

# Misura 124- Regione Toscana

Acronimo del progetto  
**Oleosalusistem**

Titolo del progetto  
**Validazione di protocolli per la produzione di oli ad elevato valore nutrizionale ed a ridotto impatto ambientale**

**Relazione Conclusiva**  
**19 Ottobre 2011 - 28 Giugno 2013**



## PREMESSA

La valorizzazione e il miglioramento delle produzioni alimentari passa attraverso la necessità di diversificare il prodotto, dimostrandone le oggettive differenze rispetto alla concorrenza. Una riconoscibile e specifica qualità del prodotto è quindi il fine da perseguire, essa è però da intendersi come il risultato dell'integrazione tra la qualità espressa come livello quantitativo delle caratteristiche di prodotto ai fini della soddisfazione delle attese dei suoi utilizzatori e la qualità espressa come livello quantitativo delle caratteristiche del sistema produttivo sempre ai fini della soddisfazione delle attese dei suoi utilizzatori.

Nel caso della realtà produttiva toscana dell'olio extra vergine di oliva le ricerche condotte in precedenti progetti (Mugelli et al., 2005; Migliorini et al., 2006; Migliorini et al., 2008; Cherubini et al., 2009; Migliorini et al., 2009; Carfagni et al., 2010;) hanno posto in evidenza soluzioni tecniche e procedure operative relative al controllo di elementi qualitativi sia di prodotto che di sistema, che sono tra i più significativi ai fini della valorizzazione delle produzioni, e che riguardano sia la linea produttiva dell'olio extra vergine di oliva sia la linea dei sottoprodotti della lavorazione oleicola.

Il progetto Oleosalusistem si pone pertanto l'obiettivo di validare presso l'azienda agricola toscana in grado di sviluppare l'intera filiera produttiva le acquisizioni tecnologiche, metodologiche ed impiantistiche sperimentate negli anni 2005-2009.

### **Obiettivi di progetto**

Le attività svolte nei 18 mesi di progetto hanno avuto come obiettivi principali:

- la definizione e il controllo delle caratteristiche nutrizionali e sensoriali dell'olio extra vergine di oliva;
- la sostenibilità ambientale del sistema produttivo olivo-oleicolo.

Per il raggiungimento di entrambi gli obiettivi di progetto è stato utilizzato il seguente comune approccio, che costituisce importante elemento di novità: *i composti fenolici sono un patrimonio caratteristico dell'olio extra vergine di oliva e pertanto la scelta delle condizioni operative da adottare durante le singole operazioni unitarie della filiera deve essere tale da preservare il contenuto di composti fenolici minimizzando la loro degradazione idrolitica ed ossidativa, e tenendo sempre presente la loro limitata liposolubilità.*

La capacità di definire e tenere sotto controllo il profilo fenolico degli oli extra vergini di oliva è una importante novità di questo progetto. Si parte dalle olive, che giocano un ruolo fondamentale sul profilo oltre per l'effetto varietà e condizioni ambientali anche per l'effetto del grado di maturazione. Si continua con il processo di estrazione, che viene monitorato criticamente sia da un punto di vista chimico che microbiologico, ed in particolare con l'operazione di gramolatura, in grado di condizionare il profilo con i parametri tempo, temperatura ed esposizione all'ossigeno, e con l'operazione di estrazione per centrifugazione con "decanter" che deve il più possibile preservare il profilo fenolico dell'olio presente nelle paste. Si conclude con la conservazione del prodotto che deve permettere solo un lento decadimento delle caratteristiche qualitative degli oli.

La definizione e il controllo fenolico non si possono disgiungere dal loro effetto diretto e indiretto sulle caratteristiche sensoriali degli oli, nonché sulle metodologie sperimentali utilizzate per valutare tali effetti ad integrazione di quelle di legge (Anonimo). Sono

introdotte pertanto nuove procedure e nuovi metodi nel campo delle scienze sensoriali, così da permettere ai produttori di disporre di metodi validati per esaltare nei prodotti gli elementi di peculiarità sensoriale delle produzioni olearie regionali, rafforzandone l'identità, ma anche di ampliare la diversificazione dell'offerta in considerazione delle attese dei consumatori per le prestazioni sensoriali degli oli toscani.

Per quanto riguarda la linea dei sottoprodotti della lavorazione delle olive, il progetto prevede la produzione e gestione integrata di:

- sansa umida di oliva, utilizzabile come ammendante di origine semplice per lo spandimento in campo e per il recupero dei composti fenolici da destinare ad altri mercati di vendita;
- nocciolino, utilizzabile come fonte energetica;

Il sistema proposto rappresenta una significativa opportunità di miglioramento dell'intera filiera olivo-oleicola, anche da un punto di vista ambientale, in quanto costituisce un passo fondamentale verso la filiera ideale "a scarto zero", mirata al recupero di sostanze e materiali potenzialmente recuperabili anziché smaltibili.

L'intero processo di produzione dell'olio extra vergine di oliva proposto per la realizzazione delle finalità sopra descritte viene attuato mediante l'utilizzo di un prototipo di linea di estrazione, collaudato e validato durante alcune fasi di progetto.

### **Fasi di progetto**

Per il completo svolgimento del progetto sono state individuate 8 differenti fasi: mentre le fasi 1 ed 8 riguardano rispettivamente aspetti organizzativi e divulgativi, tutte le altre fasi riguardano le attività più strettamente tecniche legate alla realizzazione del prototipo, al suo utilizzo per il collaudo e le attività necessarie per definire e caratterizzare le materie prime (olive) ed i prodotti (olio extra vergine di oliva e relativi sottoprodotti) che si ottengono.

Il diagramma qui sotto riporta in forma sintetica tutte le fasi inerenti gli aspetti tecnici articolate in attività di progettazione, produzione e risultati.

Lo schema riportato di seguito sarà realizzato sia durante il primo che il secondo anno di attività. Durante il primo anno l'attenzione sarà focalizzata all'ottenimento di olive con caratteristiche definite che saranno lavorate con il prototipo di produzione per l'ottenimento di oli ad elevato contenuto fenolico, mentre durante il secondo anno, partendo da olive con caratteristiche definite, saranno prodotti oli differenti grazie a differenti condizioni operative di utilizzo del prototipo di produzione.

Sia durante il primo che il secondo anno di attività saranno valorizzati gli scarti di produzione e saranno riutilizzati nel processo di produzione aziendale.

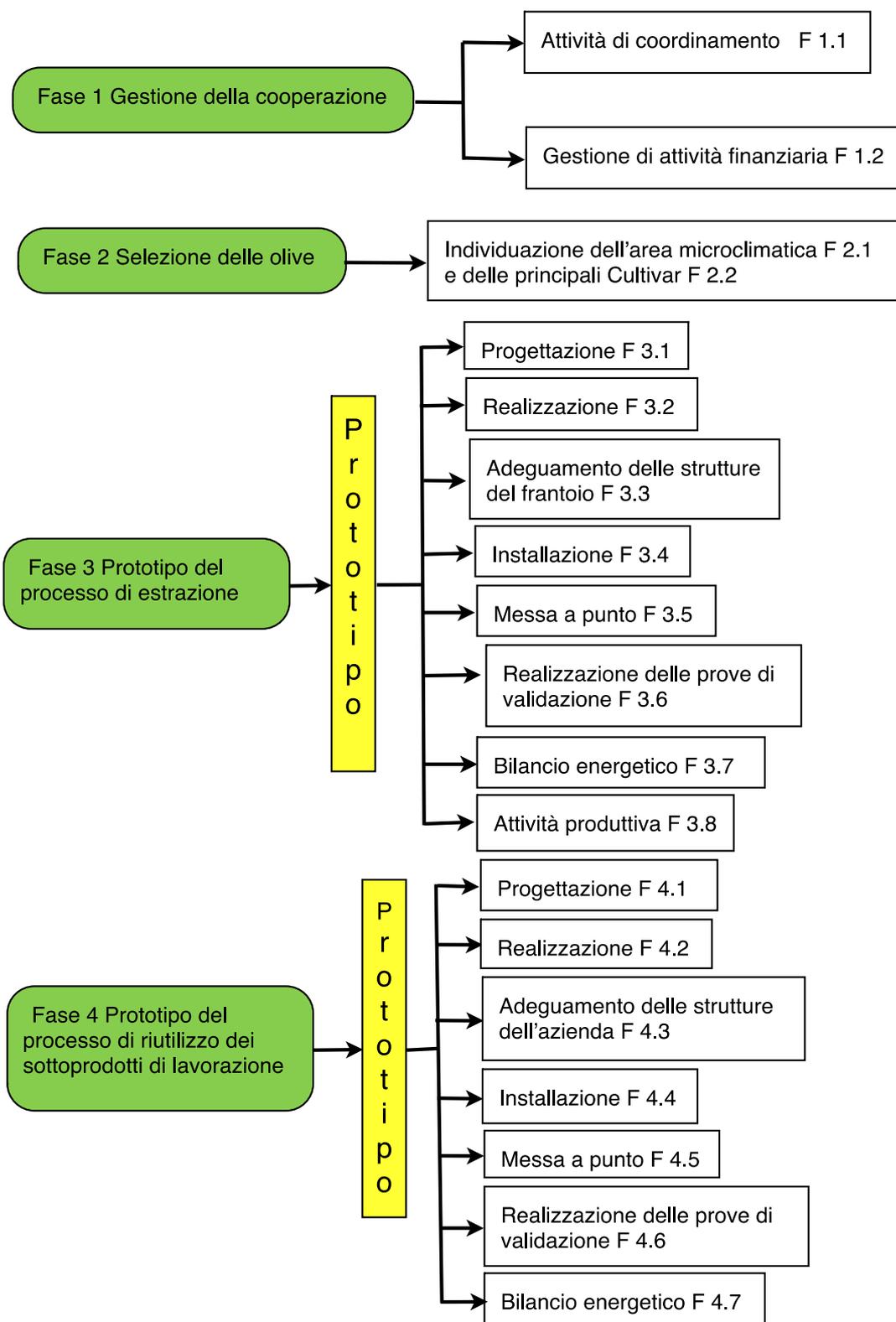
### **Partner di progetto**

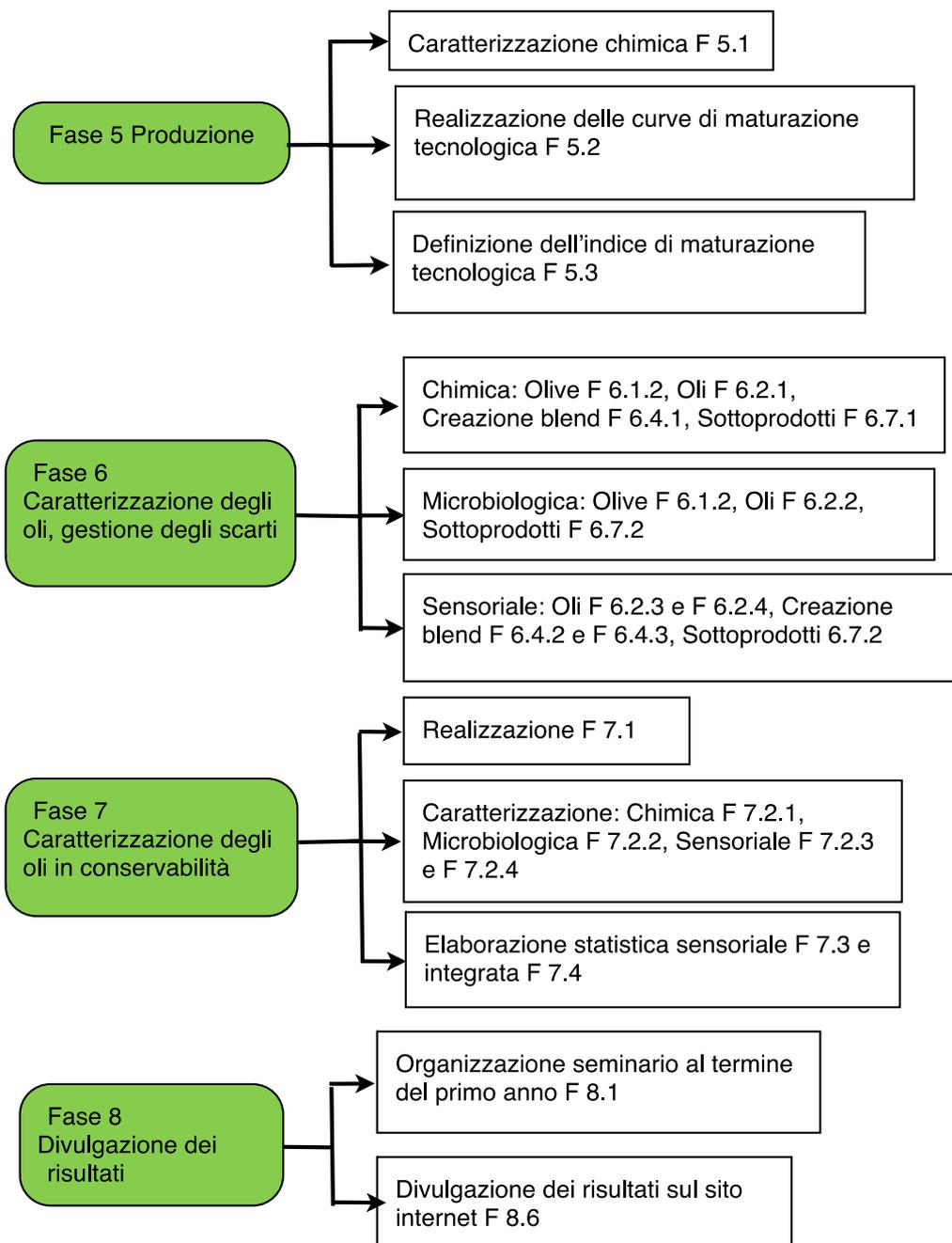
I partner che hanno preso parte al progetto ed, in sintesi, le principali attività che hanno seguito nei mesi di progetto sono riportati nella tabella seguente.

Denominazione del soggetto	Natura dei soggetti partecipanti e attività prevalente del soggetto
Azienda Agricola Buonamici di Cesare Buonamici Srl	Imprenditore agricolo professionale e impresa di trasformazione di prodotti agricoli e/o forestali <i>Trasformatore e fornitore delle olive</i>
Toscana Enologica Mori Snc	Impresa meccanica

	<i>Fornitore del prototipo innovativo</i>
Metropoli Azienda Speciale della CCIAA di Firenze	Soggetti di diritto pubblico operanti nella produzione e trasferimento di ricerca, sviluppo e innovazione tecnologica  <i>Analisi chimiche e caratterizzazione di prodotto</i>
Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agrari, Alimentari e Forestali (GESAAF), Università degli Studi di Firenze	Soggetti di diritto pubblico operanti nella produzione e trasferimento di ricerca, sviluppo e innovazione tecnologica  <i>Studio di processi e prodotti; caratterizzazione microbiologica e sensoriale di prodotto; attività di ricerca nell'ambito dell'ingegneria agraria.</i>
Associazione nazionale assaggiatori professionisti olio d'oliva (A.N.A.P.O.O.)	Soggetti di diritto privato operanti nella produzione e trasferimento di ricerca, sviluppo e innovazione tecnologica  <i>Attività di valutazione sensoriale e divulgazione delle attività svolte</i>

Il progetto ha visto la partecipazione e collaborazione di soggetti aventi competenze molto differenti (chimici, microbiologi, elaiotecnici, tecnologi, meccanici, esperti in analisi sensoriale e assaggiatori) che hanno messo a disposizione le loro competenze e la loro esperienza per la buona riuscita degli obiettivi del progetto. In questo senso, Oleosalusistem può considerarsi davvero un progetto multidisciplinare!





## INDICE

<u>Fase 1 GESTIONE DELLA RETE DI COORDINAMENTO</u> .....	9
<u>Fase 2 SELEZIONE DELLE OLIVE</u> .....	11
<u>Fase 3 PROTOTIPO DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE</u> .....	15
<u>Fase 4 PROTOTIPO DEL PROCESSO DI UTILIZZO DEI SOTTOPRODOTTI DI LAVORAZIONE</u> .....	35
<u>Fase 5 PRODUZIONE DELLE OLIVE</u> .....	46
<u>Fase 6 CARATTERIZZAZIONE DEGLI OLI, GESTIONE DEGLI SCARTI DI PRODUZIONE</u> .....	74
<u>Fase 7 CARATTERIZZAZIONE DEGLI OLI IN CONSERVABILITA'</u> .....	
<u>Fase 8 DIVULGAZIONE DEI RISULTATI</u> .....	

# **Fase 1 GESTIONE DELLA RETE DI COORDINAMENTO**

## **F 1.1 Attività di coordinamento**

Il partner P1 ha effettuato attività di coordinamento (F 1.1) durante l'intera durata del progetto organizzando:

- una riunione tenutasi martedì 6 settembre 2011 presso il partner P3 (Metropoli-Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze- Divisione Laboratorio Chimico Merceologico) coinvolgendo tutti membri del progetto e avente per oggetto la pianificazione dell'attività da svolgere;
- una riunione tenutasi giovedì 9 febbraio 2012 presso il partner P3 (Metropoli-Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze- Divisione Laboratorio Chimico Merceologico) coinvolgendo i membri partecipanti del Di.B.A (partner P4) e P3 avente per oggetto la discussione dei principali risultati ottenuti;
- una riunione tenutasi giovedì 8 marzo 2012 presso il partner P3 (Metropoli-Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze- Divisione Laboratorio Chimico Merceologico) coinvolgendo P1, P2, P3 e P4, avente per oggetto un seminario sullo stato dell'arte per il riutilizzo dei sottoprodotti di lavorazione dell'olio extra vergine di oliva e lo stato di avanzamento del progetto;
- una riunione giovedì 29 marzo 2012 presso il Partner P4 (Dipartimento di Biotecnologie Agrarie) coinvolgendo tutti i partner avente per oggetto la discussione dei risultati scientifici ottenuti, l'aggiornamento sullo stato di avanzamento dei lavori e valutazione dell'eventuale partecipazione nel mese di maggio prossimo a Medoliva ad Arezzo.
- una riunione martedì 26 giugno 2012 presso il partner P3 (Metropoli- Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze- Divisione Laboratorio Chimico Merceologico) coinvolgendo P1, P2, P3 e P4, avente per oggetto il piano sperimentale da realizzare durante la campagna olearia 2012.
- una riunione martedì 11 settembre 2012 presso il partner P2 (TEM- Toscana Enologica Mori) coinvolgendo P1, P2, P3 e P4 avente per oggetto il piano organizzativo e sperimentale per la campagna olearia 2012 con maggiore focalizzazione alla costruzione e progettazione impiantistica;

- una riunione lunedì 8 ottobre 2012 presso il partner P2 (TEM- Toscana Enologica Mori) coinvolgendo P1, P2, P3 e P4 avente per oggetto il piano sperimentale da realizzare durante la campagna olearia 2012 con maggiore focalizzazione all'ottimizzazione degli impianti e delle condizioni operative.
- una riunione venerdì 18 gennaio 2013 presso la sede del partner P4 (GESAAF - Dipartimento di Gestione delle Risorse Agrarie, Alimentari e Forestali) coinvolgendo P2 e le unità operative P3. Durante la riunione sono stati valutati i dati parziali presentati dai partner presenti focalizzando l'attenzione sui risultati microbiologici.
- una riunione mercoledì 17 aprile 2013 presso la sede del partner P3 (Metropoli-Azienda Speciale della Camera di Commercio di Firenze- Divisione Laboratorio Chimico Merceologico) coinvolgendo P2, P4, P5, P6 avente per oggetto la stesura della relazione finale, dell'opuscolo divulgativo e l'organizzazione del Convegno di fine Progetto del 21 giugno 2013.

Ogni partner ha gestito i costi sostenuti per la realizzazione del progetto grazie alle attività delle fasi F 1. 2. Il dettaglio delle spese per ciascun partner verrà presentato in seguito ed in tempo utile per la rendicontazione sul portale ARTEA.

## Fase 2 SELEZIONE DELLE OLIVE

### *1° anno di attività*

- **Periodo di svolgimento:** le fasi si sono svolte dal mese di settembre 2011 al mese di gennaio 2012.
- **Attività svolta:** grazie alla collaborazione dell'agronomo Dott. Mauro Marranci sono state individuate nel mese di luglio 2011, presso l'oliveta dell'Azienda Agricola Buonamici, alberi di cultivar Moraiolo, Frantoio e Leccino idonei agli obiettivi del progetto. Nel mese di agosto 2011 è stata installata una centralina meteorologica in prossimità delle olivete selezionate in grado di monitorare i principali parametri ambientali.

### *2° anno di attività*

- **Periodo di svolgimento:** la fase è stata svolta l'11 luglio 2012.
- **Attività svolta:** il Dott. Mauro Marranci, consulente del partner P.3, ha effettuato un sopralluogo presso le olive del partner P.1 (Fase 2. 2) per valutare se lo stato vegetativo delle piante individuate lo scorso anno (Frantoio, Moraiolo e Leccino) fosse ancora idoneo allo studio di maturazione tecnologica delle olive da olio. Il sopralluogo ha avuto esito positivo ed il campionamento delle olive è iniziato dalla metà del mese di luglio 2012 e si è concluso il 3 dicembre 2012 (Fase 5.1).

Qui di seguito si riportano le relazioni tecniche del Dott. M. Marranci per la campagna olearia 2011 e 2012 rispettivamente.

Mauro Marranci  
C. F. MRR MRA 63C29E 291X  
Tel/Fax 055.2011777 – cell. 335.8386385  
E-mail: [mauro.marranci@virgilio.it](mailto:mauro.marranci@virgilio.it)  
Iscritto all'albo dei dottori agronomi e forestali di Firenze

### **RESOCONTO DI ATTIVITA' PROGETTO Oleosalusistem**

**Riconoscimento, individuazione e definizione in campo di piante di olivo delle cultivar “Frantoio”, “Leccino” e “Moraiolo” idonee allo svolgimento di attività sperimentali inerenti la maturazione dei frutti.**

Di seguito viene riportata l'attività svolta nel periodo fine luglio presso l'azienda Buonamici

**29 luglio 2011.**

#### **Sopralluogo presso l'Azienda Agricola “Buonamici” S.r.l. – Fiesole (FI)**

L'ambiente della collina fiorentina risulta ben rappresentato dagli appezzamenti di terreno di proprietà dell'Azienda Agricola “Buonamici”. La presenza di oliveti specializzati in piena produzione con all'interno olivi appartenenti alle tre cultivar oggetto di indagine, rende questa realtà produttiva idonea al lavoro progettato. In tale contesto aziendale si è provveduto alla individuazione di n. 15 piante per ciascuna cultivar (Frantoio, Leccino, Moraiolo). Gli olivi, di 10 anni di età, localizzati su terreno collinare esposto a nord, sono stati identificati e contrassegnati adeguatamente. Tra gli elementi presi come parametro di riferimento nella scelta delle piante si è dato particolare peso alla presenza di un buon carico di olive, alla loro presenza uniforme su tutta la chioma ed alla omogeneità delle piante stesse tra di loro.

in fede  
Dot. Mauro MARRANCI  


Mauro Marranci  
C. F. MRR MRA 63C29E 291X  
Tel/Fax 055.2011777 – cell. 335.8386385  
E-mail: [mauro.marranci@virgilio.it](mailto:mauro.marranci@virgilio.it)  
Iscritto all'albo dei dottori agronomi e forestali di Firenze

## RESOCONTO DI ATTIVITA'

### Progetto: Oleosalusistem (Fase 2.2)

#### Individuazione delle principali cultivar nel microclima interessato

Durante il mese di luglio 2012 è stato effettuato il sopralluogo presso l'**Azienda Agricola "Buonamici" S.r.l. – Fiesole (FI)** per la definizione in campo di piante di olivo delle cultivar "Frantoio", "Leccino" e "Moraiolo" idonee allo svolgimento di attività sperimentali inerenti la maturazione dei frutti.

Il sopralluogo è stato eseguito congiuntamente al personale del Laboratorio Chimico Merceologico afferente a Metropoli (Azienda speciale della Camera di Commercio di Firenze).

"Frantoio", "Leccino" e "Moraiolo" costituiscono le cultivar di olivo più importanti in termini di rappresentatività numerica e produzione per la Toscana. Anche in questo territorio, queste assumono di gran lunga l'aspetto di maggiore rilevanza in termini produttivi.

Gli appezzamenti di terreno di proprietà dell'Azienda Agricola "Buonamici" rappresentano una realtà idonea per procedere a sperimentazioni aventi per oggetto l'olivo. Le caratteristiche pedologiche e climatiche, le tecniche colturali impiegate, la presenza di oliveti specializzati in piena produzione con all'interno piante appartenenti alle tre cultivar oggetto di indagine, rende questa realtà produttiva ottimale per il lavoro progettato.

In tale contesto aziendale si è provveduto alla individuazione di n. 15 piante per ciascuna cultivar (Frantoio, Leccino, Moraiolo). Gli olivi, ben coltivati, di circa 10 anni di età, localizzati su terreno collinare esposto a nord, sono stati identificati e contrassegnati adeguatamente. Tra gli elementi presi come parametro di riferimento nella scelta delle piante si è dato particolare peso alla presenza di un buon carico di olive, alla loro presenza uniforme su tutta la chioma ed alla omogeneità delle piante stesse tra di loro.

Particolare attenzione è stata inoltre rivolta alla individuazione di piante che, oltre alle predette peculiarità, avessero caratteristiche morfologiche e vegeto-riproduttive molto rappresentative della cultivar. Come è noto infatti le cultivar di olivo sono Cultivar-

popolazioni ed è frequente trovare negli oliveti piante che pur appartenendo alla stessa cultivar, hanno caratteristiche espressive (fenotipo) differenti tra di loro.

in fede  
Dot. Mauro MAFRANCI



---

## **Fase 3 PROTOTIPO DEL PROCESSO DI ESTRAZIONE**

### *1° anno di attività*

Nei mesi di luglio e agosto 2011 grazie alla collaborazione tra i partner sono state definite le caratteristiche impiantistiche del prototipo (F 3.1.1). I Partner P2 e P3 hanno collaborato alla progettazione del prototipo. Si riportano di seguito le caratteristiche impiantistiche:

- frangitore a fresa;
- gramole ad asse verticale a ridotto contenuto di ossigeno con capienza di 5 quintali;
- decanter a due uscite;
- sistema di filtrazione su cartoni.

A causa del ritardo dell'approvazione del progetto, durante la campagna olearia 2011 solo il prototipo del decanter è stato installato all'interno del frantoio, mentre tutti gli altri elementi impiantistici erano già presenti nell'azienda del Partner P1; pertanto le fasi F 3.2 Realizzazione del prototipo del processo di estrazione, F 3.3 Adeguamento delle strutture del frantoio per l'installazione del prototipo, F 3.4 Installazione del prototipo all'interno del frantoio, F 3.5 Messa a punto del prototipo, sono state effettuate solo in parte. Le prove di estrazione (3.5.2) e di validazione (3.6.2) del prototipo sono state condotte nel periodo indicato nel cronoprogramma riportato nel formulario con modalità che talvolta si discostano dal piano presentato. Le principali motivazioni sono state l'andamento stagionale della campagna olearia e la data di assegnazione del finanziamento che essendo arrivata a campagna olearia iniziata non ha permesso di programmare i lavori. Per questo ultimo motivo le prove di messa a punto (3.5.2) e di validazione (3.6.2) del prototipo sono state condotte nelle medesime giornate di lavoro al frantoio in modo da permettere la realizzazione di 2 prove nella campagna olearia 2011. La prima prova è stata realizzata il 16 novembre 2011 mentre la seconda prova è stata realizzata a distanza di una settimana (23 novembre 2011). In entrambe le date sono state lavorate olive di cultivar Frantoio e Moraiolo, mentre non è stato possibile lavorare la cultivar Leccino a causa della scarsità produttiva che ha contraddistinto la campagna olearia 2011. In totale sono state condotte 19 prove con il prototipo del processo di estrazione.

## *2° anno di attività*

Nei mesi di giugno - settembre 2012 grazie alla collaborazione tra i partner sono state definite le caratteristiche impiantistiche del prototipo (F 3.1.1). I Partner P1, P2, P3 e P4 hanno collaborato alla progettazione del prototipo.

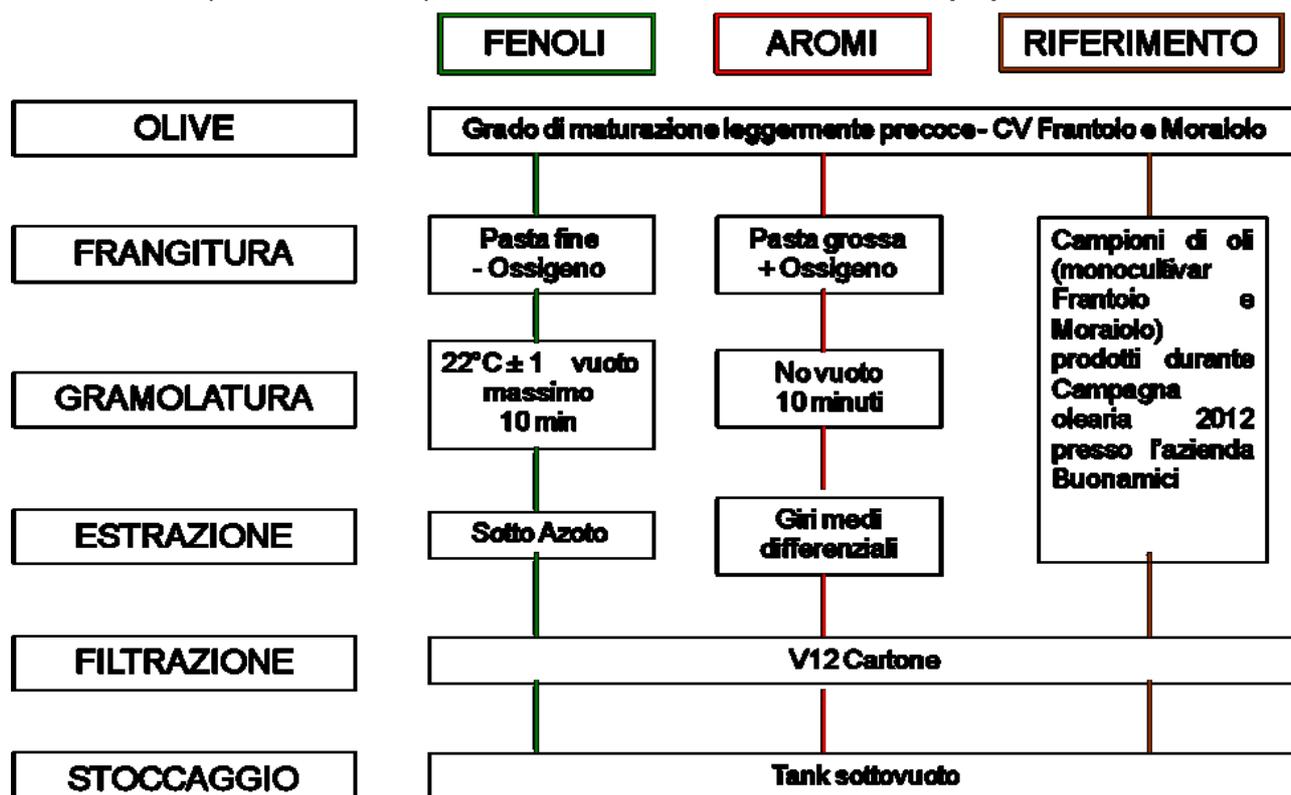
Si riportano di seguito le caratteristiche impiantistiche:

- frangitore a fresa;
- gramole ad asse verticale a ridotto contenuto di ossigeno;
- decanter a due uscite;
- sistema di filtrazione su cartoni.

L'obiettivo prefissato dalla campagna olearia 2012 è stato quello di realizzare la modulazione controllata del profilo fenolico degli oli in funzione di un desiderato profilo nutrizionale e sensoriale del prodotto finito attraverso l'applicazione del principio del frazionamento e della ricombinazione; ciò significa applicare esempi di tecniche operative per raggiungere livelli diversi di composizione chimica di lotti di olio, sia della stessa cultivar che di cultivar diverse da miscelare per ottenere una desiderata funzione nutrizionale e sensoriale del prodotto finito. A tal proposito, la proposta di attività sperimentale per la campagna olearia 2012 è stata quella di realizzare delle prove che, con determinate caratteristiche impiantistiche e modificando determinate condizioni operative, siano in grado di produrre oli extravergini di oliva ad elevato contenuto fenolico (prova "Fenoli") e ad elevato contenuto aromatico (prova "Aromi") paragonandoli ad una media di oli prodotti nella provincia di Firenze nella medesima campagna olearia (riferimento).

Si riporta di seguito lo schema delle condizioni operative dell'attività delle prove realizzate durante la campagna olearia 2012.

## Proposta attività sperimentale Oleosalustem – Campagna Olearia 2012



Durante la campagna olearia 2012 sono state realizzate le prove di messa a punto (F 3.5) sia delle prove “fenoli” che “aromi”, per confermare o meno le condizioni operative scelte. Una volta individuate sono state condotte le prove di validazione (F 3.6).

In occasione delle giornate di prove sperimentali è stato effettuato un monitoraggio completo della linea produttiva olive-olio al fine di ottenere una valutazione quantitativa dei consumi energetici del processo di estrazione, sia nel suo complesso che suddivisa nelle varie fasi del processo stesso (F 3.7).

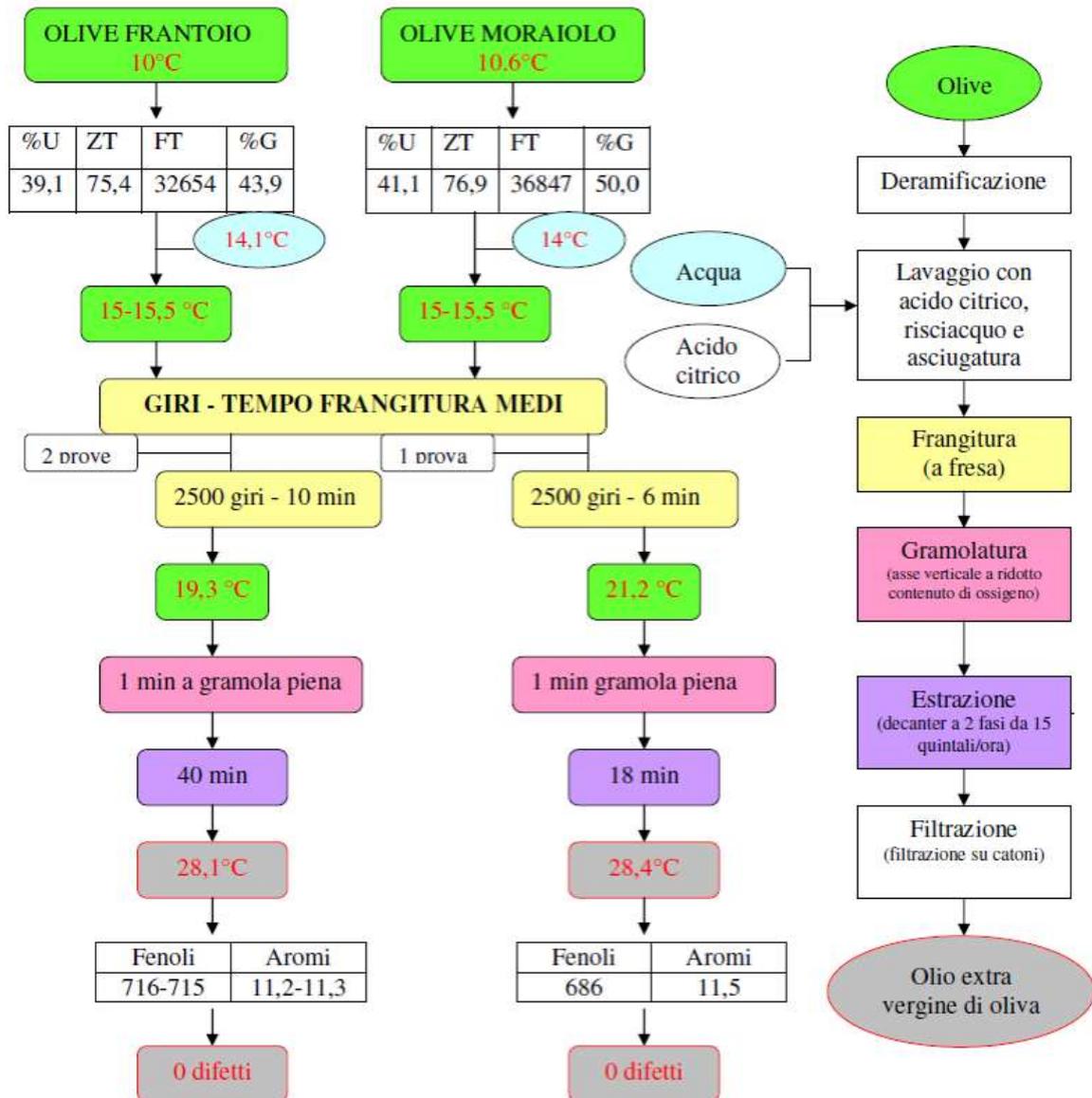
### F 3.5 Messa a punto del prototipo.

#### *1° anno di attività*

Sia per la cultivar Frantoio che per la cultivar Moraiolo sono state lavorate circa 2 quintali di olive per prova: si riporta di seguito il diagramma di flusso utilizzato durante le prove di messa a punto con i relativi parametri misurati durante la prima data in frantoio 16-novembre-2011 e durante la seconda data in frantoio 23-novembre-2011 rispettivamente.

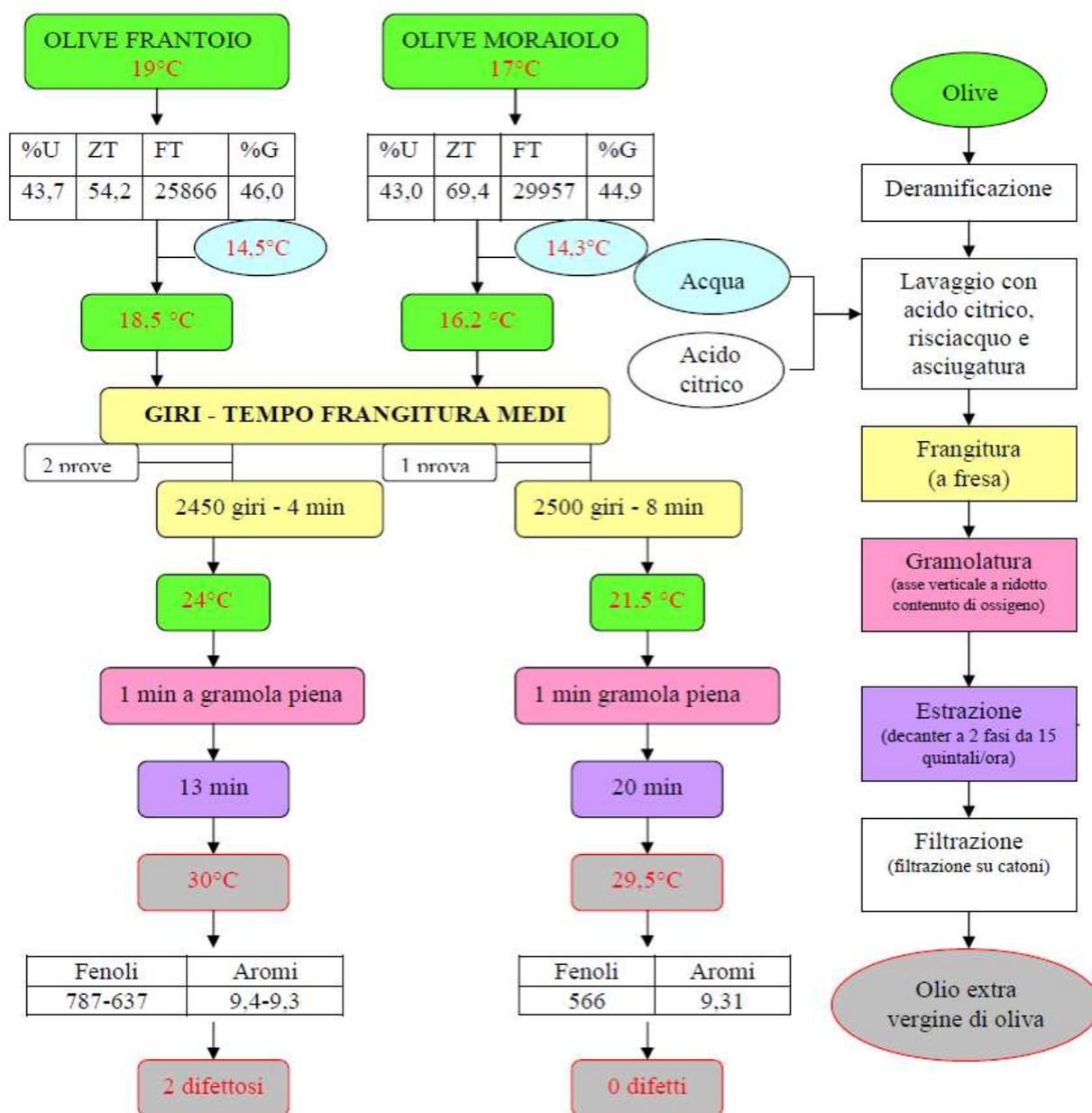
# DATA IN FRANTOIO 16/11/11

## Prove di messa a punto



# DATA IN FRANTOIO 23/11/11

## Prove di messa a punto

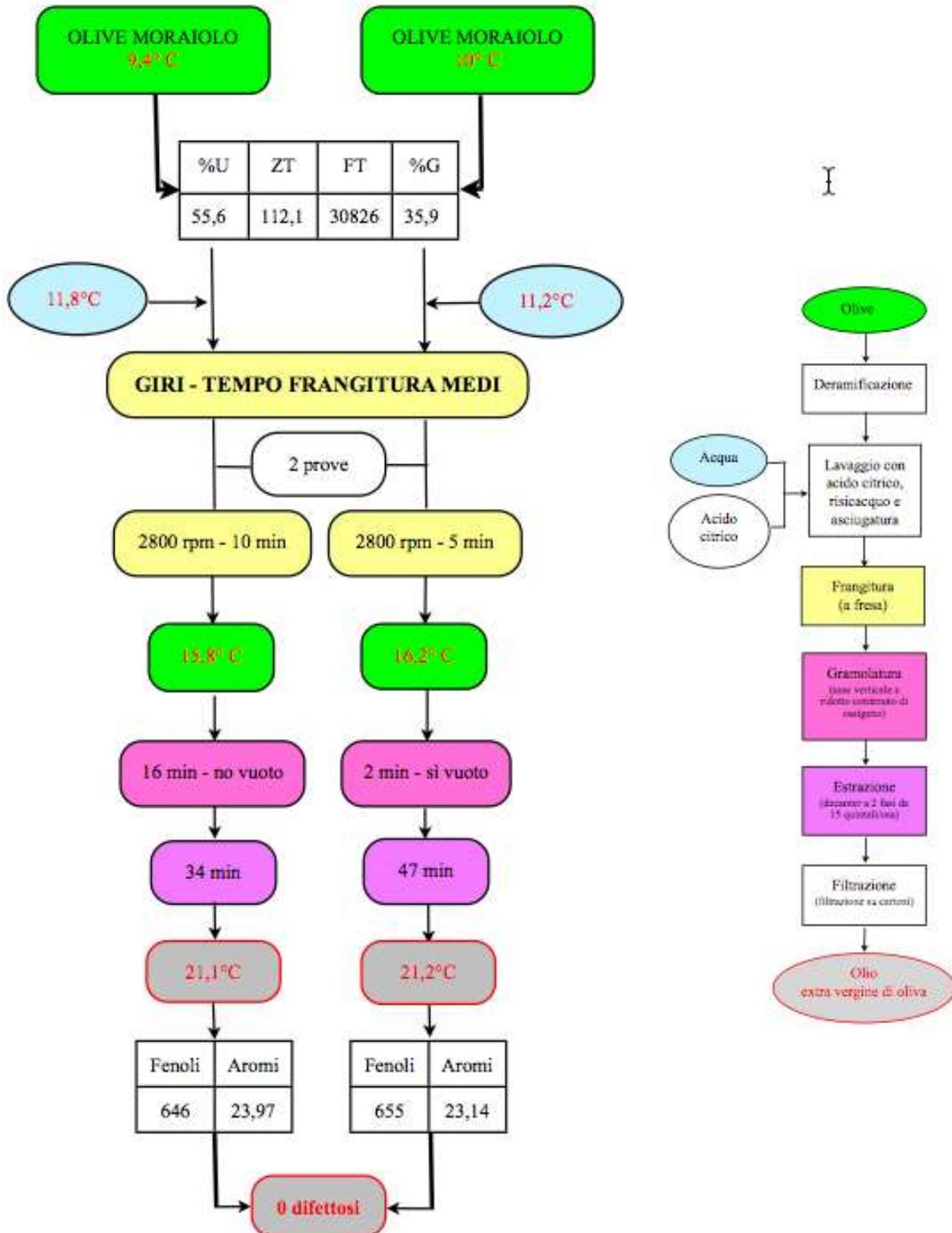


## *2° anno di attività*

Sia per la cultivar Frantoio che per la cultivar Moraiolo sono state lavorate dai 2 ai 10 quintali di olive per prova: si riporta di seguito il diagramma di flusso utilizzato durante le prove di messa a punto con i relativi parametri misurati durante la prima data in frantoio 30-ottobre-2012 e durante la seconda data in frantoio 05-novembre-2012 rispettivamente

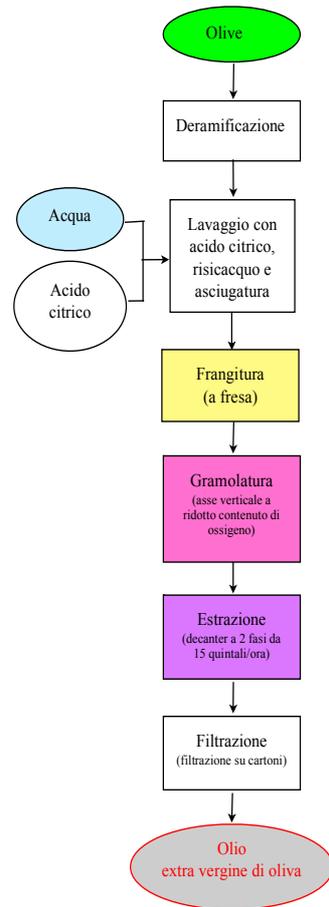
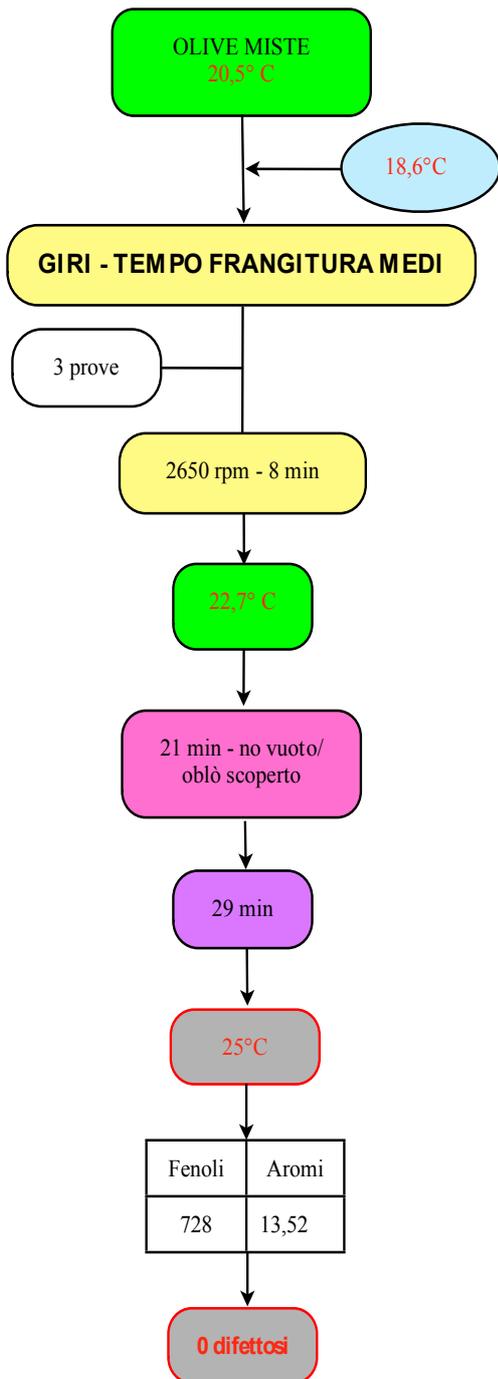
# DATA IN FRANTOIO 30/10/12

## Prove di messa a punto “Aromi” e “Fenoli”



# DATA IN FRANTOIO 05/11/12

## Prove di messa a punto "Aromi"



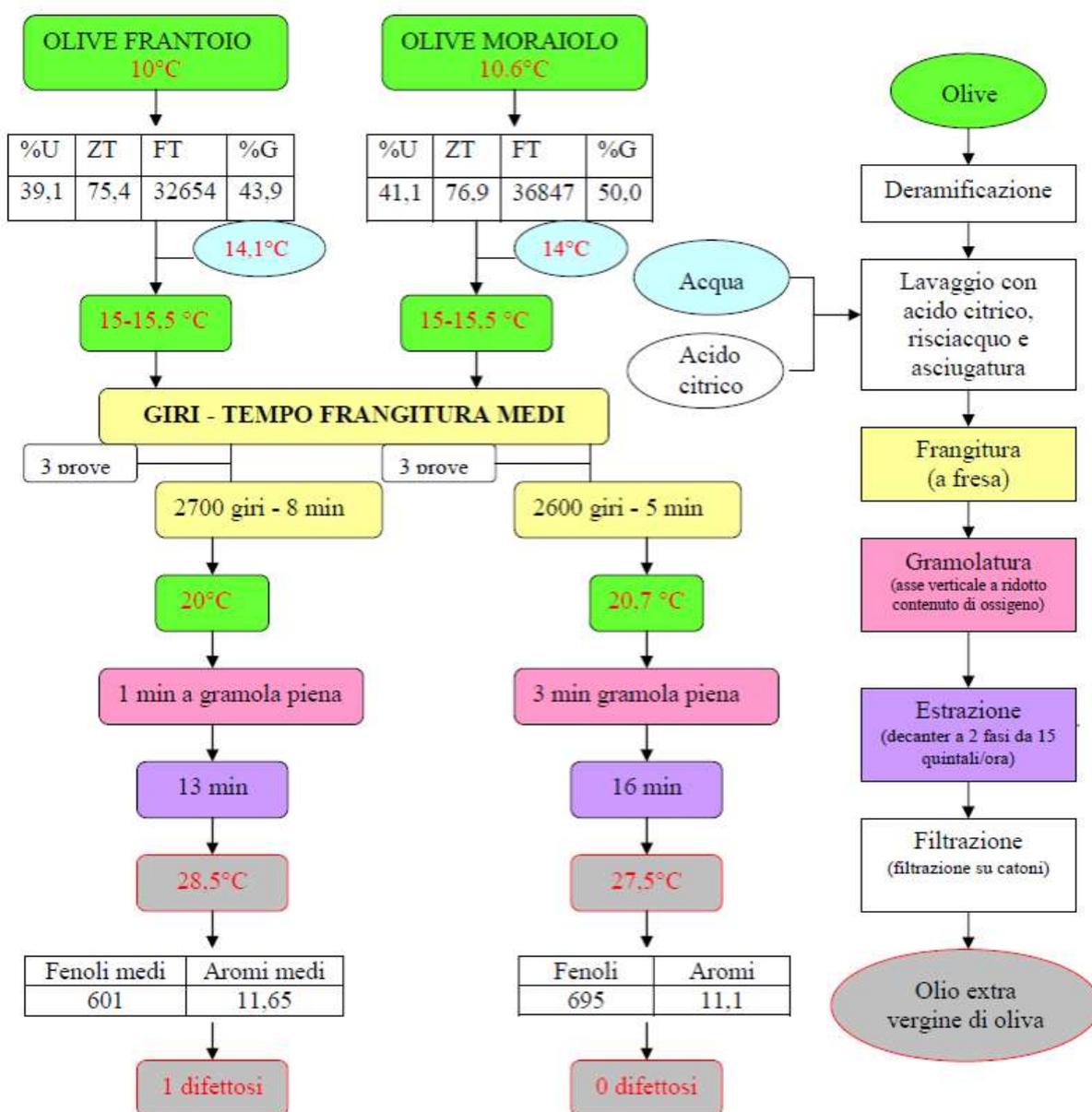
### **F 3.6 Realizzazione delle prove di validazione del prototipo.**

#### *1° anno di attività*

Per ogni data e per ogni cultivar sono state lavorate circa 2,5 quintali di olive: si riporta di seguito il diagramma di flusso utilizzato durante le prove di validazione con i relativi parametri misurati durante la prima data in frantoio 16-novembre-2011 e durante la seconda data in frantoio 23-novembre-2011 rispettivamente.

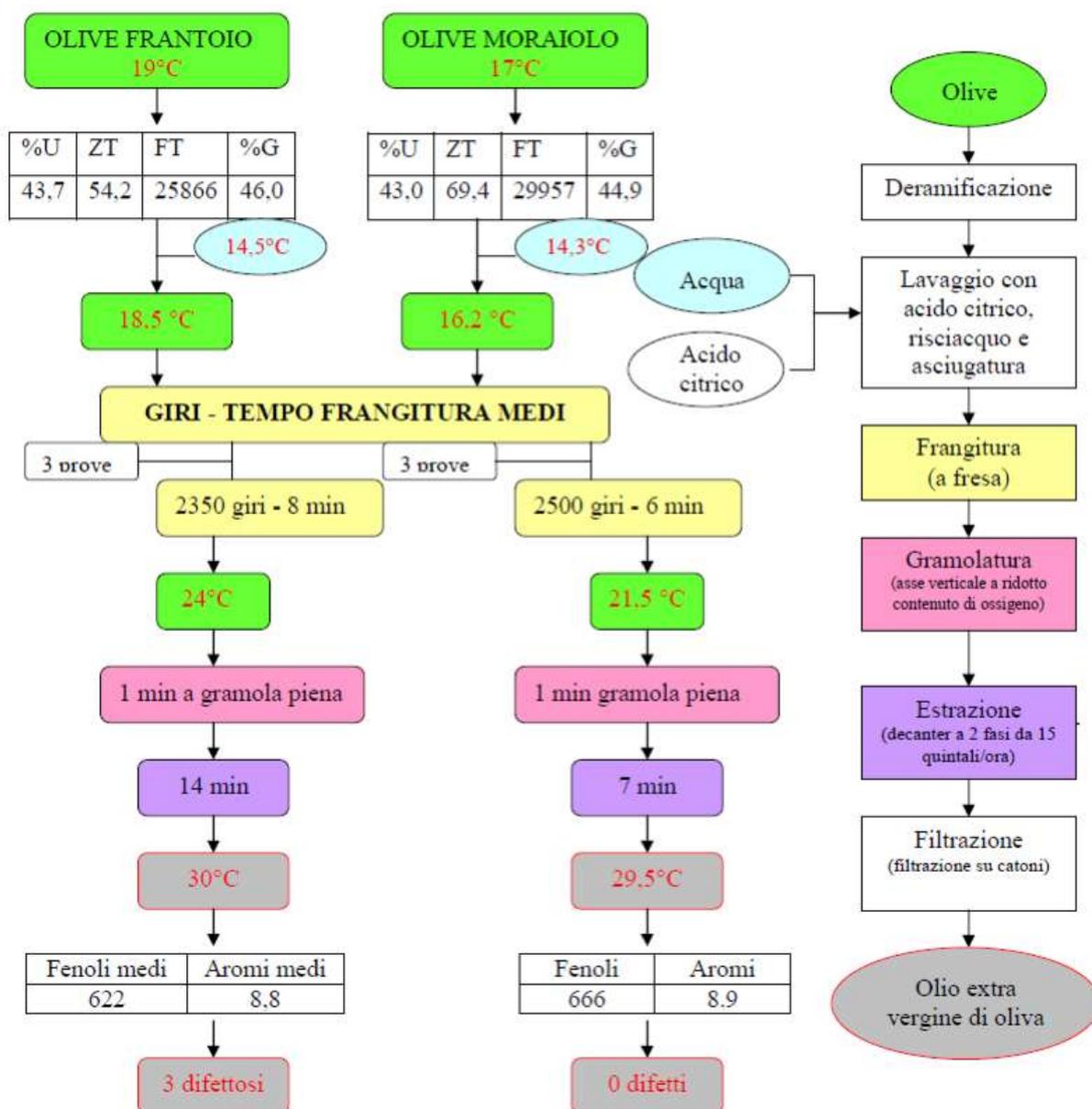
# DATA IN FRANTOIO 16/11/11

## Prove di validazione



# DATA IN FRANTOIO 23/11/11

## Prove di validazione

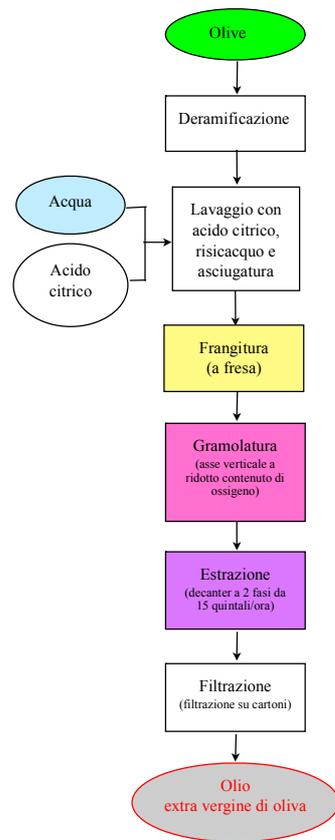
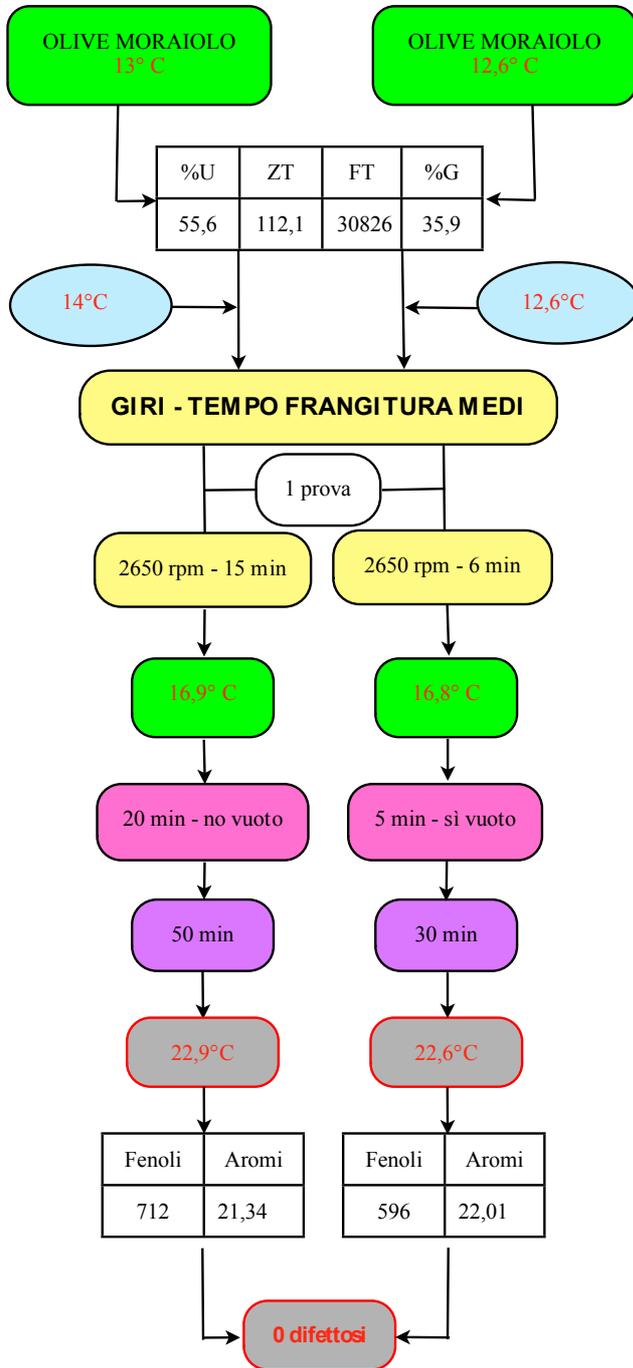


## *2° anno di attività*

Per ogni data e per ogni cultivar sono state lavorate circa 2,5 quintali di olive: si riporta di seguito il diagramma di flusso utilizzato durante le prove di validazione con i relativi parametri misurati durante le date in frantoio 30-ottobre-2012, 05-novembre-2012 e 07-novembre-2012 rispettivamente.

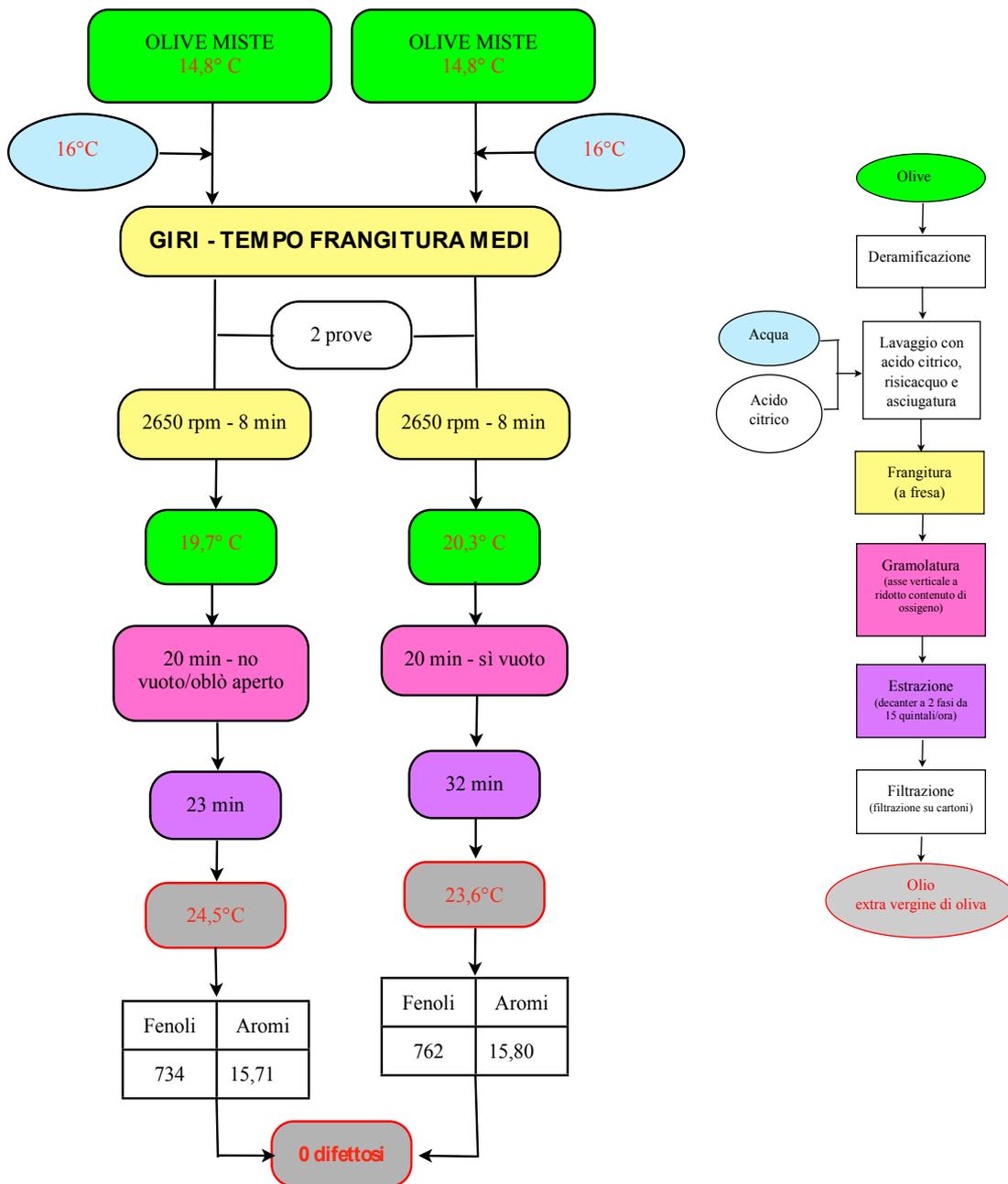
# DATA IN FRANTOIO 30/10/12

## Prove di validazione “Aromi” e “Fenoli”



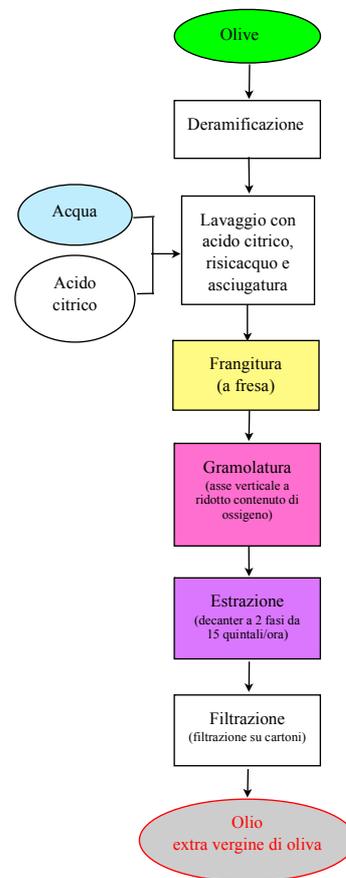
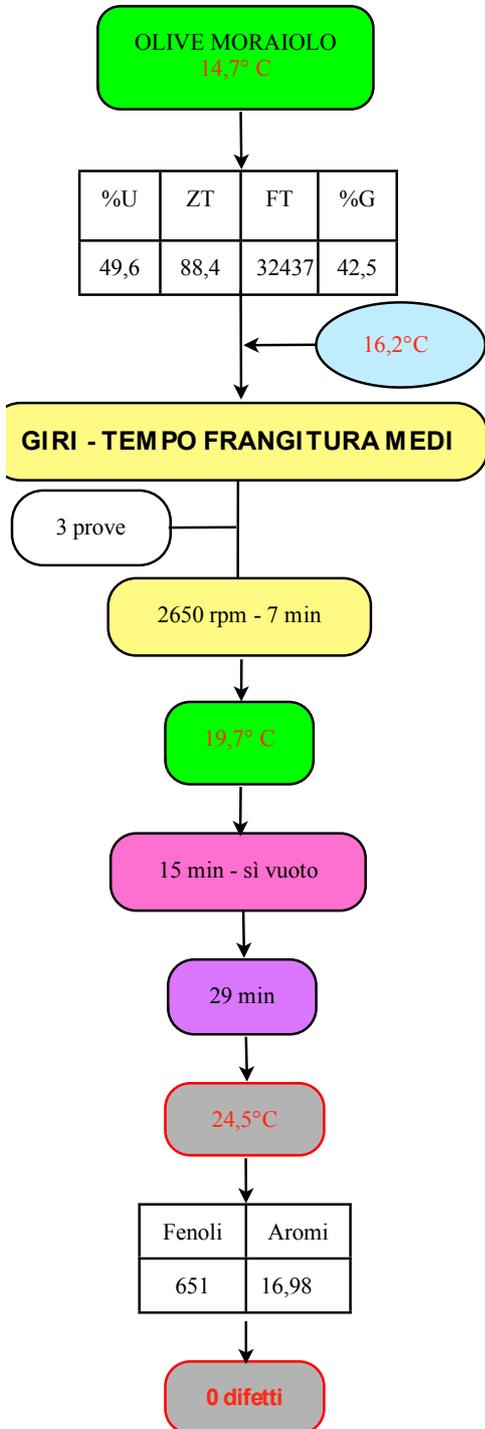
# DATA IN FRANTOIO 05/11/12

## Prove di validazione "Aromi" e "Fenoli"



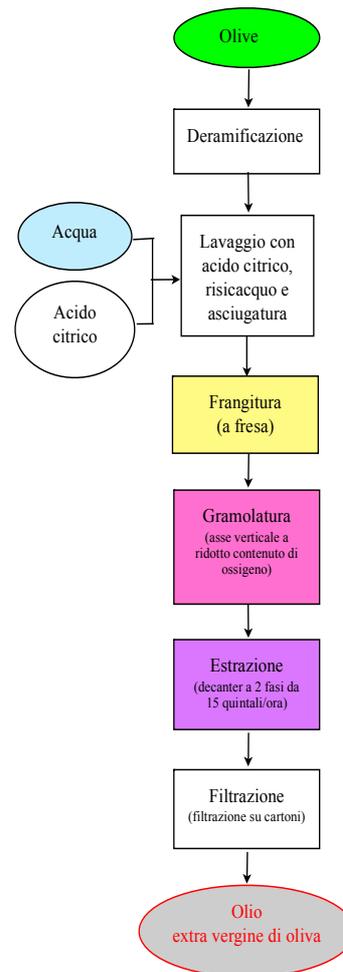
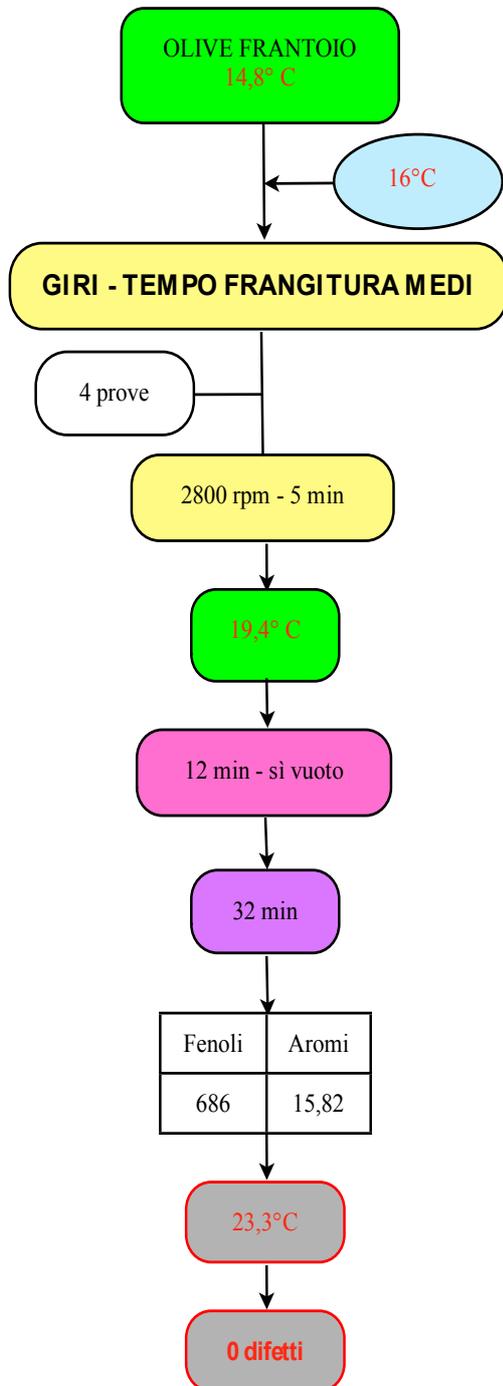
# DATA IN FRANTOIO 07/11/12

## Prove di validazione "Fenoli"



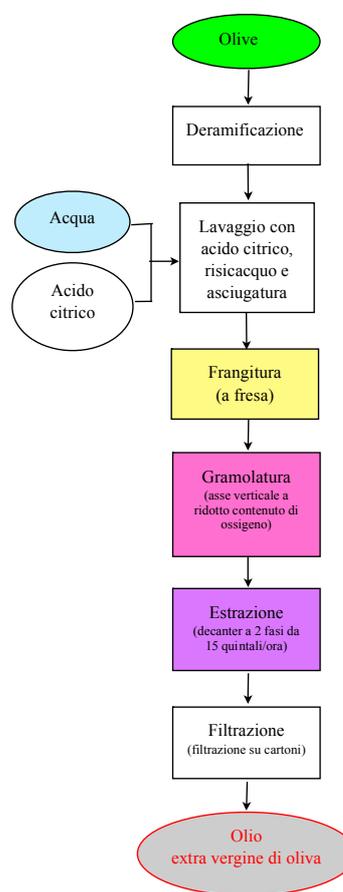
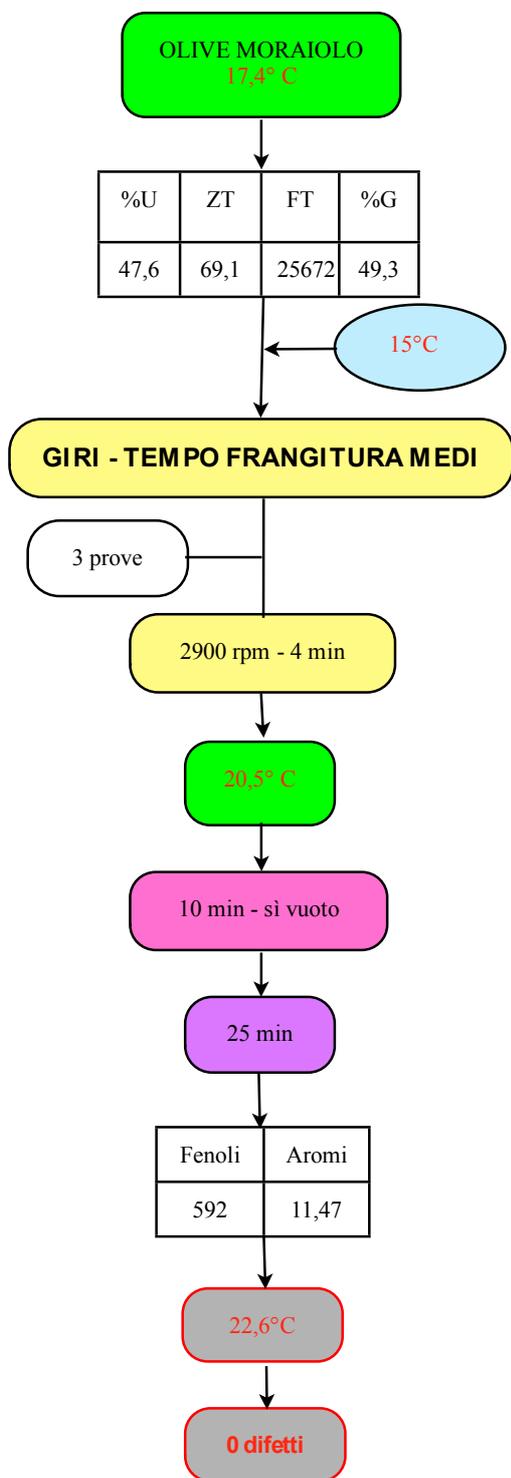
# DATA IN FRANTOIO 16/11/12

## Prove di validazione "Aromi"



# DATA IN FRANTOIO 23/11/12

## Prove di validazione



### F 3.7 Bilancio energetico del prototipo di estrazione

#### 1° anno di attività

In occasione delle due giornate di prove sperimentali svoltesi in data 16/11/2011 e 23/11/2011 è stato effettuato un monitoraggio completo della linea produttiva olive-olio al fine di ottenere una valutazione quantitativa dei consumi energetici del processo di estrazione, sia nel suo complesso, che suddivisa nelle varie fasi del processo stesso. A tale scopo, è stato effettuato il rilievo delle potenze nominali di tutti i motori installati nei vari componenti dell'impianto, a partire dalla vasca di conferimento delle olive, fino allo scarico delle sanse denocciolate. Nella Tab. 1 sono riepilogati tutti i dati relativi ai motori installati nell'impianto, con la loro rispettiva potenza nominale.

<b>LAVAGGIO</b>	<b>N°</b>	<b>kW nominale</b>
Motore tramoggia uscita vasca	1	1,50
Motore nastro trasportatore vasca/lavatrice	2	2 x 1,50
Motore nastro interno alla lavatrice	1	1,00
Motore ventilatore/defogliatore	1	0,37
Motore pompa acqua di lavaggio	1	1,96
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA LAVAGGIO</b>		<b>7,83</b>
<b>FRANGITURA</b>	<b>N°</b>	<b>kW</b>
Motore tramoggia frangitore	1	1,50
Motore carico olive	1	0,37
Motore frangitore	1	22,00
Motore raschiatore	1	0,37
Motore pompa raschiatore	1	0,75
Motore pompa uscita frangitore	1	3,00
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA FRANGITURA</b>		<b>27,99</b>
<b>GRAMOLAZIONE</b>	<b>N°</b>	<b>kW</b>
Motore mandata acqua serbatoio per riscaldamento e lavaggio gramole	4	4 x 0,10
Motore aspo gramola	4	4 x 1,10
Motore pompa scarico pasta	4	4 x 1,50
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA GRAMOLAZIONE</b>		<b>10,80</b>
<b>ESTRAZIONE E FILTRAZIONE</b>	<b>N°</b>	<b>kW</b>
Motore decanter	1	15,00
Motore invio olio uscita decanter al filtro	1	0,56
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA ESTRAZIONE E FILTRAZIONE</b>		<b>15,56</b>
<b>SEPARAZIONE NOCCIOLINO</b>	<b>N°</b>	<b>kW</b>
Motore pompa a vite per alimentazione separatore centrifugo	2	2 x 1,50
Motore separatore centrifugo	1	15,00
Motore coclea scarico nocciolino	1	0,75
Motore tramoggia scarico sansa denocciata	3	3 x 1,50
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA SEPARAZIONE NOCCIOLINO</b>		<b>23,25</b>
<b>POTENZA TOTALE INSTALLATA FRANTOIO</b>		<b>85,43</b>

Tali dati sono stati poi combinati con quelli relativi alla durata temporale delle varie fasi di estrazione, rilevate per tutte le prove effettuate, in modo da realizzare una dettagliata analisi energetica del processo di estrazione.

L'elaborazione è consistita nell'analisi dei parametri di lavorazione (portata della pasta di olive, durata delle varie fasi di lavorazione, potenza dei vari dispositivi) mediati sul numero di commesse, e nell'effettuazione del bilancio energetico. L'obiettivo finale di tale lavoro è stato quello di quantificare il consumo energetico del frantoio nel suo complesso, e i consumi relativi alle varie fasi del processo di estrazione dell'olio (frangitura, gramolazione ed estrazione), sia in termini assoluti che per kg di olive lavorate. I principali risultati, riassunti in Tab. 2, sono qui di seguito presentati.

In media, nelle 19 diverse commesse esaminate, costituite alternativamente da partite di monocultivar frantoio e moraiolo, sono state lavorate circa 200 kg di olive, per una resa media in olio del 15%.

La durata media complessiva dell'estrazione è stata di circa 2800 s, suddivisa fra le varie fasi di lavorazione come indicato in Tab. 2.

In assenza di dati derivanti da misure dirette, le percentuali di potenza effettivamente impiegata per ciascuna operazione sono state assunte pari al 100% del valore nominale. Questa scelta è stata ritenuta la più appropriata, in quanto conservativa.

Nel complesso, il consumo energetico medio del frantoio per la lavorazione di un lotto di 200 kg di olive è stato stimato in circa 59600 kJ (circa 16.6 kWh). Ciò corrisponde ad un consumo unitario di circa 298 kJ per kg di olive lavorate. Esaminando il dettaglio relativo alle varie fasi di lavorazione, è possibile anche osservare che:

1. il maggior consumo energetico del frantoio è associato alla fase di separazione del nocciolino dalla sansa mediante l'uso del separatore centrifugo. Tale consumo ammonta ad oltre il 43% del consumo totale, considerando anche le operazioni ausiliarie legate alla movimentazione della sansa denocciolata;
2. la fase di estrazione vera e propria, in cui si ottiene la separazione dell'olio dalla sansa e dalle acque di vegetazione mediante l'uso del decanter centrifugo, è responsabile per circa il 30% del consumo totale;
3. dopo separatore del nocciolino e decanter, i maggiori contributi al consumo complessivo sono dovuti alle operazioni di lavaggio e frangitura (circa il 25%), essenzialmente per effetto della elevata potenza del al frangitore installato

nell'impianto;

4. la gramolazione incide sul consumo complessivo per una piccola percentuale (2,1%), essenzialmente per la scelta fatta di limitare la durata di tale fase al semplice passaggio in gramola delle paste olearie.

Fasi	Fasi intermedie	Durata [s]	potenza nominale [kW]	% utilizzo potenza	potenza media effettiva [kW]	consumo energetico [kJ]	% consumo complessivo
Frangitura e Lavaggio	Lavaggio	410	7,83	100%	7,83	3210	5,4%
	Frangitore		27,99	100%	27,99	11476	19,2%
Gramolazione	-----	116	10,80	100%	10,80	1256	2,1%
Estrazione e Filtrazione	Decanter	1125	15,00	100%	15,00	16875	28,3%
	Operazioni ausiliarie		0,56	100%	0,56	630	1,1%
Separazione nocciolino	Separatore	1125	15,00	100%	15,00	16875	28,3%
	Operazioni ausiliarie		8,25	100%	8,25	9281	15,6%
<b>Totale</b>	-----	<b>2776</b>	<b>85,43</b>	<b>100%</b>	<b>85,43</b>	<b>59603</b>	<b>100%</b>
Quantità media di olive lavorate per lotto: 200 kg				Consumo energetico unitario medio: 298 kJ/kg			

### 3.8 Attività produttiva con il prototipo per lavorazioni monocultivar.

A causa della scarsità produttiva che ha contraddistinto la campagna olearia 2011 questa fase non è stata realizzata.

## **Fase 4 PROTOTIPO DEL PROCESSO DI UTILIZZO DEI SOTTOPRODOTTI DI LAVORAZIONE**

### *1°anno di attività*

A causa del ritardo dell'approvazione del progetto, durante la campagna olearia 2011 non è stato possibile progettare (F 4.1.1 e F 4.1.2) e realizzare (F 4.2) il processo di utilizzo dei sottoprodotti.

Nonostante ciò, data l'importanza di questa fase di progetto, i partner hanno ritenuto nella campagna olearia in oggetto di iniziare a pianificare le possibili soluzioni impiantistiche da realizzare nella successiva campagna olearia.

Si è pertanto organizzato tra i partner un seminario durante il quale è stato presentato lo stato dell'arte relativo alla problematica del recupero ed riutilizzo dei sottoprodotti della lavorazione e si è discusso sulle possibili soluzioni da adottare nella realtà aziendale toscana.

### *2°anno di attività*

#### **Nocciolino**

La componente solida a più alto valore dal punto di vista energetico è il nocciolino; il posizionamento di un denocciolatore consente, attraverso la centrifugazione, di separare questo solido dal resto della sansa umida.

Il nocciolino in uscita così dalla centrifuga denocciolatrice viene recuperato e, se introdotto nel ciclo produttivo, può integrare, se non addirittura sostituire del tutto, l'approvvigionamento di energia termica tradizionale.

Nel caso dell'Azienda Agricola Buonamici, il nocciolino di sansa vergine è stato interamente utilizzato all'interno del ciclo di produzione aziendale per la produzione di calore sia per l'anno 2011 che per l'anno 2012.

Ad esempio, nella campagna olearia 2012 sono state lavorate circa 60 tonnellate di olive dalle quali sono stati ricavati circa 900 kg di nocciolino, quantitativo che è stato più che sufficiente per la produzione di calore. Tutto ciò è stato possibile utilizzando una caldaia a combustione presente all'interno della struttura.

La fase 4.7 Bilancio energetico dei sottoprodotti di lavorazione riguardante il sottoprodotto “nocciolino” è stata descritta nella fase 3.7.

### **Sanse umide denocciolate**

Le sanse private del nocciolino hanno una concentrazione di acqua compresa tra il 50 ed il 65%, particolarmente ricca di composti fenolici. I composti fenolici sono molecole antiossidanti naturalmente contenute all'interno delle olive; sia la loro via biosintetica che la funzione al servizio della pianta non sono ancora del tutto chiare. Sembra ragionevole pensare che possano essere sintetizzati in risposta a stress quali l'irradiazione solare, le temperature, la carenza idrica o la mancanza di micronutrienti nel terreno e che esplicino un ruolo di protezione a livello cellulare.

Nell'ultimo decennio (Russo et al., 2006) è cresciuto molto l'interesse verso questa classe di composti; studi in vitro, chimici e su cavie suggeriscono che l'attività antiossidante dei composti fenolici contenuti nell'oliva possa non solo esplicarsi a protezione della pianta, ma anche in favore di un organismo vivente animale. Studi epidemiologici (Kang et al., 2011) dimostrano come esista una correlazione inversa tra il consumo nella dieta dei composti fenolici derivati dall'oliva e l'incidenza del cancro al retto, al seno ed alla prostata. Di questa classe di molecole fa parte l'idrossitirosolo che viene indicato come un potente antiossidante in possesso di buona attività antinfiammatoria (Bernini et al., 2013). Purtroppo durante il processo di estrazione dell'olio dalle olive solo una piccolissima parte di composti fenolici presenti nel frutto viene trasferito al prodotto finale, ciò a causa della loro struttura chimica definita idrofila che li porta a migrare principalmente nella frazione acquosa. Nel caso del processo di estrazione a due fasi, ciò fa sì che si abbiano sottoprodotti solidi (sanse umide) estremamente ricchi in molecole antiossidanti, che possono essere opportunamente trattati per il recupero di tali composti con un diverso grado di purezza.

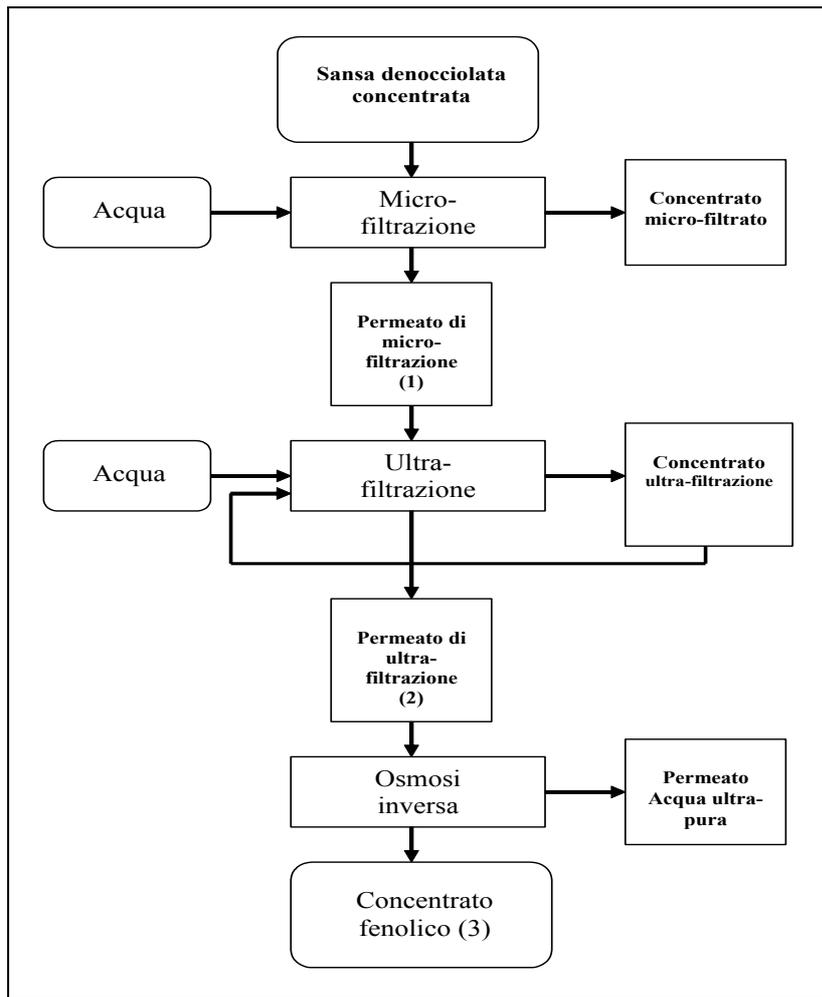
Al fine di approfondire gli aspetti relativi al recupero dei composti fenolici dai sottoprodotti di lavorazione, è stata chiesta la collaborazione di ENEA - Unità UTAGRI (Ente nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile), che ha una decennale esperienza nel settore delle membrane filtranti per il recupero di sostanze di interesse alimentare e nutraceutico da scarti delle principali filiere. È stato così stato possibile ottenere vari concentrati a partire dalle sanse umide denocciolate.

Una partita di olive di cultivar *Moraiolo* prodotte nella campagna olearia 2012 è stata franta con il prototipo di estrazione e la sansa umida in uscita al decanter a due fasi è stata privata del nocciolino mediante denocciolatore.

Le sanse denocciolate sono state stoccate ed inviate ad ENEA dove sono state introdotte in un processo di separazione che permette di ottenere acqua ultrapura e frazioni acquose con un tenore fenolico di differente purezza, definiti concentrati fenolici, a step intermedi del trattamento di purificazione.

Il processo opera in maniera del tutto analoga ad un sistema di filtri, sfruttando le differenze dimensionali dei vari composti presenti nelle acque delle sanse e li separa per mezzo di membrane ceramiche, a porosità decrescente e poste in serie. Da ogni singola operazione si ottengono così un *concentrato* (materia che non attraversa la membrana) ed un *permeato* (materia che attraversa la membrana).

Di norma i processi di filtrazione avvengono in presenza di una fase definita mobile la quale ha il compito di favorire il passaggio dei composti attraverso il filtro. Anche il processo di separazione per il recupero dei composti fenolici necessita di un coadiuvante affine alle molecole fenoliche, che in questo caso è rappresentato dall'acqua. La sansa denocciolata è stata quindi reidratata con acqua deionizzata così da permettere la prima operazione di *microfiltrazione*, la quale ha prodotto un concentrato di microfiltrazione ed un permeato introdotto nel successivo passaggio di ultrafiltrazione.

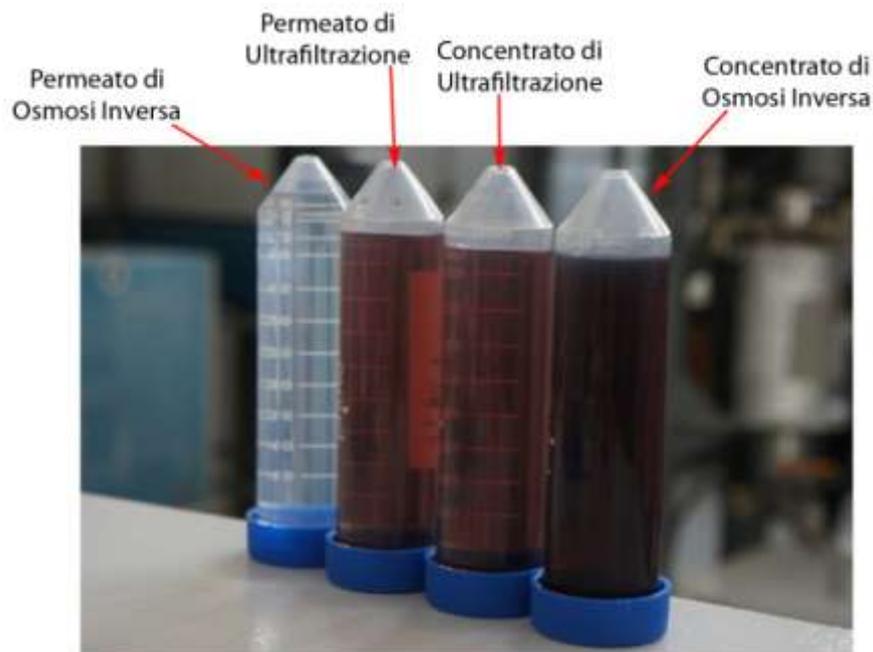


Il concentrato ottenuto è stato nuovamente filtrato (*ultrafiltrazione*) per dare il relativo permeato, poi sottoposto ad uno step di osmosi inversa per la produzione di acqua ultrapura e di un concentrato ricco in composti fenolici.

Il concentrato di microfiltrazione, non essendo stabile a causa del potenziale fermentativo, trova utilizzo, previo abbattimento della componente fenolica, nella produzione di biogas. La microfiltrazione e l'ultrafiltrazione hanno lo scopo di stabilizzare microbiologicamente i permeati che possono essere impiegati sia nell'industria alimentare come additivi sia nelle industrie cosmetiche/farmaceutiche come integratori ed antiossidanti.

L'operazione di osmosi inversa ha l'obiettivo di produrre concentrati ricchissimi in composti fenolici ed acqua ultrapura, entrambi impiegabili come additivi nell'industria alimentare.

Nella seguente Figura sono riportati i differenti prodotti ottenuti con il processo di filtrazione su membrana: la differente colorazione dei liquidi è indice di una quantità differente di carica fenolica in essi contenuta.



Dopo la corretta messa a punto dei metodi analitici sono state eseguite numerose analisi sui campioni collezionati durante lo svolgimento delle attività di recupero.

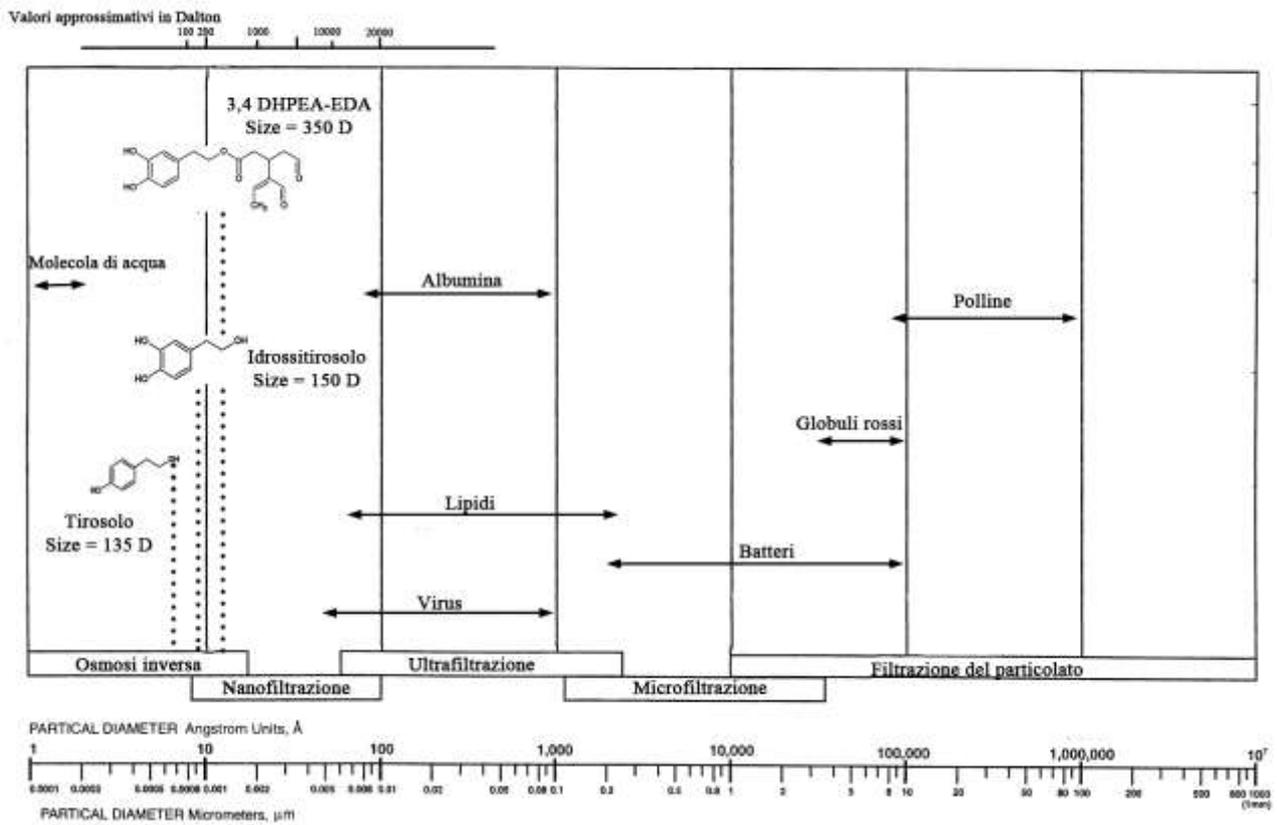
Sui concentrati fenolici sono state eseguite le analisi chimiche per determinare il contenuto dei singoli composti fenolici (Tabella di seguito) e dei più significativi cationi ed anioni, nonché del contenuto zuccherino.

<u>Sanse Olive Moraiolo</u>	Sanse + Acqua	Permeato di Microfiltrazione	Concentrato di Microfiltrazione	Permeato di Ultrafiltrazione	Concentrato di Ultrafiltrazione	Permeato di Osmosi inversa	Concentrato di Osmosi inversa
idrositiosil glucoside	170,3	27,6	71,1	102,0	142,0	0,0	676,4
idrossitiosolo	249,6	104,8	323,7	215,1	298,3	74,4	1288,5
tirosolo	45,9	9,5	42,1	30,5	43,4	15,7	190,4
acido clorogenico	14,3	3,5	10,8	16,6	23,6	4,5	45,0
$\beta$ -OH acteoside 1	146,1	5,3	44,0	32,4	55,2	6,1	192,1
$\beta$ -OH acteoside 2	234,6	16,8	59,3	46,9	74,4	28,4	273,0
rutina	47,6	2,4	45,8	32,6	100,3	7,1	234,2
verbascoside	54,8	4,1	206,4	319,3	479,2	7,1	1811,4
luteolina-7-O-glucoside	19,5	2,8	27,1	11,4	51,3	6,6	103,8
nuzhenide	59,2	14,3	35,7	20,4	85,6	14,1	154,3
idrossitiosil acidodiiidroelenolato	31,7	2,0	22,5	11,8	18,5	5,0	74,6
caffeil secologanoside	0,0	0,0	0,0	13,7	29,8	0,0	103,2
3,4-DHPEA-EDA	427,3	3,3	239,9	666,6	796,3	67,8	3652,9
oleuropeina aglicone	42,7	4,6	37,2	47,7	70,9	6,1	243,7
comselogside	78,5	0,0	42,7	38,0	92,0	0,0	0,0

Osservando la Tabella si nota come i composti fenolici tirosolo e idrossitiosolo siano presenti in elevate concentrazioni soprattutto nel concentrato di osmosi inversa.

Come spiegato in precedenza, il processo di filtrazione esplica la propria selettività nei confronti delle molecole principalmente in base alle loro dimensioni. Le molecole fenoliche sono generalmente più piccole rispetto alla porosità presente sia nei moduli di microfiltrazione che di ultrafiltrazione (figura successiva). Per queste il dato che emerge dalla tabella è il sostanziale comune passaggio di tutte le molecole fino al modulo di osmosi inversa, il quale rappresenta la vera e propria barriera del processo. L'aggiunta di un modulo di nanofiltrazione potrebbe costituire un ulteriore step in grado di generare un prodotto (concentrato di nanofiltrazione) ricco in molecole ad alto peso molecolare.

## PARTICLE SIZE REMOVAL RANGE BY FILTRATION



Dalla Tabella di seguito si evidenzia come i concentrati di ultrafiltrazione e di osmosi inversa siano molto ricchi in potassio e magnesio ed allo stesso tempo iposodici. Il permeato di osmosi inversa è essenzialmente acqua ultrapura.

**Tabella.** Concentrazione di cationi ed anioni in permeati e concentrati.

<i>Campioni</i>	Calcio (mg/l)	Cloruri (mg/l NaCl)	Fosfati (mg/l PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	Magnesio (mg/l)	Nitrato (g/l di N nitrico)	Potassio (g/l)	Sodio (mg/l)
Sanse	90,9	1133	1778	nd	4,67	3,58	17,64
Sanse + Acqua	40,9	510	800	51,5	2,10	1,61	7,94
Permeato di Microfiltrazione	47,2	540	670	47,0	2,06	1,37	17,38
Concentrato di Microfiltrazione	109,2	ND	1350	76,6	3,39	2,10	42,51
Permeato di Ultrafiltrazione	30,5	540	520	39,9	0,88	1,34	9,94
Concentrato di Ultrafiltrazione	73,8	390	1160	92,4	3,88	1,90	13,84
Permeato di Osmosi inversa	0,0	0	0	0,0	0,00	0,00	1,34
Concentrato di Osmosi inversa	186,1	2880	3000	293,7	9,39	7,23	38,78

I risultati delle analisi sulla componente zuccherina sono riportati in Tabella. La concentrazione di mannitolo è quella mediamente più elevata in ogni step di filtrazione. Questo tipo di ripartizione è del tutto paragonabile a quella presente nel frutto dell'olivo.

**Tabella.** Concentrazione zuccherina espressa in g/L in permeati e concentrati.

<b><i>Campioni</i></b>	<b>Fruttosio</b>	<b>Glucosio</b>	<b>Mannitolo</b>	<b>Saccarosio</b>
Sanse	1,31	12,36	16,40	0,10
Sanse + Acqua	0,59	5,56	7,38	0,00
Permeato di Microfiltrazione	0,40	4,09	ND	0,00
Concentrato di Microfiltrazione	0,08	1,28	ND	0,00
Permeato di Ultrafiltrazione	0,27	3,27	ND	0,00
Concentrato di Ultrafiltrazione	0,31	3,06	0,14	0,00
Permeato di Osmosi inversa	0,00	0,17	0,00	0,00
Concentrato di Osmosi inversa	7,90	35,60	41,30	0,51

Dalla collaborazione con ENEA è stato possibile ottenere dalle sanse umide denocciolate prodotti con differente contenuto fenolico, che aprono scenari di vendita potenzialmente molto interessanti e scalabili.

Come spiegato in precedenza i composti fenolici esplicano la loro funzione antiossidante non solo a protezione della pianta, ma, se introdotti al suo interno, anche nei confronti di un organismo animale. Le possibilità di applicazione di queste molecole sono molto ampie:

#### Conservanti naturali

Negli ultimi 50/60 anni le esigenze dei consumatori sono cambiate profondamente. L'innalzamento della qualità della vita, i ritmi giornalieri sempre più serrati e la globalizzazione hanno indotto l'industria di produzione alimentare a muoversi su scenari sempre più fatti da cibi lavorati, precotti o ready to use. Queste tipologie di alimenti sono estremamente sensibili e soggette ad alterazioni dovute all'ossigeno, la luce o le alte temperature. Il produttore ha quindi l'esigenza e l'onere di proteggere i propri prodotti dall'azienda fino alla tavola del consumatore. I metodi di conservazione inoltre devono essere tanto meno invasivi quanto più si vogliono mantenere inalterate le proprietà

sensoriali e nutrizionali dell'alimento. L'utilizzo delle alte o delle basse temperature, garantisce standard di sicurezza e conservabilità molto elevati a discapito però dell'alimento; negli ultimi 10/15 anni hanno quindi visto la luce metodi sempre più "sensibili" nei confronti del prodotto, ma che garantissero uguali o simili livelli stabilità e sicurezza per il consumatore.

L'uso di conservanti è un altro metodo attraverso raggiungere gli stessi o simili obiettivi. In questo caso è però bene precisare che oltre alla funzione per la quale sono aggiunti agli alimenti queste sostanze devono avere natura e concentrazioni ben stabiliti così da non danneggiare l'organismo umano. Conservanti naturali come i composti fenolici derivati dalle sanse e acque di vegetazione posseggono anche una buona capacità antimicrobica (Servili *et al.*, 2011) e potrebbero in futuro incontrare le esigenze dei produttori (elevata shelf-life, bassi costi, possibilità di esclusione dall'etichetta del prodotto) e quelle dei consumatori (sicurezza e inalterazione del prodotto).

#### Additivi naturali antiossidanti per la preparazione di bevande

Le bevande funzionali in senso stretto sono bevande integrate o arricchite o fortificate con speciali nutrienti ("ingredienti attivi"), capaci di favorire alcune funzioni fisiologiche e, più in generale, contribuire in modo specifico a preservare il benessere dei consumatori. L'utilizzo di composti o concentrati fenolici come additivi naturali in quest'ambito è molto delicato in quanto un additivo indicato come funzionale all'organismo umano deve essere accettato come tale a livello normativo ed avere comprovata atossicità per l'organismo umano. In questa direzione sono di conforto recenti studi, i quali dimostrano come i composti fenolici derivati dai reflui dell'estrazione di olio di oliva abbiano buone potenzialità come additivi naturali per la produzione di bevande data dalla loro elevata biodisponibilità (Obied *et al.*, 2008). Inoltre la loro elevata stabilità alle alte temperature ed agli stress ossidativi gli rende ideali nella preparazione di succhi e concentrati (Hanaa Zbakh *et al.*, 2011).

### Preparati antiossidanti per l'industria cosmetica e farmaceutica

Da parte dell'industria cosmetica e farmaceutica c'è sempre più interesse verso tutte quelle molecole di origine naturale in grado di apportare beneficio all'organismo umano. Numerosissime sono le evidenze scientifiche delle proprietà antiossidanti che hanno i composti fenolici presenti nell'oliva e quindi nei reflui di produzione dell'olio:

- idrossitirosolo: attività antiossidante (Zhu et al., 2010), citoprotettiva (Schaffer et al., 2010), antimicrobica ed antivirale (Bisignano et al., 1999);
- oleuropeina: attività antiaterogenica (Manna et al., 2004), cardioprotettiva (Omar et al., 2010) e antipertensiva (Susalit et al., 2011);
- oleuropeina aglicone: attività neuro protettiva (Daccache et al., 2011);
- tirosolo: attività antiossidante (Dejana et al., 2010) e cardioprotettiva (Nakbi et al., 2011);
- verbascoside: attività antiossidante, anti-infiammatoria e fotoprotettiva (Vertuani et al., 2011)

Il processo di estrazione può essere sviluppato in misura del target di prodotto che si vuole ottenere e di conseguenza i concentrati possono essere venduti, sia come semilavorati, che pronti all'uso, alle industrie farmaceutiche, alimentari o chimiche.

Inoltre sul concentrato di osmosi inversa è possibile operare ulteriori tecniche di separazione volte all'ottenimento dei singoli composti fenolici con elevatissimi standard di purezza di cui si riportano i prezzi di vendita (Fonte Sigma Aldrich Maggio 2013):

- Tirosolo titolo 98% 15€/g (in COI di moraiolo 0,7 g/L)
- Idrossitirosolo titolo 98% 5800€/g (in COI di moraiolo 1,3 g/L)
- Verbascoside titolo 99% 10000€/g (in COI di moraiolo 1,8 g/L)

L'acqua che viene ricavata come permeato di osmosi inversa può essere reintrodotta nel ciclo aziendale ad esempio per il lavaggio delle olive in entrata, oppure venduta all'industria.

La sansa di oliva rimanente, oltre all'impiego come ammendante di origine semplice, può diventare una nuova fonte di reddito per le aziende agricole olivicole, se utilizzata per l'alimentazione animale, in alternativa ai foraggi, o miscelata a quest'ultimi, e se utilizzata come combustibile dopo la digestione anaerobica nei bio-gassificatori (M.R. Goncalves et al., 2012).

Ad oggi i costi di gestione e manutenzione degli impianti per il trattamento delle acque di vegetazione, così come la preparazione tecnica del personale per la loro conduzione, possono difficilmente essere sostenuti da un singolo frantoio.

In futuro potrebbe essere auspicabile la creazione di uno o più centri di raccolta in grado di ricevere e processare le sanse e le acque di vegetazione provenienti dai moltissimi piccoli e medi frantoi dispersi su tutto il territorio toscano e che il processo di recupero dei concentrati fenolici venga collegato per la sua gestione/utilizzo ad industrie chimiche, farmaceutiche o alimentari, presenti sul territorio. Questo permetterebbe di allungare ulteriormente la filiera di produzione dell'olio extra vergine di oliva.

## Fase 5 PRODUZIONE DELLE OLIVE

### F 5.1 Caratterizzazione chimica delle drupe

#### *1° anno di attività*

Nel periodo settembre - dicembre 2011 sono state campionate settimanalmente circa 500 g di olive per ciascuna cultivar selezionata, le olive sono state utilizzate per le determinazioni analitiche (F 5.1). La successiva tabella (Tab. 1) riporta le date di campionamento per ciascuna cultivar (Frantoio, Moraiolo e Leccino).

Tabella 1. Date di campionamento delle olive per le determinazioni analitiche.

Data	Cultivar Frantoio	Cultivar Moraiolo	Cultivar Leccino
12/09/11	x	x	x
19/09/11	x	x	x
26/09/11	x	x	x
03/10/11	x	x	x
10/10/11	x	x	x
17/10/11	x	x	x
24/10/11	x	x	x
31/10/11	x	x	x
07/11/11	x	x	x
14/11/11	x	x	x
21/11/11	x	x	x

Su tutti i campioni di olive è stato determinato:

- contenuto di umidità;
- contenuto di olio;
- contenuto di zuccheri;
- contenuto in composti fenolici;
- peso medio e rapporto polpa nocciolo.

Sotto forma di tabella per ciascuna cultivar (Tab. 2-4) sono riportati i valori delle determinazioni analitiche sui campioni di olive di cultivar Frantoio, Moraiolo e Leccino.

Time (giorni)	Date	Contenuto olio (g/kg s.s.)	Contenuto zucchero (g/kg s.s.)	Contenuto fenoli totali (mg/kg s.s.)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
14	12/09/11	382,50	92,60	37421	1,53	10,80	16,30	100,0
21	19/09/11	397,20	79,13	37456	1,59	10,05	15,80	100,0
28	26/09/11	380,50	62,27	33732	1,86	10,70	15,50	100,0
35	03/10/11	369,90	52,82	26557	2,23	11,50	17,10	95,0
42	10/10/11	436,00	56,07	28607	2,09	11,50	16,60	74,0
49	17/10/11	451,40	59,72	27185	2,03	11,10	15,80	50,0
56	24/10/11	544,80	51,18	25965	1,98	12,00	17,20	27,0
63	31/10/11	512,10	41,20	22700	2,31	12,10	18,00	22,0
70	07/11/11	531,60	36,57	22414	2,38	11,10	16,00	14,0
77	14/11/11	502,50	50,10	22669	2,47	12,20	17,60	10,0
84	21/11/11	521,40	59,32	24614	2,27	11,60	18,00	3,0

Time (giorno)	Date	Contenuto olio (g/kg s.s.)	Contenuto zucchero (g/kg s.s.)	Contenuto fenoli totali (mg/kg s.s.)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
14	12/09/11	258,60	122,55	51297	1,46	9,30	13,10	100,0
21	19/09/11	324,30	119,86	55238	1,71	10,10	14,70	100,0
28	26/09/11	313,90	104,58	49636	2,01	10,37	13,90	80,0
35	03/10/11	303,30	84,65	37347	2,41	10,30	13,60	80,0
42	10/10/11	407,20	96,00	36927	2,19	10,70	14,00	66,0
49	17/10/11	414,70	96,92	38171	1,95	10,50	13,80	10,0
56	24/10/11	406,50	99,67	38573	2,52	11,70	16,00	0,0
63	31/10/11	406,55	80,18	29233	2,67	11,20	15,30	0,0
70	07/11/11	413,80	63,14	31224	2,82	11,20	16,00	0,0
77	14/11/11	428,20	70,50	28630	2,38	11,80	17,00	0,0
84	21/11/11	464,20	80,56	29110	2,67	12,10	17,70	0,0

Time (giorni)	Date	Contenuto olio (g/kg s.s.)	Contenuto zucchero (g/kg s.s.)	Contenuto fenoli totali (mg/kg s.s.)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
14	12/09/11	318,10	109,64	43279	1,56	10,20	15,50	93,0
21	19/09/11	326,60	111,24	46653	1,64	10,20	15,50	58,0
28	26/09/11	310,50	87,98	42604	2,04	11,10	15,30	53,0
35	03/10/11	369,10	85,84	35137	2,26	11,50	16,30	30,0
42	10/10/11	373,40	102,62	32991	2,32	11,30	15,60	5,0
49	17/10/11	456,80	99,44	38482	2,26	10,70	14,90	1,0
56	24/10/11	442,45	108,56	35983	2,33	10,60	15,10	0,0
63	31/10/11	398,85	100,80	32158	2,85	11,50	16,30	0,0
70	07/11/11	405,00	77,01	34618	2,84	10,50	15,00	0,0
77	14/11/11	389,10	95,01	33963	2,79	11,40	16,40	0,0
84	21/11/11	401,30	88,68	28069	2,52	11,10	16,50	0,0

## 2° anno di attività

Nella campagna olearia 2012, rispetto alla precedente, sono state campionate olive anche in una primissima fase di maturazione (luglio e agosto 2012). La successiva tabella riporta le date di campionamento di ciascuna cultivar (Frantoio, Moraiolo e Leccino).

Ogni settimana sono state campionate circa 500g di olive per ciascuna cultivar selezionata, le olive sono state utilizzate per le determinazioni analitiche.

Data	Cultivar Frantoio	Cultivar Moraiolo	Cultivar Leccino
16/07/12	x	x	x
06/08/12	x	x	x
27/08/12	x	x	x
03/09/12	x	x	x
10/09/12	x	x	x
17/09/12	x	x	x
24/09/12	x	x	x
01/10/12	x	x	x
08/10/12	x	x	x
15/10/12	x	x	x
22/10/12	x	x	x
29/10/12	x	x	x
05/11/12	x	x	x
12/11/12	x	x	x
19/11/12	x	x	x
26/11/12	x	x	x
3/12/12	x	x	x

Su tutti i campioni di olive è stato determinato:

- contenuto di umidità;
- contenuto di olio;
- contenuto di zuccheri;
- contenuto di composti fenolici;

- peso medio e rapporto polpa/nocciolo.

Sotto forma di tabella per ciascuna cultivar (Tabelle) sono riportati i valori delle determinazioni analitiche sui campioni di olive di cultivar Frantoio, Moraiolo e Leccino.

Time (die)	Date	Umidità %	Contenuto di olio (g/kg sostanza secca)	Resa teorica frantoio (%)	Contenuto di zucchero (g/kg sostanza secca)	Contenuto in fenoli totali (g/kg sostanza secca)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
0	16/07/12	68,4	6,50	0,17	222,53	50697	infinito	7,70	12,40	100,0
21	06/08/12	51,2	105,50	4,38	172,40	57990	1,07	9,40	15,10	100,0
42	27/08/12	43,2	166,40	8,03	136,10	52470	1,10	9,30	14,50	100,0
49	03/09/12	52,1	236,40	9,63	107,25	50168	1,49	10,10	15,40	100,0
56	10/09/12	54,4	302,80	11,74	139,72	47831	1,84	11,10	15,90	100,0
63	17/09/12	47,6	355,20	15,82	93,04	39449	1,91	11,40	17,00	100,0
70	24/09/12	49,5	327,20	14,05	104,45	41675	2,06	10,60	14,80	100,0
77	01/10/12	50,3	402,40	17,00	89,79	32617	2,50	12,40	17,80	100,0
84	08/10/12	50,9	430,70	17,98	80,21	30175	2,82	12,70	18,10	100,0
91	15/10/12	52,1	453,80	18,48	72,72	30113	2,95	12,70	17,20	100,0
98	22/10/12	50,3	451,10	19,06	70,01	26934	3,16	13,8	17,30	100,0
105	29/10/12	51,1	459,30	19,09	79,27	24821	3,63	13,40	18,10	93,0
112	05/11/12	51,3	464,90	19,24	73,53	23426	3,57	13,60	18,60	76,0
119	12/11/12	52,6	469,7	18,92	66,66	22756	3,71	13,1	18,00	99,0
126	19/11/12	52,2	512,9	20,84	75,99	23462	3,51	13,1	18,00	91,0
133	26/11/12	50,3	495,3	20,92	65,41	20004	3,68	12,30	16,60	84,0
140	03/12/12	48,8	486,6	21,18	66,35	18768	3,64	12,80	17,40	93,0

Time (die)	Date	Umidità %	Contenuto di olio (g/kg sostanza secca)	Resa teorica frantoio (%)	Contenuto di zucchero (g/kg sostanza secca)	Contenuto in fenoli totali (mg/kg sostanza secca)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
0	16/07/12	67,30	8,30	0,23	243,87	47504	infinito	8,50	12,10	100,0
21	06/08/12	45,70	71,90	3,32	220,96	61675	1,29	9,60	13,90	100,0
42	27/08/12	44,10	182,90	8,69	117,23	54829	1,43	9,60	13,40	100,0
49	03/09/12	54,00	260,30	10,18	126,92	64051	1,86	10,60	14,60	100,0
56	10/09/12	54,10	279,60	10,91	124,63	50456	2,10	10,80	14,10	100,0
63	17/09/12	53,40	248,50	9,84	121,36	44426	1,96	10,10	14,90	100,0
70	24/09/12	51,30	362,70	15,01	110,90	44972	2,41	11,30	14,70	100,0
77	01/10/12	52,50	435,00	17,56	82,36	36130	2,92	12,10	15,80	100,0
84	08/10/12	53,00	408,80	16,33	95,75	31847	3,42	12,80	16,10	98,0
91	15/10/12	55,20	416,00	15,84	82,78	32095	3,88	12,70	15,80	90,0
98	22/10/12	55,50	433,30	16,39	78,91	28205	4,23	13,30	16,40	60,0
105	29/10/12	53,70	445,40	17,53	76,46	27663	4,70	13,80	17,10	64,0
112	05/11/12	55,30	511,50	19,43	71,59	26977	5,14	13,30	16,50	40,0
119	12/11/12	56,50	490,50	18,14	72,57	27055	4,98	14,60	17,90	34,0
126	19/11/12	54,00	487,30	19,05	83,15	30191	4,69	13,30	16,60	46,0
133	26/11/12	53,10	547,00	21,81	67,97	23930	5,09	14,40	17,50	16,0
140	03/12/12	51,80	493,10	20,20	74,05	25257	4,70	13,70	17,00	9,0

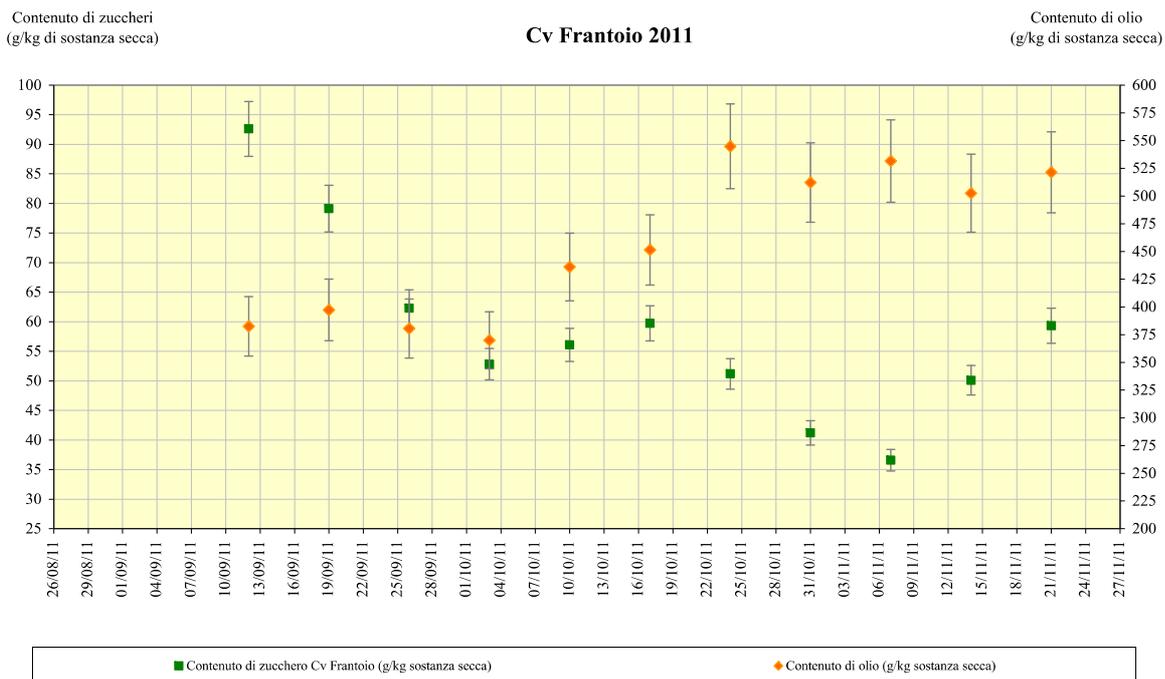
Time (die)	Date	Umidità %	Contenuto di olio (g/kg sostanza secca)	Resa teorica frantoio (%)	Contenuto in zuccheri (g/kg sostanza secca)	Contenuto in fenoli totali (mg/kg sostanza secca)	Rapporto polpa-nocciolo	Larghezza (mm)	Lunghezza (mm)	Olive verdi (%)
0	16/07/12	65,3	6,80	0,20	233,36	51791		7,10	11,50	100,0
21	06/08/12	53,5	62,90	2,49	236,30	66845	1,23	9,10	14,60	100,0
42	27/08/12	48,4	96,70	4,24	198,66	70533	1,21	9,30	14,20	100,0
49	03/09/12	58,2	158,70	5,64	169,26	75703	1,70	9,70	14,30	100,0
56	10/09/12	59,2	205,20	7,12	162,73	56101	1,87	10,30	14,80	100,0
63	17/09/12	52,5	345,30	13,94	141,86	50266	2,26	11,50	14,40	100,0
70	24/09/12	56,6	284,60	10,50	137,07	54564	2,24	11,30	15,90	100,0
77	01/10/12	55,2	356,70	13,58	103,36	49781	2,53	12,00	16,10	98,0
84	08/10/12	56,1	360,70	13,46	109,96	39264	3,00	11,90	16,10	96,0
91	15/10/12	56,4	371,60	13,77	89,97	32047	3,66	13,10	16,40	89,0
98	22/10/12	54,3	352,50	13,69	93,91	30668	3,47	12,60	17,10	57,0
105	29/10/12	55,9	401,60	15,05	98,51	23646	3,68	12,80	17,40	51,0
112	05/11/12	57,0	373,36	13,65	94,20	28404	3,83	12,50	16,30	38,0
119	12/11/12	55,2	372,7	14,19	76,89	25225	3,55	12,30	16,70	40,0
126	19/11/12	51,5	440,6	18,16	96,21	26507	3,39	12,00	16,70	12,0
133	26/11/12	53,7	420,5	16,55	75,05	25781	4,29	13,50	17,80	3,0
140	03/12/12	50,3	431,3	18,22	84,94	24699	3,15	11,70	15,90	0,0

## F 5.2 Realizzazione delle curve di maturazione tecnologica

### 1° anno di attività

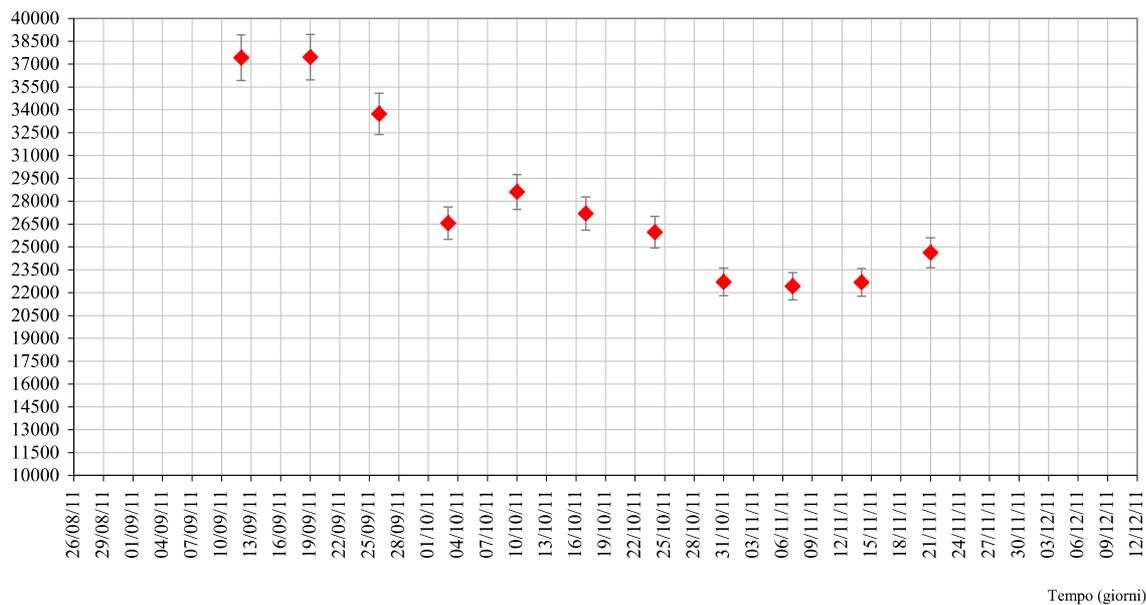
I dati analitici collezionati integrati con i dati ambientali forniti dalla centralina meteorologica posta in prossimità delle olivete selezionate hanno permesso di realizzare le curve di maturazione tecnologica.

Per ogni cultivar si riportano due grafici: uno relativo all'andamento degli zuccheri e dell'olio e l'altro relativo all'andamento del contenuto in composti fenolici (Fig. 1, 2).



Composti fenolici  
(mg/kg di sostanza secca)

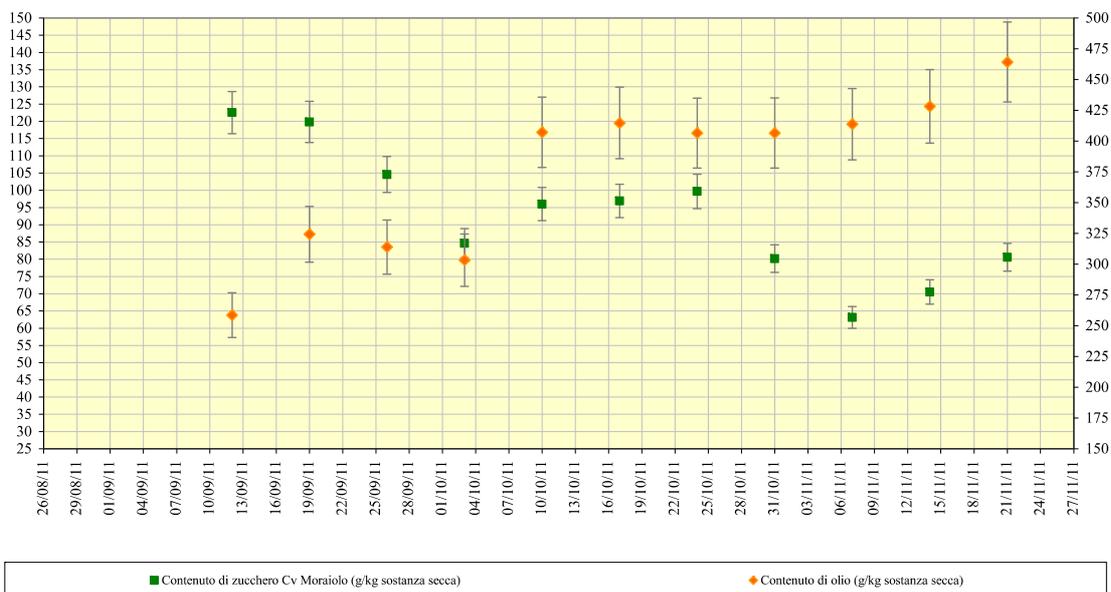
### Cultivar Frantoio



Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

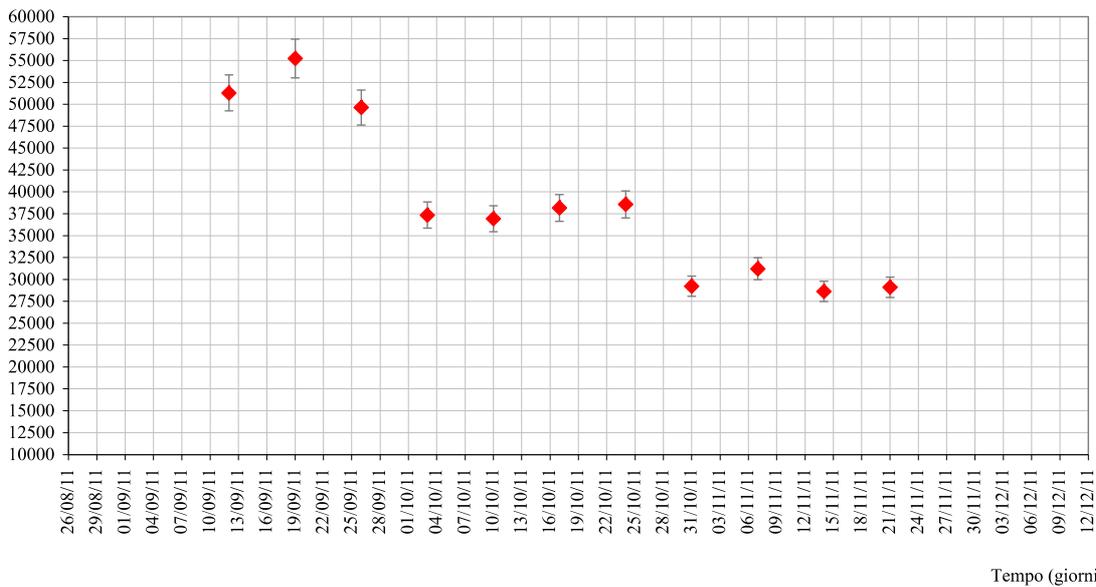
### Cv Moraiolo 2011

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Composti fenolici  
(mg/kg di sostanza secca)

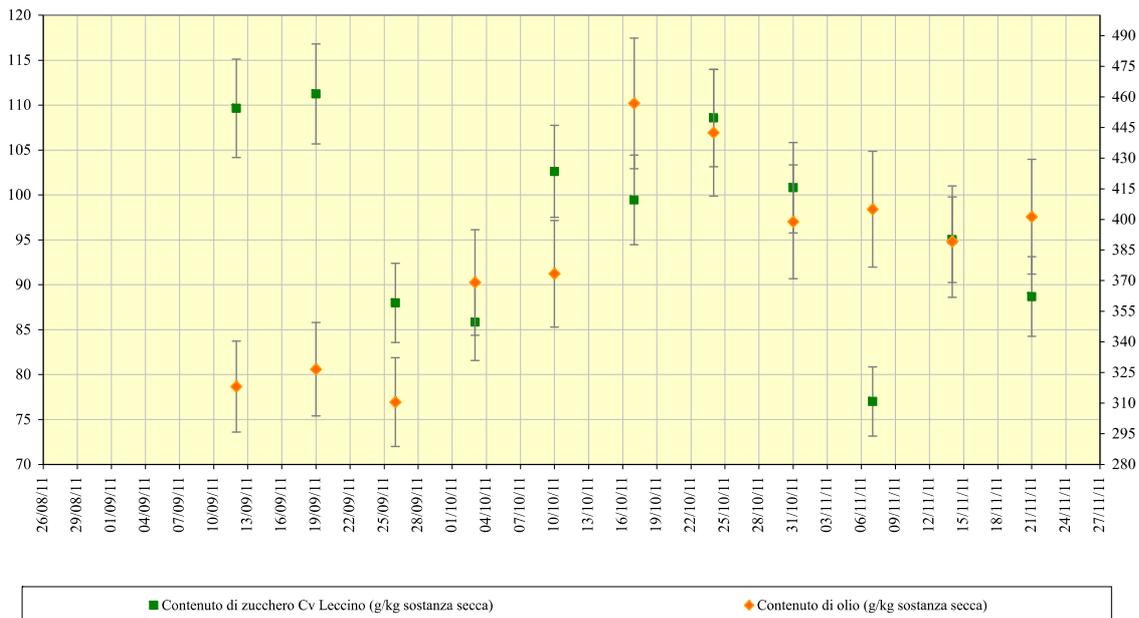
**Cultivar Moraiolo**



Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

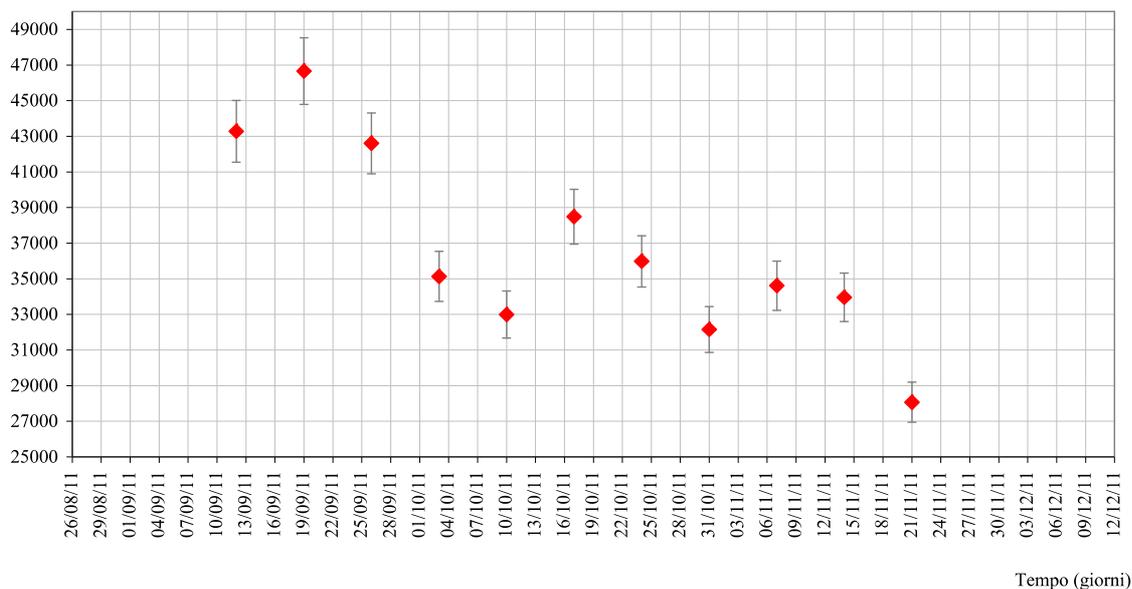
**Cv Leccino 2011**

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Composti fenolici  
(mg/kg di sostanza secca)

### Cultivar Leccino



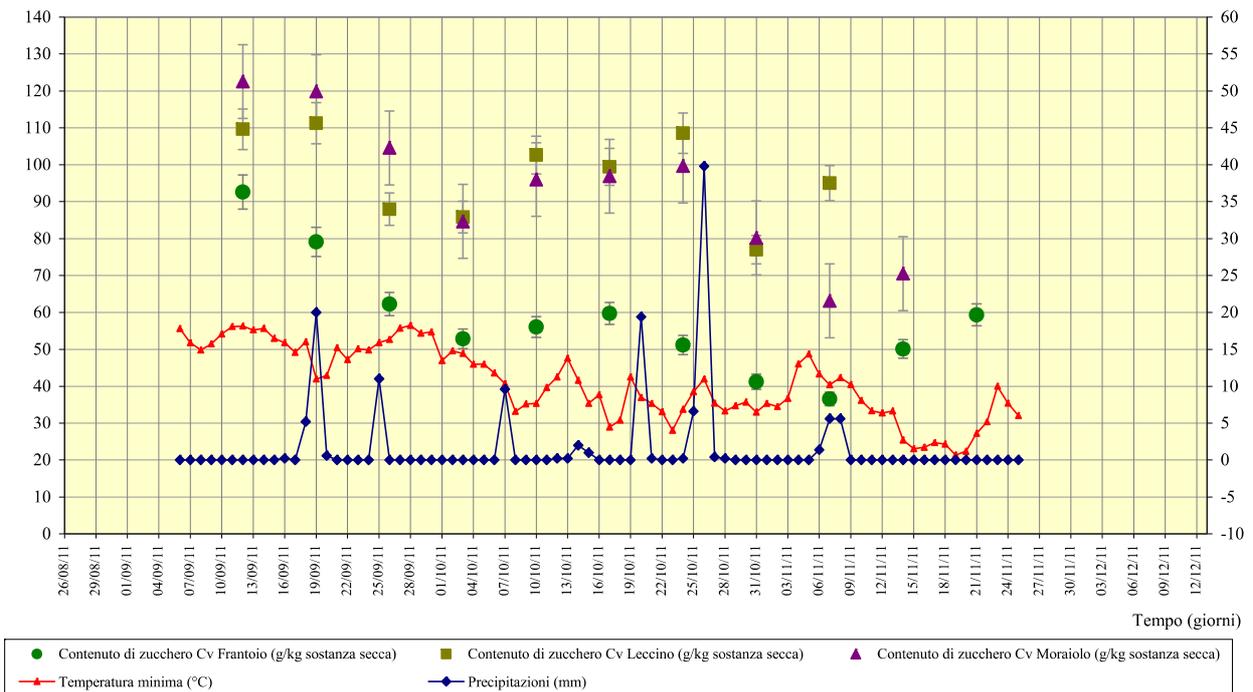
L'andamento nel tempo del contenuto zuccherino delle tre cultivar è stato messo in relazione all'andamento nel tempo delle temperature minime e della piovosità totale giornaliera (Fig. 4).

Nel grafico successivo è indicata la temperatura dei 10°C come temperatura soglia, al di sotto della quale l'olivo entra in riposo vegetativo.

Contenuto di zucchero  
(g/kg sostanza secca)

### Campagna olearia 2011

Temperatura minima  
(°C)  
Piovosità (mm)



Precedenti ricerche hanno permesso di affermare che ad un contenuto minimo di zuccheri corrisponde un valore massimo di olio, tale condizione si realizza sicuramente quando le temperature minime sono stabili al di sotto dei 10°C.

Per la cultivar Frantoio il contenuto minimo di zuccheri (circa 50 g/kg) è stato raggiunto intorno all'ultima settimana di ottobre.

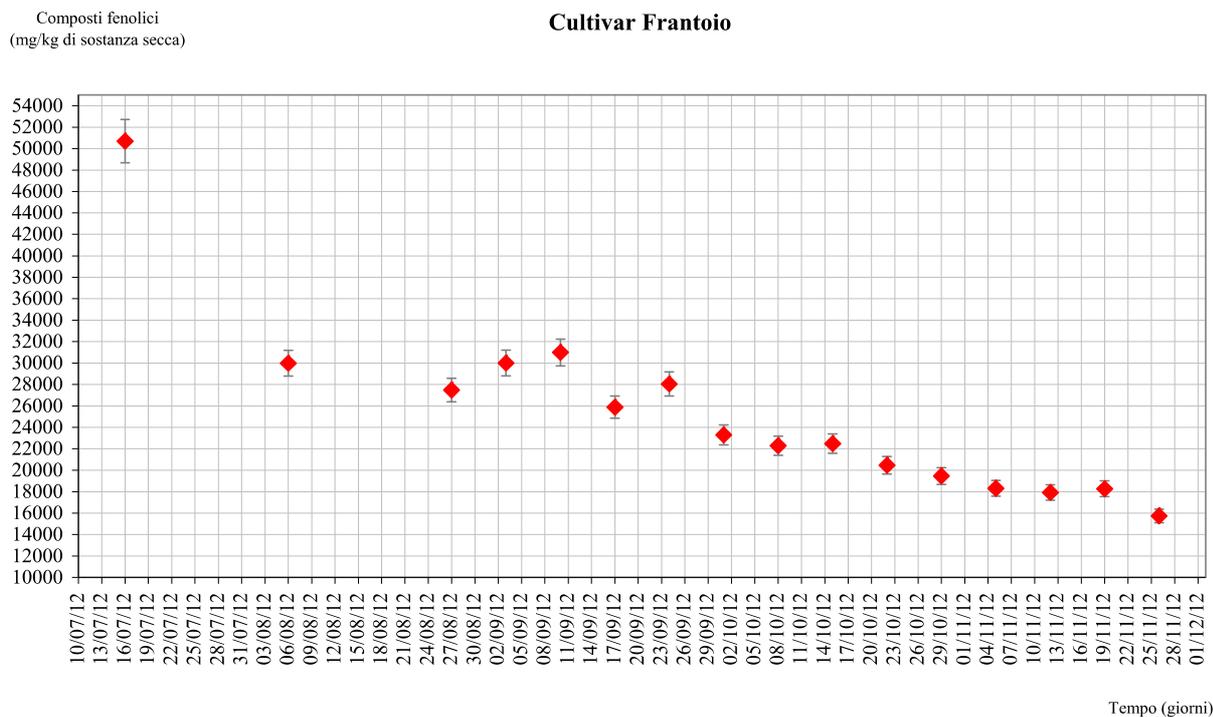
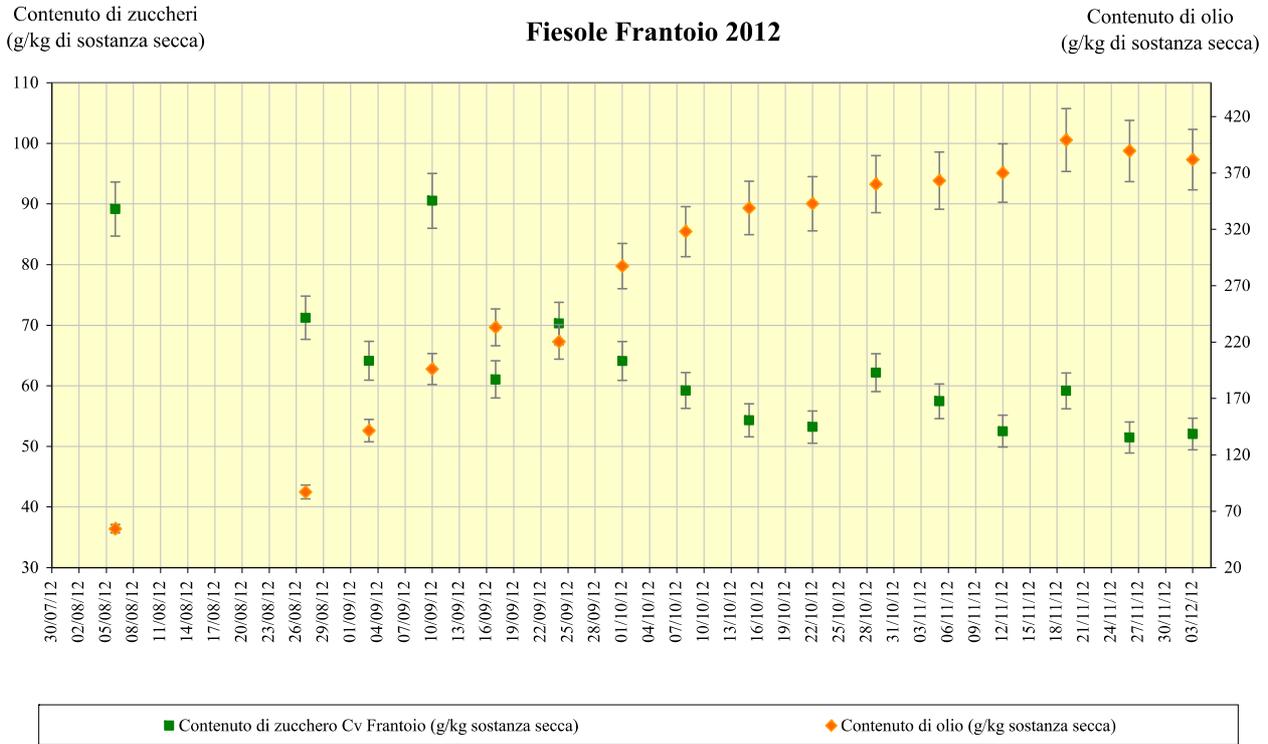
Per la cultivar Moraiolo e Leccino il contenuto minimo di zuccheri (rispettivamente circa 70 g/kg e circa 80 g/kg) è stato raggiunto intorno alla prima settimana di novembre 2011.

Il contenuto di composti fenolici ha un caratteristico andamento decrescente durante il periodo di maturazione per tutte e tre le cultivar. Le olive di cultivar moraiolo risultano essere quelle con il maggior contenuto fenolico, seguite dalle olive di cultivar Leccino. Le olive di cultivar Frantoio risultano avere un contenuto fenolico inferiore rispetto alle altre.

Come si osserva dai grafici precedenti il contenuto minimo di zuccheri è stato raggiunto tra l'ultima settimana di ottobre e la prima di novembre 2011 momento nel quale anche le temperature minime hanno raggiungono la soglia dei 10°C. Da una prima analisi dei dati tale periodo coincide con il momento di maturazione tecnologica delle olive da olio.

## 2° anno di attività

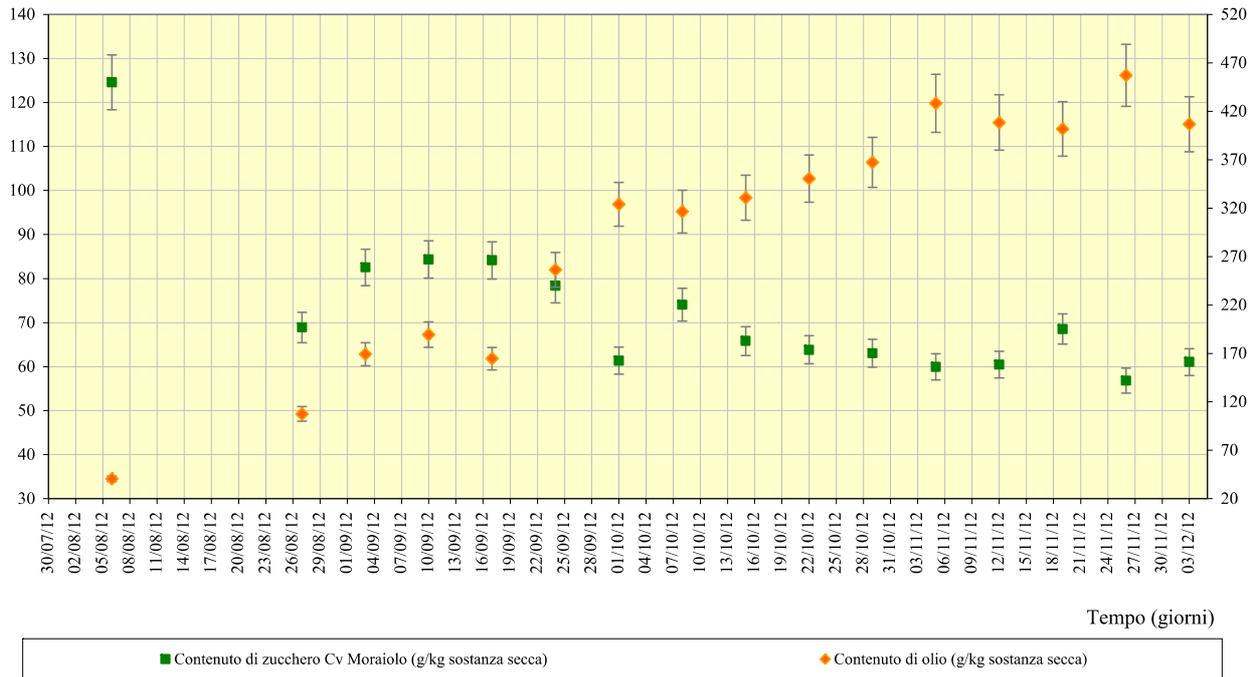
Per le olive collezionate si riportano, per ogni cultivar, due grafici: uno relativo all'andamento degli zuccheri e dell'olio e l'altro relativo all'andamento del contenuto in composti fenolici (Figure 6-8).



Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

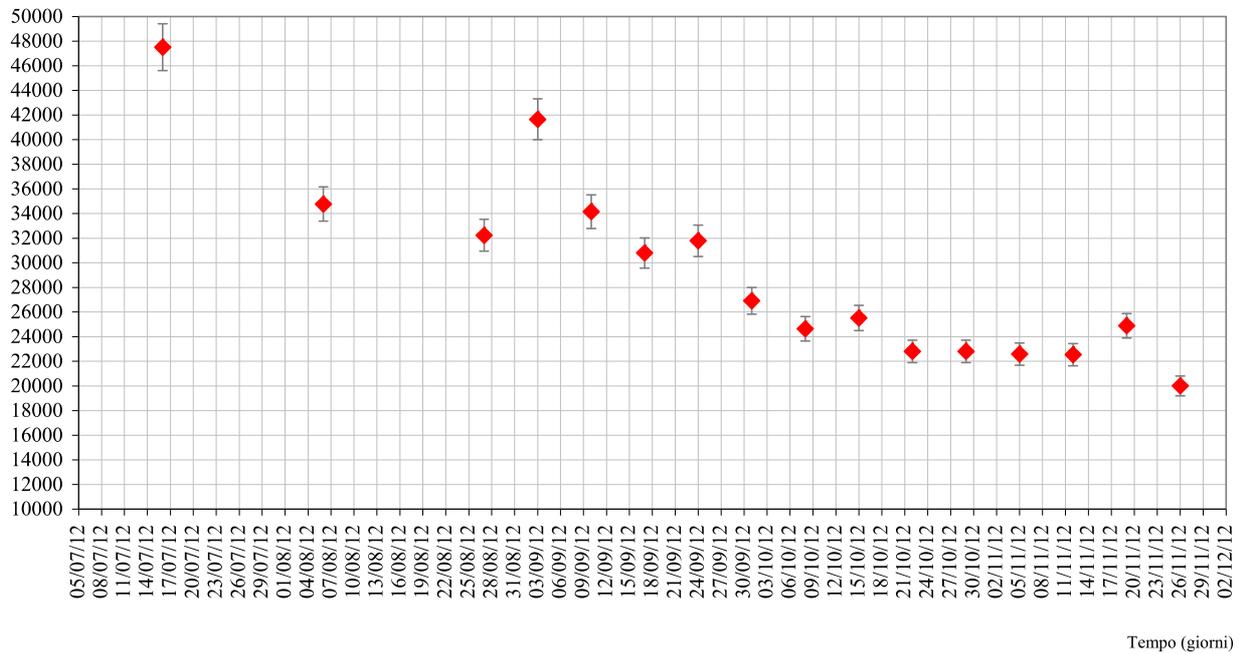
### Fiesole Moraiolo 2012

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Composti fenolici  
(mg/kg di sostanza secca)

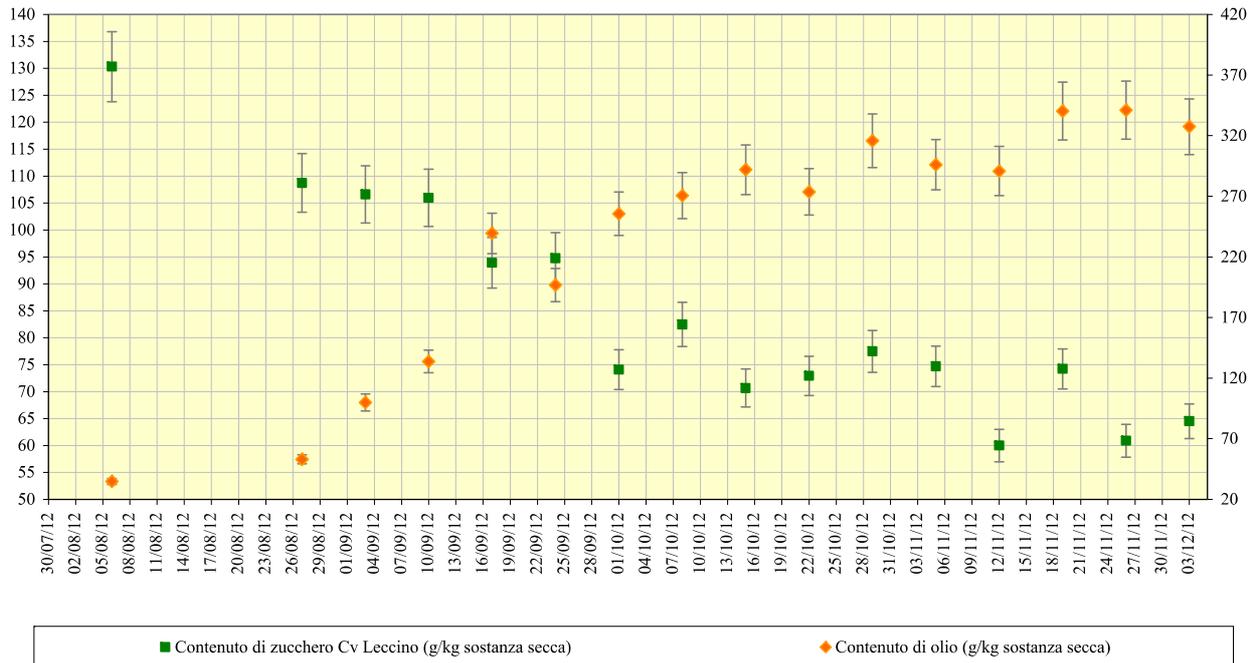
### Cultivar Moraiolo



Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

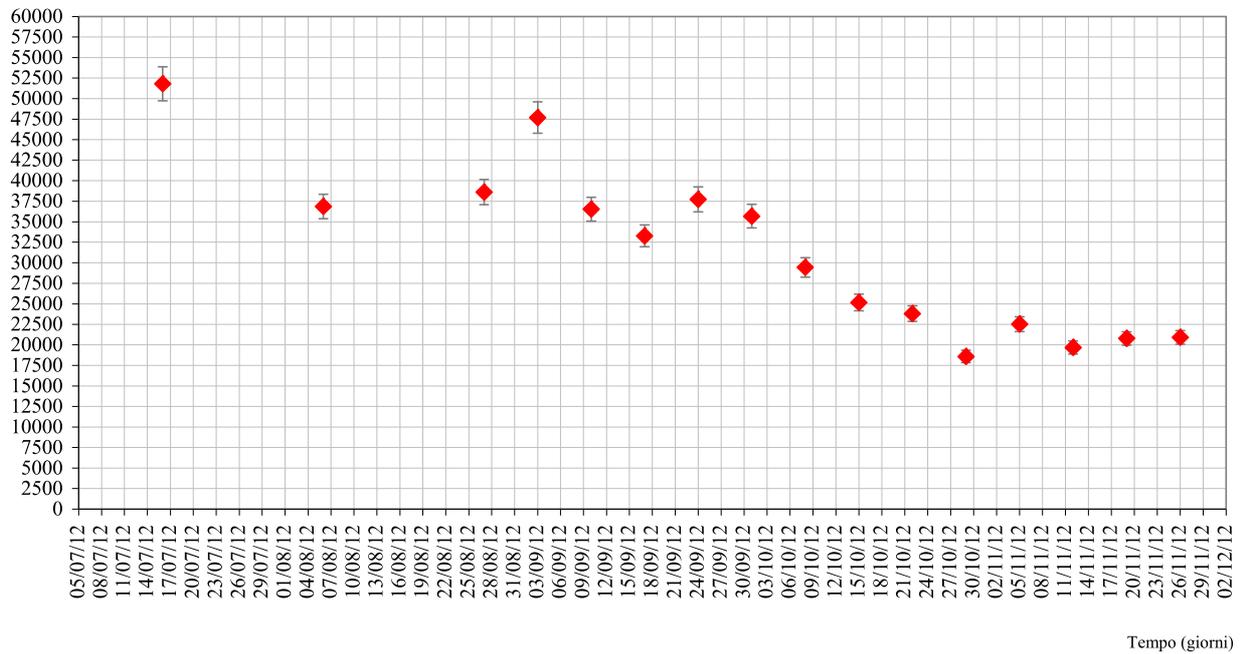
### Fiesole Leccino 2012

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Composti fenolici  
(mg/kg di sostanza secca)

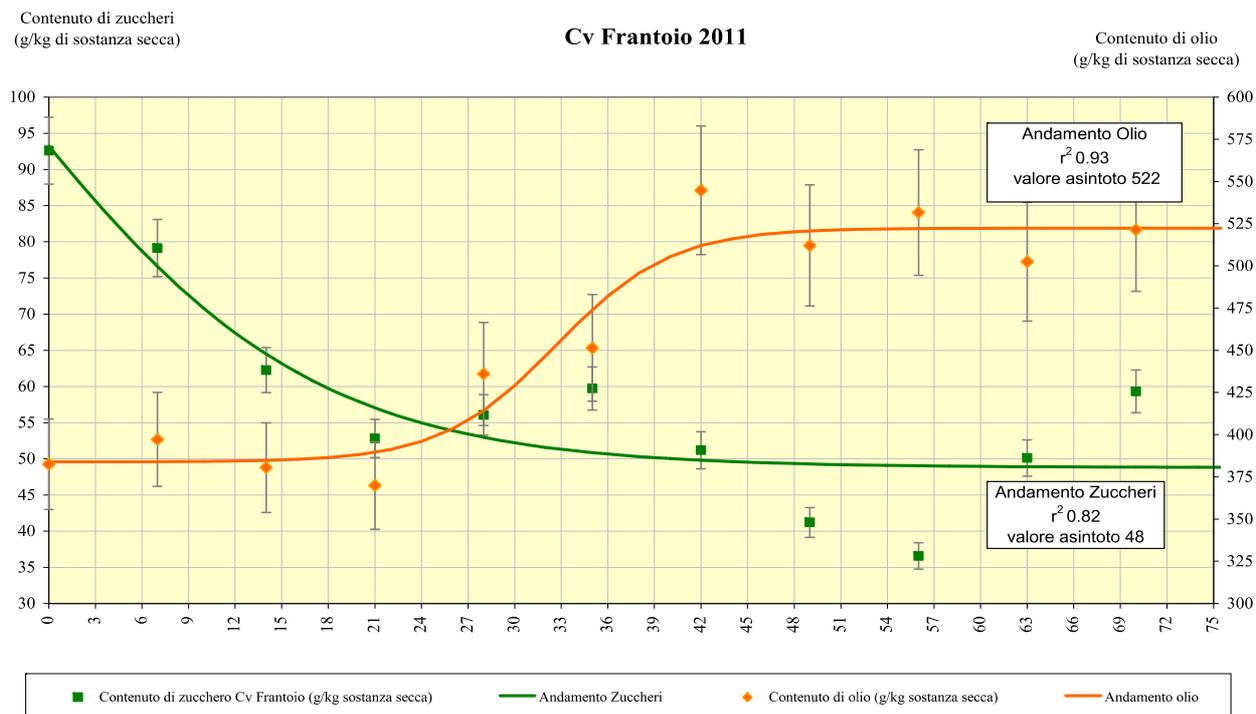
### Cultivar Leccino



## F 5.3 Definizione dell'indice di maturazione tecnologica

### 1° anno attività

I dati delle olive precedentemente riportati sono stati analizzati al fine di ottenere, per le cultivar utilizzate durante la nostra sperimentazione, un indice di maturazione tecnologica. Si riportano di seguito gli andamenti degli zuccheri e dell'olio per quanto riguarda la cultivar Frantoio con i relativi indici di correlazione e con i valori di asintoti.



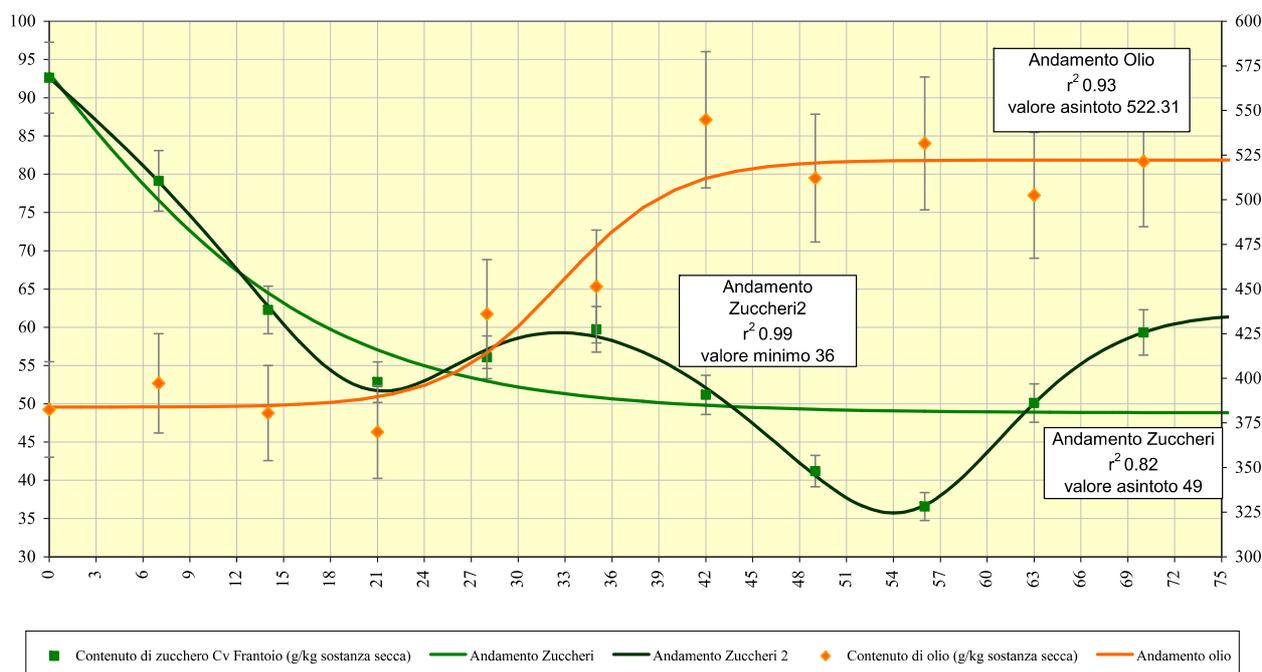
Dall'analisi, anche prettamente visiva, si osserva che l'andamento degli zuccheri non è del tutto ottimale non rappresentando al massimo il reale andamento dei punti sperimentali ottenuti.

A tal proposito è parso opportuno trovare un andamento che meglio rappresentasse i punti: di seguito se ne riporta il grafico. Da un'analisi prettamente visiva e dall'elevato indice di correlazione si può notare che questo secondo andamento è più rappresentativo rispetto al precedente.

Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

### Cv Frantoio 2011

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)

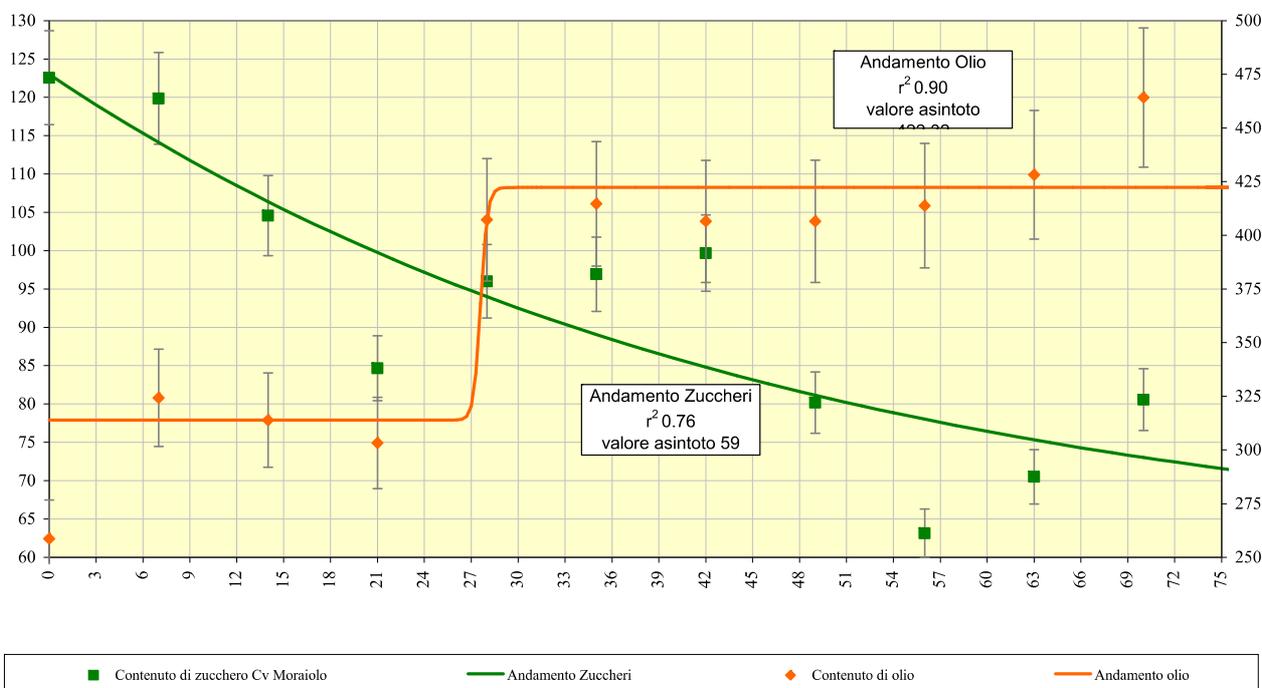


Le medesime considerazioni possono essere effettuate anche per la cultivar Moraiolo: si riportano di seguito i grafici con gli andamenti del contenuto in olio e zuccheri.

Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

### Cv Moraiolo 2011

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)

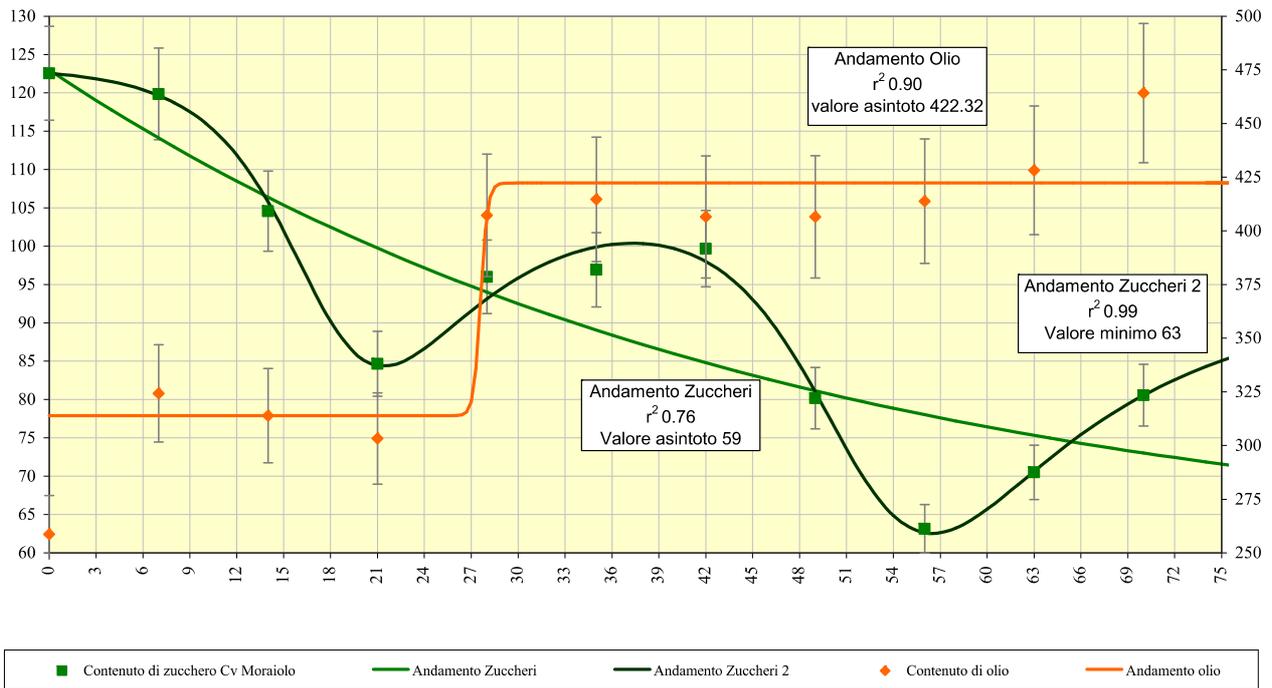


Anche per la Cultivar Moraiolo si può notare che il classico andamento degli zuccheri non rappresenta del tutto il reale andamento dei punti sperimentali ottenuti; per tale ragione si riporta di seguito il grafico con un secondo andamento.

Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

### Cv Moraiolo 2011

Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



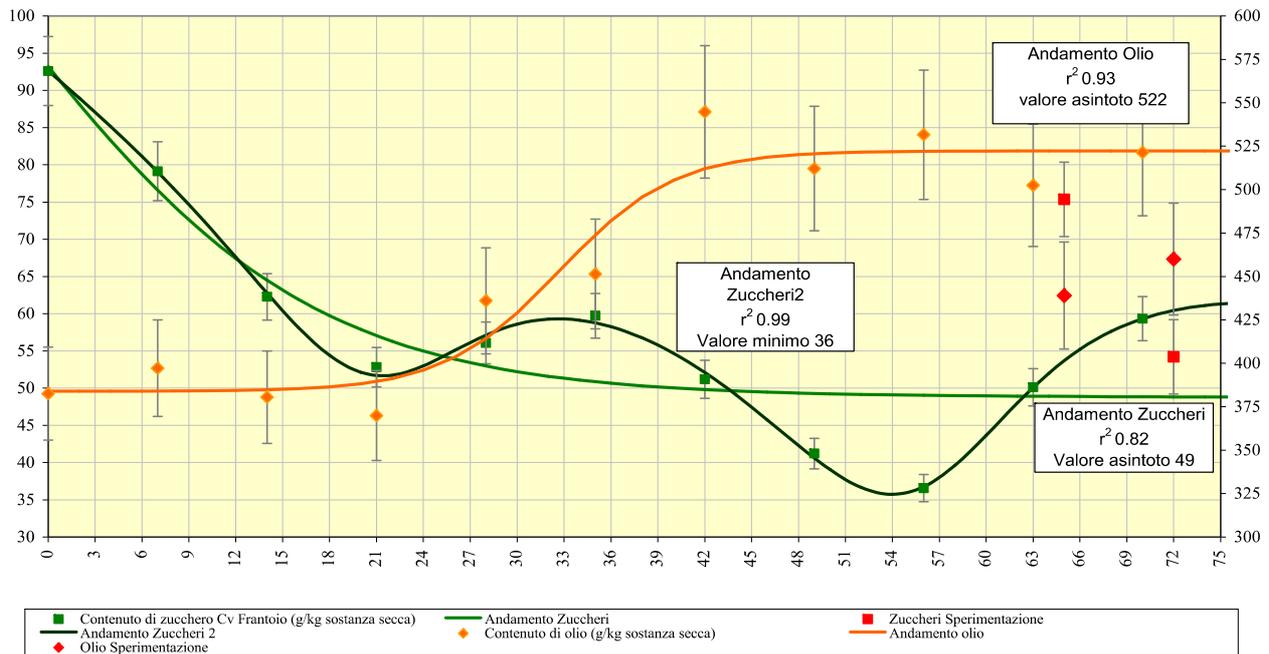
Da un'analisi prettamente visiva e dall'elevato indice di correlazione si può notare che, anche per la cultivar Moraiolo, questo secondo andamento è più rappresentativo dei punti sperimentali ottenuti.

Anche se si riferisce alla fase successiva (F 6.1.1 Caratterizzazione chimica delle olive destinate alla trasformazione) è parso opportuno riportare graficamente in tale sezione i valori dei contenuti chimici delle olive utilizzate durante la nostra sperimentazione per la cultivar Frantoio e Moraiolo rispettivamente, che verranno riprese al momento opportuno.

Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

### Cv Frantoio 2011

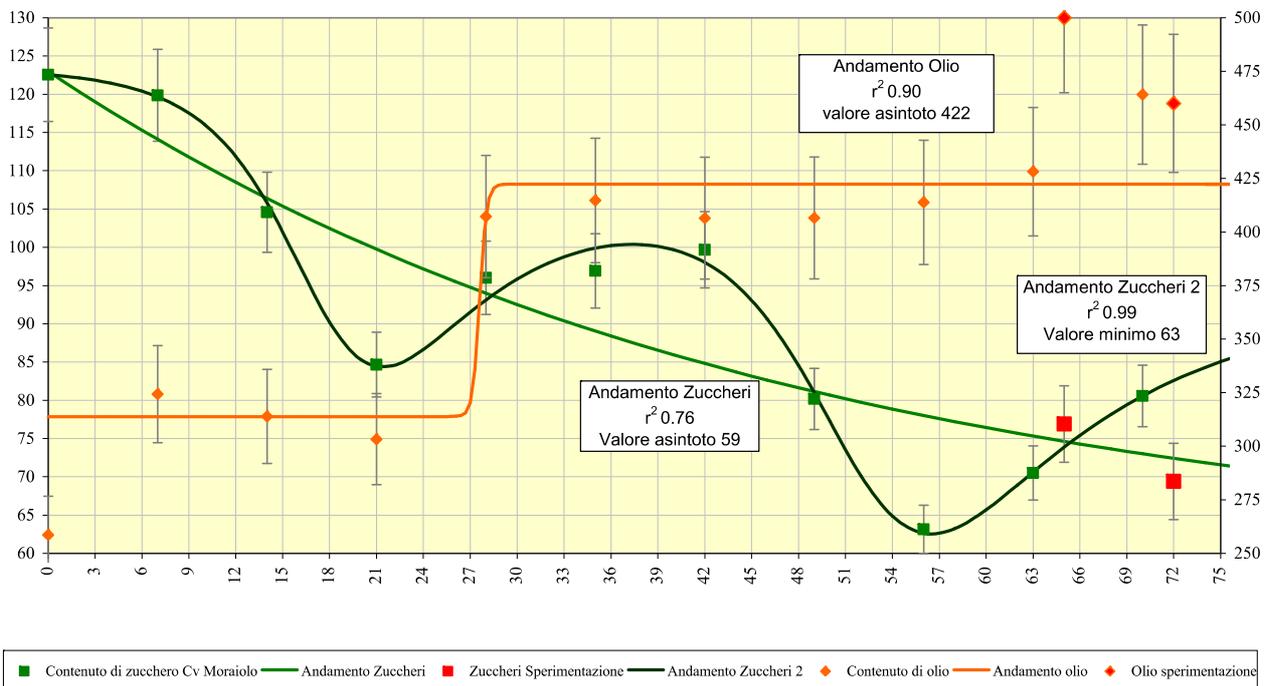
Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Contenuto di zuccheri  
(g/kg di sostanza secca)

### Cv Moraiolo 2011

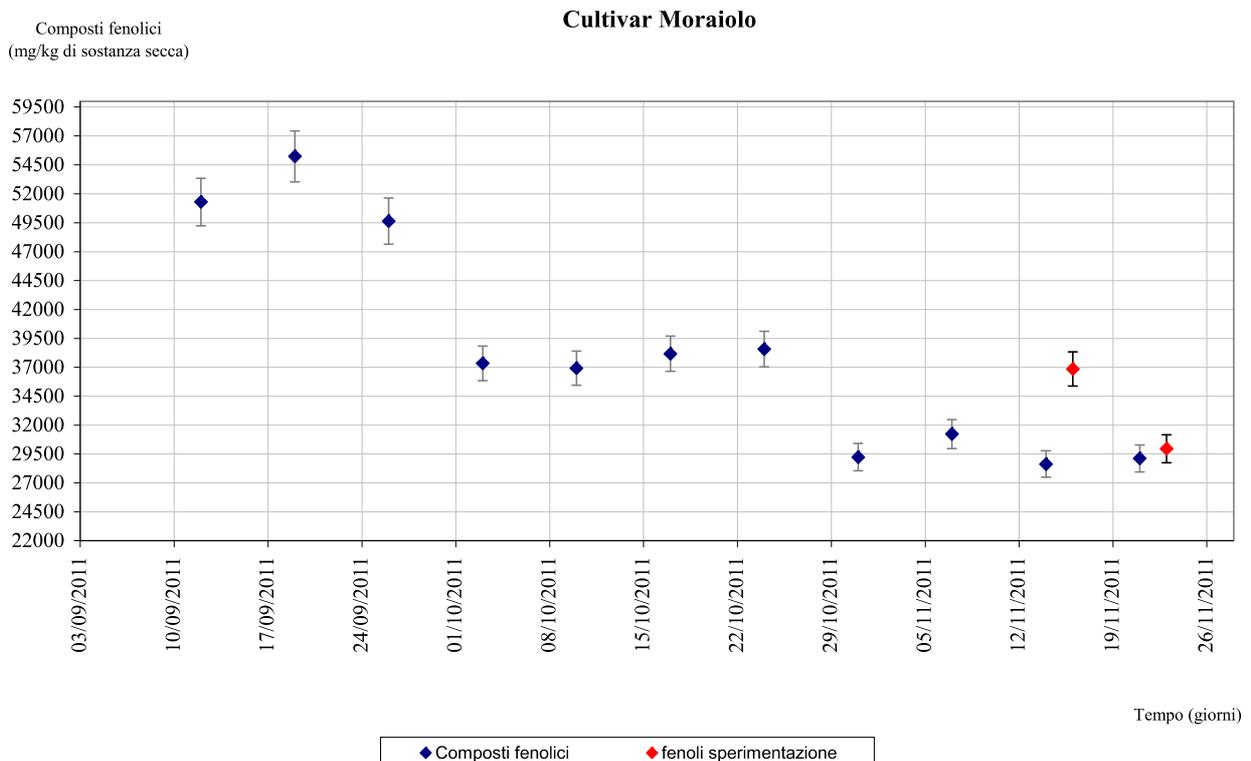
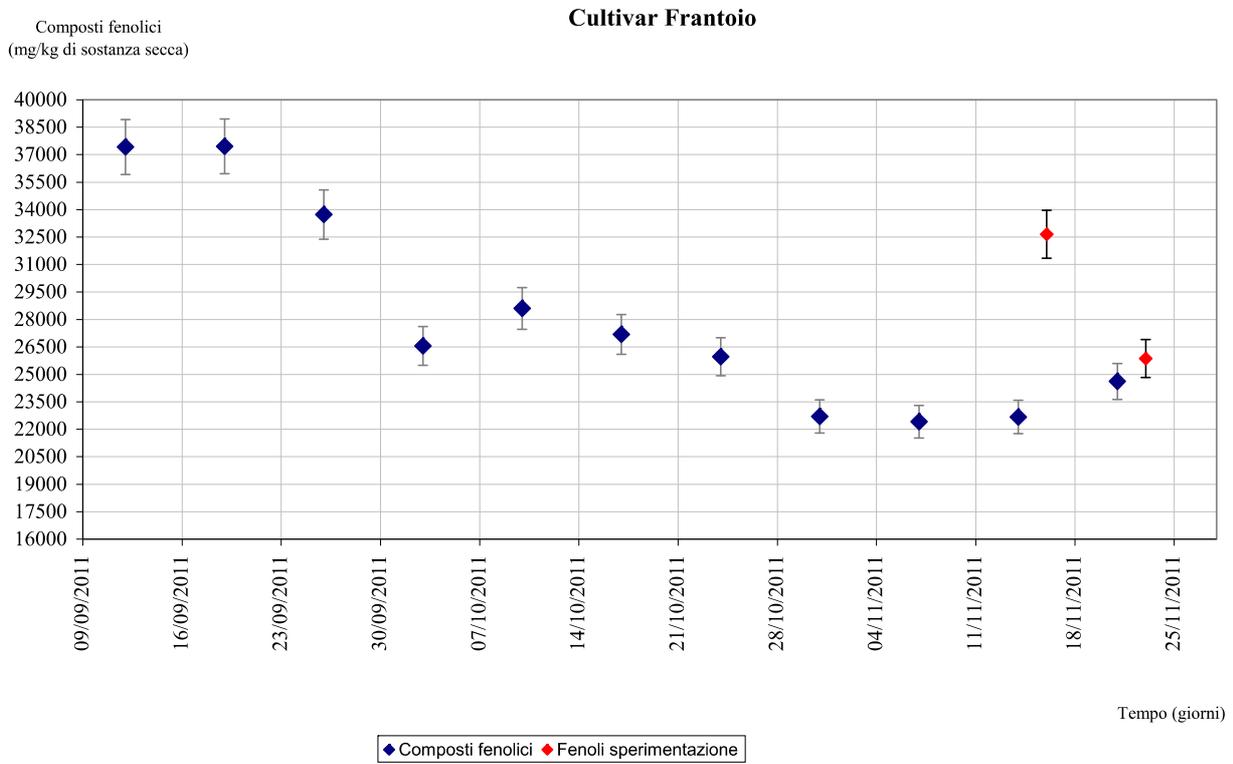
Contenuto di olio  
(g/kg di sostanza secca)



Per la cultivar Frantoio si può notare che, soprattutto durante la prima data di lavorazione, i punti sperimentali non sono perfettamente in linea con gli andamenti ottenuti.

Stessa considerazione, anche se in misura minore può essere effettuata anche per la cultivar Moraiolo.

Infine si riportano il contenuto in composti fenolici totali evidenziando anche i valori ottenuti dalle olive utilizzate durante la sperimentazione per la Cultivar Frantoio e Moraiolo rispettivamente.



Si può notare che l'andamento del contenuto in composti fenolici è più o meno decrescente per entrambe le cultivar; anche per i composti fenolici si nota che nella prima data per entrambe le cultivar il contenuto in composti fenolici delle olive utilizzate durante la lavorazione non è in linea con i dati ottenuti durante lo studio. Tale differenza si attenua nella seconda data per entrambe le cultivar.

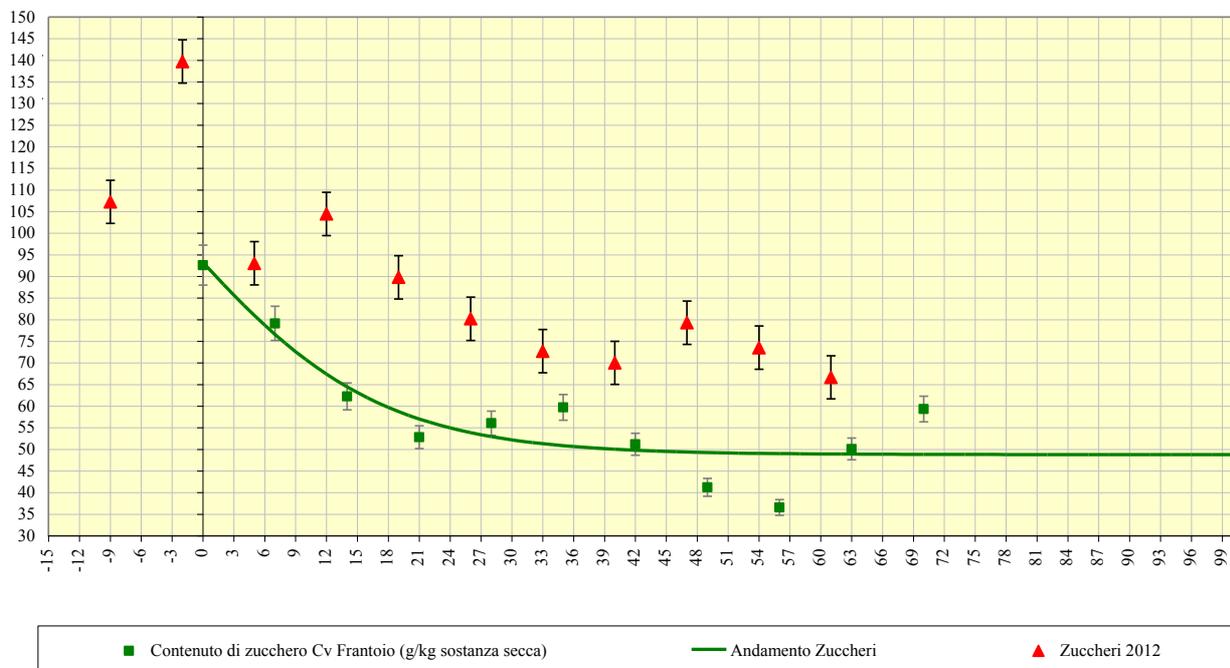
## 2°anno di attività

I dati delle olive precedentemente mostrati sono stati riportati graficamente anche in relazione agli andamenti dei parametri chimici individuati nella stagione olearia (2011). In questo modo è stato possibile paragonare i dati delle due campagne olearie (2011-2012) per individuare l'indice di maturazione tecnologica.

Si riportano di seguito gli andamenti degli zuccheri, dell'olio e dei composti fenolici per quanto riguarda la cultivar Frantoio con i relativi indici di correlazione, con i valori asintotici della campagna olearia 2011 e con i punti sperimentali raccolti nel 2012 (rappresentati con i triangoli rossi).

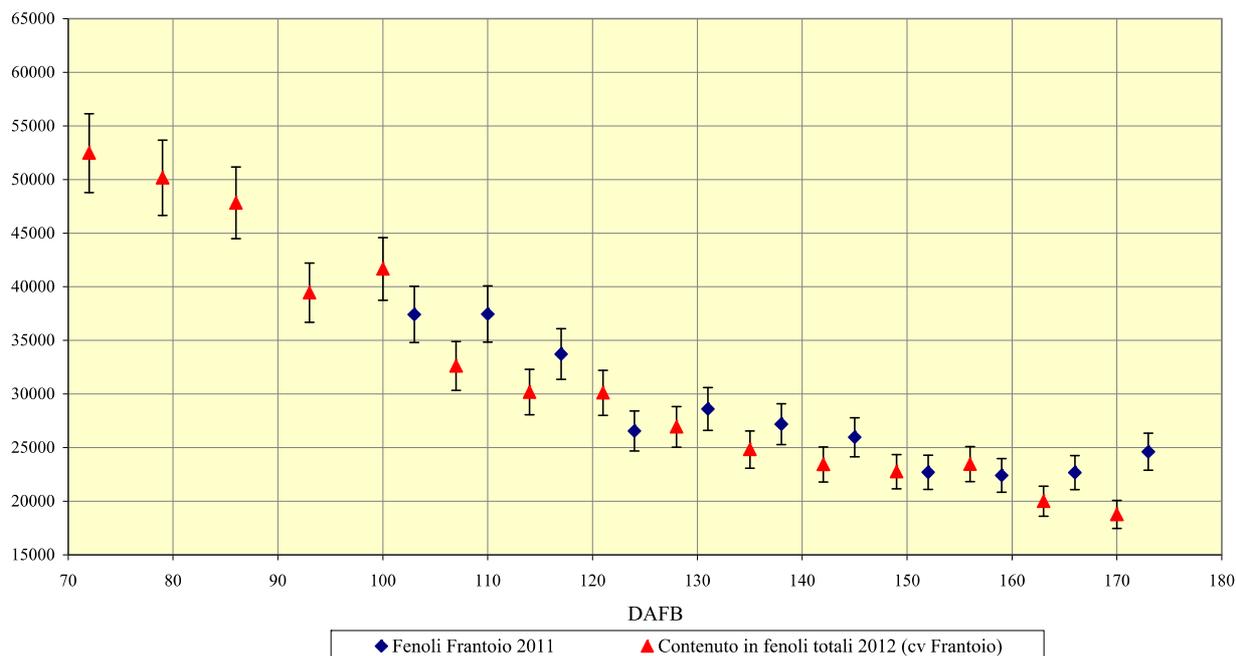
Contenuto di zuccheri  
(g/kg di polpa secca)

**Cv Frantoio**  
**Confronto andamento 2011 - punti 2012**



Contenuto in composti  
fenolici  
(mg/kg polpa secca)

Buonamici Cv Frantoio  
Confronto andamento 2011 - punti 2012



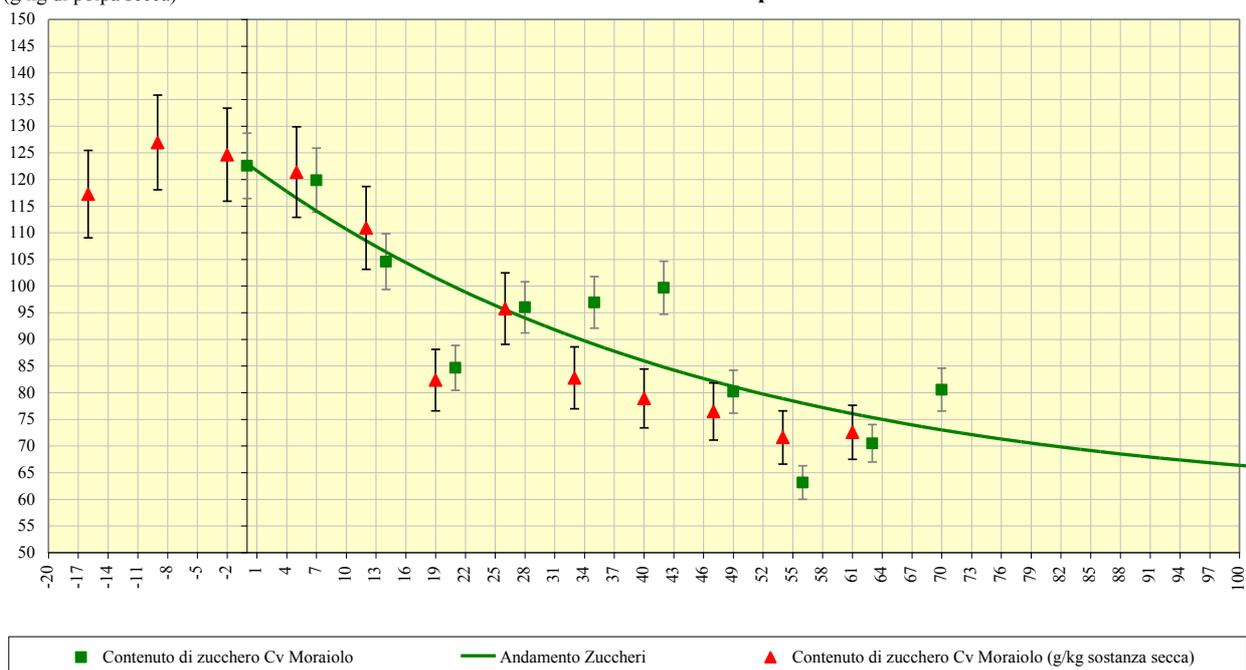
Dall'analisi dei dati 2012 si può valutare che, a parità di tempo, le olive di cultivar Frantoio rispetto alla campagna olearia 2011 mostrano:

- un valore in termini di zuccheri nettamente più elevato;
- un contenuto di olio finale inferiore all'anno precedente (rappresentando circa il 19% della resa teorica in frantoio contro il 21% dell'anno precedente);
- un contenuto in composti fenolici pressochè in linea tra le due campagne olearie.

Si riportano di seguito gli andamenti degli zuccheri, dell'olio e dei composti fenolici per quanto riguarda la cultivar Moraiolo con i relativi indici di correlazione, con i valori asintotici della campagna olearia 2011 e con i punti sperimentali raccolti nel 2012 (rappresentati con triangoli rossi).

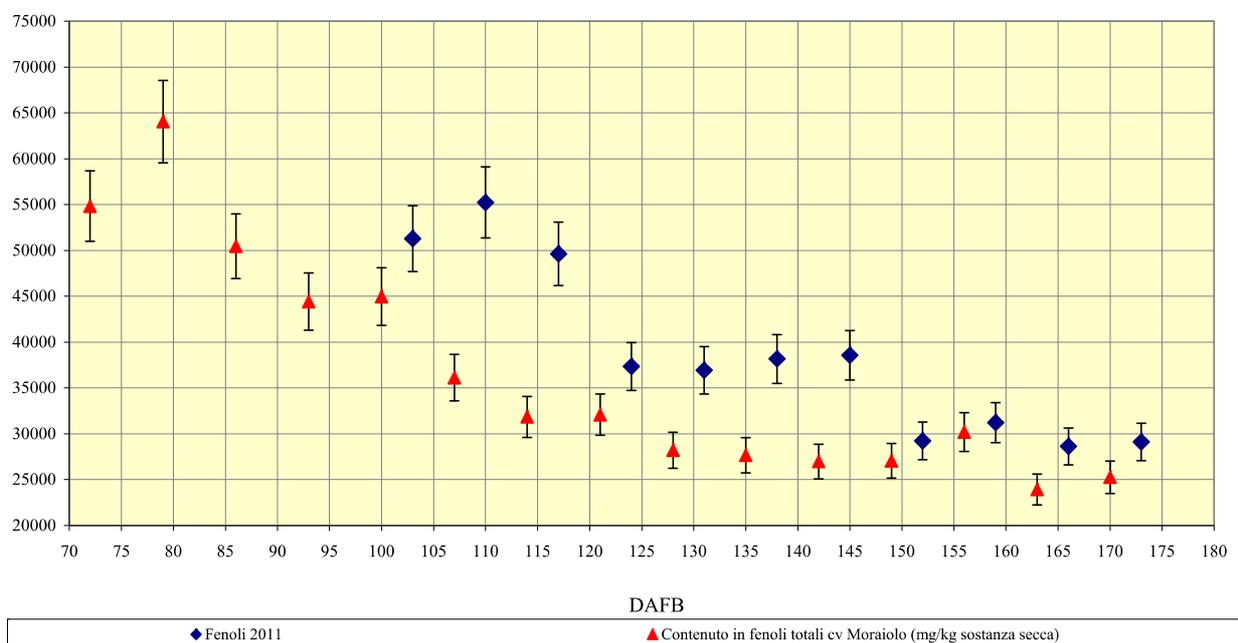
Contenuto di zuccheri  
(g/kg di polpa secca)

### Cv Moraiolo Confronto andamento 2011 - punti 2012



Contenuto in composti  
fenolici  
(mg/kg polpa secca)

### Buonamici Cv Moraiolo Confronto andamento 2011 - punti 2012

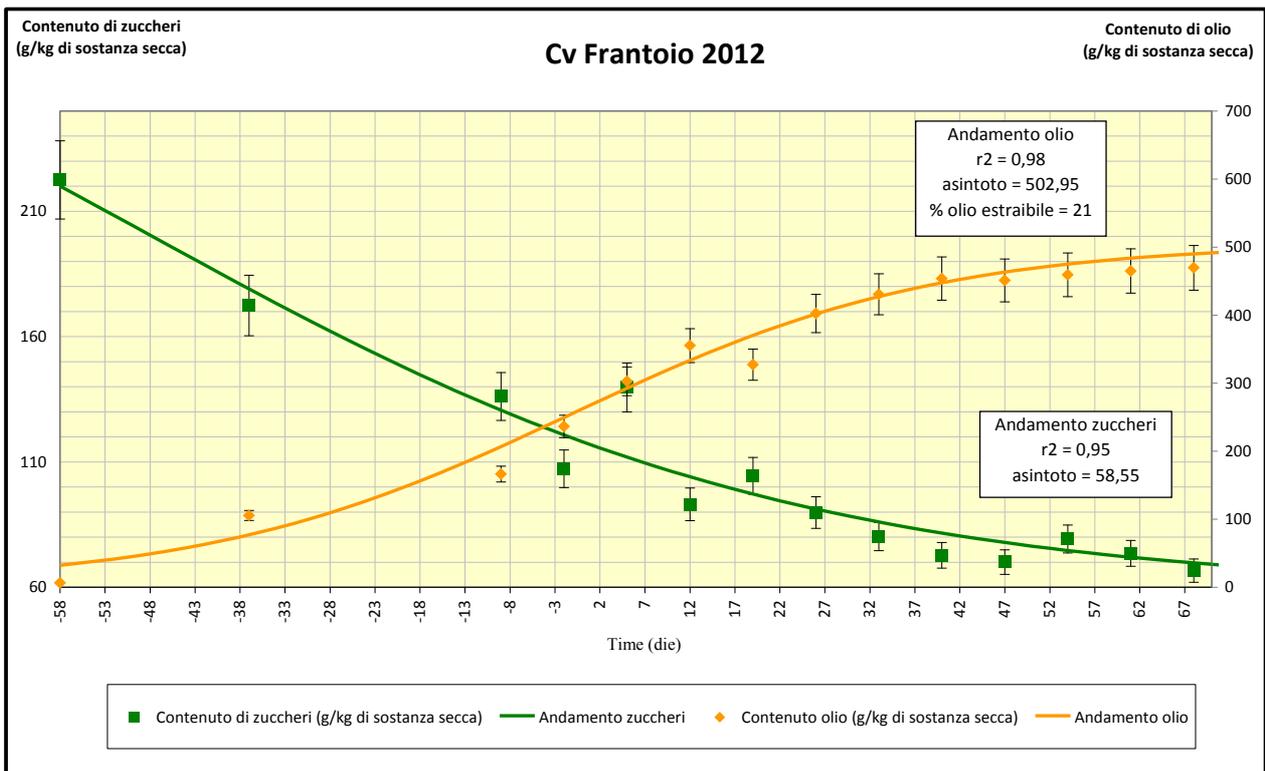


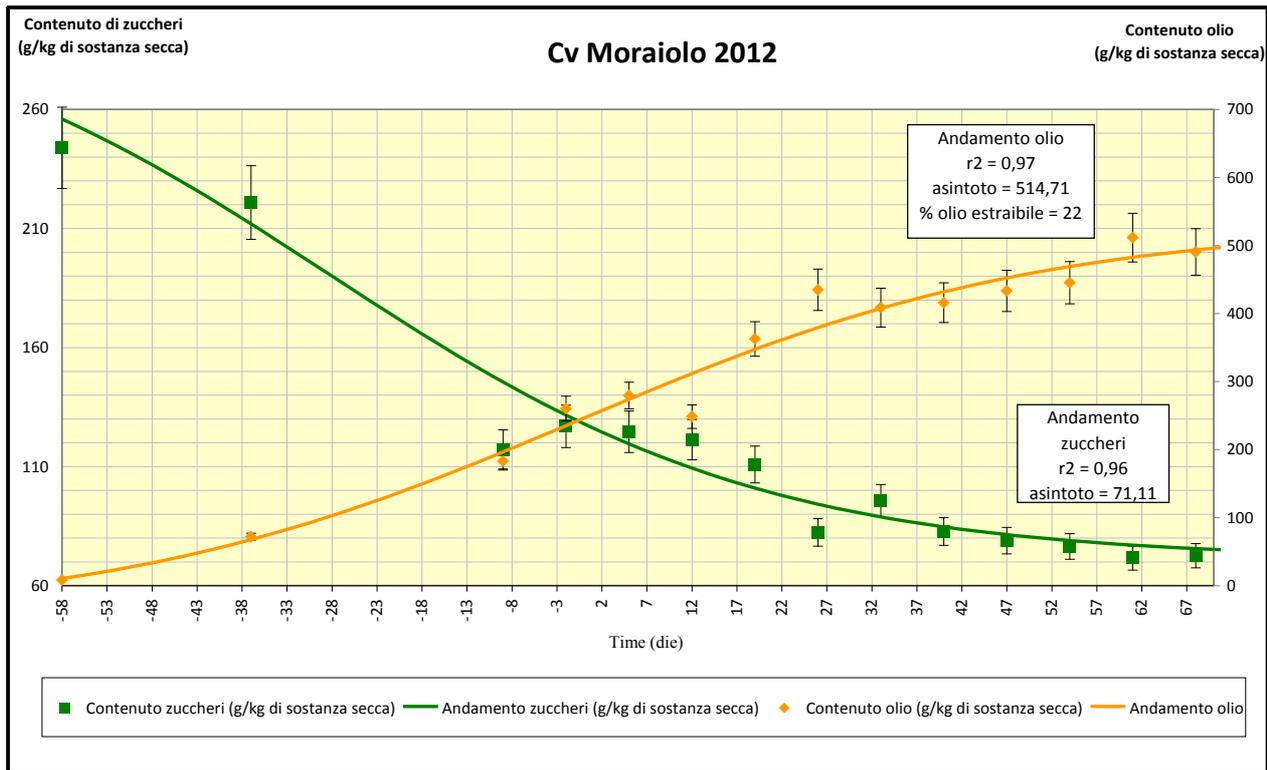
Dall'analisi dei dati 2012 si può valutare che, a parità di tempo, le cultivar Moraiolo rispetto alla campagna olearia 2011 mostrano:

- un contenuto in zuccheri perfettamente in linea;
- un contenuto di olio a fine maturazione superiore (rappresentando circa il 21% della resa teorica in frantoio contro il 17% del 2011);

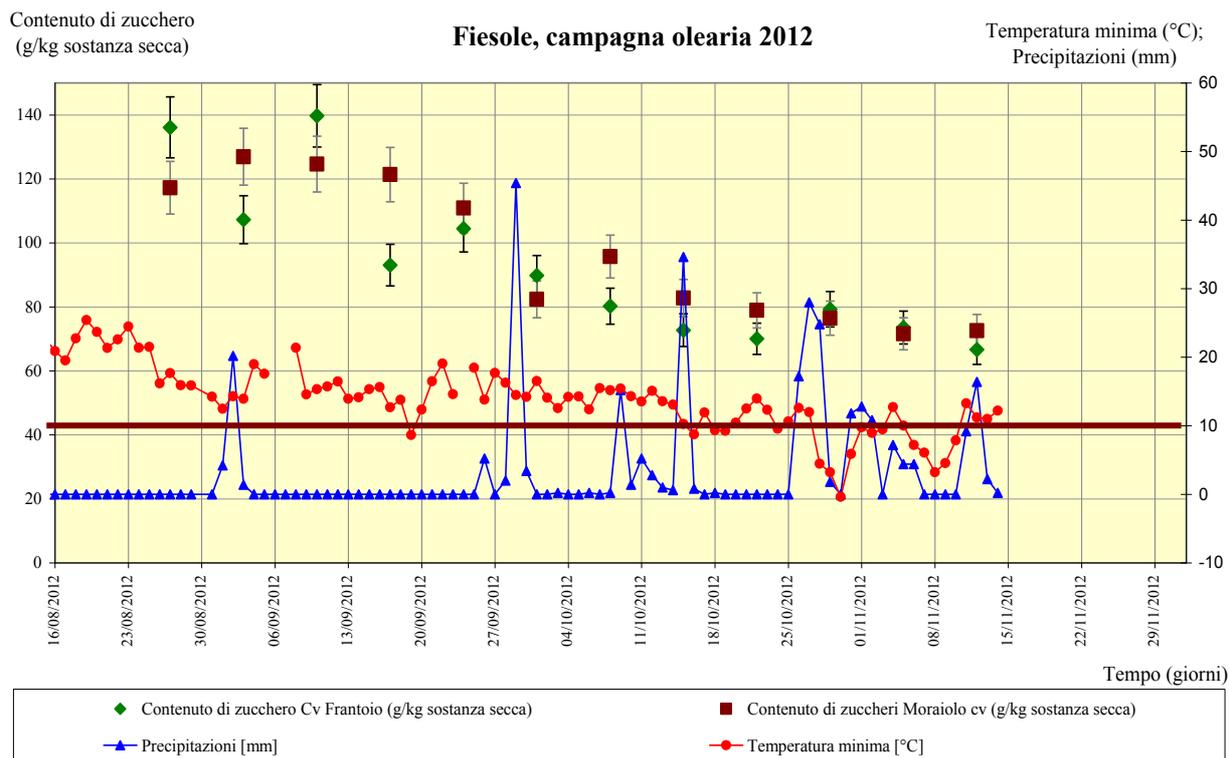
- un contenuto in composti fenolici leggermente inferiore.

Una volta collezionati tutti i dati della campagna olearia 2012, sono state realizzate le curve di maturazione: si riportano di seguito i grafici relativi al contenuto in olio e zuccheri per le cultivar Frantoio e Moraiolo rispettivamente.





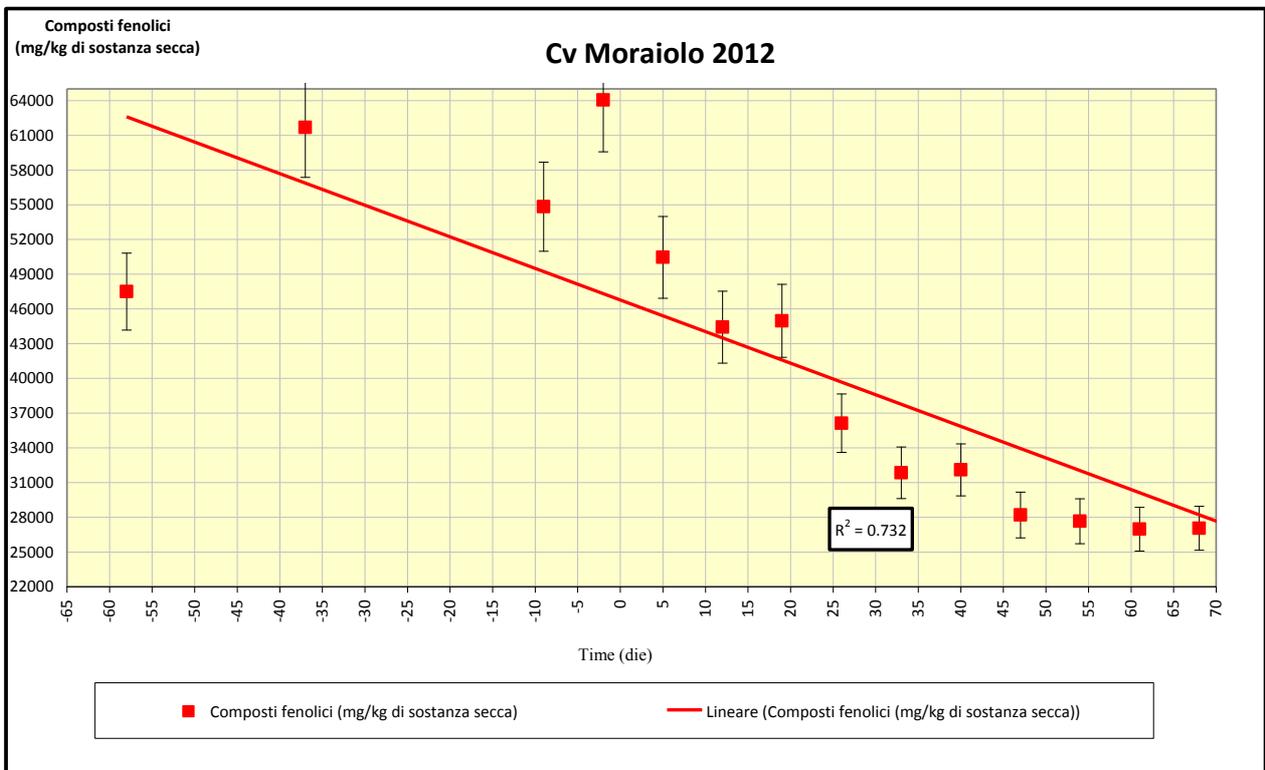
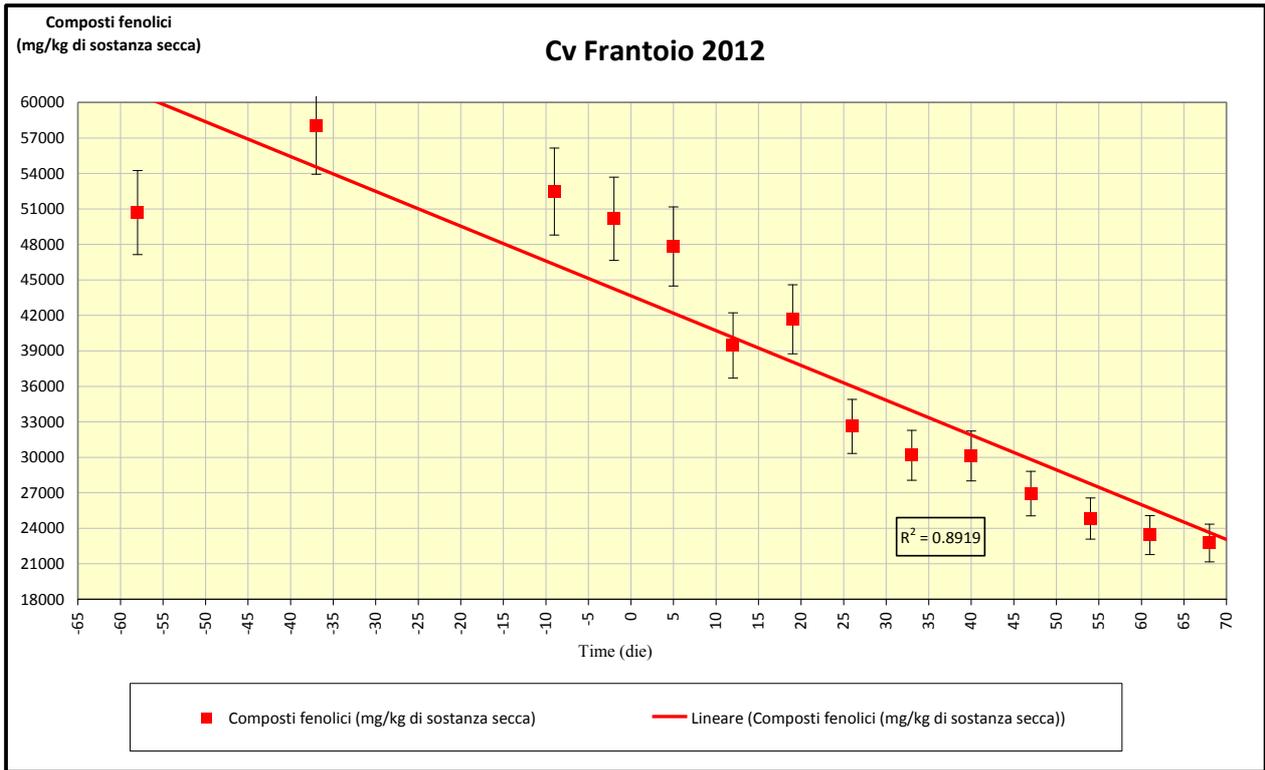
Mediante una semplice analisi visiva e dall'elevato indice di correlazione si può constatare che per tutte le cultivar sia l'andamento degli zuccheri che quello dell'olio vengono espressi con un modello sigmoidale. L'andamento nel tempo del contenuto zuccherino delle due cultivar è stato messo in relazione all'andamento nel tempo delle temperature minime e della piovosità totale giornaliera. Nella figura di seguito è indicata la temperatura dei 10°C come temperatura soglia, al di sotto della quale l'olivo entra in riposo vegetativo.



Come detto in precedenza ad un contenuto minimo di zuccheri corrisponde un valore massimo di olio, tale condizione si realizza sicuramente quando le temperature minime sono stabili al di sotto dei 10°C.

Per la cultivar Frantoio il contenuto minimo di zuccheri (circa 70 g/kg) è stato raggiunto a metà novembre, mentre per la cultivar Moraiolo il contenuto minimo di zuccheri (circa 70 g/kg) è stato raggiunto già a fine ottobre 2012.

Il contenuto di composti fenolici ha un caratteristico andamento decrescente durante il periodo di maturazione per tutte e due le cultivar. Di seguito si riportano i grafici con i relativi indici di correlazione.



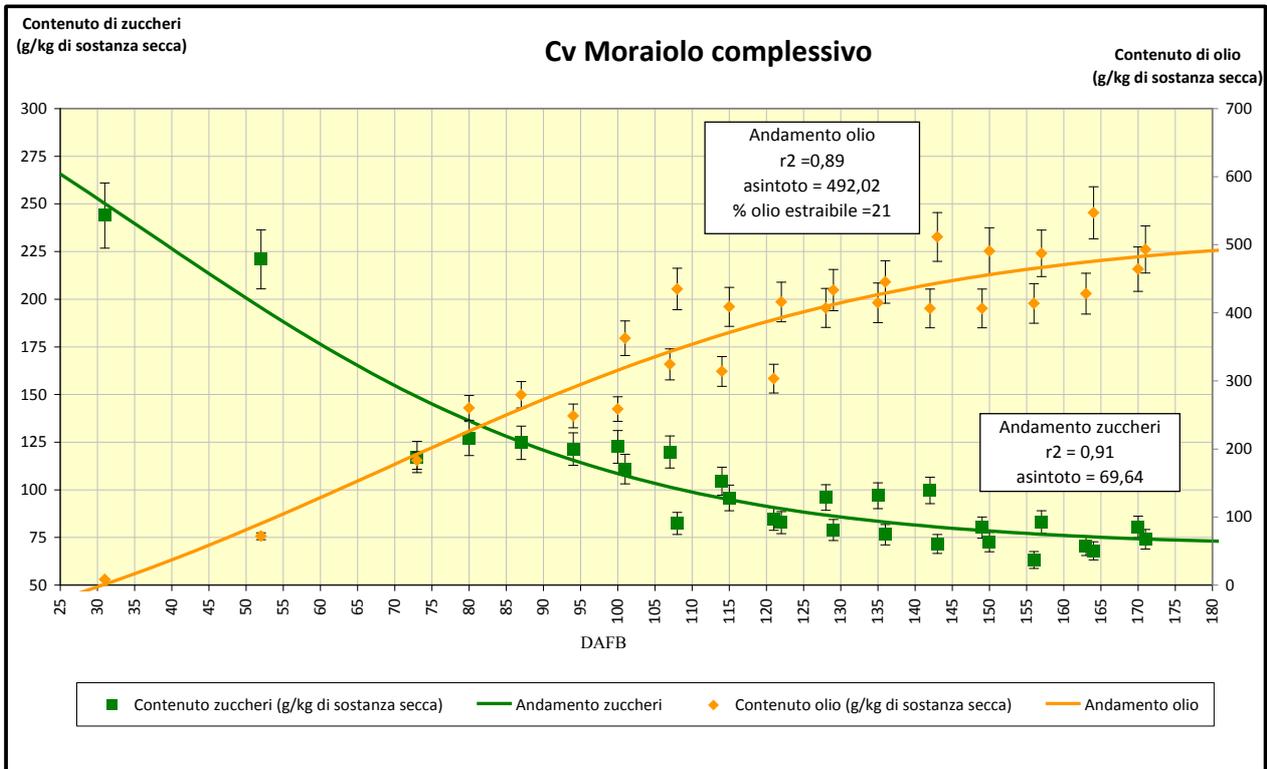
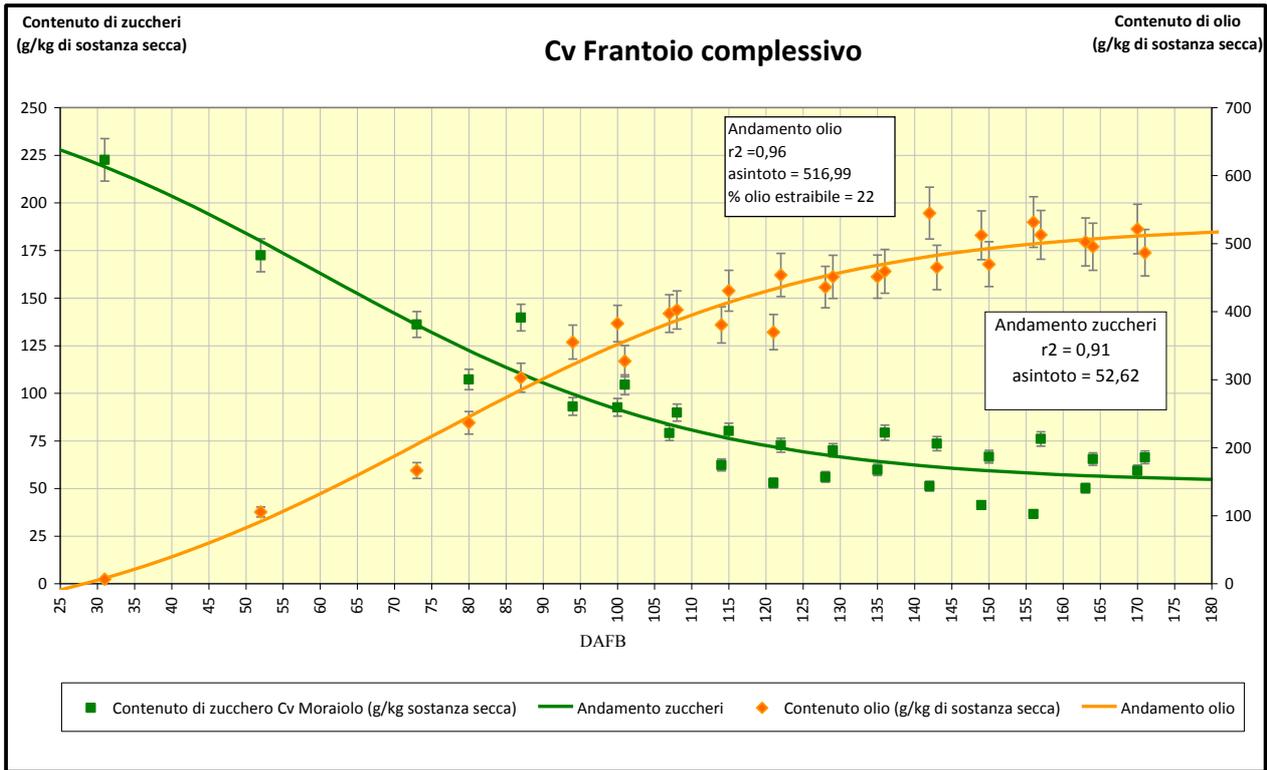
Le olive di cultivar Moraiolo risultano essere inizialmente quelle con il maggior contenuto fenolico e a fine maturazione la cultivar Frantoio registra un contenuto inferiore (circa 20000 mg/kg contro 27000 per la cultivar Moraiolo). Si sottolinea nuovamente che sarebbe opportuno, una volta raggiunto l'asintoto del contenuto in zuccheri, effettuare repentinamente la raccolta delle olive in modo da evitare una perdita consistente del contenuto fenolico.

Come si osserva dai grafici precedenti il contenuto minimo di zuccheri è stato raggiunto tra la fine ottobre (Moraiolo) e metà di novembre (Frantoio) 2012 momento nel quale anche le temperature minime hanno raggiungono la soglia dei 10°C: tale periodo coincide con il momento di maturazione tecnologica delle olive da olio.

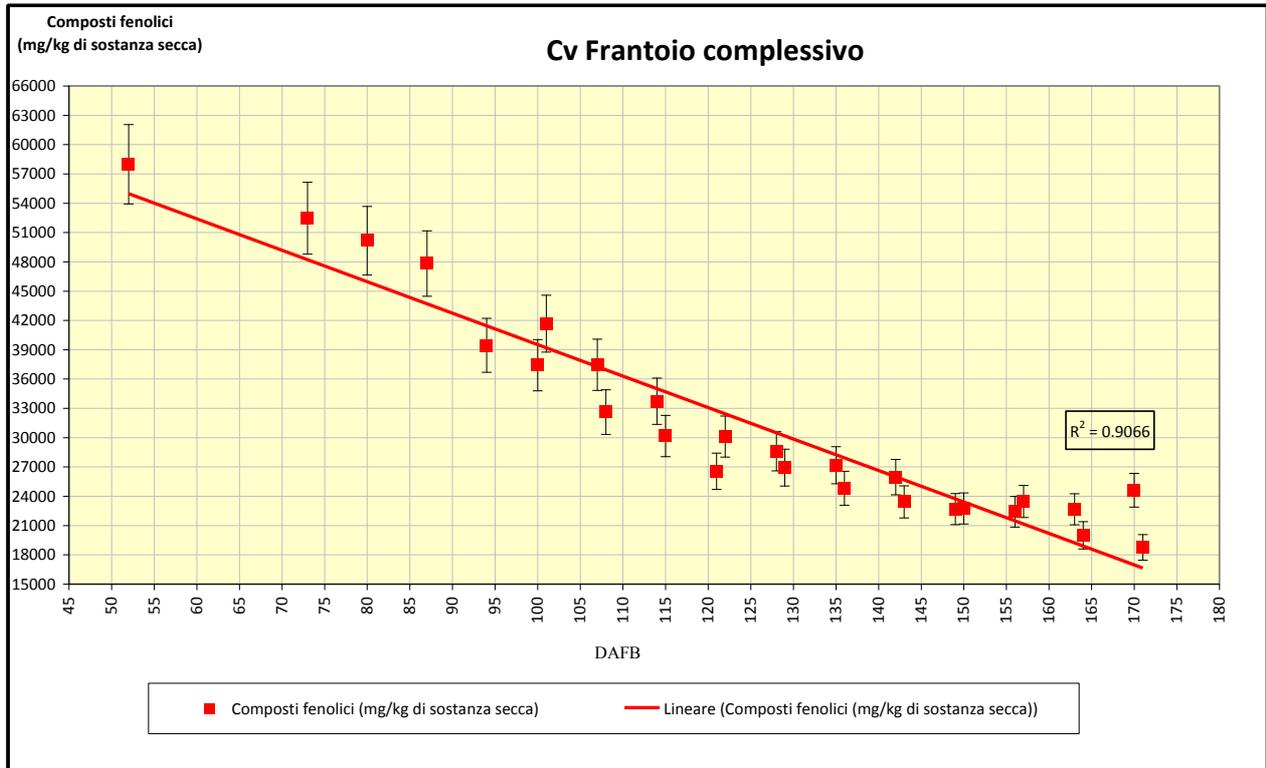
Grazie alla consistente mole di dati collezionati è stato possibile realizzare delle curve complessive di maturazione tecnologica per l'area microclimatica di Fiesole in provincia di Firenze.

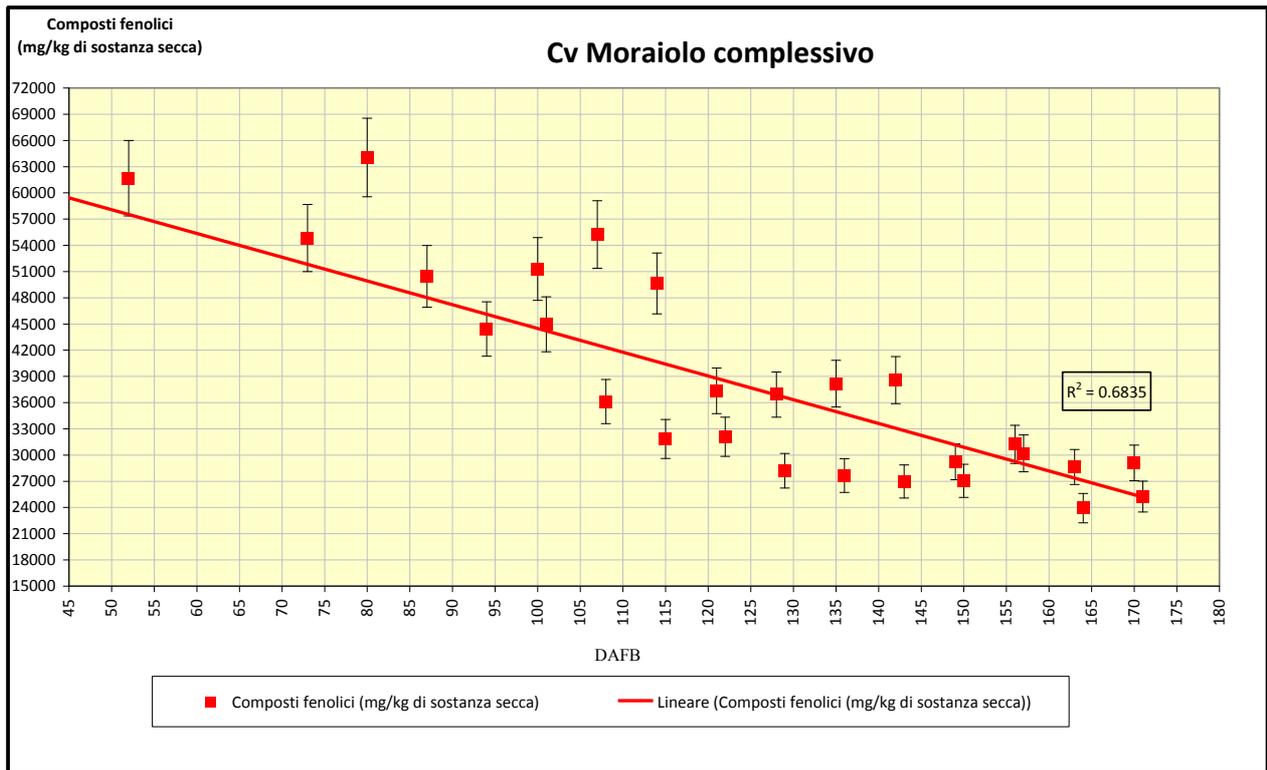
Per rappresentare adeguatamente le due annate è parso opportuno convertire i dati del tempo, idonei invece per il paragone tra campagne olearie, in DAFB (Day After Full Blooming) ovvero il giorno dopo la completa fioritura.

Si riportano di seguito i grafici relativi all'andamento in zuccheri e olio per le cultivar Frantoio, Moraiolo rispettivamente.



Di seguito si riportano gli andamenti complessivi del contenuto in composti fenolici delle cultivar Frantoio e Moraiolo rispettivamente.





Per maggiore chiarezza si riportano tutti i parametri significativi ottenuti dalle curve di maturazione nel 2011, 2012 e i complessivi nella tabella di seguito.

Dalla tabella si può notare che:

- tutti gli indici di correlazione sono elevati, pertanto gli andamenti ritrovati sono rappresentativi per cultivar diverse in diverse annate;
- il valore asintotico degli zuccheri è superiore per la cultivar Moraiolo rispetto alla cultivar Frantoio;
- il valore asintotico del contenuto in olio e quindi la percentuale di olio estraibile in frantoio è sostanzialmente simile tra le cultivar studiate;
- i composti fenolici mostrano sempre andamento decrescente lineare nel tempo.

La valutazione durante la maturazione del contenuto in olio combinato a quello del contenuto in zuccheri risulta un utile strumento di monitoraggio e previsione del tempo ottimale di maturazione. Il raggiungimento di un valore minimo di zuccheri correlato al raggiungimento di un valore massimo e costante di olio estraibile appare il corretto

CV	Campagna olearia	Zuccheri		Olio			Fenoli		
		Asintoto	r <sup>2</sup>	Asintoto - Valore max	% Olio estraibile in frantoio	r <sup>2</sup>	m	q	r <sup>2</sup>
Frantoio	2011	49	0.82	522	22	0.93	-218	35733	0.80
	2012	59	0.95	503	21	0.98	-294	43646	0.89
	Complessivo	53	0.91	517	22	0.96	-332	71717	0.91
Moraiolo	2011	71	0.76	422	18	0.90	-373	51725	0.84
	2012	71	0.96	515	22	0.97	-273	46768	0.73
	Complessivo	70	0.91	492	21	0.89	-329	79376	0.77

approccio per scegliere un momento ottimale di raccolta ai fini della qualità dell'olio extra vergine di oliva, in termini di incrementi di rese di estrazione e di riduzione dei difetti sensoriali da fermentazione degli oli.

## FASE 6 CARATTERIZZAZIONE DEGLI OLI, GESTIONE DEGLI SCARTI DI PRODUZIONE

**F 6.1.1 - F 6.2.1 Caratterizzazione chimica delle olive destinate alla trasformazione e degli oli monocultivar ottenuti**

*1° anno di attività*

Durante le giornate di lavorazione al frantoio con il prototipo di estrazione sono stati raccolti i campioni di olive di cultivar frantoio e moraiolo che sono stati utilizzati per la caratterizzazione chimica (6.1.1).

La tabella riporta le caratteristiche chimico - fisiche delle olive sottoposte a trasformazione.

Data	Numero Laboratorio	Cultivar	Umidità (%)	Grasso (g/kg)	Fenoli Totali (mg/kg)	Zuccheri Totali (g/kg)	Peso medio (g)	Rapporto polpa/nocciolo
16-nov-11	4778	Frantoio	39,1	43,9	32654	75,4	1,4	2,5
16-nov-11	4779	Moraiolo	41,1	50,0	36847	76,9	1,6	3,4
23-nov-11	4528	Frantoio	43,7	46,0	25866	54,2	1,6	2,6
23-nov-11	4527	Moraiolo	43,0	44,9	29957	69,4	2,1	3,4

Tutti gli oli ottenuti sono stati sottoposti a caratterizzazione chimica (6.2.1) che ha permesso di determinare:

- contenuto di acidi grassi liberi (acido oleico%);
- contenuto di perossidi (meq di O<sub>2</sub>/kg di olio);
- assorbimento all'ultravioletto (K<sub>232</sub>; K<sub>270</sub>;ΔK);
- contenuto di composti fenolici (mg/kg);
- contenuto di tocoferoli;
- contenuto in esteri metilici degli acidi grassi;
- contenuto di composti volatili.

I risultati delle principali analisi sono riportate nella tabella sottostante.

Le successive tabelle riportano nel dettaglio il contenuto di composti fenolici, aromatici ed il contenuto in esteri metilici degli acidi grassi

numero	Data	Cultivar	Acidi grassi liberi (acid oleico%)		Perossidi (meq di O <sub>2</sub> /kg di olio)		K232		K270		ΔK		Fenoli totali (mg/kg)		Tocoferoli (mg/kg)		% acido oleico
4520	16/11/11	Frantoio	0,23	± 0,01	4,4	± 0,80	1,63	± 0,06	0,16	± 0,01	- 0,01	± 0,01	446	± 9	350	± 10	73,96
4522	16/11/11	Frantoio	0,20	± 0,01	3,6	± 0,80	1,76	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	720	± 9	285	± 10	73,95
4521	16/11/11	Frantoio	0,20	± 0,01	3,6	± 0,80	1,71	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	638	± 9	249	± 10	74,16
4519	16/11/11	Frantoio	0,20	± 0,01	3,5	± 0,80	1,74	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	716	± 9	238	± 10	74,47
4518	16/11/11	Frantoio	0,22	± 0,01	1,8	± 0,80	1,79	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	715	± 9	240	± 10	74,41
4526	16/11/11	Moraiolo	0,20	± 0,01	3,9	± 0,80	1,80	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	686	± 9	249	± 10	74,61
4525	16/11/11	Moraiolo	0,22	± 0,01	4,0	± 0,80	1,74	± 0,06	0,16	± 0,01	- 0,01	± 0,01	667	± 9	256	± 10	74,98
4523	16/11/11	Moraiolo	0,22	± 0,01	4,3	± 0,80	1,82	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	733	± 9	252	± 10	75,28
4524	16/11/11	Moraiolo	0,22	± 0,01	4,6	± 0,80	1,80	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	720	± 9	257	± 10	75,35
4790	23/11/11	Frantoio	0,23	± 0,01	5,2	± 0,80	1,9	± 0,06	0,18	± 0,01	- 0,01	± 0,01	787	± 9	289	± 10	73,03
4791	23/11/11	Frantoio	0,22	± 0,01	5,7	± 0,80	1,81	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	637	± 9	289	± 10	72,98
4792	23/11/11	Frantoio	0,19	± 0,01	6,2	± 0,80	1,77	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	560	± 9	292	± 10	72,86
4793	23/11/11	Frantoio	0,19	± 0,01	4,9	± 0,80	1,8	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	607	± 9	292	± 10	73,85
4794	23/11/11	Frantoio	0,23	± 0,01	5,3	± 0,80	1,87	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	699	± 9	287	± 10	73,39
4795	23/11/11	Frantoio	0,24	± 0,01	4,6	± 0,80	1,85	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	694	± 9	288	± 10	73,36
4786	23/11/11	Moraiolo	0,25	± 0,01	5,3	± 0,80	1,79	± 0,06	0,15	± 0,01	- 0,01	± 0,01	566	± 9	283	± 10	73,15
4787	23/11/11	Moraiolo	0,25	± 0,01	4,5	± 0,80	1,86	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	696	± 9	278	± 10	74,02
4788	23/11/11	Moraiolo	0,27	± 0,01	5,2	± 0,80	1,79	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	609	± 9	252	± 10	74,41
4789	23/11/11	Moraiolo	0,27	± 0,01	4,9	± 0,80	1,83	± 0,06	0,17	± 0,01	- 0,01	± 0,01	695	± 9	249	± 10	74,76

Numero Laboratorio	4517	4520	4522	4521	4519	4518	4526	4525	4523	4524
Cultivar	Frantoio	Frantoio	Frantoio	Frantoio	Frantoio	Frantoio	Moraiolo	Moraiolo	Moraiolo	Moraiolo
Biofenoli mg/kg (espressi in tirosolo)	-									
Data lavorazione	16-nov									
Idrossitirosolo	2	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Tirosolo	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
Acido Vanillico+ Acido Caffeoico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vanillina	7	3	3	2	3	2	3	2	2	2
Acido Para-coumarico	1	0	1	1	2	2	1	1	2	2
Idrossitirosilacetato	2	1	1	1	2	3	0	0	1	0
Acido Ferulico	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
Acido Orto-coumarico	4	3	2	1	3	2	2	2	3	2
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica ossidata	62	48	89	79	102	112	122	127	162	148
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica	114	91	228	173	200	182	153	142	152	157
Oleuropeina	22	19	39	32	39	46	42	51	67	63
Aglicone Oleuropeina forma di aldeidica	28	20	39	38	48	55	63	63	71	72
Aglicone Decarbossimetilligstroside forma dialdeidica ossidata	17	17	20	20	21	22	24	22	21	20
Aglicone Decarbossimetilligstroside forma dialdeidica	77	76	92	84	83	78	67	59	46	47
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo	56	55	71	78	78	72	67	67	59	54
Acido Cinnamico	9	10	11	12	13	16	18	19	20	19
Aglicone Ligstroside forma di aldeidica	5	4	12	10	14	14	13	13	15	14
Aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica ossidata	35	20	33	35	38	30	24	27	31	27
Luteolina	7	2	4	5	4	3	5	4	4	4
Aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica	48	39	31	29	26	30	26	36	33	33
Aglicone Ligstroside forma aldeidica e idrossilica ossidata	40	16	19	21	20	24	18	23	24	23
Apigenina	18	7	8	7	8	3	8	3	3	3
Metil-luteolina	7	3	3	2	3	3	3	4	3	3
Aglicone Ligstroside forma aldeidica e idrossilica	22	10	8	8	8	8	9	8	8	7
<b>BIOFENOLI TOTALI</b>	<b>586</b>	<b>448</b>	<b>720</b>	<b>642</b>	<b>719</b>	<b>711</b>	<b>674</b>	<b>676</b>	<b>731</b>	<b>704</b>
<i>Incertezza di misura</i>	63	48	83	71	82	81	75	76	85	80

Numero Laboratorio	Cultivar	4786	4787	4788	4789	4790	4791	4792	4793	4794	4795
Biofenoli mg/kg (espressi in tirosolo) - Idrossitirosolo	Data lavorazione	Moraiolo 23-nov	Moraiolo 23-nov	Moraiolo 23-nov	Moraiolo 23-nov	Frantoio 23-nov	Frantoio 23-nov	Frantoio 23-nov	Frantoio 23-nov	Frantoio 23-nov	Frantoio 23-nov
Tirosolo		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Acido Vanillico+ Acido Caffeico		1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
Vanillina		2	2	3	2	3	2	2	2	2	2
Acido Para-coumarico		2	2	2	2	1	0	0	1	2	2
Idrossitirosilacetato		9	7	4	2	2	1	1	1	0	0
Acido Ferulico		1	1	1	0	2	1	1	1	1	1
Acido Orto-coumarico		2	2	2	3	2	2	2	2	3	3
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica ossidata		106	158	130	173	82	60	59	83	131	134
Aglicone Decarbossimetiloleuropeina forma dialdeidica		105	144	102	113	238	172	130	126	147	142
Oleuropeina		39	51	56	61	40	29	26	40	47	49
Aglicone Oleuropeina forma di aldeidica		46	63	57	95	45	35	30	44	77	64
Aglicone Decarbossimetilligstroside forma dialdeidica ossidata		17	18	19	18	22	21	21	21	21	21
Aglicone Decarbossimetilligstroside forma dialdeidica		39	38	33	26	133	126	112	90	58	52
Pinoresinolo, 1 acetossi-pinoresinolo		62	67	62	55	49	44	41	55	66	69
Acido Cinnamico		12	13	15	22	15	14	16	16	20	20
Aglicone Ligstroside forma di aldeidica		13	15	13	16	11	8	6	8	14	15
Aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica ossidata		18	28	25	24	26	19	18	21	23	22
Luteolina		3	3	3	4	3	3	4	4	5	3
Aglicone oleuropeina forma aldeidica e idrossilica		39	40	41	38	58	51	48	47	40	48
Aglicone Ligstroside forma aldeidica e idrossilica ossidata		32	27	22	24	22	18	16	19	21	22
Apigenina		2	2	3	3	5	4	3	3	3	3
Metil-luteolina		3	3	3	3	6	5	5	4	4	4
Aglicone Ligstroside forma aldeidica e idrossilica		10	9	8	8	19	18	17	15	11	12
<b>BIOFENOLI TOTALI</b>		<b>566</b>	<b>696</b>	<b>609</b>	<b>695</b>	<b>787</b>	<b>637</b>	<b>560</b>	<b>607</b>	<b>699</b>	<b>694</b>
<i>Incertezza di misura</i>		61	79	66	79	94	70	60	66	79	78

	Eptano	Ottano	Metil acetato	Etil acetato	2-butanone	Metil propionato	2-metil butanale	Isovaleraldeide	Etil propionato	2-pentanone	Caleraldeide	Etil-vinil chetone	2-butanolo	Etil butirrato
4518	0,007	0,033	0,009	0,015	0,004	0,000	0,028	0,014	0,000	0,000	0,097	0,555	0,000	0,000
4519	0,004	0,038	0,015	0,020	0,003	0,000	0,027	0,013	0,000	0,000	0,087	0,484	0,000	0,000
4520	0,016	0,060	0,022	0,023	0,004	0,000	0,062	0,039	0,000	0,000	0,129	0,335	0,000	0,000
4521	0,006	0,043	0,022	0,017	0,003	0,000	0,031	0,017	0,000	0,000	0,106	0,477	0,000	0,000
4522	0,007	0,048	0,036	0,019	0,003	0,000	0,045	0,027	0,000	0,000	0,128	0,433	0,000	0,000
4523	0,005	0,031	0,005	0,016	0,004	0,000	0,035	0,022	0,000	0,000	0,079	0,590	0,000	0,000
4524	0,003	0,033	0,006	0,019	0,003	0,000	0,041	0,024	0,000	0,000	0,100	0,606	0,000	0,000
4525	0,003	0,032	0,005	0,018	0,003	0,000	0,034	0,018	0,000	0,000	0,092	0,586	0,000	0,000
4526	0,005	0,028	0,005	0,015	0,003	0,000	0,028	0,015	0,000	0,000	0,087	0,533	0,000	0,000
4786	0,003	0,037	0,006	0,023	0,008	0,000	0,036	0,022	0,000	0,000	0,070	0,753	0,000	0,000
4787	0,003	0,035	0,006	0,021	0,005	0,000	0,033	0,018	0,000	0,000	0,053	0,715	0,000	0,000
4788	0,004	0,040	0,005	0,020	0,004	0,000	0,034	0,020	0,000	0,000	0,044	0,711	0,000	0,000
4789	0,002	0,036	0,008	0,022	0,004	0,000	0,035	0,021	0,000	0,000	0,042	0,720	0,000	0,000
4790	0,008	0,155	0,037	0,063	0,003	0,000	0,077	0,050	0,000	0,000	0,100	0,346	0,000	0,000
4791	0,006	0,142	0,036	0,066	0,003	0,000	0,084	0,052	0,000	0,000	0,108	0,340	0,000	0,000
4792	0,005	0,053	0,015	0,042	0,003	0,000	0,068	0,041	0,000	0,000	0,094	0,360	0,000	0,000
4793	0,002	0,039	0,007	0,035	0,004	0,000	0,049	0,031	0,000	0,000	0,079	0,481	0,000	0,000
4794	0,003	0,036	0,008	0,027	0,007	0,000	0,043	0,024	0,000	0,000	0,070	0,708	0,000	0,000
4795	0,003	0,036	0,006	0,023	0,007	0,000	0,037	0,023	0,000	0,000	0,071	0,712	0,000	0,000

	Propanolo	Butil acetato	Esanale	Iso butanolo	2-pentanolo	E-2-pentenale	Z-3-Esenale	1-penten-3-olo	2-eptanone	3-penten-2-olo	Eptanale	Limonene	2 e 3-metil-1-butanolo	E-2-esenale
4518	0,008	0,003	0,622	0,019	0,000	0,034	1,490	0,581	0,000	0,000	0,026	0,007	0,049	9,344
4519	0,007	0,002	0,596	0,016	0,000	0,030	1,569	0,475	0,000	0,000	0,025	0,005	0,033	9,963
4520	0,008	0,003	0,630	0,017	0,000	0,030	1,328	0,416	0,000	0,000	0,028	0,024	0,075	9,565
4521	0,006	0,002	0,644	0,012	0,000	0,035	1,822	0,454	0,000	0,000	0,026	0,007	0,036	10,217
4522	0,006	0,002	0,586	0,017	0,000	0,031	1,421	0,446	0,000	0,000	0,025	0,007	0,051	10,090
4523	0,005	0,002	0,443	0,017	0,000	0,036	2,016	0,569	0,000	0,000	0,022	0,005	0,045	7,684
4524	0,005	0,003	0,489	0,021	0,000	0,042	1,937	0,584	0,000	0,000	0,029	0,006	0,050	7,371
4525	0,005	0,001	0,556	0,020	0,000	0,036	1,742	0,554	0,000	0,000	0,028	0,006	0,046	8,750
4526	0,006	0,001	0,563	0,020	0,000	0,032	2,045	0,571	0,000	0,000	0,025	0,005	0,046	9,435
4786	0,007	0,001	0,585	0,021	0,002	0,038	1,123	0,636	0,000	0,000	0,025	0,011	0,065	6,607
4787	0,009	0,001	0,538	0,022	0,001	0,039	1,320	0,658	0,000	0,000	0,027	0,008	0,057	6,595
4788	0,008	0,002	0,474	0,031	0,001	0,043	1,803	0,575	0,000	0,000	0,022	0,008	0,079	6,172
4789	0,008	0,001	0,416	0,031	0,000	0,045	4,051	0,603	0,000	0,000	0,015	0,006	0,066	5,121
4790	0,015	0,002	0,654	0,046	0,002	0,032	1,125	0,417	0,000	0,000	0,028	0,010	0,146	7,553
4791	0,013	0,001	0,636	0,052	0,002	0,026	1,139	0,399	0,000	0,000	0,029	0,009	0,136	7,562
4792	0,014	0,002	0,481	0,031	0,003	0,023	1,085	0,403	0,000	0,000	0,017	0,009	0,092	7,331
4793	0,009	0,002	0,504	0,025	0,002	0,028	1,084	0,491	0,000	0,000	0,017	0,010	0,073	6,938
4794	0,008	0,001	0,547	0,025	0,002	0,035	1,157	0,597	0,000	0,000	0,023	0,008	0,063	6,785
4795	0,007	0,001	0,535	0,023	0,002	0,035	1,050	0,582	0,000	0,000	0,022	0,008	0,059	6,545

	Ocimene	Pentanolo	Esil acetato	2-ottanone	Ottanale	1-octen-3-one	E-2-pentenolo	Z-3-esenil-acetato	E-2-eptenale	2-eptanolo	Z-2-pentenolo	E-2-esenil-acetato	6-metil-5-epten-2-one	Esanolo
4518	0,041	0,005	0,218	0,006	0,084	0,001	0,052	0,341	0,022	0,000	0,415	0,004	0,004	0,218
4519	0,035	0,004	0,087	0,004	0,134	0,001	0,050	0,134	0,024	0,000	0,353	0,001	0,004	0,143
4520	0,084	0,006	0,153	0,004	0,123	0,002	0,039	0,199	0,049	0,000	0,310	0,001	0,006	0,242
4521	0,041	0,005	0,089	0,004	0,159	0,001	0,051	0,131	0,033	0,000	0,358	0,002	0,005	0,168
4522	0,051	0,005	0,110	0,003	0,131	0,001	0,047	0,144	0,038	0,000	0,337	0,003	0,004	0,171
4523	0,044	0,006	0,208	0,004	0,137	0,002	0,052	1,070	0,009	0,000	0,444	0,027	0,002	0,297
4524	0,043	0,005	0,224	0,006	0,152	0,002	0,052	1,173	0,020	0,000	0,447	0,004	0,004	0,312
4525	0,041	0,006	0,215	0,008	0,148	0,002	0,053	0,747	0,013	0,000	0,435	0,003	0,004	0,266
4526	0,041	0,006	0,249	0,005	0,117	0,001	0,052	0,480	0,023	0,000	0,428	0,006	0,003	0,254
4786	0,066	0,006	0,237	0,011	0,126	0,004	0,061	0,701	0,036	0,381	0,420	0,000	0,000	0,409
4787	0,049	0,005	0,237	0,009	0,117	0,002	0,059	1,032	0,024	0,375	0,412	0,000	0,000	0,419
4788	0,043	0,005	0,199	0,003	0,093	0,002	0,057	0,858	0,021	0,369	0,405	0,000	0,000	0,355
4789	0,034	0,004	0,159	0,003	0,072	0,002	0,057	0,927	0,010	0,361	0,394	0,000	0,000	0,307
4790	0,053	0,005	0,105	0,008	0,066	0,003	0,038	0,071	0,087	0,225	0,228	0,000	0,000	0,410
4791	0,053	0,007	0,099	0,007	0,064	0,002	0,039	0,067	0,078	0,221	0,224	0,000	0,000	0,377
4792	0,056	0,004	0,107	0,014	0,063	0,003	0,038	0,070	0,042	0,225	0,228	0,000	0,000	0,223
4793	0,061	0,004	0,184	0,012	0,066	0,002	0,047	0,409	0,034	0,294	0,310	0,000	0,000	0,273
4794	0,064	0,005	0,235	0,010	0,090	0,001	0,058	0,614	0,031	0,351	0,382	0,000	0,000	0,358
4795	0,063	0,005	0,228	0,035	0,103	0,004	0,059	0,619	0,030	0,346	0,376	0,000	0,000	0,369

	E-3- esenolo	Z-3- esenolo	Nonanale	2- nonanone	2,4 esadienale	E-2- esenolo	Z-2- esenolo	2- ottanolo	E-2- ottanale	1- octen- 3-olo	Eptanolo	Copaene	2,4- eptadienale	Decanale
<b>4518</b>	0,005	0,285	0,684	0,997	0,247	0,185	0,002	0,000	0,019	0,002	0,000	0,563	0,000	0,191
<b>4519</b>	0,003	0,200	0,799	0,000	0,270	0,221	0,002	0,000	0,010	0,002	0,000	0,649	0,000	0,154
<b>4520</b>	0,005	0,285	0,714	0,000	0,282	0,379	0,003	0,000	0,022	0,003	0,000	0,745	0,000	0,140
<b>4521</b>	0,004	0,260	0,793	0,000	0,313	0,302	0,003	0,000	0,010	0,002	0,000	0,631	0,000	0,113
<b>4522</b>	0,004	0,242	0,709	0,000	0,292	0,273	0,002	0,000	0,015	0,002	0,000	0,650	0,000	0,169
<b>4523</b>	0,009	0,695	0,752	0,536	0,262	0,229	0,003	0,000	0,016	0,002	0,000	0,404	0,000	0,095
<b>4524</b>	0,008	0,709	0,897	0,800	0,246	0,261	0,003	0,000	0,014	0,002	0,000	0,475	0,000	0,128
<b>4525</b>	0,006	0,521	0,793	0,000	0,271	0,212	0,003	0,000	0,019	0,002	0,000	0,477	0,000	0,111
<b>4526</b>	0,006	0,346	0,607	0,000	0,276	0,195	0,002	0,000	0,019	0,002	0,000	0,560	0,000	0,156
<b>4786</b>	0,007	0,509	0,541	0,000	0,192	0,264	0,004	0,000	0,018	0,012	0,000	0,447	0,000	0,000
<b>4787</b>	0,008	0,714	0,578	0,000	0,206	0,219	0,003	0,000	0,012	0,009	0,000	0,356	0,000	0,000
<b>4788</b>	0,005	0,745	0,497	0,000	0,229	0,185	0,002	0,000	0,009	0,007	0,000	0,296	0,000	0,000
<b>4789</b>	0,006	0,853	0,458	0,000	0,348	0,162	0,001	0,000	0,022	0,006	0,000	0,255	0,000	0,000
<b>4790</b>	0,006	0,158	0,650	0,000	0,172	0,449	0,007	0,000	0,024	0,006	0,000	0,826	0,000	0,000
<b>4791</b>	0,006	0,146	0,629	0,000	0,181	0,427	0,004	0,000	0,020	0,006	0,000	0,704	0,000	0,000
<b>4792</b>	0,004	0,089	0,507	0,000	0,198	0,249	0,003	0,000	0,010	0,005	0,000	0,734	0,000	0,000
<b>4793</b>	0,005	0,259	0,531	0,000	0,189	0,243	0,003	0,000	0,015	0,007	0,000	0,670	0,000	0,000
<b>4794</b>	0,006	0,431	0,529	0,000	0,177	0,249	0,003	0,000	0,014	0,008	0,000	0,503	0,000	0,000
<b>4795</b>	0,007	0,454	0,552	0,000	0,172	0,258	0,003	0,000	0,016	0,010	0,000	0,542	0,000	0,000

	Benza l- deide	E-2 nonena le	Acido propioni co	ottano lo	Acido butirri co	E-2 decena le	nonano lo	2,4 nonadien ale	Acido pentanoi co	2,4 decadien ale	Acido esanoi co	Guaiaco lo	Benze ne etanol o	Acido eptanoi co	Fenolo	Etil guaiaco lo	Acido ottanoi co	4- etilfeno lo
451 8	0,034	0,209	0,019	0,061	0,000	0,192	0,225	0,000	0,013	0,000	0,250	0,016	0,311	0,338	0,371	0,189	0,050	0,081
451 9	0,030	0,185	0,015	0,059	0,000	0,237	0,206	0,000	0,011	0,000	0,255	0,008	0,281	0,321	0,253	0,158	0,047	0,080
452 0	0,039	0,216	0,016	0,073	0,000	0,303	0,165	0,000	0,014	0,000	0,288	0,009	0,339	0,332	0,274	0,138	0,064	0,099
452 1	0,031	0,196	0,019	0,066	0,000	0,232	0,186	0,000	0,013	0,000	0,333	0,005	0,299	0,398	0,275	0,124	0,089	0,000
452 2	0,031	0,190	0,014	0,058	0,000	0,229	0,182	0,000	0,010	0,000	0,274	0,005	0,303	0,335	0,261	0,131	0,070	0,000
452 3	0,029	0,197	0,018	0,053	0,000	0,186	0,161	0,000	0,007	0,000	0,259	0,004	0,251	0,383	0,251	0,117	0,083	0,000
452 4	0,031	0,194	0,017	0,064	0,000	0,204	0,229	0,000	0,008	0,000	0,277	0,003	0,271	0,404	0,352	0,114	0,065	0,067
452 5	0,028	0,187	0,016	0,068	0,000	0,203	0,176	0,000	0,004	0,000	0,236	0,004	0,277	0,392	0,245	0,000	0,095	0,000
452 6	0,028	0,202	0,023	0,063	0,000	0,180	0,181	0,000	0,004	0,000	0,214	0,004	0,262	0,341	0,238	0,000	0,065	0,000
478 6	0,039	0,000	0,019	0,075	0,014	0,099	0,096	0,000	0,015	0,000	0,262	0,006	0,274	0,400	0,205	0,000	0,171	0,000
478 7	0,036	0,000	0,015	0,067	0,013	0,081	0,070	0,000	0,012	0,000	0,277	0,006	0,240	0,441	0,208	0,000	0,185	0,000
478 8	0,035	0,000	0,017	0,053	0,013	0,058	0,079	0,000	0,011	0,000	0,261	0,004	0,216	0,382	0,210	0,000	0,160	0,000
478 9	0,034	0,000	0,021	0,049	0,012	0,059	0,066	0,000	0,008	0,000	0,201	0,002	0,174	0,334	0,196	0,000	0,119	0,000
479 0	0,034	0,000	0,024	0,076	0,014	0,367	0,156	0,000	0,010	0,000	0,227	0,002	0,322	0,315	0,284	0,000	0,077	0,000
479 1	0,035	0,000	0,027	0,075	0,014	0,317	0,101	0,000	0,009	0,000	0,207	0,003	0,297	0,221	0,193	0,000	0,087	0,000
479 2	0,030	0,000	0,013	0,059	0,011	0,132	0,099	0,000	0,007	0,000	0,210	0,002	0,251	0,319	0,198	0,000	0,121	0,000
479 3	0,032	0,000	0,013	0,065	0,010	0,125	0,097	0,000	0,008	0,000	0,243	0,004	0,264	0,321	0,200	0,000	0,135	0,000
479 4	0,033	0,000	0,024	0,074	0,012	0,078	0,082	0,000	0,013	0,000	0,237	0,005	0,257	0,324	0,193	0,000	0,170	0,000
479 5	0,034	0,000	0,019	0,076	0,010	0,092	0,087	0,000	0,010	0,000	0,235	0,006	0,269	0,324	0,203	0,000	0,166	0,000

	4518	4519	4520	4521	4522	4523	4524	4525	4526	4786	4787	4788	4789	4790	4791	4792	4793	4794	4795
Miristico (C14:0)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Palmitico (C16:0)	12,89	12,81	12,57	13,08	13,02	12,59	12,53	12,70	12,79	13,07	12,94	12,89	12,69	13,19	13,25	13,25	12,29	12,91	12,92
Palmitoleico (C16:1)	0,95	0,96	0,90	0,98	0,96	0,79	0,79	0,87	0,93	0,85	0,80	0,78	0,72	0,93	0,93	0,93	0,83	0,85	0,84
Margarico (C17:0)	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Margaroleico (C17:1)	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06
Stearico (C18:0)	2,20	2,27	2,40	2,25	2,30	2,00	2,00	2,07	2,18	2,13	2,05	1,95	1,91	2,52	2,54	2,59	2,49	2,24	2,20
Oleico (C18:1)	74,41	74,47	73,97	74,16	73,95	75,28	75,35	74,98	74,61	73,15	74,02	74,41	74,77	73,03	72,98	72,86	73,86	73,39	73,36
Linoleico (C18:2)	8,12	8,04	8,47	8,09	8,25	7,89	7,87	7,93	8,08	9,29	8,70	8,51	8,47	8,74	8,72	8,77	8,90	9,10	9,18
Arachico (C20:0)	0,33	0,35	0,38	0,34	0,35	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,32	0,31	0,36	0,36	0,37	0,39	0,34	0,33
Linolenico (C18:3)	0,61	0,61	0,78	0,63	0,67	0,63	0,64	0,62	0,62	0,66	0,66	0,65	0,64	0,73	0,73	0,74	0,71	0,67	0,66
Ecosanoico (C20:1)	0,23	0,24	0,26	0,23	0,24	0,25	0,25	0,24	0,23	0,24	0,25	0,25	0,25	0,23	0,23	0,22	0,26	0,24	0,24
Beenico (C22:0)	0,10	0,11	0,12	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,12	0,10	0,10
Lignocerico (C24:0)	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,07	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04
trans C18:1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,02	0,01	0,01
trans C18:2 +trans C18:3	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

## 2° anno di attività

Durante le giornate di lavorazione al frantoio con il prototipo di estrazione sono stati raccolti i campioni di olive di cultivar frantoio e moraiolo che sono stati utilizzati per la caratterizzazione chimica (6.1.1).

La tabella riporta le caratteristiche chimico - fisiche delle olive sottoposte a trasformazione.

**Tabella.** Risultati delle analisi chimico-fisiche condotte sui campioni di olive.

Data	Cultivar	Umidità (%)	Contenuto di olio (%)	Contenuto di zuccheri (g/kg)	Contenuto in composti fenolici (mg/kg)	Polpa/Nocciolo	Peso medio
30/10/12	Moraiolo	55,6	35,92	112,1	30826	6,64	1,49
07/11/12	Moraiolo	49,6	42,5	88,43	32437	4,87	1,81
23/11/12	Frantoio	47,5	49,26	69,05	25672	4,68	2,06

Tutti gli oli ottenuti sono stati sottoposti a caratterizzazione chimica (6.2.1) che ha permesso di determinare:

- contenuto di acidi grassi liberi (acido oleico%);
- contenuto di perossidi (meq di O<sub>2</sub>/kg di olio);
- assorbimento all'ultravioletto (K<sub>232</sub>; K<sub>270</sub>;ΔK);
- contenuto di composti fenolici (mg/kg);
- contenuto di tocoferoli;
- contenuto in esteri metilici degli acidi grassi;
- contenuto di composti volatili.

I risultati delle principali analisi sono riportate nella tabella sottostante.

**Tabella.** Risultati delle analisi chimico-fisiche condottesui campioni di olio.

Tipo Lavorazione	Numero	Data	Cultivar	Acidi grassi liberi (acido oleico%)	U	Perossidi (meq di O <sub>2</sub> /kg di olio)	U	K232	U	K270	U	ΔK	U	Fenoli totali (mg/kg)	U	Tocoferoli	U	% acido oleico
Messa a punto Aromi	3681	30-ott-12	moraiole	0,23	±0,01	2,3	±0,80	1,62	±0,06	0,11	±0,01	-0,005	±0,01	521	±55	252	±10	76,85
Messa a punto Fenoli	3682	30-ott-12	moraiole	0,26	±0,01	1,4	±0,80	1,86	±0,06	0,15	±0,01	-0,006	±0,01	654	±72	250	±10	77,63
Messa a punto Aromi	3683	30-ott-12	moraiole	0,31	±0,01	1,6		1,89		0,15		-0,007		771	±92	245	±10	77,60
Messa a punto Fenoli	3684	30-ott-12	moraiole	0,26	±0,01	1,6	±0,80	1,8	±0,06	0,14	±0,01	-0,006	±0,01	656	±73	245	±10	77,57
Validazione Fenoli	3685	30-ott-12	moraiole	0,25	±0,01	2,1	±0,80	1,8	±0,06	0,15	±0,01	-0,006	±0,01	598	±65	235	±10	77,54
Validazione Aromi	3686	30-ott-12	moraiole	0,31	±0,01	2,1	±0,80	1,87	±0,06	0,14	±0,01	-0,006	±0,01	712	±81	243	±10	77,62
Campagna olearia	3687	30-ott-12	moraiole	0,26	±0,01	1,9	±0,80	1,55	±0,06	0,12	±0,01	-0,004	±0,01	501	±9	236	±10	77,20
Messa a punto Aromi	3755	5-nov-12	miste vecchie	0,26	±0,01	3,8	±0,80	1,93	±0,06	0,16	±0,01	-0,006	±0,01	782	±94	197	±10	76,73
Messa a punto Aromi	3756	5-nov-12	miste vecchie	0,28	±0,01	3,1	±0,80	1,91	±0,06	0,16	±0,01	-0,006	±0,01	746	±87	208	±10	77,01
Messa a punto Aromi	3757	5-nov-12	miste vecchie	0,24	±0,01	2,6	±0,80	1,81	±0,06	0,15	±0,01	-0,006	±0,01	657	73	208	±10	77,01
Validazione Aromi	3758	5-nov-12	miste fresche	0,23	±0,01	3,0	±0,80	1,95	±0,06	0,18	±0,01	-0,007	±0,01	775	92	237	±10	77,33
Validazione Fenoli	3759	5-nov-12	miste fresche	0,26	±0,01	2,7	±0,80	1,96	±0,06	0,19	±0,01	0,007	±0,01	773	92	200	±10	77,38
Validazione Aromi	3760	5-nov-12	miste fresche	0,21	±0,01	2,8	±0,80	1,91	±0,06	0,17	±0,01	-0,007	±0,01	694	79	195	±10	77,02
Validazione Fenoli	3761	5-nov-12	miste fresche	0,29	±0,01	2,6	±0,80	1,91	±0,06	0,18	±0,01	-0,007	±0,01	751	88	207	±10	77,70
Campagna olearia	3762	5-nov-12	miste fresche	0,13	±0,01	4,6	±0,80	1,48	±0,06	0,12	±0,01	-0,003	±0,01	327	38	234	±10	77,07
Campagna olearia	3763	4-nov-12	frantoio	0,17	±0,01	2,9	±0,80	1,85	±0,06	0,17	±0,01	-0,006	±0,01	710	81	214	±10	77,13
Campagna olearia	3764	4-nov-12	frantoio	0,16	±0,01	5,2	±0,80	1,86	±0,06	0,17	±0,01	-0,006	±0,01	676	76	209	±10	76,94
Validazione Fenoli	3811	7-nov-12	moraiole	0,28	±0,01	2,7	±0,80	1,76	±0,06	0,14	±0,01	-0,006	±0,01	663	74	239	±10	77,06
Validazione Fenoli	3812	7-nov-12	moraiole	0,28	±0,01	2,3	±0,80	1,78	±0,06	0,15	±0,01	-0,006	±0,01	591	64	228	±10	77,07
Validazione Fenoli	3813	7-nov-12	moraiole	0,23	±0,01	2,5	±0,80	1,84	±0,06	0,16	±0,01	-0,007	±0,01	699	79	212	±10	77,10
Validazione Aromi	4035	16-nov-12	frantoio	0,23	±0,01	2,7	±0,80	1,73	±0,06	0,14	±0,01	0,005	±0,01	645	71	191	±10	77,71
Validazione Aromi	4036	16-nov-12	frantoio	0,25	±0,01	2,3	±0,80	1,89	±0,06	0,18	±0,01	-0,006	±0,01	752	88	200	±10	78,27
Validazione Aromi	4037	16-nov-12	frantoio	0,25	±0,01	2,7	±0,80	1,9	±0,06	0,17	±0,01	-0,006	±0,01	713	81	199	±10	78,11
Validazione Aromi	4038	16-nov-12	frantoio	0,24	±0,01	2,9	±0,80	1,86	±0,06	0,17	±0,01	-0,006	±0,01	636	70	204	±10	77,82
Campagna olearia	4039	16-nov-12	frantoio	0,17	±0,01	3,1	±0,80	1,58	±0,06	0,12	±0,01	-0,003	±0,01	369	41	212	±10	77,05
Campagna olearia	4058	16-nov-12	moraiole	0,22	±0,01	2,2	±0,80	1,78	±0,06	0,16	±0,01	-0,006	±0,01	675	75	247	±10	77,70
Campagna olearia	4059	16-nov-12	frantoio	0,25	±0,01	1,7	±0,80	2,03	±0,06	0,17	±0,01	-0,005	±0,01	727	84	192	±10	77,78
Validazione Aromi	4224	23-nov-12	frantoio	0,27	±0,01	4,5	±0,80	1,70	±0,06	0,13	±0,01	-0,005	±0,01	569	61	221	±10	76,72
Validazione Aromi	4225	23-nov-12	frantoio	0,26	±0,01	4,4	±0,80	1,70	±0,06	0,13	±0,01	-0,005	±0,01	573	62	208	±10	76,80
Validazione Aromi	4226	23-nov-12	frantoio	0,25	±0,01	3,2	±0,80	1,73	±0,06	0,14	±0,01	-0,006	±0,01	636	70	194	±10	77,07
Validazione Aromi	4227	23-nov-12	miste fresche	0,24	±0,01	3,3	±0,80	1,71	±0,06	0,13	±0,01	-0,005	±0,01	581	63	202	±10	76,81

### **F 6.1.2 Caratterizzazione microbiologica delle olive dopo frangitura e degli oli monocultivar ottenuti.**

Le paste di oliva prese in esame sono state prodotte con due tipologie diverse di olive (Frantoio e Moraiolo) raccolte in due giorni diversi della campagna olearia 2011 e in quattro giorni della campagna olearia 2012. Per quanto riguarda la campagna 2011, le due tipologie di olive sono state impiegate in 4 linee produttive diverse (lotti). Il campionamento delle paste è stato eseguito in uscita dalla frangitura e i campioni sono stati prelevati in doppio a distanza di qualche minuto tra i due prelievi in modo tale che fossero rappresentativi della massa di olive impiegata per ciascuna linea. Pertanto, il numero totale di campioni di paste analizzato nella fase 6.1.2 per il 2011 è stato di 32, come esemplificato in Tabella 1. Per quanto riguarda la campagna 2012, il campionamento delle paste è stato eseguito non solo in uscita dal frangiture, ma anche dopo gramolatura. Anche in questo caso i campioni sono stati prelevati in doppio a distanza di qualche minuto tra i due prelievi in modo tale che fossero rappresentativi della massa di olive impiegata per ciascuna linea (lotto). Pertanto, il numero totale di campioni di paste analizzato nella fase 6.1.2 per il 2012 è stato di 56, come esemplificato in Tabella 2.

**Tabella 1:** Campioni di paste analizzate durante la campagna olearia 2011.

<b>Tipologia di olive</b>	<b>Data sperimentazione</b>	<b>N° di linee di produzione</b>	<b>N° campioni per ciascuna linea</b>	<b>N° campioni per giorno di sperimentazione</b>
<b>Frantoio</b>	16/11/2011	4	2	8
<b>Frantoio</b>	23/11/2011	4	2	8
<b>Moraiolo</b>	16/11/2011	4	2	8
<b>Moraiolo</b>	23/11/2011	4	2	8
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	32

**Tabella 2:** Campioni di paste analizzate durante la campagna olearia 2012.

<b>Tipologia di olive</b>	<b>Data sperimentazione</b>	<b>N° di linee di produzione</b>	<b>N° campioni per ciascuna linea (paste frante + gramolate)</b>	<b>N° campioni per giorno di sperimentazione</b>
<b>Moraiolo</b>	30/10/2012	6	4	24
<b>Mista</b>	05/11/2012	2	4	8
<b>Moraiolo</b>	07/11/2012	3	4	12
<b>Frantoio</b>	23/11/2012	3	4	12
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	56

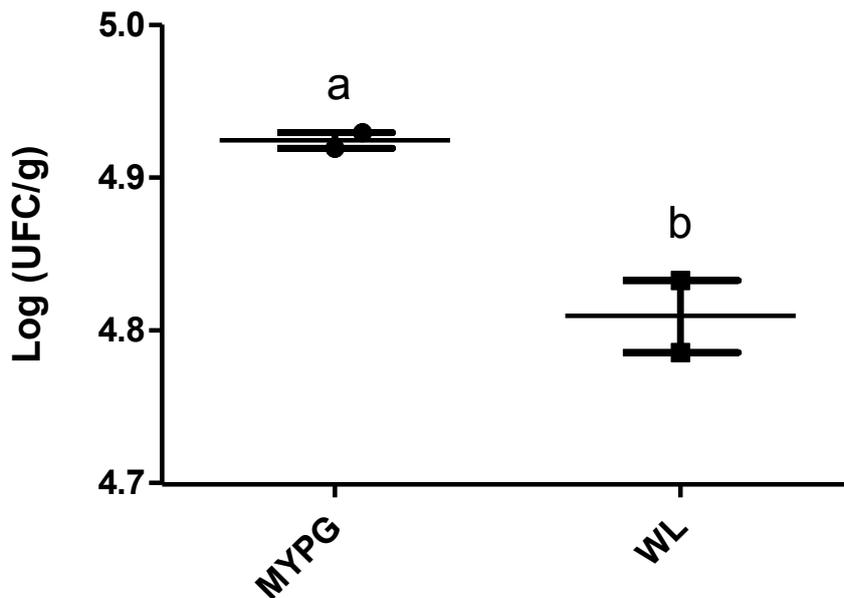
Le analisi microbiologiche condotte sulle paste sono consistite in conte vitali su mezzi selettivi dopo diluizione seriale del campione in soluzione fisiologica. Tutte le analisi sono state eseguite in triplo. I microrganismi ricercati sono stati i seguenti:

1. Lieviti
2. Muffe
3. Carica microbica totale (CMT: lieviti, muffe e batteri)

Il mezzo previsto dal progetto per la ricerca dei lieviti (WL, Oxoid) è stato sostituito dal mezzo MYPG, la cui composizione è riportata in tabella 3. La decisione di apportare questo cambiamento nel protocollo di analisi è maturata a fronte di alcuni risultati preliminari ottenuti analizzando la stessa pasta di olive (in doppio) con entrambi i mezzi di coltura. I risultati ottenuti hanno dimostrato una maggior efficienza del mezzo MYPG rispetto al WL. Come mostrato in figura 1, infatti, il mezzo di crescita MYPG consentiva lo sviluppo di un numero di colonie di lievito significativamente maggiore rispetto a quelle contabili su WL ed oltretutto il loro sviluppo richiedeva un minor numero di giorni di incubazione delle piastre a 30°C (2 invece di 3). Infine, le colonie su MYPG sono risultate più grandi e pertanto più facilmente contabili.

**Tabella 3:** Composizione del mezzo MYPG impiegato per il conteggio dei lieviti.

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Estratto di lievito	3,0
Estratto di carne	5,0
Estratto di malto	5,0
Glucosio	10,0
Agar	20,0



**Figura 1:** Analisi microbiologica della stessa pasta di olive con due mezzi colturali diversi per la quantificazione dei lieviti; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (t-student;  $p < 0,05$ ).

### *1° anno di attività*

#### **Campagna olearia 2011.**

#### **Analisi microbiologica delle paste d'oliva ottenute con la varietà Frantoio.**

In figura 2 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste della varietà Frantoio campionate il 16/11/2011 e il 23/11/2011. La CMT era costituita quasi unicamente da lieviti e muffe. Nei campioni saggiati, i lieviti oscillavano tra  $10^2$  e  $10^4$  UFC/g, mentre le muffe da valori sotto il limite di rilevabilità ( $< 100$  UFC/g) a concentrazioni intorno a  $10^4$  UFC/g.

Per quanto riguarda i risultati del primo giorno di sperimentazione (Fig. 2A), è possibile osservare come la pasta F1a avesse una contaminazione maggiore di lieviti e CMT rispetto alle altre (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ). Il terzo lotto F1c ha mostrato una contaminazione da muffe inferiore a 100 UFC/g.

Per quanto riguarda il secondo giorno di campionamento, nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra le concentrazioni microbiche presenti nelle paste provenienti da linee produttive diverse (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

Infine, l'analisi statistica (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ) condotta per valutare la possibilità che le paste campionate in due momenti diversi, e quindi con gradi di maturità differenti, possedessero o meno una diversa contaminazione microbica ha evidenziato come le olive più mature (23/11/2012) fossero maggiormente contaminate dalle muffe rispetto alle altre (16/11/2011).

### Analisi microbiologica delle paste d'oliva ottenute con la varietà Moraiolo durante la Campagna olearia 2011.

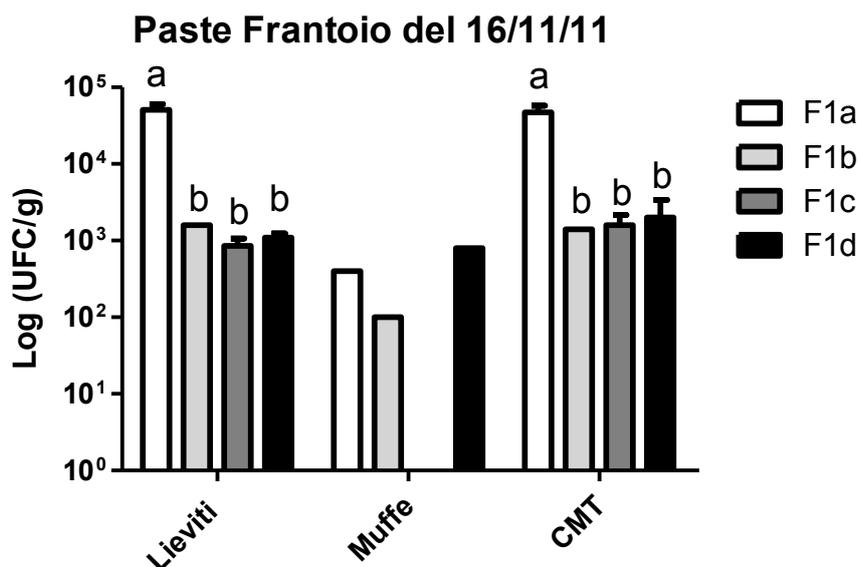
In figura 3 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste della varietà Moraiolo campionate il 16/11/2011 e il 23/11/2011. La CMT era costituita quasi unicamente da lieviti e muffe. In tutti i campioni sia i lieviti sia le muffe erano presenti a concentrazioni intorno a  $10^3$  UFC/g.

Per quanto riguarda i risultati del primo giorno di sperimentazione (Fig. 3A), è possibile osservare come la pasta della M1b avesse una contaminazione di lieviti e CMT maggiore rispetto alle altre (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

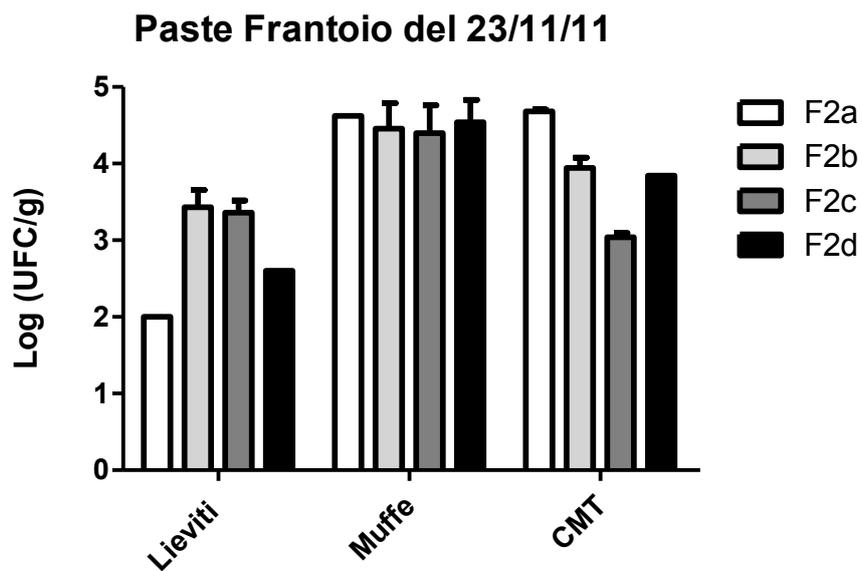
Per quanto riguarda il secondo giorno di campionamento (Fig. 3B), la contaminazione dei lieviti tendeva ad aumentare da M2d a M2c, viceversa quella delle muffe a diminuire (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

Infine, l'analisi statistica (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ) condotta per valutare la possibilità che le paste campionate in due momenti diversi, e quindi con gradi di maturità differenti, possedessero una diversa contaminazione microbica non ha evidenziato nessuna differenza statisticamente significativa.

A

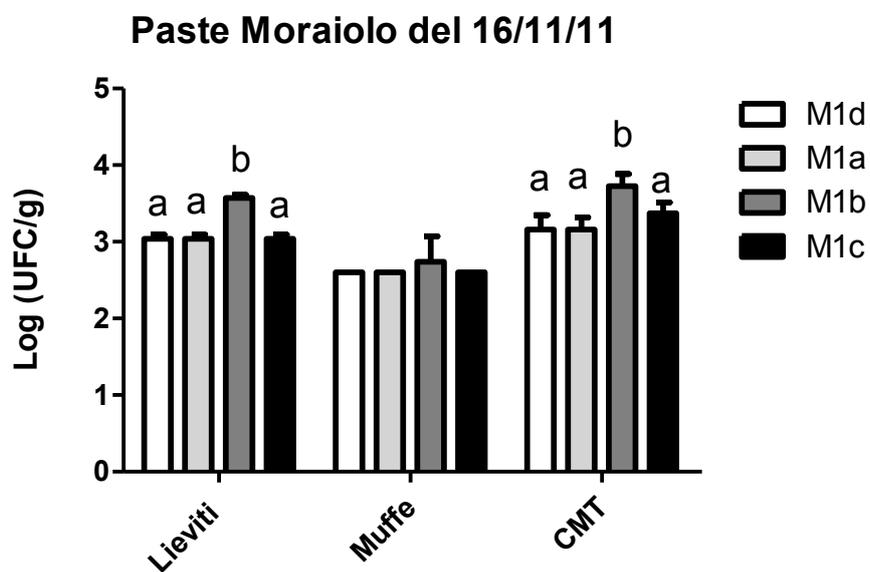


B

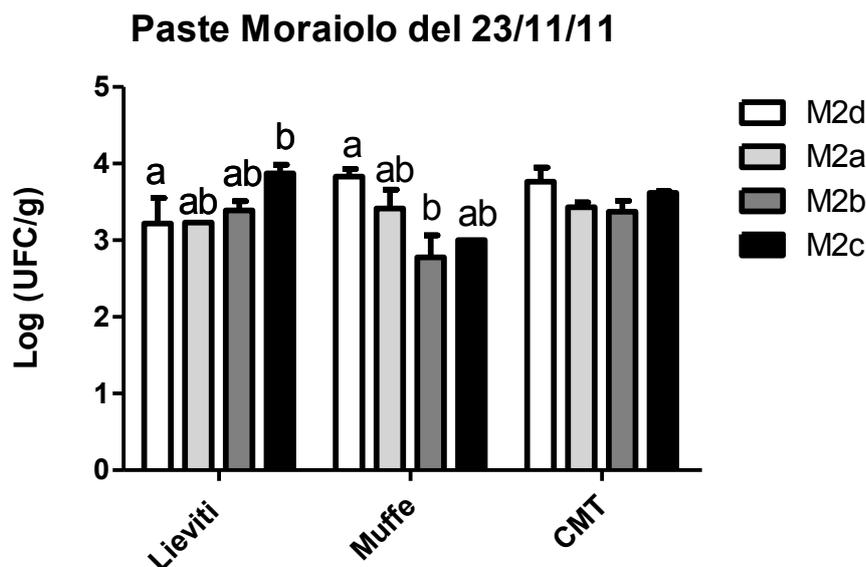


**Figura 2:** Analisi microbiologiche delle paste di oliva Frantoio; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

A



B



**Figura 3:** Analisi microbiologiche delle paste di oliva Moraiolo; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

#### **Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nelle paste.**

Circa 20 isolati di lievito per ciascun campione di paste sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.**

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). L'identificazione è stata poi confermata mediante sequenziamento della regione D1/D2, nonostante questa metodica non fosse stata inserita nella proposta progettuale. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 4 e 5. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi rappresentativi di ciascuna delle specie presenti sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 6.

Specie di lievito da paste Frantoio	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	9	-
<i>Candida adriatica</i>	9	17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9	-
<i>Candida molendinolei</i>	46	66
<i>Candida wickerhamii</i>	9	17
<i>Candida diddensiae</i>	18	-

**Tabella 4:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste da Frantoio.

Specie di lievito da paste Moraiolo	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	36	8
<i>Candida adriatica</i>	7	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14	15
<i>Candida molendinolei</i>	29	53
<i>Candida wickerhamii</i>	7	8
<i>Candida diddensiae</i>	7	8
<i>Candida railenensis</i>	-	8

**Tabella 5:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste da Moraiolo.

**Tabella 6:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>Z. fermentati</i>	<i>C. adriatica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. molendinolei</i>	<i>C. wickerhamii</i>	<i>C. diddensiae</i>	<i>C. railenensis</i>
Esterasi							
Esterasi Lipasi							
β-glucosidasi							

## 2° anno di attività

### Campagna olearia 2012.

#### Analisi microbiologica delle paste d'oliva ottenute con la varietà Moraiolo e miste.

In figura 4 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste (frante e gramolate) della varietà Moraiolo campionate il 30/10/2012. I lotti 2M1a,b,c,d sono le prove di messa a punto del processo, mentre i lotti 2M1e e 2M1f quelli delle prove vere e proprie. Le contaminazioni di batteri e muffe erano significative in tutti i campioni analizzati e a concentrazioni

intorno a  $10^3$  UFC/g. I lieviti in alcuni lotti erano inferiori a 100 UFC/g. Le paste gramolate si sono dimostrate tendenzialmente più contaminate da lieviti rispetto a quelle frante.

In figura 5 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste (frante e gramolate) ottenute da olive miste campionate il 05/11/2012. Le contaminazioni di batteri erano significative in tutti i campioni analizzati e a concentrazioni intorno a  $10^3$  UFC/g, mentre lieviti e muffe erano spesso sotto il limite di rilevabilità. Le paste gramolate si sono dimostrate notevolmente più contaminate da lieviti rispetto a quelle frante, infatti, mentre le prime contenevano lieviti a concentrazioni di  $10^4$  UFC/g, le seconde sotto il limite di rilevabilità (<100 UFC/g).

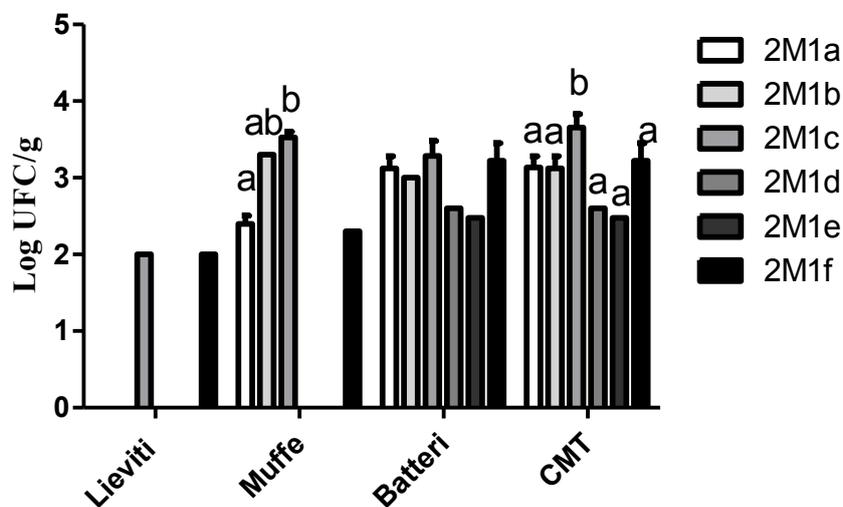
In figura 6 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste (frante e gramolate) campionate il 07/11/2012. Le contaminazioni di batteri e muffe erano significative in tutti i campioni analizzati e a concentrazioni intorno a  $10^3$  UFC/g. Come osservato precedentemente, le paste gramolate si sono dimostrate notevolmente più contaminate da lieviti rispetto a quelle frante, raggiungendo valori intorno a  $10^4$  UFC/g.

#### **Analisi microbiologica delle paste d'oliva ottenute con la varietà Frantoio.**

In figura 7 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sulle paste (frante e gramolate) della varietà Frantoio campionate il 23/11/2012. Le contaminazioni di batteri e muffe erano significative in tutti i campioni analizzati sia alla frangitura che alla gramolatura e a concentrazioni intorno a  $10^3$  UFC/g. I lieviti erano intorno a  $10^3$  UFC/g nelle paste frante, ma raggiungevano valori di  $10^4$  UFC/g nelle paste gramolate.

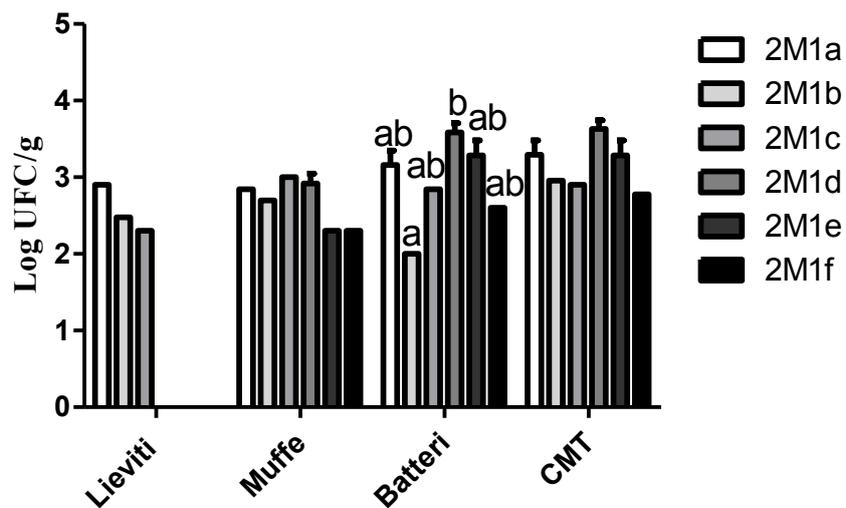
A

#### **Paste frante Moraio del 30/10/2012**



B

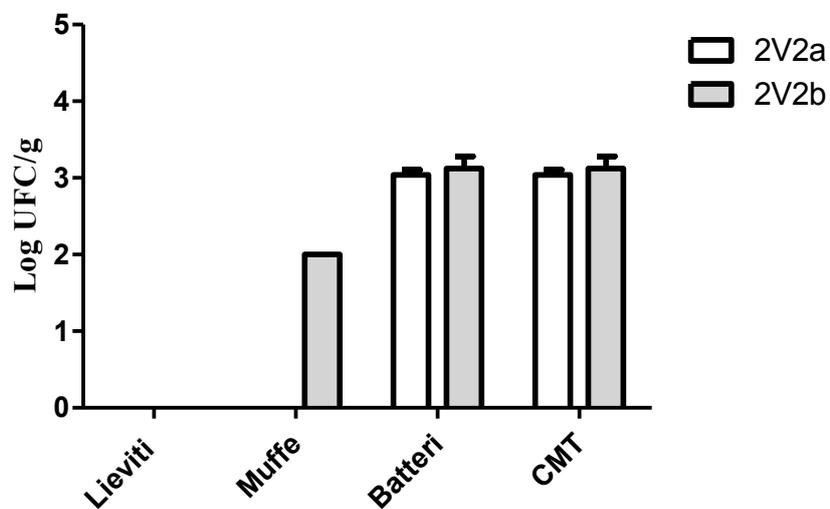
### Paste gramolate Moraiolo del 30/10/2012



**Figura 4:** Analisi microbiologiche delle paste frante (A) e gramolate (B) di olive Moraiolo; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

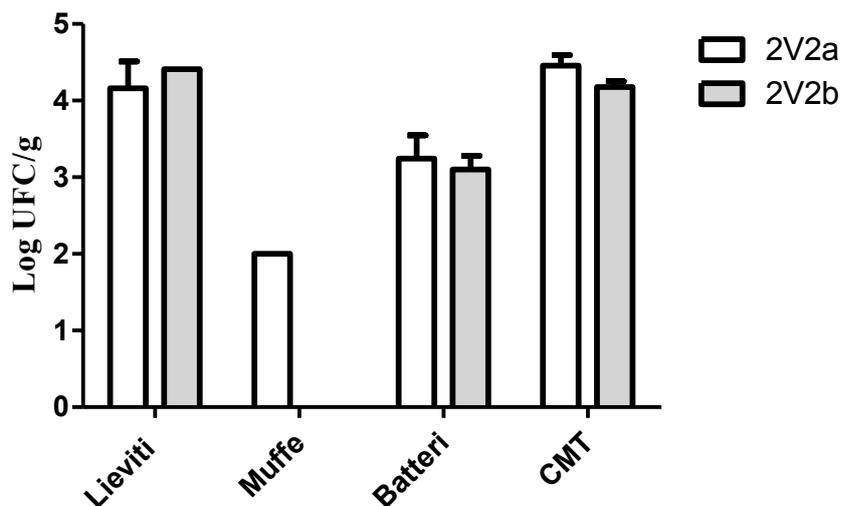
A

### Paste frante olive miste del 05/11/2012



B

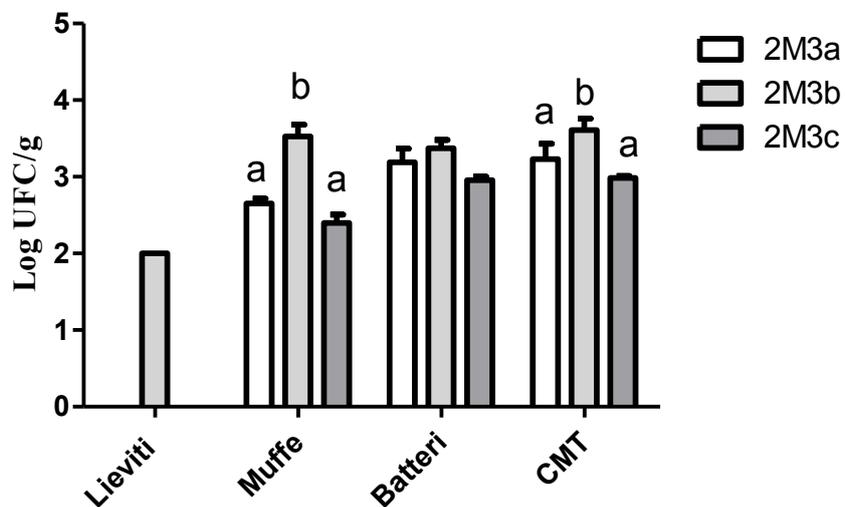
### Paste gramolate olive miste del 05/11/2012



**Figura 5:** Analisi microbiologiche delle paste frante (A) e gramolate (B) di olive miste; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

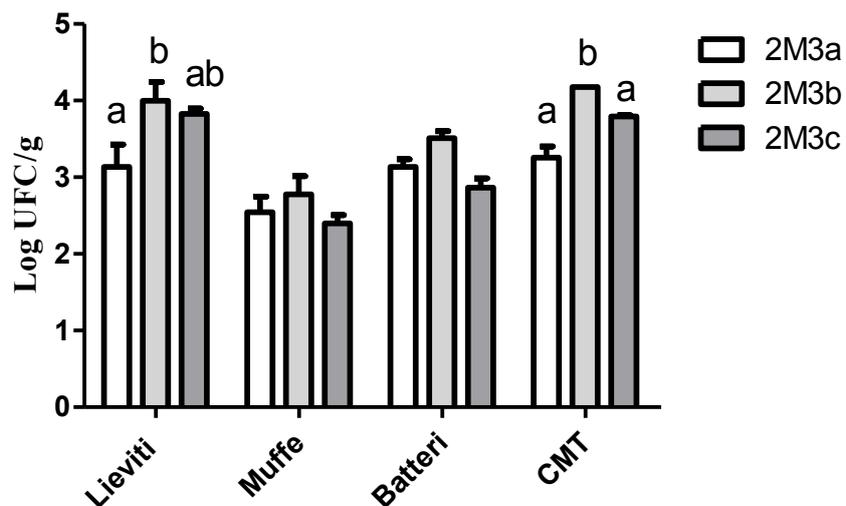
A

### Paste frante Moraio del 07/11/2012



B

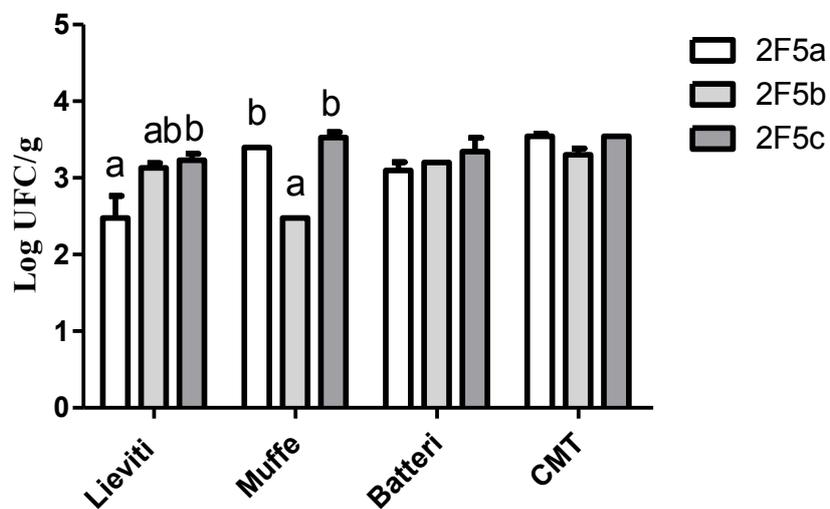
### Paste gramolate Moraiolo del 07/11/2012



**Figura 6:** Analisi microbiologiche delle paste frante (A) e gramolate (B) di Moraiolo; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

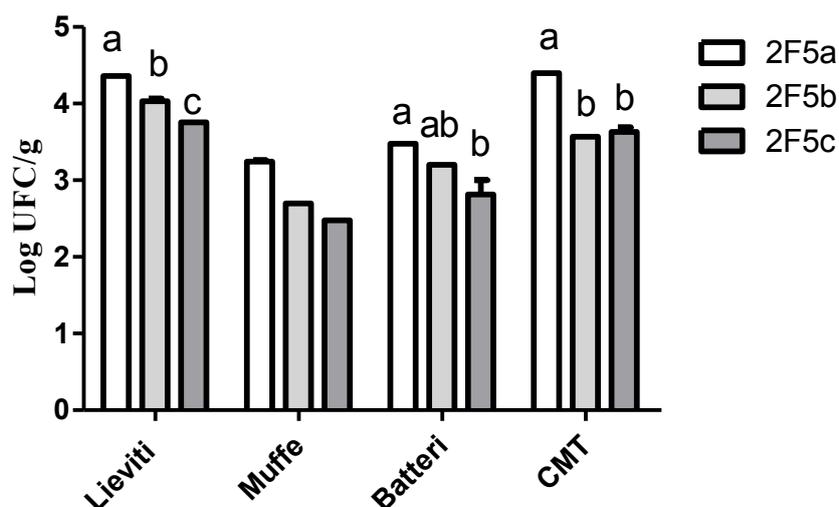
A

### Paste frante Frantoio del 23/11/2012



B

## Paste gramolate Frantoio del 23/11/2012



**Figura 7:** Analisi microbiologiche delle paste frante (A) e gramolate (B) di Moraiolo; a, b, c: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

### Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nelle paste.

Circa 25 isolati di lievito per ciascun campione di paste (frante e gramolate per un totale di 50 isolati per linea produttiva) sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 7, 8, 9, e 10. Alcuni isolati hanno dato inaspettatamente un profilo ITS che non corrispondeva in modo univoco ad un'unica specie di lievito. Pertanto, per identificare a livello di specie gli isolati che sono stati indicati come "sconosciuti" sarà necessario procedere al sequenziamento della regione D1/D2 non prevista dal progetto Oleosalusistem, ma che sarà comunque condotta nei prossimi mesi visto l'interesse per l'argomento di ricerca. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi rappresentanti di ciascuna delle specie presenti sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività

metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 11.

**Tabella 7:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste frante da Moraiolo (30/10 e 7/11) e da olive

Specie di lievito da paste frante	Percentuale di isolati 30/10/2012	Percentuale di isolati 05/11/2012	Percentuale di isolati 07/11/2012
<i>Candida norvegica</i>	50	-	33
<i>Metschnikowia spp.</i>	50	-	-
<i>Pichia anomala</i>	-	-	77

miste (5/11).

**Tabella 8:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste gramolate da Moraiolo (30/10 e 7/11) e da olive miste (5/11).

Specie di lievito da paste gramolate	Percentuale di isolati 30/10/2012	Percentuale di isolati 05/11/2012	Percentuale di isolati 07/11/2012
<i>Pichia kluyveri</i>	50	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	13	-	-
<i>C. molendinolei</i>	6	3	6
<i>C. diddensiae</i>	6	-	-
<i>Pichia pijperi</i>	-	88	87
<i>C. wickerhamii</i>	-	9	3
<i>Saccharomyces spp.</i>	12	-	2
<i>Metschnikowia spp.</i>	-	-	1
Sconosciuti	13	-	1

**Tabella 9:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste frante da Frantoio.

Specie di lievito da paste frante	Percentuale di isolati 23/11/2012
<i>C. molendinolei</i>	5
<i>C. wickerhamii</i>	5
<i>C. railenensis</i>	9
<i>C. norvegica</i>	13
<i>Metschnikowia spp.</i>	5
Sconosciuti	63

Specie di lievito da paste gramolate	Percentuale di isolati 23/11/2012
<i>C. molendinolei</i>	13
<i>P. pijperi</i>	53
<i>C. wickerhamii</i>	26
<i>Saccharomyces spp.</i>	8

**Tabella 10:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nelle paste gramolate da Frantoio.

**Tabella 11:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>C. adriatica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. molendinolei</i>	<i>C. diddensiae</i>	<i>C. wickerhamii</i>	<i>P. pijperi</i>	<i>C. railenensis</i>	<i>P. kluyveri</i>	<i>C. norvegica</i>	<i>P. anomala</i>
Esterasi	■	■	■	■	■	□	■	□	□	■
Esterasi Lipasi	■	□	■	■	■	□	■	□	□	□
β-glucosidasi	■	□	■	■	■	□	■	□	■	■

### F 6.2.2 Caratterizzazione microbiologica degli oli monocultivar ottenuti P4

Gli oli ottenuti dalle paste prese in esame nella fase 6.1.2 sono stati campionati in due giorni della campagna olearia 2011 e in quattro giorni della campagna olearia 2012 per essere sottoposti ad analisi microbiologica. Gli oli sono stati analizzati in uscita dal decanter (par. 2) e dopo filtrazione (par. 3).

#### 1) Analisi microbiologica dell'olio in uscita dal decanter.

L'olio è stato prelevato in uscita dal decanter, prima di essere sottoposto a filtrazione ed analizzato per quantificare i lieviti, le muffe e la CMT. I campioni prelevati sono quelli riportati in tabella 12 per il 2011 e in tabella 13 per il 2012 (dati analizzati in triplo).

**Tabella 12:** Campioni di olio analizzati in uscita dal decanter durante la campagna olearia 2011.

<b>Tipologia di olive</b>	<b>Data sperimentazione</b>	<b>N° di linee di produzione</b>	<b>N° campioni per ciascuna linea</b>	<b>N° campioni per giorno di sperimentazione</b>
<b>Frantoio</b>	16/11/2011	4	1	4
	23/11/2011	4	1	4
<b>Moraiolo</b>	16/11/2011	4	1	4
	23/11/2011	4	1	4
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	16

**Tabella 13:** Campioni di olio analizzati in uscita dal decanter durante la campagna olearia 2012.

<b>Tipologia di olive</b>	<b>Data sperimentazione</b>	<b>N° di linee di produzione</b>	<b>N° campioni per ciascuna linea</b>	<b>N° campioni per giorno di sperimentazione</b>
<b>Moraiolo</b>	30/10/2012	6	1	6
<b>Mista</b>	05/11/2012	2	1	2
<b>Moraiolo</b>	07/11/2012	3	1	3
<b>Frantoio</b>	23/11/2012	3	1	3
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	14

## *1° anno di attività*

### **Campagna olearia 2011.**

#### **Analisi microbiologica dell'olio d'oliva in uscita dal decanter ottenuto con la varietà Frantoio.**

In figura 8 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sull'olio ottenuto dalle olive della varietà Frantoio campionate il 16/11/2011 e il 23/11/2011 in uscita dal decanter. La CMT era costituita quasi unicamente da lieviti e muffe. In tutti i lotti analizzati, i lieviti oscillavano tra valori compresi tra  $10^2$  e  $10^4$  UFC/g, mentre le muffe erano minori o uguali a  $10^2$  UFC/g.

L'analisi statistica dei dati (Fig. 8A), ottenuti per la produzione olearia del 16/11/11, ha dimostrato come differenze significative tra i quattro lotti fossero solo a carico della CMT che è risultata significativamente maggiore nel lotto F1d rispetto agli altri (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ). Le muffe sono risultate sempre a concentrazioni inferiori a  $10^2$  UFC/g.

Per quanto riguarda invece l'analisi statistica dei dati ottenuti durante la produzione del 23/11/2011 (Fig. 8B) è possibile osservare, per i lieviti e la CMT, una tendenza a un incremento di contaminazione dal lotto F1a al lotto F1d.

#### **Analisi microbiologica dell'olio d'oliva in uscita dal decanter ottenuto con la varietà Moraiolo.**

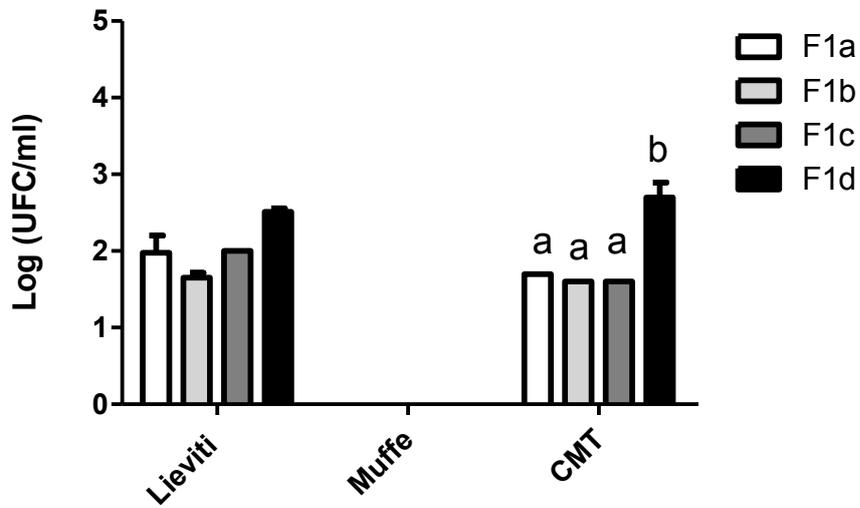
In figura 9 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sull'olio ottenuto dalle olive della varietà Moraiolo campionate il 16/11/2011 e il 23/11/2011 in uscita dal decanter. La CMT era costituita quasi unicamente da lieviti e muffe. In tutti i campioni, i lieviti mostravano valori compresi tra poco più di 10 e circa  $10^4$  UFC/g, mentre le muffe erano minori o uguali a  $10^2$  UFC/g.

L'analisi statistica dei dati ottenuti per la produzione olearia del 16/11/11 ha dimostrato come il lotto M1c fosse significativamente più contaminato da lieviti e CMT rispetto agli altri (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ) (Fig. 9A). Le muffe sono risultate a concentrazioni inferiori a 10 UFC/g.

Per quanto riguarda invece l'analisi statistica dei dati ottenuti durante la produzione del 23/11/2011 (Fig. 9B), è possibile osservare come il lotto M2c fosse significativamente più contaminato da lieviti rispetto agli altri (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata a carico di muffe e CMT nelle quattro linee di produzione.

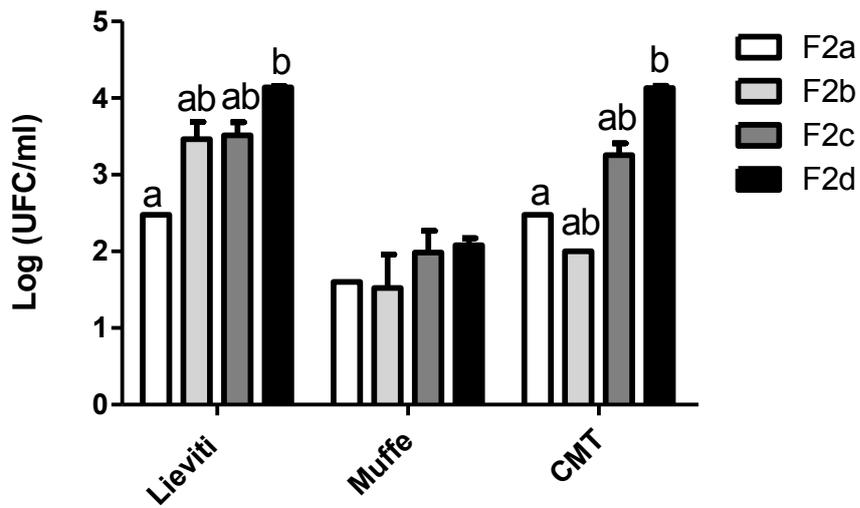
A

### Olio in uscita decanter Frantoio del 16/11/11



B

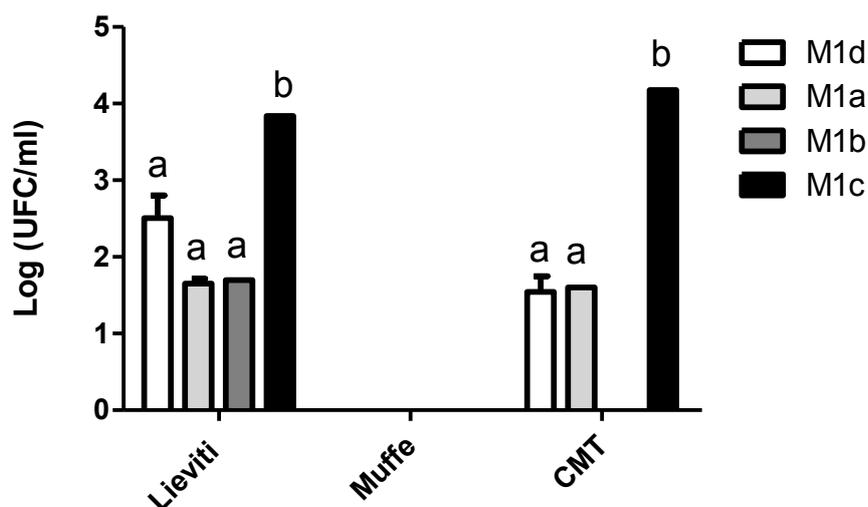
### Olio in uscita decanter Frantoio del 23/11/11



**Figura 8:** Analisi microbiologiche dell'olio ottenuto dalle paste di oliva Frantoio e campionato in uscita dal decanter; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

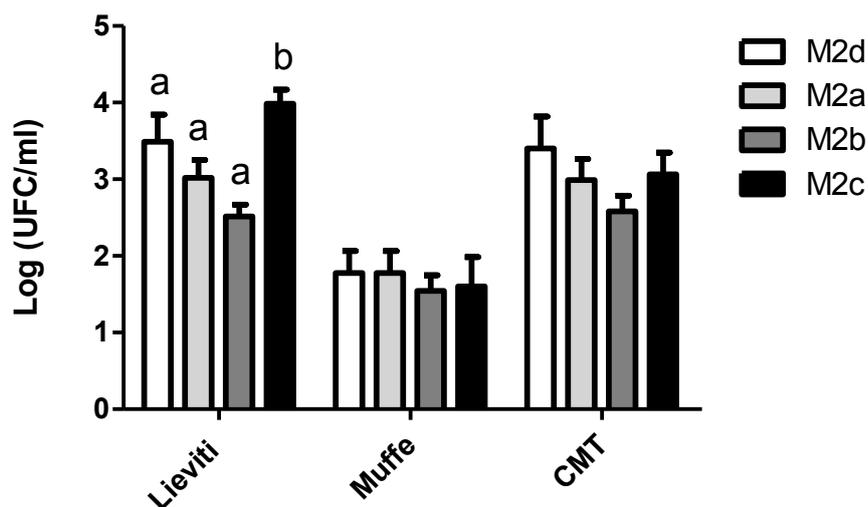
A

### Moraiolo uscita decanter del 16/11/11



B

### Moraiolo uscita decanter del 23/11/11



**Figura 9:** Analisi microbiologiche dell'olio ottenuto dalle paste di oliva Moraiolo e campionato in uscita dal decanter; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

#### **Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nell'olio in uscita da decanter.**

Circa 20 isolati di lievito per ciascun campione di olio in uscita da decanter sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.**

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). L'identificazione è stata poi confermata mediante sequenziamento della regione D1/D2, nonostante tale approccio non fosse previsto dal progetto. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 14 e 15. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi rappresentanti di ciascuna delle specie presenti sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 16.

Specie di lievito da olio in uscita dal decanter Frantoio	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>C. adriatica</i>	-	8
<i>S. cerevisiae</i>	-	8
<i>C. molendinolei</i>	67	8
<i>C. wickerhamii</i>	-	8
<i>C. diddensiae</i>	33	-
<i>C. tenuis</i>	-	68

**Tabella 14:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nell'olio da Frantoio in uscita da decanter.

Specie di lievito da olio in uscita dal decanter Moraiolo	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>C. adriatica</i>	-	8
<i>C. molendinolei</i>	-	33
<i>C. wickerhamii</i>	22	-
<i>C. tenuis</i>	78	59

**Tabella 15:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nell'olio da Moraiolo in uscita da decanter.

**Tabella 16:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>C. adriatica</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. molendinolei</i>	<i>C. wickerhamii</i>	<i>C. diddensiae</i>	<i>C. tenuis</i>
Esterasi						
Esterasi						
Lipasi						
β-glucosidasi						

## 2° anno di attività

### Campagna olearia 2012.

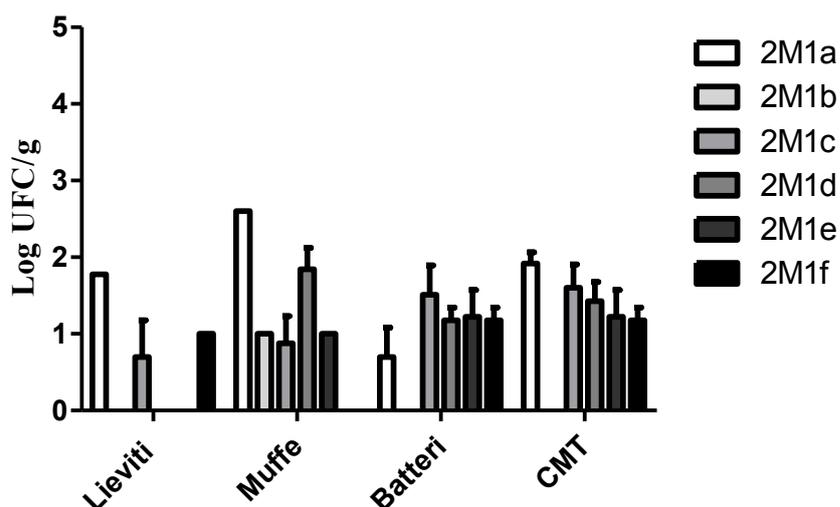
#### Analisi microbiologica dell'olio d'oliva in uscita dal decanter ottenuto con la varietà Moraiolo e miste.

In figura 10, 11 e 12 sono riportati rispettivamente i risultati delle analisi microbiologiche condotte sull'olio in uscita dal decanter ottenuto dalle olive campionate il 30/10/2012, 05/11/2012 e 07/11/2012. In tutti i campioni analizzati, la CMT era costituita da lieviti, batteri e muffe. I lieviti mostravano valori compresi tra poco più di 10 e circa  $10^5$  UFC/g e quelle più elevate erano presenti nel campionamento del 5/11, in particolare nel lotto 2V2a. Muffe e batteri erano sempre a concentrazioni intorno a  $10^2$  UFC/g.

#### Analisi microbiologica dell'olio d'oliva in uscita dal decanter ottenuto con la varietà Frantoio.

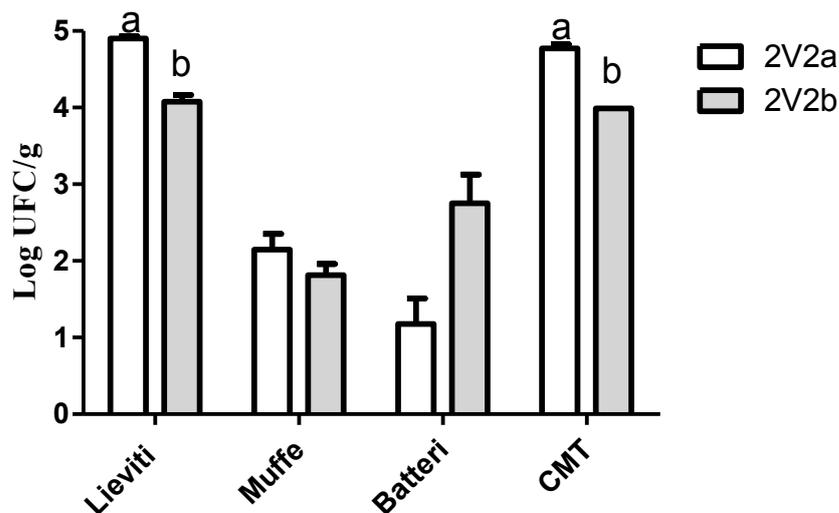
In figura 13 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche condotte sull'olio ottenuto dalle olive della varietà Frantoio campionate il 23/11/2012. La CMT era costituita da lieviti, batteri e muffe. I risultati ottenuti sono analoghi a quelli osservati per il campionamento del Moraiolo in data 7/11/2012 tranne che per il lotto 2F5a. Questo lotto, infatti, è risultato significativamente più contaminato degli altri (ANOVA a 2 vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

#### Moraiolo olio uscita decanter del 30/10/2012



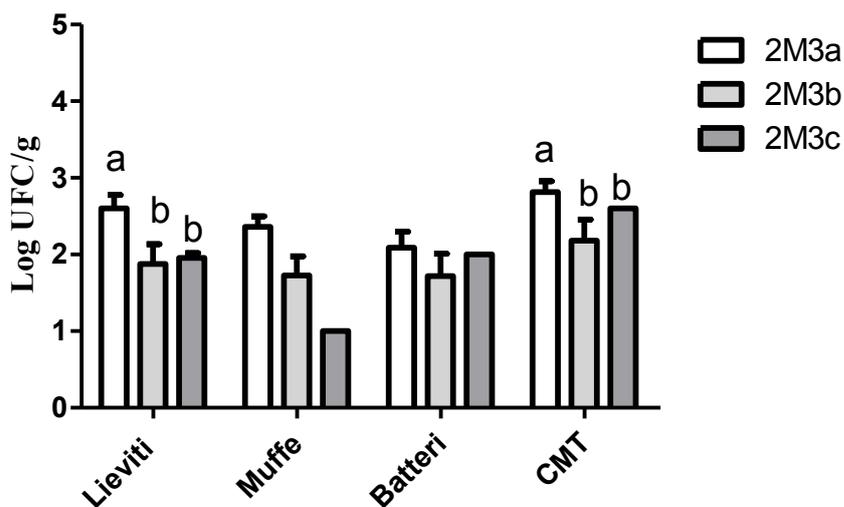
**Figura 10:** Analisi microbiologiche dell'olio in uscita da decanter ottenuto dalle paste di oliva Moraiolo (A) e di olive miste (B); a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

### Olio uscita decanter olive miste del 05/11/2012



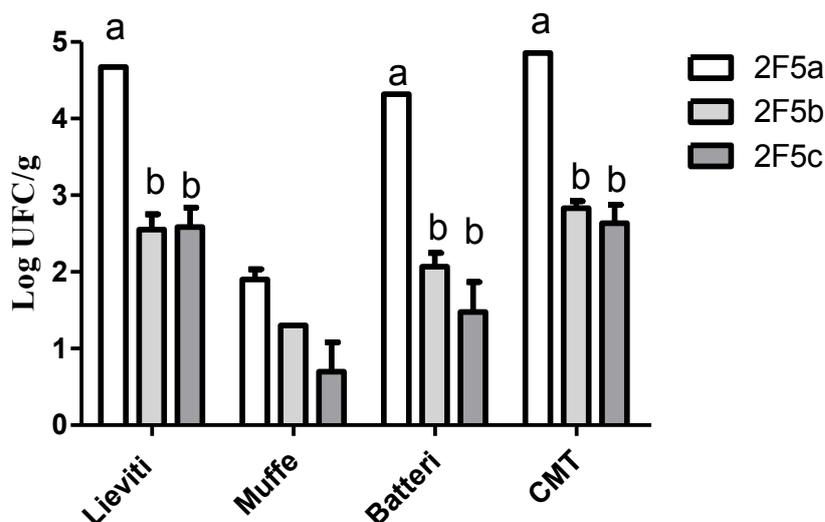
**Figura 11:** Analisi microbiologiche dell'olio in uscita da decanter ottenuto dalle paste di oliva Moraiolo (A) e di olive miste (B); a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

### Olio uscita decanter Moraiolo del 07/11/2012



**Figura 12:** Analisi microbiologiche dell'olio in uscita da decanter ottenuto dalle paste di oliva Moraiolo (A) e di olive miste (B); a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

### Olio uscita decanter Frantoio del 23/11/2012



**Figura 13:** Analisi microbiologiche dell'olio in uscita dal decanter ottenuto dalle paste di oliva Frantoio; a, b: indici diversi indicano differenze statisticamente significative (ANOVA e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

#### **Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nell'olio in uscita dal decanter.**

Circa 25 isolati di lievito per ciascun campione di paste sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.**

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 17 e 18. Per identificare a livello di specie gli isolati che sono risultati "sconosciuti" sarà necessario procedere al sequenziamento della regione D1/D2 non prevista dal presente progetto, ma che sarà comunque eseguita nei prossimi mesi visto l'interesse per l'argomento. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi, rappresentativi di ciascuna delle specie presenti, sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 19.

Specie di lievito da olio in uscita da decanter Moraio	Percentuale di isolati 30/10/2012	Percentuale di isolati 05/11/2012	Percentuale di isolati 07/11/2012
<i>C. molendinolei</i>	13	29	3
<i>C. wickerhamii</i>	62	29	19
<i>C. adriatica</i>	-	24	26
<i>C. tenuis</i>	-	18	52
<i>Metschnikowia spp.</i>	25	-	-

**Tabella 17:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nell'olio da Moraio in uscita da decanter.

Specie di lievito da olio in uscita da decanter Frantoio	Percentuale di isolati 23/11/2012
<i>C. molendinolei</i>	4
<i>C. wickerhamii</i>	4
<i>P. pijperi</i>	4
<i>C. adriatica</i>	29
<i>C. tenuis</i>	59

**Tabella 18:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito nell'olio da Frantoio in uscita da decanter.

**Tabella 19:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>C. adriatica</i>	<i>C. molendinolei</i>	<i>C. wickerhamii</i>	<i>P. pijperi</i>	<i>C. tenuis</i>
Esterasi					
Esterasi					
Lipasi					
$\beta$ -glucosidasi					

## 2) Analisi microbiologica dell'olio dopo filtrazione.

Analisi microbiologiche per quantificare i lieviti, le muffe e la CMT sono state condotte sull'olio, ottenuto dalle paste analizzate nella fase 6.1.2, campionato immediatamente dopo la filtrazione. I campioni prelevati sono quelli riportati in tabella 20 per la campagna olearia 2011 e in tabella 21 per la campagna olearia 2012. Tutti i campioni sono stati analizzati per quantificare lieviti, muffe, CMT e coliformi. La contaminazione da coliformi è risultata assente in tutti i campioni analizzati.

**Tabella 20:** Campioni di olio in uscita dal decanter analizzati nella campagna olearia 2011.

Tipologia di olive	Data sperimentazione	N° di linee di produzione	N° campioni per ciascuna linea	N° campioni per giorno di
--------------------	----------------------	---------------------------	--------------------------------	---------------------------

				<b>sperimentazione</b>
<b>Frantoio</b>	16/11/2011	4	1	4
	23/11/2011	4	1	4
<b>Moraiolo</b>	16/11/2011	4	1	4
	23/11/2011	4	1	4
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	16

**Tabella 21:** Campioni di olio in uscita dal decanter analizzati nella campagna olearia 2012.

<b>Tipologia di olive</b>	<b>Data sperimentazione</b>	<b>N° di linee di produzione</b>	<b>N° campioni per ciascuna linea</b>	<b>N° campioni per giorno di sperimentazione</b>
<b>Moraiolo</b>	30/10/2012	6	1	6
<b>Mista</b>	05/11/2012	2	1	2
<b>Moraiolo</b>	07/11/2012	3	1	3
<b>Frantoio</b>	23/11/2012	3	1	3
			<b>N° totale campioni analizzati</b>	14

### *1° anno di attività*

#### **Campagna olearia 2011.**

##### **Analisi microbiologica dell'olio d'oliva filtrato ottenuto con la varietà Frantoio.**

I campioni di olio filtrato ottenuto dalle olive della varietà Frantoio il 16/11/2011 non hanno mostrato contaminazioni microbiologiche. Per quanto riguarda invece quelli campionati il 23/11/2011, i risultati sono riportati in figura 14 e mostrano come la contaminazione degli oli sia a carico di una popolazione di lieviti compresa tra le 15 e le 50 UFC/100ml. La CMT era costituita quasi unicamente da lieviti. La contaminazione delle muffe è risultata non significativa.

##### **Analisi microbiologica dell'olio d'oliva filtrato ottenuto con la varietà Moraiolo.**

I campioni di olio filtrato ottenuto dalle olive della varietà Moraiolo il 16/11/2011 hanno mostrato solo contaminazioni a carico di muffe (circa 10 UFC/100ml) oltretutto in numeri poco significativi (figura 15A). Per quanto riguarda invece quelli campionati il 23/11/2011, i risultati sono riportati in figura 15B e mostrano come la contaminazione degli oli sia a carico di una popolazione di lieviti compresa tra <1 e le 150 UFC/100ml e una contaminazione di muffe compresa tra <1 e 160

UFC/100ml. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata nella contaminazione microbica tra linee diverse (ANOVA a due vie e Bonferroni test;  $p < 0,05$ ).

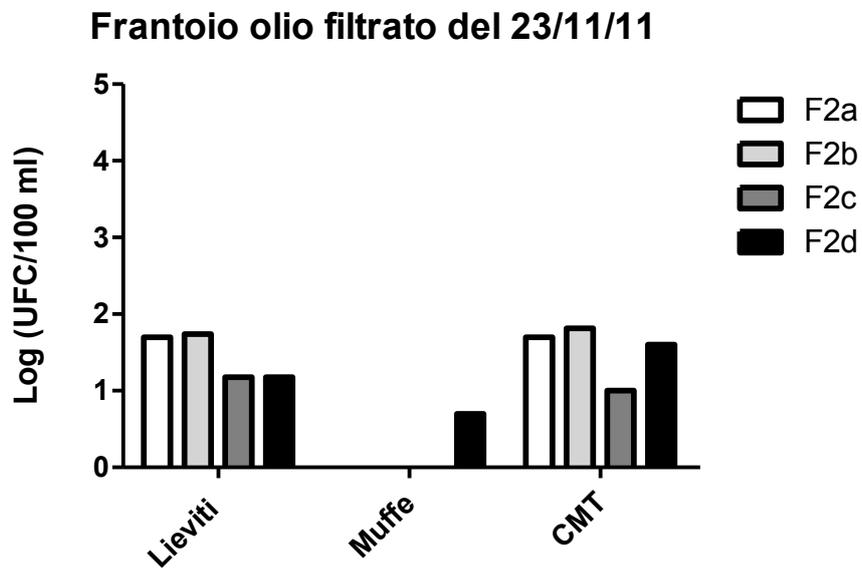
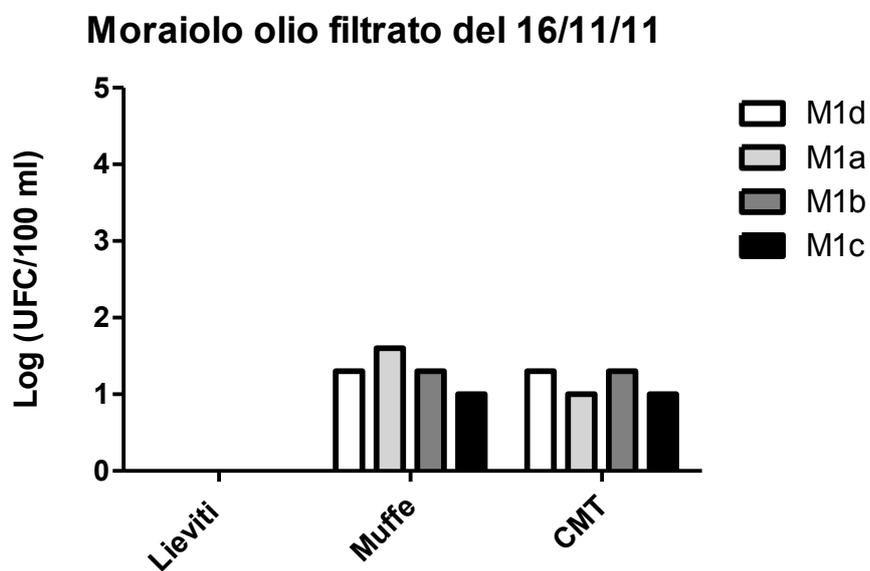


Figura 14: Analisi microbiologiche dell'olio filtrato ottenuto dalle paste di oliva Frantoio.

A



B

### Moraiolo olio filtrato del 23/11/11

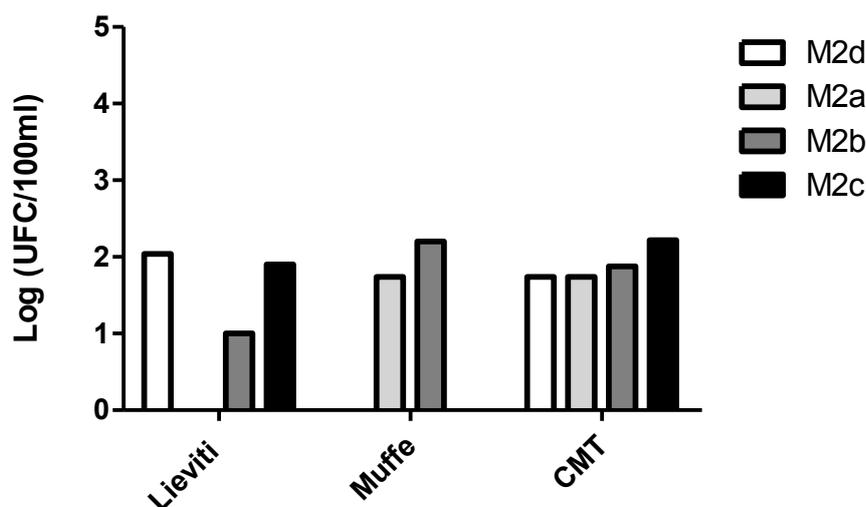


Figura 15: Analisi microbiologiche dell'olio filtrato ottenuto dalle paste di oliva Moraiolo.

#### Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nell'olio filtrato.

Circa 25 isolati di lievito per ciascun campione di olio sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a -80°C.

#### Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). L'identificazione è stata poi confermata mediante sequenziamento della regione D1/D2 nonostante questo approccio non fosse stato previsto dal progetto. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 22 e 23. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi rappresentativi di ciascuna delle specie presenti sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 24.

Specie di lievito da olio filtrato Frantoio	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>Pichia manshurica</i>	-	100

**Tabella 22:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito negli oli filtrati ottenuti da Frantoio.

Specie di lievito da olio filtrato Moraiolo	Percentuale di isolati I° campionamento	Percentuale di isolati II° campionamento
<i>C. adriatica</i>	-	67
<i>C. molendinolei</i>	-	33

**Tabella 23:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito negli oli filtrati ottenuti da Moraiolo.

**Tabella 24:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>C. adriatica</i>	<i>C. molendinolei</i>	<i>P. manshurica</i>
Esterasi			
Esterasi Lipasi			
$\beta$ -glucosidasi			

## 2° anno di attività

### Campagna olearia 2012.

#### Analisi microbiologica dell'olio d'oliva dopo filtrazione.

La contaminazione microbica di tutti gli oli da olive Moraiolo e miste campionati il 30/10/2012, 05/11/2012 e 07/11/2012 è risultata inferiore al limite di rilevabilità (1 UFC/100ml). Una contaminazione inferiore alle 10<sup>2</sup> UFC/100ml è stata riscontrata solo per gli oli ottenuti da Frantoio e campionati il 23/11/2012 (fig. 16).

## Olio filtrato Frantoio del 23/11/2012

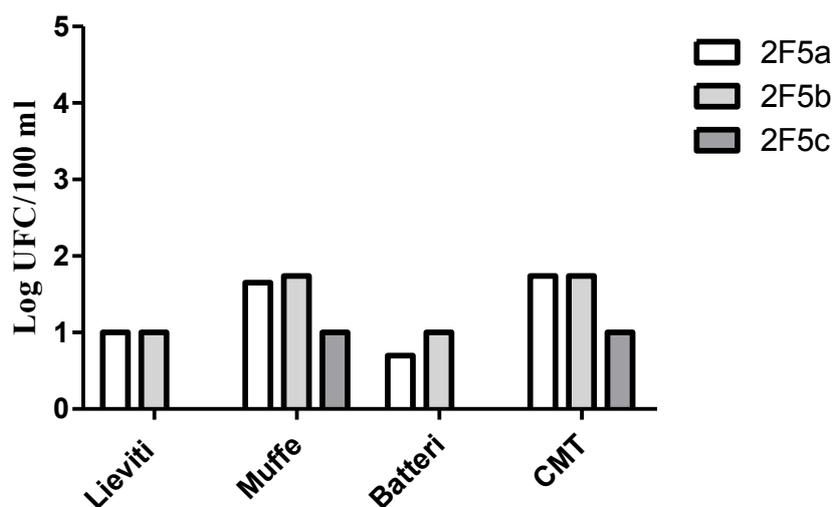


Figura 16: Analisi microbiologiche dell'olio filtrato ottenuto dalle paste di oliva Frantoio.

### Isolamento e purificazione dei lieviti presenti nell'olio filtrato.

Circa 10 isolati di lievito per ciascun campione di olio sono stati scelti in modo *random* e purificati mediante strisci successivi per poi essere coltivati su un mezzo di coltura ottimale. Al raggiungimento della fase stazionaria gli isolati sono stati centrifugati e i *pellet* risospesi in un mezzo contenente glicerina al 50% (v/v) per poi essere conservati a -80°C.

### Identificazione dei lieviti a livello di specie e caratterizzazione a livello di ceppo.

L'identificazione a livello di specie dei lieviti isolati e purificati è stata condotta mediante PCR della regione ITS dell'rDNA e alla successiva digestione dell'amplicone con enzimi di restrizione (RFLP). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 25. Gli isolati sono stati poi sottoposti a RAPD PCR con il primer M13 al fine di caratterizzare gli isolati anche a livello di ceppo. Alcuni ceppi rappresentanti di ciascuna delle specie presenti sono stati infine caratterizzati fenotipicamente per valutare le loro attività metaboliche utilizzando il saggio miniaturizzato API Zym commercializzato dalla Biomerieux. I risultati ottenuti per le capacità enzimatiche di interesse per l'olio sono riportate in tabella 26.

**Tabella 25:** Percentuali di isolamento delle varie specie di lievito negli oli filtrati ottenuti da Frantoio.

Specie di lievito da olio filtrato Frantoio	Percentuale di isolati 23/10/2012
<i>C. tenuis</i>	79
<i>C. molendinolei</i>	14
<i>P. pijperi</i>	7

**Tabella 26:** Attività enzimatiche dei lieviti identificati (saggi condotti su 3 ceppi per ciascuna specie). Il rettangolo colorato indica la presenza dell'attività.

	<i>C. tenuis</i>	<i>P. pijperi</i>	<i>C. molendinolei</i>
Esterasi			
Esterasi			
Lipasi			
$\beta$ -glucosidasi			