.

Il K232 varia invece solamente in funzione del tempo, mentre non risponde al trattamento dello stripping. In questo caso non si confermano le indicazioni del precedente esperimento, ma i dati concordano con le osservazioni di Masella et al., (2010).

Tabella 49: K232 negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	1.65 (0.11)	1.66 (0.03)	0.92
Gennaio	1.65 (0.11)	1.71 (0.05)	0.48
Febbraio	1.71 (0.08)	1.71 (0.06)	0.89
Aprile	1.69 (0.07)	1.72 (0.11)	0.69
Maggio	1.72 (0.07)	1.74 (0.03)	0.59
Luglio	1.65 (0.11)	1.66 (0.03)	0.92

Per quanto riguarda il K270 si riscontrano in media negli oli strippati valori lievemente più elevati rispetto agli oli non strippati ($p=0.0036$). Tale differenza appare essere poco o per nulla rilevante dal punto di vista della qualità dell'olio.

Tabella 50: K270 negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	0.15 (0.03)	0.15 (0.02)	0.99
Gennaio	0.13 (0.02)	0.13 (0.01)	0.74
Febbraio	0.15 (0.02)	0.15 (0.02)	0.73
Aprile	0.15 (0.00)	0.16 (0.02)	0.55
Maggio	0.15 (0.02)	0.16 (0.01)	0.66
Luglio	0.15 (0.02)	0.16 (0.01)	0.84

Il valore di delta k, come nei precedenti studi, non è influenzato dal trattamento dello stripping ($p=0.99$), ma solo dal tempo di conservazione ($p<0.001$). I tre oli aumentano il valore di questo parametro partendo in media da valori di -0,005 che crescono in maniera lineare fino al punto di Aprile. I valori medi finali per questo parametro (luglio 2013) sono di circa 0,001.

Analizziamo adesso gli effetti dello stripping sui composti antiossidanti presenti. I tocoferoli avevano mostrato concentrazioni superiori ($p < 0.10$) negli oli strippati già alla partenza negli oli di Arbequina e nel punto di conservazione ($p < 0.05$) per entrambe le cultivar. In questi test, invece, a conferma delle osservazioni riportate da Masella et al., (2010) non ci sono differenze legate allo stripping sulla concentrazione di tocoferoli nell'olio.

Tabella 51: concentrazione dei tocoferoli negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	199 (10)	200 (11)	0.91
Gennaio	190 (12)	190 (8)	0.92
Febbraio	169 (5)	174 (4)	0.22
Aprile	172 (6)	169 (4)	0.41
Maggio	172 (6)	170 (5)	0.61
Luglio	156 (7)	152 (4)	0.47

L'andamento nel tempo, indipendentemente dal trattamento subito, della concentrazione di questi composti nei 3 oli oggetto di studio è il seguente: nelle fasi iniziali di conservazione questi composti sono rapidamente consumati in quanto si passa da valori di circa 200 mg/kg alla produzione, fino al raggiungimento della concentrazione di 170 mg/kg circa nel mese di febbraio; dopo un periodo stabile attorno a questi valori, nel mese di luglio il consumo riprende.

Anche le clorofille diminuiscono rapidamente nel corso della conservazione (a causa delle condizioni scelte – esposizione alla luce per 12 h al giorno). Gli oli iniziano con concentrazioni superiori ai 10 mg/kg ed alla fine delle prove hanno tutti la concentrazione di 0 mg/kg di clorofilla.

Tabella 52: concentrazione delle clorofille negli oli di controllo e sottoposti a stripping. La colonna p rappresenta la probabilità che si verifichi l'ipotesi “non ci sono differenze fra la popolazione di oli sottoposti a stripping e oli di controllo”. Fra parentesi la deviazione standard.

	Controllo	Stripping	p
Produzione	17 (5)	19 (4)	0.60
Gennaio	12 (6)	14 (5)	0.71
Febbraio	6 (3)	8 (3)	0.45
Aprile	4 (1)	4 (1)	0.71
Maggio	2 (1)	2 (1)	0.91
Luglio	0 (0)	0 (0)	-

In particolare, nel corso di tutte le prove, gli oli sottoposti a stripping riescono a mantenere pochi mg/kg di clorofilla integra in più rispetto agli oli controllo. Questa osservazione non è supportata dalla statistica ed inoltre ha scarsa rilevanza per la qualità dell'olio di oliva oggetto di studio.

Andiamo ad analizzare adesso, con maggiore dettaglio, la frazione fenolica: in primo luogo i fenoli totali aumentano in entrambe le tesi nel corso della conservazione. I contenuti sono uguali per fino al mese di aprile 2014. Dal questo punto di conservabilità in poi, gli oli sottoposti a stripping hanno presentato una quantità superiore rispetto al controllo di biofenoli.

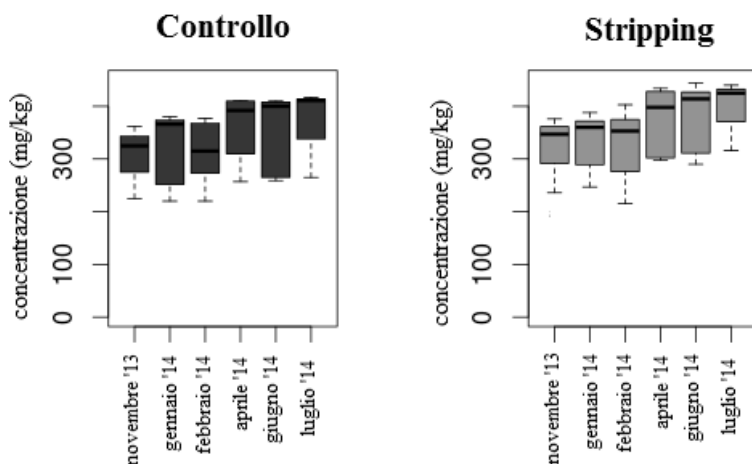


Figura 48: Contenuto totale in biofenoli degli oli sottoposti a stripping e di controllo

Per quanto riguarda l'analisi dei composti fenolici considerati singolarmente, alla partenza si riscontrano differenze limitate. Solo l'aglicone decarbossimetiloleuropeina nella forma dialdeidica ossidata si riscontra in concentrazioni maggiori negli oli strippati, rispetto al controllo. La corrispettiva forma non ossidata non mostra invece differenze. Anche nelle analisi effettuate nel gennaio successivo le concentrazioni dei composti fenolici non sono diverse fra gli oli sottoposti a stripping e gli oli utilizzati come controllo. Le analisi del mese di febbraio mostrano una differenza significativa nell'aglicone decarbossimetilligstroside in forma dialdeidica ossidata. Questo composto, in modo concorde allo studio precedentemente descritto risulta essere maggiormente presente nel controllo, mentre la rispettiva forma non ossidata maggiormente concentrata negli oli strippati ($p=0.19$). Le analisi effettuate nel mese di maggio confermano questo comportamento riportando concentrazioni maggiori della forma ossidata nel controllo ($p=0.016$) e della forma non ossidata negli strippati ($p=0.09$). Questi risultati sono mostrati per maggiore chiarezza in figura 49.



Figura 49: concentrazione delle forme ossidate e non ossidate dell'aglicone decarbossimetilligstroside in forma dialdeidica rilevate nel febbraio 2013 e nel maggio 2013 sugli oli sottoposti a stripping e di controllo

Nelle analisi effettuate nel mese di aprile le differenze si fanno più marcate. Al contrario dei test effettuati su Arbequina e Coratina, in questi test, nelle tesi strippate si instaurano reazioni di idrolisi a carico di Oleuropeina, Ligstroside e derivati che determinano un incremento nella concentrazione di Tirosolo ed Idrossitirosolo.

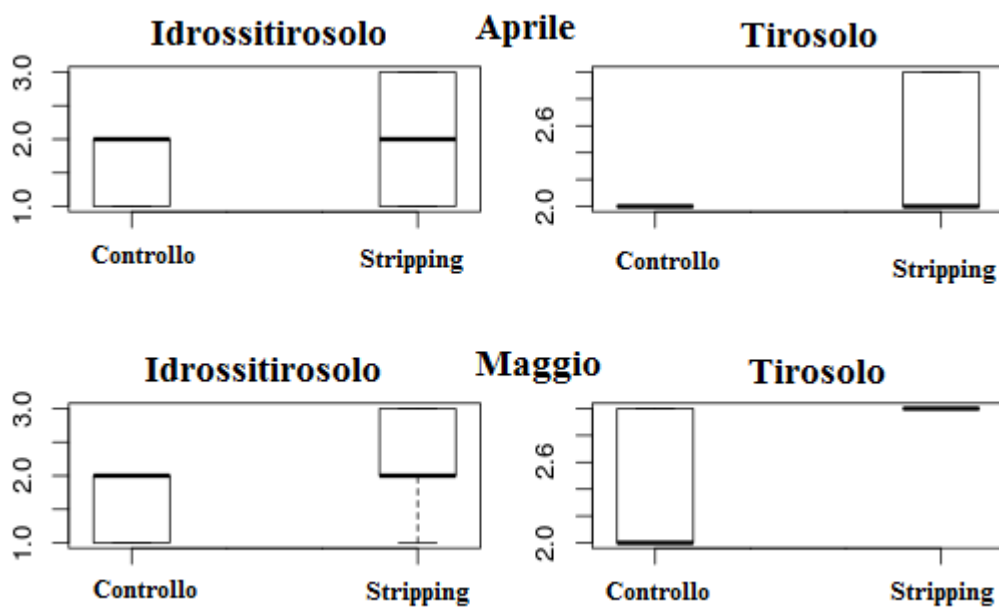


Figura 50: concentrazione di tirosolo ed idrossitirosolo negli oli strippati e negli oli di controllo misurate nel mese di aprile 2013 e nel mese di maggio 2013

Anche le forme del secoiridoide aglicone oleuropeina in forma aledidica ed idrossilica appaiono invertite rispetto ai test precedentemente svolti. Infatti le forme ossidate sono, in questo caso, nei campioni sottoposti a stripping, mentre le forme non ossidate in quelli di controllo.

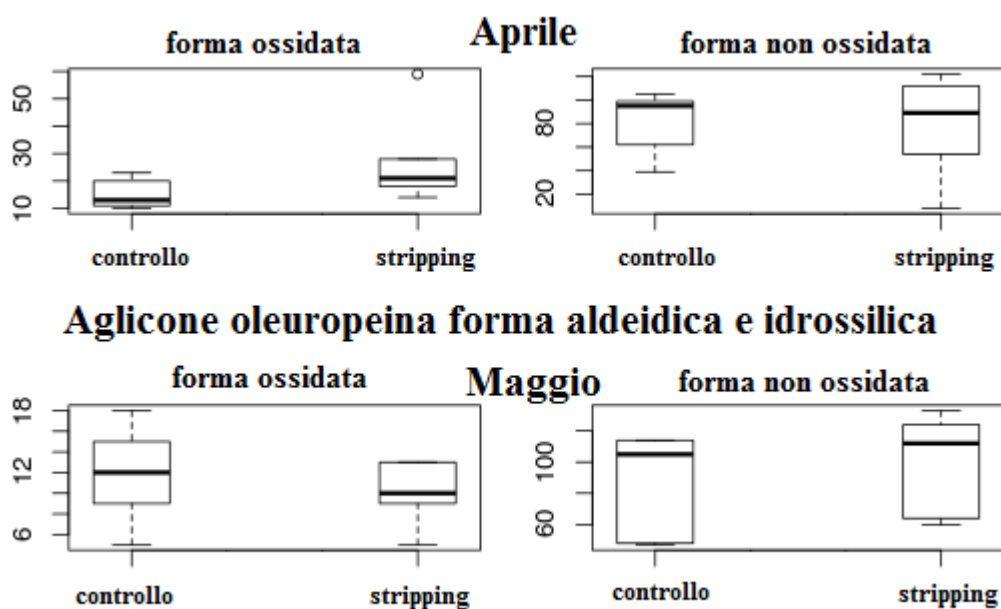


Figura 51: concentrazione dell'aglicone oleuropeina in forma aldeidica ed idrossilica ossidata e non ossidata negli oli sottoposti a stripping e negli oli di controllo rilevata nei mesi di aprile 2013 e maggio 2013.

Per quanto riguarda la forma aldeidica ed idrossilica dell'aglicone ligstroside si hanno risultati contrastanti nei due successivi punti di conservazione: nel mese di aprile, una concentrazione superiore della forma non ossidata negli oli strippati e nessuna differenza nella forma non ossidata. Nel mese di maggio invece non si hanno differenze significative per la forma non ossidata, mentre si hanno concentrazioni superiori negli oli strippati del composto in forma ossidata. La forma non ossidata, che in aprile aveva concentrazione di circa 26 mg/kg negli oli strippati e di circa 22 mg/kg negli oli di controllo, nel mese di maggio ha visto la riduzione a circa 23 mg/kg negli strippati e 20 mg/kg nel controllo. La forma ossidata invece, che era circa 19 mg/kg in entrambi i trattamenti ad aprile, presentava una concentrazione di circa 13 mg/kg negli strippati e di circa 10 mg/kg nel controllo. In questo caso quindi, lo stripping è effettivamente riuscito a conservare una maggiore quantità di secoiridoidi all'interno degli oli.

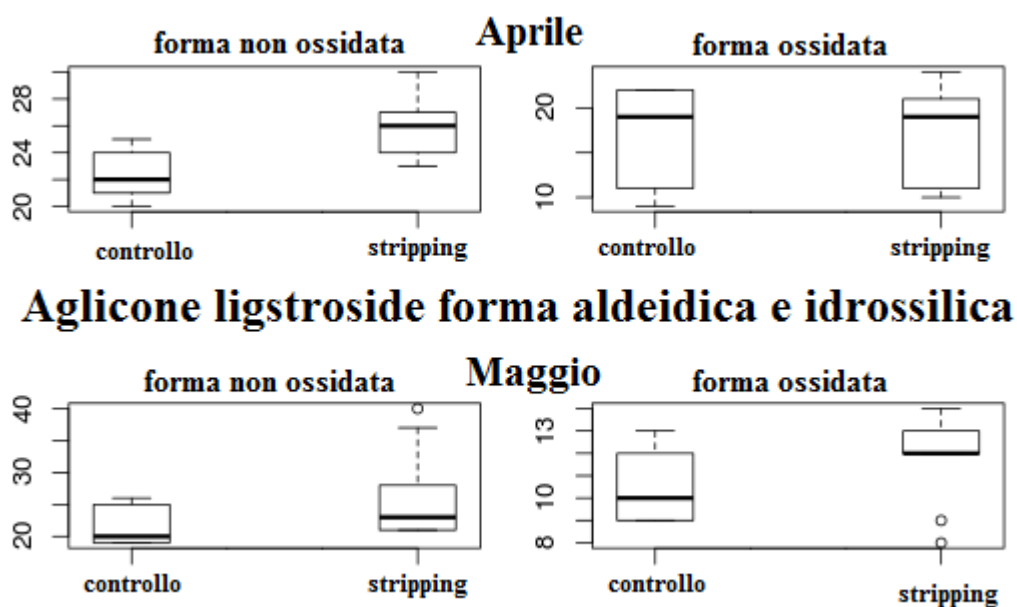


Figura 52: concentrazione dell'aglicone ligstroside in forma aldeidica ed idrossilica, ossidata e non ossidata, negli oli sottoposti a stripping e negli oli di controllo rilevata nei mesi di aprile 2013 e maggio 2013.

In aggiunta agli effetti positivi associati al trattamento di stripping, in Masella et al. (2010), era stata evidenziata una perdita di alcuni costituenti dell'aroma dell'olio di oliva a seguito del trattamento di stripping. Infatti era stata evidenziata una diminuzione di E-2-esenale, quantitativamente il maggior costituente dell'aroma di fruttato.

Nelle prove oggetto di discussione è stata confermata la diminuzione della concentrazione dei composti volatili negli oli sottoposti a tale trattamento. La riduzione in questione ha effetto aspecifico sia sui composti che sono desiderati all'interno di un olio di oliva di qualità, sia sugli off-flavor, quindi sui composti indesiderati. Subito dopo la produzione, infatti, gli oli strippati presentano minori concentrazioni sia di composti quali il E-2-esenale ed il 2,4 esadienale, associati rispettivamente a note "verdi" ed a odore di oliva matura (Kiritsakis et al., 1998), sia di composti quali il 4 etilfenolo e l'acido propionico, associati

rispettivamente a sensazioni di “cavallo bagnato” (Brenes et al., 2004) e di morchia (Morales et al., 2005). Per tutti questi composti, eccetto per il 4 etilfenolo, la minore concentrazione negli oli strippati è conservata anche nel batch di analisi effettuato dopo 45 giorni dalla data di produzione.

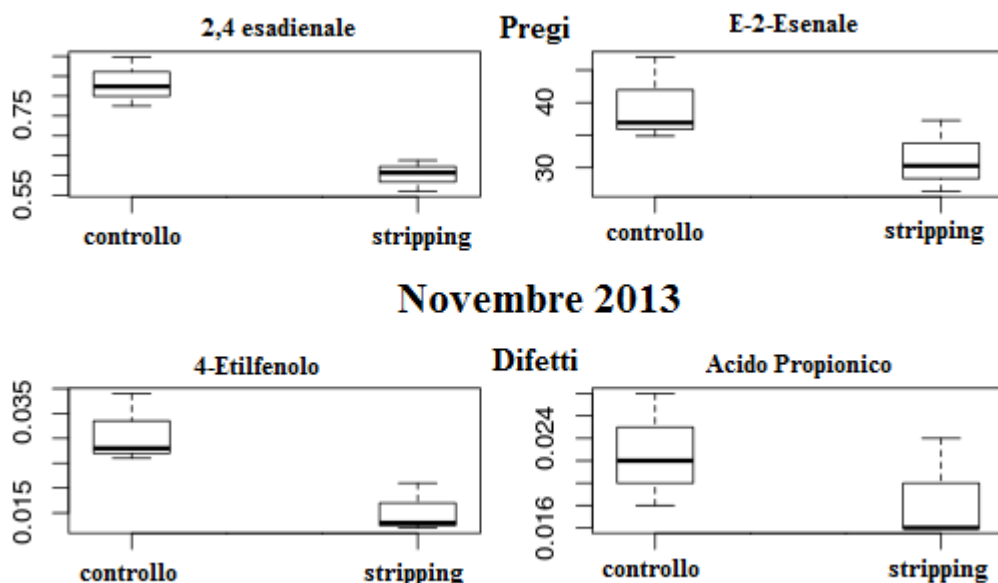


Figura 53: differenza di concentrazione in composti organici volatili subito dopo la produzione in oli strippati e di controllo. In alto due composti “graditi” ed in basso due “off-flavour”

Oltre ai composti già descritti, nel batch di analisi di gennaio, i seguenti composti hanno mostrato concentrazioni minori negli oli sottoposti a stripping: 2,4-eptadienale, 3-pentanone, nonanolo, valeraldeide. Anche stavolta abbiamo due composti desiderati: 3-pentanone e valeraldeide (Morales et al., 1997) e due composti non desiderati: nonanolo (rancido; Morales et al., 2005) e 2,4-eptadienale (rancido; Morales et al., 1997).

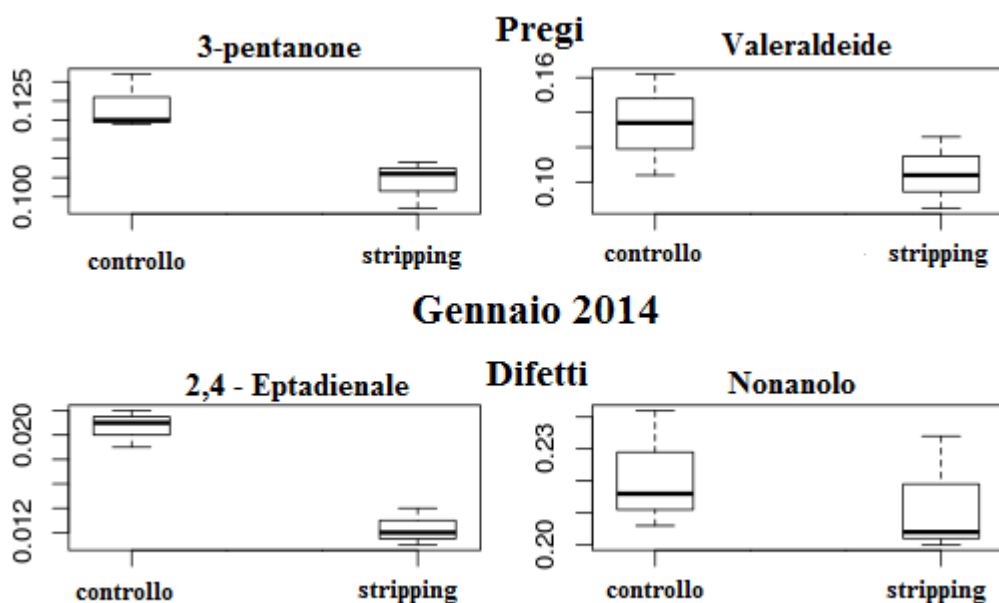


Figura 54: differenza di concentrazione in composti organici volatili a 45 giorni dalla produzione in oli strippati e di controllo. In alto due composti “graditi” ed in basso due “off-flavour”

Nel mese di febbraio i composti che mostrano differenze significative fra i trattamenti sono solamente 2, ed entrambi associabili a difetti: 2,4-Eptadienale e Metil-Acetato, associato al difetto di avvinato.

Nel batch di analisi di aprile si hanno differenze nei composti E-2-decenale ed Ottanolo, che hanno ancora una volta minori concentrazioni negli oli sottoposti a stripping ed indicano un minor difetto di rancido in questi ultimi. Si hanno inoltre concentrazioni più basse per il limonene, terpene gradito nell’olio di oliva.

In maggio le concentrazioni minori dei composti volatili legate agli oli sottoposti a stripping sono rilevate nei seguenti composti: Z-2-Pentenolo (aroma di mandorla, Angerosa et al., 2000), Z-2-Esenilacetato (aroma di frutta, banana, Angerosa et al., 2000), Z-3-Esenolo (sensazioni “verdi”, Kalua et al., 2007), Esanolo (sensazioni “verdi”, Olias et al., 1993), Eptanolo, 2-Feniletanolo (Guth & Grosh, 1993) per i pregi. Nel mese di luglio registriamo invece minori concentrazioni di acido butirrico, associato al difetto di riscaldamento, negli oli strippati.

In definitiva questi test confermano le osservazioni di Masella et al. (2010) sulla leggera diminuzione di composti organici volatili associata al trattamento di stripping. Tale diminuzione è aspecifica e colpisce indifferentemente i costituenti legati a sensazioni positive e quelli legati a difetti dell'olio di oliva.

Conclusioni

In questo lavoro sono state esaminate alcune tecniche di stabilizzazione dell'olio di oliva: la centrifugazione, la filtrazione e lo stripping. Inoltre è stato progettato e messo a punto un sistema di pre-filtrazione a cartucce in acciaio da anteporre ai filtri-prensa per aumentarne la capacità operativa e ridurre i consumi di materiali non riutilizzabili.

Una parte del lavoro di tesi ha riguardato l'approfondimento degli effetti dell'utilizzo del separatore centrifugo verticale sulla qualità dell'olio di oliva. Questa centrifuga addiziona ossigeno all'olio di oliva, portandolo vicino alla soglia di saturazione. Questo si traduce in un peggioramento dello stato ossidativo del prodotto, che priva più velocemente l'olio di oliva delle caratteristiche per appartenere alla categoria merceologica "olio extra-vergine", quindi ne accorcia la shelf-life. Inoltre la centrifuga utilizza, per il suo funzionamento, acqua di processo che dilava alcune componenti ritenute importanti per la qualità quali i biofenoli (stabilità ossidativa) e le clorofille (colore).

I danni prodotti dal separatore centrifugo all'olio hanno portato i piccoli impianti votati alla qualità a considerare di eliminare questo step dalla filiera di produzione dell'olio, prelevando il prodotto direttamente dalla centrifuga orizzontale. Questa tesi, per prima, descrive ed analizza questa modalità di lavoro. E' stata testata nel tempo la stabilità dell'olio prelevato direttamente dal decanter. Tale olio (olio mosto) ha mostrato di essere particolarmente soggetto a quelle reazioni che, nel tempo, portano all'inevitabile decadimento qualitativo dell'olio extra-vergine di oliva. In particolare, l'idrolisi della componente fenolica è risultata particolarmente rapida, con un veloce aumento dei composti finali di degradazione dei secoiridoidi (tirosolo ed idrossitirosolo). Inoltre, anche la componente aromatica si è deteriorata in maniera più rapida, portando alla formazione precoce di composti che possono essere ritenuti marker dei difetti di riscaldamento e di rancido dopo pochi mesi. L'olio non può essere mantenuto a lungo allo stato di mosto e deve pertanto essere filtrato il prima possibile. La filtrazione di un olio mosto è tuttavia un processo dispendioso in termini di materiali consumati (setti filtranti) e di perdite di olio. Questa

pratica necessita di essere migliorata perché sia sostenibile dal punto di vista aziendale. Dato che le aziende che tendono a filtrare l'olio senza il trattamento nel separatore centrifugo verticale utilizzano prevalentemente filtri-pressa, è stato messo a punto un sistema a due fasi con un pre-filtro in acciaio seguito dal filtro-pressa. Con tale approccio si intendono trattenere la maggior parte dei solidi sospesi per effetto superficiale su griglie lavabili, mentre i setti di cellulosa utilizzati dal filtro-pressa ritengono l'acqua ed i solidi di dimensioni inferiori per effetto di profondità. Questa modalità di lavoro ha permesso di filtrare circa il doppio dell'olio per ogni ciclo di lavoro, riuscendo pertanto quasi a dimezzare il consumo di setti di cellulosa e le perdite di olio in esso intrappolato.

Gli effetti della filtrazione con filtro-pressa come trattamento stabilizzante per l'olio di oliva sono stati testati e la shelf-life degli oli così processati è risultata maggiore. Sono stati effettuati inoltre test di confronto in conservazione fra il filtro-pressa e l'assetto pre-filtro con filtro-pressa che hanno mostrato che non ci sono differenze dal punto di vista qualitativo nel filtrare in maniera tradizionale, quindi in un'unica fase, oppure in due fasi distinte.

La tecnologia dello stripping per l'allontanamento dell'ossigeno disciolto, prima che esso possa andare a danneggiare l'olio ossidandone alcune delle componenti, è stata testata sia su oli provenienti dal separatore, sia su oli filtrati provenienti dal decanter.

Nel primo caso la rimozione dell'ossigeno ha prodotto effetti positivi sulla qualità dell'olio. In particolare le forme agliconiche dei secoiridoidi sono risultate maggiormente concentrate negli oli strippati rispetto agli oli testimone, mentre in questi ultimi si sono riscontrate concentrazioni maggiori delle forme ossidate degli stessi composti. Benefici sono stati rilevati anche nella riduzione del numero di perossidi associata al trattamento. Nel caso degli oli provenienti dal decanter questi effetti positivi sono stati parzialmente confermati in quanto non sono stati chiari come nel caso precedente, probabilmente a causa delle minori quantità di ossigeno che vengono addizionate all'olio.

Bibliografia

1. Abuznait, Alaa H., Hisham Qosa, Belnaser A. Busnena, Khalid A. El Sayed, and Amal Kaddoumi. "Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: In vitro and in vivo studies." *ACS chemical neuroscience* 4, no. 6 (2013): 973-982.
2. Aguilera, M. P., Beltràn, G., Sanchez-Villasclaras, S., Uceda, M., & Jimenez, A. (2010). Kneading olive paste from unripe 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *Journal of Food Engineering*, 97, 533-538.
3. Altieri, G., Di Renzo, G. C., Genovese, F., Tauriello, A., D'Auria, M., Racioppi, R., & Viggiani, L. (2014). Olive oil quality improvement using a natural sedimentation plant at industrial scale. *Biosystems Engineering*, 122, 99–114.
4. Ambrosone, L., Angelico, R., Cinelli, G., Lorenzo, V., & Ceglie, A. (2002). The role of water in the oxidation process of extra virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(6), 577–582.
5. Amirante, R., Cini, E., Montel, G. L., & Pasqualone, A. (2001). Influenza della miscelazione e di estrazione. sulla qualità vergine di oliva. *Grasas y Aceites*, 52, 198-201.
6. Angerosa, F., Mostallino, R., & Basti, C. (2000). Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68, 283–287.
7. Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72, 19-28.
8. Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 614–627.
9. Aparicio, R., & Morales, M. T. (2002). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry, 46 (3), 1116-1122.
10. Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2014). A new extraction approach to correct the effect of apparent increase in the secoiridoid content after filtration of virgin olive oil. *Talanta*, 127, 18–25.
 11. Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., & Montedoro, G. F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(11), 1589–1593.
 12. Bonnet, J.-P., Devesvre, L., Artaud, J., & Moulin, P. (2011). Dynamic viscosity of olive oil as a function of composition and temperature: A first approach. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1019–1025.
 13. Bosque-Sendra, J.M., Cuadros-Rodriguez, L., Ruiz-Samblas, C., De La Mata, A. P. (2012). Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data - - a review. *Analytica Chimica Acta*, 724, 1-11.
 14. Bottino, A., Capannelli, G., Comite, A., Ferrari, F., Marotta, F., Mattei, A., & Turchini, a. (2004). Application of membrane processes for the filtration of extra virgin olive oil. *Journal of Food Engineering*, 65(2), 303–309.
 15. Bottino, A., Capannelli, G., Mattei, A., Rovellini, P., & Zunin, P. (2008). Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(12), 1109–1115.
 16. Bouaziz, M., Chamkha, M., Sayadi, S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5476-5481.
 17. Brenes, M., García, a, García, P., & Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5609–14.
 18. Brenes, M., Romero, C., Garcia, A., Hidalgo, F. J., & Ruiz-

- Mendez, M. V. (2004). Phenolic Compounds in Olive Oils Intended for Refining: Formation of 4-Ethylphenol during Olive Paste Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8177–8181.
19. Brkić Bubola, K., Koprivnjak, O., & Sladonja, B. (2012). Influence of filtration on volatile compounds and sensory profile of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 132(1), 98–103.
 20. Brockerhoff H. (1974). Lipases, R.G. Jensen (Eds.), *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, New York, pp. 25–125
 21. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure - activity relationships. *Free Radical Biol. Med*, 22, 749 - 760.
 22. Caponio F, Gomes T, Summo C, Pasqualone A (2003)- Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105.
 23. Ciafardini, G., & Zullo, B. (2002). Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1-2), 111–8.
 24. Ciafardini, G., Zullo, B., & Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23(1), 60–7.
 25. Cini, E., Magni, J., Migliorini, M., Mugelli, M., Pasquini, M., & Recchia, L. (2006). Sperimentazione di una gramola ad asse verticale nell'estrazione dell'olio di oliva. *Rivista di Ingegneria Agraria. (Journal of Agricultural Engineering)*, 1, 1-19.
 26. De Vita, P. (1997). *Corso di meccanica enologica*. Hoepli, Milano, Italy. Pp. 532.
 27. Di Giacinto, L., Di Loreto, G., Di Natale, C., Gianni, G., Guasti, S., Migliorini, M., Pellegrino, M., Perri, E., & Santonico, M. (2010). Caratterizzazione analitica degli attributi sensoriali degli oli vergini di oliva. Project final report. Camera di Commercio di Firenze.
 28. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1316, 1332), maintenance of normal (fasting)

- blood concentrations of triglycerides (ID 1316, 1332), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1316, 1332) and maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 4244) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011;9(4):2044 [19 pp.].
29. European Union Commission. (1991). Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.
 30. Foote, C. S. (1979). Quenching of singlet oxygen. In *Singlet Oxygen*; Wasserman, H. H., Murray, R. W., Eds; Academic Press: New York; Vol. 40, pp. 139-171.
 31. Frega, N., Mozzon, M., & Lercker, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(3), 325–329.
 32. Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., & Desamparados Salvador, M. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(2), 134–142.
 33. Georgalaki, M. D., Sotiroudis, T. G., & Xenakis, A. (1998). The presence of oxidizing enzyme activities in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 155–159.
 34. Giovacchino, L. Di, Solinas, M., & Miccoli, M. (1994). Effect of Extraction Systems on the Quality of Virgin Olive Oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1189–1194.
 35. Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2009). Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETc in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International*, 42(8), 1067–1076.
 36. Goulas, V., Charisiadis, P., Gerothanassis, I. P., Manganaris, G. A. (2012). Classification, Biotransformation and Antioxidant Activity of Olive Fruit Biophenols: a Review. *Current Bioactive Compounds*, 8, 232-239.
 37. Grossi, C., Rigacci, S., Ambrosini, S., Ed Dami, T., Luccarini, I.,

- Traini, C., ... Stefani, M. (2013). The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. *PloS One*, 8(8), e71702.
38. Hermoso Fernandez, M. Uceda Ojeda, M. Garcia-Ortiz Rodriguez, A. Morales Bernardino J., Friaz Ruiz L., Fernando Garcia A. 1998 *In Elaboracion del aceite de oliva de calidad. Obtencion por el sistema de dos fases (pp. 65e71). Sevilla (Spain): Junta de Andalusia, Apuntes n. 11/94.*
 39. Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2001). Determination of peptides and proteins in fats and oils. *Analytical Chemistry*, 73(3), 698–702.
 40. Hidalgo, F. J., Alaiz, M., & Zamora, R. (2002). Low molecular weight polypeptides in virgin and refined olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7), 685–689.
 41. International Olive Oil Council. (2009). Trade Standard Applying to Olive Oil and Olive Pomace Oils. COI/T.15/NC Rev (4 November)
 42. Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, a. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273–286.
 43. Kalua, C. M., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2006) Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 7641-7651
 44. Kiritsakis, a. K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673–681.
 45. Koidis, A., & Boskou, D. (2006). The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 323–328.
 46. Koidis, A., Triantafillou, E., & Boskou, D. (2008). Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils. *European Journal of Lipid Science*

- and Technology, 110(2), 164–171.
47. Lercker, G., Frega, N., Bocci, R., & Mozzon, M. (1999). Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils: influence of the kneading of olivepaste. *Grasas Y Aceites*, 50, 26-29.
 48. Lerker, G., Frega, N., Bocci, F., & Servidio, G. (1994). “Veiled” Extra-Virgin Olive Oils: Dispersion Response Related to Oil Quality. *Journal of American Oil Chemists’ Society*, 71(6), 657–658.
 49. Lopez, M. J. O., Innocenti, M., Ieri, F., Romani, A., Mulinacci, N. (2008). HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea Europea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 62-70.
 50. Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). New Filtration Systems for Extra-Virgin Olive Oil: Effect on Antioxidant Compounds, Oxidative Stability, and Physicochemical and Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3754–3762. ù
 51. Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 201–211.
 52. Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 124(3), 1146–1150.
 53. Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. (2006). Characterization of 39 varietal virgin olive oil by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98, 243-252.
 54. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, Garcia-Rios A, Rodriguez F, Gutierrez-Mariscal FM, Gomez P, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. (2011). Mediterranean diet reduces endothelial damage and

- improves the regenerative capacity of endothelium. *Am J Clin Nutr.* Feb;93(2):267-74.
55. Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Velasco, J., & Dobarganes, C. (2008). Formation of oxidation compounds in sunflower and olive oils under oxidative stability index conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5), 465–471.
 56. Masella, P. (2002). Studio dei parametri che influiscono sulla filtrazione dell'olio extra-vergine di oliva. Tesi di Laurea.
 57. Masella, P., Parenti, A., Spugnoli, P., & Calamai, L. (2009). Influence of Vertical Centrifugation on Extra Virgin Olive Oil Quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(11), 1137–1140.
 58. Masella, P., Parenti, A., Spugnoli, P., & Calamai, L. (2012). Vertical centrifugation of virgin olive oil under inert gas. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), 1094–1096.
 59. Mateos, R., Dominguez, M. M., Espartero, J. L., & Cert, A. (2003). Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, r-Tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7170–7175.
 60. Messina Worldwide. Filtracell technical sheet.
 61. Migliorini, M., Zanoni, B., Berti, A., Cherubini, C., Cini, E., Daou, M., et al. (2008). Protocolli innovativi per la produzione di olio extra vergine nell'arealtà aziendale toscana. *Firenze: Camera di Commercio di Firenze. Maggio 2008*.
 62. Montedoro, G., 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (9), 1571-1576
 63. Morales, M. T., Luna, G., & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293–301.
 64. Morales, M. T., Rios, J. J., & Aparicio, R. (1997). Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 45(7), 2666–2673.
65. NGD (1976). Norme Italiane per il controllo dei Grassi e Derivati. Stazione Sperimentale Oli e Grassi (terza edizione), Milano
 66. Olías, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J., & Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(12), 2368–2373.
 67. Papadimitriou, V., Dulle, M., Wachter, W., Sotiroidis, T. G., Glatter, O., & Xenakis, a. (2013). Structure and Dynamics of Veiled Virgin Olive Oil: Influence of Production Conditions and Relation to its Antioxidant Capacity. *Food Biophysics*, 8(2), 112–121.
 68. Parenti, A., & Spugnoli, P. (2002). Influence of olive oil paste temperature on polyphenols content of the extracted oils. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 79, 97-100.
 69. Parenti, A., Spugnoli, P., Baldi, F., Masella, P., Calamai, L., & Mattei, A. (2008). Preliminary observations on veiled olive oil turbidity with regards to wax content. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 85, 221–228.
 70. Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P., & Calamai, L. (2007). Influence of the extraction process on dissolved oxygen in olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(12), 1180–1185.
 71. Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P., & Calamai, L. (2008). The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 735-741.
 72. Peri, C. (1983). *La filtrazione nelle industrie alimentari*. Edizioni AEB, Brescia, Italia.
 73. Peri, C. (2014). *The extra-virgin olive oil handbook*. Wiley Blackwell, United Kingdom.
 74. Pirisi, F. M., Angioni, A., Bandino, G., Cabras, P., Guillou, C., Maccioni, E., & Reniero, F. (1998). Photolysis of α -Tocopherol in Olive Oils and Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3, 4529–4533.
 75. Pokorny J., Kalinova L., Dysseler P., (1995). Determination of

- chlorophyll pigments in crude vegetable oils. *Pure Appl. Chem.*, 67, 1781-1787.
76. Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 722–7.
 77. Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., & Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 228-238.
 78. Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., & Iannucci Elucera, L. (2003). Effects of olive paste kneading time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 57-67.
 79. Rawls, H. R., & Santen, P. J. (1970). A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 47(4), 121–125.
 80. Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596–601.
 81. Rothwell, J. A., Day, A. J., & Morgan, M. R. A. (2005). Experimental Determination of Octanol – Water Partition Coefficients of Quercetin and Related Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4355–4360.
 82. Ryan, D., Robard, K., Lavee, S. (1999). Determination of phenolic compounds in olive by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatograph A*. 832, 87-96.
 83. Sacchi, R., Paduano, A., Fiore, F., Della Medaglia, D., Ambrosino, M. L., & Medina, I. (2002). Partition Behavior of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in Oil – Brine Mixtures during Thermal Processing for Fish Canning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2830–2835.
 84. Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M. Á., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., ... Ros, E. (2011). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized

- trial. *Diabetes Care*, 34(1), 14–9.
85. Saleh, N. K., & Saleh, H. a. (2011). Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 10.
 86. Samieri, C., Féart, C., Proust-Lima, C., Peuchant, E., Tzourio, C., Stapf, C., ... Barberger-Gateau, P. (2011). Olive oil consumption, plasma oleic acid, and stroke incidence: the Three-City Study. *Neurology*, 77(5), 418–25.
 87. Sánchez-Villegas, A., Verberne, L., De Irala, J., Ruíz-Canela, M., Toledo, E., Serra-Majem, L., & Martínez-González, M. A. (2011). Dietary fat intake and the risk of depression: the SUN Project. *PloS One*, 6(1).
 88. Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, GF. (2003). Air exposure time of olive pastes during the extraction process and phenolic and volatile composition of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 80, 685 - 695.
 89. Sutherland, K. (2008). *Filters and Filtration Handbook*. Elsevier.
 90. Tovar, M.J., Motilva, M.J. , Romero, M.P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5502-5508
 91. Tsai, S. W., & Chiang, C. L. (1991). Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(2), 206–11.
 92. Tsimidou, M. Z., Georgiou, A., Koidis, A., & Boskou, D. (2005). Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*, 93(3), 377–383.
 93. Valgimigli, L., Sanjust, E., Curreli, N., Rinaldi, A., Pedulli, G. F., & Rescigno, A. (2001). Photometric assay for polyphenol oxidase activity in olives, olive pastes, and virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 78(12), 1245–1248.
 94. Valitutti, G., Fornari, G., & Gando, M. T. (1999). *Chimica organica, biochimica e laboratorio*. Ed. Zanichelli, Bologna, Italia,

pp. 582.

95. Visioli, F., Poli, A., & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65–75.
96. Weatherall, I. L., & Coombs, B. D. (1992). Skin Color Measurements in Terms of CIELAB Color Space Values. *Journal of Investigative Dermatology*, 99, 468-473.
97. Xenakis, A., Papadimitriou, V., & Sotiroudis, T. G. (2010). Colloidal structures in natural oils. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 55–60.