



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE

ALIMENTARI E AMBIENTALI

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

***Valorizzazione di scarti dell'industria olearia per la
produzione di nuovi prototipi di prodotti da forno***

***Exploitation of wastes from the olive oil industry for
the manufacturing of new prototypes of leavened
baked goods***

Relatore:

Prof.ssa Lucia Aquilanti

Tesi di Laurea di:

Alessandra Beldomenico

Correlatore:

Dott.ssa Federica Cardinali

Sessione Estiva

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. PROCESSO DI ESTRAZIONE DELL'OLIO DI OLIVA E SCARTI AD ESSO ASSOCIATI	1
1.1.1 Acque di vegetazione	4
1.1.2 Sansa di oliva	7
1.2 SANSA DI OLIVA COME FONTE DI COMPOSTI FUNZIONALI E/O BIOATTIVI	8
1.2.1 Polifenoli	8
1.2.2 Fibra	10
1.3 PROPRIETÀ SALUTISTICHE E POTERE ANTIOSSIDANTE DEI POLIFENOLI CONTENUTI NELLA SANSA DI OLIVA	10
1.4. RECENTI APPLICAZIONI DI SCARTI DELL'INDUSTRIA OLEARIA PER LA PRODUZIONE DI ALIMENTI	12
1.4.1. Applicazione della sansa di oliva fermentata	12
1.4.2. Applicazioni del nocciolo e dei semi dell'oliva	15
1.4.3. Applicazioni di foglie di olivo	17
1.4.4. Oli edibili arricchiti con composti fenolici	19
2. SCOPO DEL LAVORO	21
3. MATERIALI E METODI	22
3.1. DISEGNO SPERIMENTALE	22
3.2. ALLESTIMENTO PROVA DI PANIFICAZIONE CON FARINA 0	23
3.3. ALLESTIMENTO PROVA DI PANIFICAZIONE CON FARINA INTEGRALE	24
3.4. ANALISI MICROBIOLOGICHE	25
3.5. DETERMINAZIONE DEL VOLUME DEL PANE	27
3.6. DETERMINAZIONE DELLA TEXTURE DEL PANE	27
3.7. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI POLIFENOLI DEL PANE	27
3.8. ANALISI SENSORIALE	28
3.9. ANALISI STATISTICA	29
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	30
4.1. CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DEGLI IMPASTI PRIMA E DOPO LA LIEVITAZIONE. 30	
4.2. CARATTERIZZAZIONE DEL PANE	32
5. CONCLUSIONI	37
6. BIBLIOGRAFIA	38

1. INTRODUZIONE

1.1. Processo di estrazione dell'olio di oliva e scarti ad esso associati

Olea europaea L., comunemente denominata olivo, è un albero da frutto coltivato da più di 7000 anni e molto diffuso nel bacino del Mediterraneo (Cavalheiro *et al.*, 2015) soprattutto in Spagna, Italia e Grecia. In queste aree, la produzione di olive copre circa il 97% dell'intera produzione mondiale con quasi 10 milioni di ettari di terreno coltivati (IOOC 2017).

Le olive ottenute da questa pianta possono essere consumate come frutto da tavola, dopo aver subito varie lavorazioni, oppure possono costituire la materia prima di partenza per la preparazione di svariati prodotti alimentari, tra cui l'olio di oliva. In particolare, la produzione di olio di oliva, date le sue qualità nutrizionali, organolettiche e funzionali, rappresenta una delle più importanti porzioni del settore agro-alimentare nel mondo, generando, ogni anno, una vasta quantità di scarti e di sottoprodotti che devono essere correttamente gestiti o, se non recuperati, opportunamente smaltiti (Mirabella *et al.*, 2014).

L'estrazione dell'olio d'oliva può essere effettuata con diverse metodologie e con l'impiego di diversi macchinari. In particolare, per la produzione di olio di oliva vergine, i metodi di estrazione impiegati sono esclusivamente meccanici e non richiedono l'uso di solventi chimici. Tra i piccoli-medi produttori, il metodo di estrazione meccanico a pressione (o metodo discontinuo) è quello più diffuso, mentre, nelle grandi industrie del settore agroalimentare, prevalgono il metodo di estrazione a due fasi e/o il metodo di estrazione a tre fasi (metodo continuo) (Alshraideh & Qdais 2016).

Tutti i processi di estrazione dell'olio di oliva prevedono delle fasi in comune:

- raccolta dei frutti – a mano o meccanizzata;
- lavaggio dei frutti – processo con cui si mira alla rimozione di piccoli rami, foglie, insetti etc, che non partecipano al processo di estrazione dell'olio e potrebbero, inoltre, danneggiare gli impianti utilizzati;
- molitura o frangitura – fase che permette la fuoriuscita dei succhi contenuti nella polpa del frutto; la molitura prevede l'uso di molazze, mentre nella frangitura vengono utilizzati dei frangitori meccanici, ad esempio a dischi o a martelli;

- gramolatura – rimescolamento lento e continuo della pasta di olive a temperatura controllata, effettuato al fine di aumentare la resa in olio e favorire la coalescenza delle goccioline lipidiche, così che risulti più facile separarle dal materiale di scarto;
- spremitura delle olive – estrazione, dalla sansa di oliva, del mosto oleoso, costituito approssimativamente dall'80% di olio e dal 20% di acqua;
- centrifugazione – separazione della frazione oleosa contenuta nel mosto dalla frazione acquosa, grazie all'utilizzo di centrifughe che, con una vorticoso rotazione di piatti rotanti, separano le due componenti in base al diverso peso specifico.

In dettaglio, l'estrazione dell'olio tramite metodo discontinuo a pressione viene effettuata inserendo, all'interno di un cilindro forato, molteplici diaframmi filtranti in fibra vegetale o sintetica, contenenti sansa di oliva proveniente dal processo di molitura. Tali diaframmi, chiamati anche fiscoli, vengono impilati l'uno sull'altro alternati a dischi di acciaio, formando una colonna che, una volta caricata, viene inserita all'interno di una pressa. Grazie alla forte pressione esercitata dalla pressa sui dischi, la sansa di oliva, frazione solida composta da frammenti di polpa, nocciolo e bucce, viene separata dall'olio di oliva. Tale metodo, seppur si caratterizzi per la produzione di un olio di elevata qualità organolettica e sensoriale, ha dei costi di gestione ingenti a causa dell'elevata manodopera richiesta per le operazioni di carico e scarico della colonna e di gestione dei diaframmi filtranti. In particolare, i diaframmi richiedono un'elevata e costante pulizia al fine di evitare che i residui delle olive rimangano incastrati all'interno delle fibre. Tale evenienza potrebbe, infatti, causare lo sviluppo di muffe e cattivi odori che potrebbero incidere negativamente sulla qualità finale dell'olio.

I metodi di estrazione continui, invece, prevedono l'estrazione dell'olio tramite centrifugazione attraverso l'uso di macchinari rotanti chiamati *decanter*. Questi ultimi, dopo essere stati caricati con la sansa d'oliva, permettono la separazione tramite rotazione forzata dell'olio di oliva, che affiora in superficie, dai residui solidi e dai residui acquosi, che vengono definiti acque reflue o acque di vegetazione.

I metodi continui vengono preferiti rispetto al metodo discontinuo, in quanto, grazie all'utilizzo di macchinari e impianti a ciclo continuo, i tempi di lavorazione risultano inferiori, consentendo di lavorare una quantità molto più elevata di materia prima.

Durante la fase di gramolatura, sia nei metodi continui sia nel metodo discontinuo, il controllo di parametri quali tempo e temperatura è essenziale per l'ottenimento di un prodotto di qualità elevata. Infatti, al fine di evitare fenomeni di ossidazione della pasta di olive che potrebbero compromettere le caratteristiche organolettiche del prodotto finale e portare ad una diminuzione di sostanze altamente termolabili come vitamine e polifenoli, si sceglie di operare per tempi brevi (10-40 minuti) ad una temperatura che oscilla tra i 25°C e i 27°C, e mai superiore ai 30°C.

Per quanto riguarda il sistema di estrazione a due fasi, esso non prevede l'aggiunta di acqua al *decanter*, ma l'aggiunta di un ridotto quantitativo di acqua alla fine del processo di gramolatura per migliorare la viscosità della pasta di olive prodotta; di conseguenza, i prodotti che si ottengono a fine processo sono due: una frazione liquida costituita da olio (circa 200 kg su 1000 kg di olive) e una pasta umida semi-solida dalla composizione eterogenea, contenente frammenti di buccia, di nocciolo, di semi e residui di polpa di oliva, con un contenuto di acqua variabile dal 18 al 27% (circa 800 kg su 1000 kg di olive). Al contrario, nel sistema di estrazione a tre fasi, si aggiunge acqua direttamente al *decanter* e si ottiene così la produzione di tre diverse frazioni: la pasta di olive, che rappresenta la frazione solida (550 kg su 1000 kg di olive), e due frazioni liquide (210 kg di olio e 1,6 m³ di acqua di vegetazione su 1000 kg di olive).

La quantità di acqua utilizzata durante il processo di estrazione a due fasi varia da 0,2 a 0,3 t/m³, ma risulta essere nettamente inferiore rispetto alla quantità utilizzata e prodotta nel sistema di estrazione a tre fasi (Servili *et al.*, 2012). In quest'ultimo, infatti, durante la centrifugazione della pasta di olive, viene aggiunta un'ingente quota di acqua, circa 50 L per 100 kg di pasta di olive (Roig *et al.*, 2006).

Le acque reflue o acque di vegetazione prodotte durante l'intero processo costituiscono un prodotto di scarto dall'elevato potere inquinante, e devono essere quindi smaltite in modo corretto.

1.1.1 Acque di vegetazione

Le acque di vegetazione costituiscono la frazione liquida proveniente dai processi di estrazione continui, in particolare dal processo di estrazione a tre fasi, e sono costituite principalmente da acqua proveniente dalle olive stesse (acqua naturalmente presente nelle strutture cellulari della drupa), acqua di diluizione della pasta di olive e acqua usata durante il lavaggio dei macchinari. Le acque di vegetazione contengono la quasi totalità delle sostanze solubili contenute nel frutto e presentano in media valori di pH tendenzialmente acidi, variabili tra 4 e 6, definiti dalla presenza di acidi, tra cui acido malico, acido tartarico, acido citrico e acido succinico. Tali valori di pH, però, possono subire delle variazioni a seguito dell'instaurarsi di fenomeni di fermentazione spontanea indesiderati durante lo stoccaggio. La loro composizione e la quantità percentuale delle molecole che le compongono variano in relazione alla cultivar delle olive, al clima di coltivazione e alla tecnica di estrazione dell'olio utilizzata. Nonostante ciò, le sostanze riscontrate in maggior quantità risultano essere: polisaccaridi, zuccheri semplici, polialcoli, proteine, acidi grassi a catena lunga e polifenoli (Ranalli *et al.*, 2003).

Considerate materiale di scarto dell'industria olearia, le acque di vegetazione sono dunque gestite come un rifiuto. Il loro smaltimento prevede, nella maggior parte dei casi, il loro spargimento sui suoli agricoli. In Italia, in particolare, l'impiego e lo smaltimento delle acque di vegetazione, provenienti sia da frantoi a ciclo continuo (estrazione a due o tre fasi) che discontinuo (estrazione meccanica), insieme ad altri scarti provenienti dalla lavorazione delle olive, è stato normato dalla legge 574/96 "*Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi dei frantoi oleari*" (pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 265 del 12 novembre 1996), in cui, oltre alle tecniche stabilite per il loro spandimento nei terreni, vengono stabiliti i limiti di acque di vegetazione, variabili da regione a regione, da potervi riversare.

All'interno delle acque di vegetazione è possibile riscontrare composti quali azoto, fosforo, potassio e vari sali minerali, che risultano essere particolarmente importanti ed indispensabili soprattutto per i suoli adibiti a coltivazione. Tuttavia, tali acque si caratterizzano anche per la presenza di ingenti quantità di molecole lipidiche e fenoliche, il cui smaltimento nell'ambiente potrebbe rappresentare un serio problema per il suolo. Le molecole in questione, in particolar modo i composti fenolici, note le loro proprietà

antimicrobiche e fitotossiche, i) rallentano i processi di trasformazione dei residui organici, ii) mostrano una forte resistenza alla biodegradazione, risultando quindi tossiche e altamente inquinanti per i suoli agricoli, iii) provocano danni alla fertilità dei terreni e alle falde acquifere sottostanti, compromettendo l'intero agro-sistema (Zirehpour *et al.*, 2014). Inoltre, durante lo stoccaggio delle acque di vegetazione, non è raro l'instaurarsi di fenomeni di fermentazione spontanea, che provocano l'abbassamento del pH totale delle acque, la produzione di gas maleodoranti e la diminuzione della concentrazione di sostanze organiche fermentescibili (zuccheri semplici, polisaccaridi, ecc.) (McNamara *et al.*, 2008).

Al fine di quantificare e analizzare il potere inquinante di tali acque reflue viene analizzata la domanda chimica di ossigeno (COD), che rappresenta la quantità di ossigeno impiegata per ossidare composti inquinanti di natura organica ed inorganica presenti in una determinata quantità di acqua. Nel caso delle acque di vegetazione, la COD è piuttosto elevata (Paraskeva *et al.*, 2006), a dimostrazione di come lo smaltimento di ingenti quantità di acque di vegetazione nei terreni non sia la miglior soluzione.

Una delle possibili alternative da adottare con lo scopo di ridurre il potere altamente inquinante e quindi di moderare eventuali danni apportati ai terreni agricoli, prevede il trattamento delle acque di vegetazione attraverso diversi metodi di depurazione, che hanno come obiettivo primario l'eliminazione della maggior parte dei residui solidi e molecole organiche e inorganiche poco bio-degradabili e tossiche. I metodi di depurazione possono essere eseguiti attraverso l'impiego di trattamenti filtranti, tra cui l'ultrafiltrazione, la nano-filtrazione e l'osmosi inversa, o combinazioni di esse (Paraskeva *et al.*, 2007; Cassano *et al.*, 2013). Tali trattamenti possono essere, inoltre, applicati per la depurazione di acque e rifiuti oleari, al fine di poterli impiegare come materiale combustibile (pellet), come supporto per l'alimentazione zootecnica o come materiale fertilizzante per i terreni agricoli.

Lo smaltimento delle acque reflue e, di conseguenza, lo spargimento di prodotti inquinanti e pericolosi nei suoli agricoli potrebbe essere ulteriormente ridotto se parte di queste acque venissero recuperate al fine di isolare ed estrarre da esse molecole biologicamente importanti e con potenziali proprietà benefiche per l'uomo, tra cui le sostanze fenoliche. Tali sostanze possono essere, infatti, utilizzate per l'arricchimento e la produzione di prodotti funzionali e a elevato valore biologico, sia nel settore alimentare

sia in quello farmaceutico o cosmetico (Goula *et al.*, 2015). Infatti, nonostante le sostanze fenoliche contenute abbiano un impatto negativo dal punto di vista ambientale, queste molecole risultano particolarmente interessanti dal punto di vista della nutrizione umana, in quanto rappresentano una fonte naturale ed economica di antiossidanti (Bertin *et al.*, 2011). Le molecole di natura fenolica sono in grado di apportare numerosi benefici, come:

- inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità;
- produzione di leucotrieni nel sistema immunitario umano;
- attività antimicrobica testata *in-vitro* (De Marco *et al.*, 2007).

In particolare, la componente fenolica presente nelle acque di vegetazione è costituita per lo più da flavonoidi, come luteolina, luteolina-7-glucoside, quercetina e rutina (Pietta, 2000). La struttura chimica di tali sostanze permette loro di agire come molecole ad azione antiossidante, prevenendo i molteplici danni causati dalle specie reattive dell'ossigeno che si formano durante i processi di ossidazione (Procházková *et al.*, 2011). Ciò rende le acque di vegetazione uno dei prodotti di scarto delle olive potenzialmente riutilizzabili, al fine di sfruttare la presenza al suo interno di sostanze ad azione benefica per l'uomo.

Un'altra molecola fenolica ampiamente studiata è l'idrossitirosolo, un composto ad azione antimicrobica ampiamente presente nelle acque di vegetazione e nella sansa di olive. Infatti, le sue proprietà sono già note all'industria enologica, in cui viene impiegata come conservante alternativo all'anidride solforosa, la quale, se utilizzata in dosi eccessive, potrebbe risultare tossica per l'organismo umano (Ruiz-Moreno *et al.*, 2015). Lo studio condotto da Sabatini e collaboratori (2010) mira al recupero e al successivo incapsulamento di molteplici molecole polifenoliche, tra cui l'idrossitirosolo, contenute nei vari scarti dell'industria olearia. Lo scopo di tale studio riguarda più precisamente l'impiego di questi ultimi sotto forma di pastiglie o di polveri, non solo nel settore farmaceutico e cosmetico (come integratori), ma anche in quello alimentare. Questo processo viene definito come bioconservazione e consiste nella sostituzione dei comuni additivi impiegati nel settore alimentare (molti di origine sintetica) con composti di origine naturale estratti da fonti rinnovabili, tra cui le acque reflue provenienti da impianti di estrazione dell'olio.

A tal proposito, uno studio effettuato in ambito alimentare da Galanakis e collaboratori (2011) ha permesso di investigare la potenziale capacità conservante dei composti fenolici aggiunti ai prodotti a base di carne, in particolare in salsicce essiccate e fermentate. Galanakis e collaboratori (2011) hanno quindi verificato l'eventuale possibilità di utilizzo dei composti fenolici in sostituzione di altri coadiuvanti tecnologici o additivi di sintesi, dimostrando come gli stessi siano in grado di inibire lo sviluppo di funghi e la germinazione di spore sulla superficie dell'alimento (Vazquez *et al.*, 2011; Gonzalez-Santiago *et al.*, 2010), confermandone la forte attività antimicrobica e conservante.

1.1.2 Sansa di oliva

La sansa di oliva si presenta come una massa semi-solida, caratterizzata da un colore verde scuro e da un odore forte e pungente, costituita da frammenti di bucce, noccioli e semi contenuti nelle drupe.

A seconda della metodologia usata per l'estrazione dell'olio di oliva e della cultivar del frutto dalla quale deriva, si ottengono sansa di oliva con differenti caratteristiche chimico-fisiche, tra cui il contenuto in polifenoli, carotenoidi e zuccheri, e la percentuale di umidità. Quest'ultima, infatti, risulta molto variabile: i) la sansa ottenuta tramite processi discontinui (estrazione meccanica/per pressatura) presenta un contenuto di acqua compreso tra il 22 e il 25%; ii) la sansa ottenuta dal sistema a tre fasi mostra un contenuto di acqua pari al 40-45%; iii) la sansa ottenuta con il sistema a due fasi mostra un quantitativo di umidità nettamente superiore, con una percentuale di acqua pari al 65-75% (Dermeche *et al.*, 2013).

I composti maggiormente presenti nella sansa sono:

- cellulosa, emicellulosa (polisaccaridi insolubili presenti nelle bucce delle olive);
- lignani (molecole associate alla composizione del nocciolo);
- zuccheri (in particolare glucosio ed arabinosio) (Niaounakis *et al.*, 2006);
- proteine;
- acidi grassi a catena lunga (C:16 e C:18), i quali rappresentano circa il 96% degli acidi grassi totali presenti (Rodríguez *et al.*, 2008);

- acido caffeico, acido p-cumarico, acido vanillico, e piccole quantità di pigmenti (Mirabella *et al.*, 2014).

La sansa di olive, così come le acque di vegetazione, contiene un'elevata percentuale di sostanze lipidiche e polifenoliche, rappresentando dunque una potenziale fonte di inquinamento se smaltita nei terreni agricoli. In alternativa, nonostante l'ingente quantità di acqua al suo interno, la sansa di olive può essere utilizzata come materiale combustibile per la produzione di biogas e di compost, o può essere utilizzata nell'alimentazione zootecnica. L'elevato contenuto di umidità rende la sansa particolarmente difficile da conservare ed immagazzinare, in quanto, durante l'intero periodo di stoccaggio, potrebbe favorire lo sviluppo di fenomeni di fermentazione che comprometterebbero il profilo organolettico e chimico-fisico del prodotto.

1.2 Sansa di oliva come fonte di composti funzionali e/o bioattivi

1.2.1 Polifenoli

Il contenuto in sostanze fenoliche della sansa di oliva varia soprattutto in base al metodo di estrazione dell'olio; in particolare il metodo di estrazione continuo a due fasi, non richiedendo l'aggiunta di acqua durante la lavorazione, determina la produzione di un sottoprodotto con un contenuto di sostanze fenoliche molto più elevato rispetto a quello ottenuto tramite sistema di estrazione a tre fasi.

I polifenoli sono delle molecole molto abbondanti nel regno vegetale (piante, fiori, frutta, radici ecc.), in grado di offrire loro protezione da agenti esterni, come le radiazioni ultraviolette. Tra le molteplici proprietà di tali molecole, la forte azione antiossidante risulta una delle più benefiche sia per l'organismo vegetale sia per quello animale. Infatti, i polifenoli hanno la capacità di inibire o prevenire la formazione di radicali liberi, ossia molecole tossiche e particolarmente nocive, in grado di danneggiare le strutture cellulari, provocando danni talvolta irreversibili. Nonostante i polifenoli non rientrino tra i nutrienti essenziali della dieta umana, e non siano quindi richiesti dal metabolismo basale per sostenere le principali funzioni vitali, essi possono comunque esercitare attività importanti per l'organismo.

Tuttavia, a causa della loro elevata suscettibilità nei confronti di luce solare, ossigeno, alte temperature e idrolisi enzimatica, i polifenoli risultano particolarmente sensibili alla

degradazione e al deterioramento. Particolare attenzione durante l'utilizzo delle tecniche di estrazione è richiesta infatti per scelta del solvente, il quale non deve risultare tossico per la salute umana, e a parametri quali temperatura, pH, tempo di estrazione e numero di cicli di estrazione. (Khoddami *et al.*, 2013). Le tecniche di estrazione di materiale polifenolico maggiormente impiegate nel settore alimentare per il recupero di molecole dalla sansa di oliva o dalle acque di vegetazione sono la tecnica di estrazione liquido-liquido e liquido-solido (Suhaj *et al.*, 2006). Ne consegue che tali tecniche per estrazione di sostanze dai sottoprodotti derivanti dall'estrazione dell'olio d'oliva (acque reflue e sansa di oliva) per un loro potenziale utilizzo nell'industria alimentare debbano essere particolarmente accurate e calibrate al fine di non alterarne le caratteristiche chimico-fisiche e funzionali (Uribe *et al.*, 2015).

La distribuzione delle sostanze fenoliche lipofile e idrofile a livello dei tessuti dell'oliva, tra cui epicarpo (buccia), mesocarpo (polpa) ed endocarpo (nocciolo e semi), è altamente variabile (Ghanbari *et al.*, 2012). Infatti, il profilo fenolico della sansa di oliva non mostra una composizione chimica costante e ben definita, in quanto viene ampiamente alterato e modificato durante i processi di estrazione dell'olio di oliva. Ad esempio, durante la fase di gramolatura possono intervenire vari enzimi, tra cui β glucosidasi o polifenolo ossidasi, che tendono ad ossidare il substrato, provocando una notevole diminuzione di composti fenolici rispetto al quantitativo iniziale riscontrato nelle drupe, sia nell'olio di oliva che nei vari sottoprodotti (Servili *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la classificazione dei composti fenolici idrofili presenti nella sansa di olive, troviamo l'acido idrossibenzoico ed idrossicinnamico, idrossitirosolo e tirosolo, flavonoidi e secoroididi; tra quest'ultimi spiccano l'oleuropeina, la dimetiloleuropeina e l'oleoside. Considerando inoltre che la sansa di olive è una massa formata principalmente da residui solidi delle olive, quelli maggiormente riscontrati sono quelli presenti nei frutti, e cioè tirosolo ed idrossitirosolo (Zagmutt *et al.*, 2016; Fernández-Bolaños *et al.*, 2001). Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi invece, è possibile identificare la presenza di acidi benzoici e derivati di acidi cinnamici, tra cui i più rilevanti sono l'acido caffeico (Lesage-Meessen, *et al.* s.d.), l'acido cumarico (Bianco *et al.*, 2003) e il verbascoside (Mulinacci *et al.*, 2001); infine sono presenti tracce di antociani, luteina, rutina e flavonoidi minori (Romero *et al.*, 2002).

1.2.2 Fibra

Nella sansa di oliva, come già citato, sono presenti vari composti polisaccaridici, come cellulosa, emicellulosa, lignina e pectina. In particolare, quest'ultima è caratterizzata da un polisaccaride strutturale che compone la parete cellulare di vari organismi vegetali ed è responsabile della croccantezza e del turgore di frutta e verdura. Nel dettaglio, la pectina si caratterizza per la presenza di una lunga catena principale dove si susseguono monomeri di acido galatturonico e altri zuccheri (arabinosio, ramnosio, xilosio, fucosio), che formano delle catene laterali più o meno corte, in grado di donare alla pectina una struttura altamente ramificata responsabile delle sue note caratteristiche reologiche e chimiche, quali la capacità di trattenere acqua, di formare gel ad elevata viscosità e di scambio cationico. Inoltre, date le sue spiccate proprietà addensanti, può essere impiegata come sostituto di olii e grassi di origine animale nella produzione di alimenti dietetici, soprattutto in quelli a ridotto contenuto calorico (Vierhuis, *et al.*, 2003; Galanakis *et al.*, 2010). Nell'industria alimentare, in particolar modo nel settore conserviero, la pectina, normalmente estratta dalle bucce di mele o di agrumi, viene utilizzata come agente gelificante. Quindi, negli alimenti la pectina viene aggiunta non solo per aumentarne la viscosità e la consistenza, ma anche per conferire al prodotto finale un'elevata conservabilità. Quest'ultimo aspetto in particolare è legato alla capacità delle catene laterali di sottrarre acqua libera, responsabile del processo di deterioramento dei prodotti sia a livello organolettico che salutistico (Vierhuis *et al.*, 2003; Galanakis *et al.*, 2010). Il materiale pectinico presente nella sansa di oliva potrebbe quindi essere potenzialmente utilizzato nell'industria alimentare come fonte naturale di fibra. Tuttavia, ad oggi, l'estrazione di pectina da materiali di scarto dell'industria oleifera risulta essere economicamente poco sostenibile, abbastanza complesso e soprattutto poco efficiente, in quanto la quantità di pectina estratta risulta scarsa se paragonata alla quantità che viene normalmente estratta dai sottoprodotti della lavorazione della frutta.

1.3 Proprietà salutistiche e potere antiossidante dei polifenoli contenuti nella sansa di oliva

Tra le proprietà salutistiche che caratterizzano i composti fenolici, spicca in particolar modo l'attività antiossidante. Quest'ultima viene esercitata attraverso la capacità delle

sostanze fenoliche di inibire o bloccare la formazione di radicali liberi (perossido di idrogeno, anione superossido, ossido nitrico, ecc.), e di chelare cationi metallo. In particolare, la presenza nella loro struttura di gruppi ossidrilici (OH), in grado di donare un atomo di idrogeno alle molecole dei radicali liberi, consente l'interruzione delle reazioni di ossidazione indotte dai radicali liberi stessi.

Entrambe le molecole di tirosolo e d'idrossitirosolo precedentemente menzionate possiedono gruppi ossidrilici nella loro struttura (Balasundram *et al.*, 2006). Tale caratteristica permette loro di agire come inibitori dell'ossidazione lipidica su molecole lipoproteiche a bassa densità (LDL), assumendo un ruolo non trascurabile sul trasporto del colesterolo all'interno dell'organismo umano e sulla prevenzione delle malattie cardiovascolari (Gonzalez-Santiago *et al.*, 2010; Vazquez-Velasco *et al.*, 2011; Fabiani *et al.*, 2008; Fabiani *et al.*, 2002). L'idrossitirosolo, inoltre, è in grado di inibire le fasi di inizio e di progressione della carcinogenesi indotta da diverse molecole ad azione tossica, nonché possiede una buona attività antimicrobica contro alcuni dei principali patogeni alimentari, come *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Helicobacter pylori* (Medina *et al.*, 2006).

Un'altra molecola ad azione antiossidante presente nella sansa di oliva è l'oleuropeina, la quale possiede una struttura chimica simile a quella dell'idrossitirosolo, caratterizzata dalla presenza di un gruppo o-difenolico. L'oleuropeina, responsabile del tipico sapore amaro e pungente dell'oliva appena raccolta, è impiegata nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e possiede anch'essa attività antitumorale (Manna *et al.*, 2004).

Vari studi scientifici del settore alimentare (Chiou *et al.*, 2007; Servili *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2012) hanno focalizzato l'attenzione sulla possibilità di estrazione di tali molecole (idrossitirosolo, tirososolo ed oleuropeina), al fine di poterle utilizzare per l'arricchimento di oli raffinati, tra cui l'olio di sansa, di mais, di soia, di girasole ed oli di oliva vergini o extra-vergini. In tali studi infatti, campioni di olio sono stati aggiunti di concentrazioni variabili di composti polifenolici e successivamente sottoposti a *consumer test*. I risultati hanno mostrato che le molecole fenoliche, nonostante aumentino il contenuto di sostanze bioattive nel prodotto finale, impattano in modo abbastanza negativo sul profilo organolettico dell'olio, conferendogli un sapore aspro e pungente, non particolarmente gradito dai consumatori. Al fine di evitare l'insorgenza e di minimizzare i livelli di amarezza, in uno studio condotto da Rubió e collaboratori (2012)

la sansa di oliva è stata addizionata ad una spezia aromatica, il timo. In particolare, da questo studio è emerso come l'aggiunta del 40% di timo alla sansa di oliva determini un aumento del contenuto di molecole funzionali, non alterando allo stesso tempo il profilo aromatico e sensoriale.

1.4. Recenti applicazioni di scarti dell'industria olearia per la produzione di alimenti

Negli ultimi decenni, la crescente attenzione dei consumatori nei confronti dell'ambiente e di stili di vita più ecosostenibili, sta spingendo l'industria alimentare verso l'adozione di un'economia circolare, un sistema pianificato che mira a rigenerare, riutilizzare e rivalorizzare quei prodotti che di norma andrebbero scartati, smaltiti e dunque persi. Oggigiorno, si assiste ad un radicale cambiamento delle abitudini alimentari del consumatore, il quale dimostra di essere non solo più sensibile ai problemi socio-ambientali, ma anche più consapevole, informato e dunque selettivo nella scelta dei prodotti. Infatti, il consumatore risulta particolarmente critico nell'acquisto di generi alimentari, orientandosi verso cibi sani, biologici, possibilmente di origine naturale, ad elevato valore nutrizionale, ricchi di sostanze utili e potenzialmente benefiche per la salute.

In questo contesto, gli alimenti a base di cereali, in particolare i prodotti da forno, risultano essere tra i migliori da poter utilizzare e modificare a tali scopi. Questi prodotti infatti, poco costosi, accessibili ad un ampio target di consumatori e facili da maneggiare, sono stati ampiamente studiati per migliorarne le loro caratteristiche nutrizionali. La pasta di grano duro, ad esempio, è stata recentemente modificata con lo scopo di aumentarne e migliorarne il contenuto di sostanze biologicamente attive. Tale modifica prevedeva l'aggiunta di ingredienti non tradizionali, che includono: sansa di oliva, acidi grassi lipofili (tococromanoli e carotenoidi), licopene (estratto da pomodori liofilizzati), α - e β -carotene, e α -tocoferoli estratti dall'olio di zucca (Pasqualone *et al.*, 2016).

1.4.1. Applicazione della sansa di oliva fermentata

Alcuni studi condotti sull'applicazione di sottoprodotti dell'industria olearia hanno proposto un insolito riutilizzo della sansa di oliva. Un progetto in particolare, ideato da

Durante e collaboratori (2019), si poneva come obiettivo principale quello di aumentare il valore nutrizionale e salutistico dei taralli, un prodotto da forno tipico della tradizione italiana che rientra nella categoria dei non lievitati, preparato principalmente nelle regioni dell'Italia centrale e meridionale (Pagani *et al.*, 2007). La modifica prevedeva l'aggiunta all'impasto tradizionale, caratterizzato da farina di grano duro, acqua, sale e olio extravergine di oliva, del 20% di sansa di oliva precedentemente fermentata.

In dettaglio, l'esperimento condotto da Durante e collaboratori (2019) si è focalizzato sulla produzione di taralli aggiunti di sansa di olive nere appartenenti a due cultivar italiane, Cellina di Nardò e Leccino, le quali sono risultate le migliori tra le varie cultivar valutate, in quanto particolarmente ricche in sostanze polifenoliche. Nello studio, la sansa di oliva, estratta con un *decanter* multifase, veniva trattata termicamente a 121°C per 4 minuti e successivamente diluita con acqua distillata (in rapporto 1:1). In seguito, sono stati aggiunti estratto di lievito (0,5%), peptone (0,5%) e glucosio (0,5%), per poi eseguire l'inoculo dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* KI-30-1 e *Leuconostoc mesenteroides* BC-T3-35. La sansa di oliva è stata quindi lasciata fermentare per 50 giorni ad una temperatura compresa tra 18 e 22 °C. I lieviti in questione sono stati scelti per le loro intense attività metaboliche, responsabili della produzione di elevati livelli di acidi organici e composti volatili che migliorano il profilo organolettico e nutrizionale del prodotto finale (Tufariello *et al.*, 2019). A seguito della fermentazione, la sansa è stata sottoposta ad un ulteriore trattamento termico a 90 °C per 2 minuti, divenendo così nuovo potenziale semi-ingrediente salutare, sicuro e ad elevato valore biologico con il quale poter formulare nuovi alimenti o arricchirne di convenzionali, come i taralli. Nell'esperimento di Durante *et al.* (2019) l'impasto dei taralli è stato preparato con 1 kg di farina di grano duro varietà Senatore Cappelli, acqua (0,4 L), olio extra vergine di oliva (100 g), sale (0,02 kg) e sansa di oliva fermentata (200 g). I taralli modificati (arricchiti con la sansa di oliva fermentata) e i taralli ottenuti con un impasto tradizionale (taralli di controllo) sono stati poi conservati all'interno di confezioni di plastica trasparente da 500 grammi per un periodo di 180 giorni, in presenza di luce artificiale (500 lux) attiva 12 ore al giorno ad una temperatura di 25 °C. Gli effetti correlati all'esposizione alla luce solare, legati soprattutto a fenomeni di irrancidimento, sono stati valutati determinando la variazione di esanale (Frankel *et al.*, 1983), una molecola derivata dall'ossidazione dell'acido oleico, responsabile della formazione di *off-flavors* (sapore/odore di rancido)

nei prodotti da forno (Choe *et al.*, 2006). I campioni sono stati inoltre sottoposti a valutazione del contenuto di polifenoli, degli acidi grassi e dei carotenoidi.

I livelli di esanale quantificati nei taralli tradizionali si sono dimostrati decisamente aumentati nei primi 30 giorni di stoccaggio (16,75 ug/g), mentre nei taralli arricchiti i livelli di tale composto è risultato inferiore nel medesimo lasso di tempo (11,11 ug/g per oliva Cellina di Nardò e 13,09 ug/g per oliva Leccino). Per quanto riguarda i livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFA) invece, nei taralli di controllo essi hanno mostrato una diminuzione dopo i primi 60 giorni dall'inizio del loro stoccaggio, mentre nei taralli arricchiti è stata rilevata una leggera variazione solo dopo 120 giorni, pari allo 0,001% nei taralli con sansa proveniente dalla cultivar Cellina di Nardò e allo 0,029% nei taralli ottenuti con sansa proveniente dalla cultivar Leccino. Risulta evidente come la composizione chimica della sansa di oliva di partenza abbia influenzato in modo positivo le caratteristiche funzionali dei taralli, conferendo un miglioramento della stabilità degli acidi grassi polinsaturi ai processi ossidativi e aumentando di conseguenza la conservabilità del prodotto finale (Caruso *et al.*, 2017; Caponio *et al.*, 2013). Per quanto riguarda il contenuto in polifenoli, nei taralli arricchiti sia con sansa di oliva derivante dalla cultivar Cellina di Nardò sia con quella derivante dalla cultivar Leccino, l'idrossitirosolo ha mostrato nei primi 30 giorni di conservazione una diminuzione abbastanza lenta e poco significativa, addirittura inferiore allo 0,001%, per poi decrescere rapidamente tra i 120 e i 180 giorni di stoccaggio con una diminuzione totale del 62% rispetto ai livelli iniziali. Al contrario, i livelli di tirosolo e verbascoside rimanevano stabili. In dettaglio, i livelli di tirosolo nei taralli Cellina di Nardò hanno iniziato a scendere del 23% rispetto ai valori iniziali dopo 150 giorni dall'inizio della conservazione, mentre rimanevano stabili nei taralli Leccino. Gli studi di Esposto e collaboratori (2013), e di Servili e collaboratori (2009) hanno riportato che la stabilità della molecola del tirosolo rispetto a quella dell'idrossitirosolo è giustificata dal fatto che il tirosolo possiede un'attività antiossidante maggiore, permettendogli di rimanere quasi completamente inalterato durante tutto il periodo di stoccaggio. In conclusione, i taralli arricchiti con la sansa fermentata hanno mostrato, rispetto ai taralli di controllo, livelli di composti polifenolici decisamente elevati (1337 µg/g per la cultivar Cellina di Nardò e 1016 µg/g per la cultivar Leccino) ed un notevole contenuto di acidi triterpenici (80,26

µg/g e 80,92 µg/g), isoprenoidi come il tococromanolo (30,27 µg/g e 22,22 µg/g) e carotenoidi (1,17 µg/g e 1,03 µg/g) (Tufariello *et al.*, 2019).

Altre recenti applicazioni della sansa di oliva prevedevano la sua aggiunta, dopo un accurato processo di fermentazione, al pane e alla pasta di semola di grano duro, come gli spaghetti. Entrambi questi prodotti arricchiti hanno mostrato un aumento di sostanze bioattive, con particolare riferimento ad elevati livelli di acido maslinico, luteolina (un carotenoide), quercitina, acido oleico e α -T, α -, e β -carotene.

La sansa di oliva è stata inoltre impiegata con successo, insieme al mosto d'uva, per arricchire di sostanze fenoliche dei prodotti fermentati come lo yogurt. In particolare, lo studio condotto da Aliakbarian e collaboratori (2015), prevedeva l'arricchimento in composti fenolici, estratti dalla sansa di oliva e dal mosto di uva, di yogurt ottenuto dalla fermentazione di latte scremato in polvere con l'impiego di *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*. Dalle analisi condotte è emerso che le sostanze fenoliche, addizionate in precedenza alla fermentazione, sono rimaste stabili ed inalterate durante l'intero processo produttivo dello yogurt, andando quindi ad incrementare ulteriormente il profilo nutrizionale dell'alimento.

1.4.2. Applicazioni del nocciolo e dei semi dell'oliva

Durante i processi di estrazione dell'olio di oliva, i frammenti solidi (nocciolo e semi), che rappresentano circa il 25% dei residui solidi totali (Cuevas *et al.*, 2015), vengono rimossi tramite filtrazione. Nonostante la presenza di parti solide aiuti il processo di estrazione delle goccioline lipidiche durante la gramolatura della pasta, nel prodotto finale tali residui devono essere rimossi, in quanto costituiscono materiale organico facilmente fermentescibile.

Data la composizione chimica di nocciolo e semi, ricca in polisaccaridi, come cellulosa (34%), emicellulosa (25%) e lignina (34%), polifenoli e proteine, tali residui vengono destinati all'alimentazione zootecnica o in alternativa impiegati per la formazione di materiali bio-assorbenti come le resine (Rodríguez *et al.*, 2008; Esteve *et al.*, 2015).

I semi delle olive sono ricchi in steroli, in particolare β -sitosteroli, e acidi grassi polinsaturi, oltre a contenere quantità elevate di acido linoleico, maggiori rispetto a quelle presenti nell'olio di oliva (Ranalli *et al.*, 2002), e di amminoacidi essenziali, maggiori rispetto a quelle presenti nel frutto dell'oliva. Inoltre, come dimostrato da uno studio

condotto da Mansour e collaboratori (2015), i semi delle olive, ricchi in composti volatili, partecipano attivamente alla caratterizzazione del flavour finale dell'olio di oliva, e in tal contesto sono stati condotti studi per il loro recupero e il loro utilizzo negli oli di oliva al fine di migliorarne il profilo organolettico.

Nell'ambito alimentare, nuove tecniche sono state applicate per l'estrazione di determinate molecole sia dai semi che dal nocciolo delle olive. Tali tecniche comprendono il frazionamento, con il quale è possibile operare la rottura dei legami carboidrato-lignina presenti nelle macromolecole polisaccaridiche insolubili, come cellulosa, emicellulosa e lignina. In questo modo si ottengono così zuccheri e composti fenolici, al contrario altamente solubili in acqua, i quali potrebbero trovare applicazione, ad esempio, nell'industria alimentare come emulsionanti e gelificanti (Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2008).

Inoltre, entrambe le componenti solubili ed insolubili riscontrate nel nocciolo e nei semi di oliva hanno dimostrato un'elevata funzionalità, se assunte regolarmente dall'uomo. In dettaglio, la frazione della fibra solubile è stata correlata a vari benefici per la salute, come la riduzione del colesterolo nel sangue e la diminuzione dei livelli di glucosio nell'intestino, mentre la frazione della fibra insolubile è stata associata a benefici nella regolazione intestinale (Grigelmo-Miguel *et al.*, 1999).

In dettaglio, dal nocciolo delle olive è possibile ricavare, tramite varie tecniche di pretrattamento e di idrolisi enzimatica, alcune importanti molecole, come vanillina (estratta dalla lignina), zuccheri (in particolare lo xilitolo) e cellulosa, usata principalmente nella produzione di etanolo o nell'industria alimentare come agente addensante (Fernández-Bolaños *et al.*, 2001). Particolare importanza riveste l'estrazione dello xilitolo, un poli-alcol classificato come additivo alimentare, che viene impiegato come sostituto di altri zuccheri, soprattutto per la produzione di caramelle, gomme da masticare e prodotti dietetici a basso indice calorico, in quanto apporta circa il 40% di calorie in meno rispetto al saccarosio.

1.4.3. Applicazioni di foglie di olivo

Dopo la raccolta, i frutti di *Olea europaeae L.*, sia che vengano destinati alla produzione di olive da tavola o che vengano portate in azienda per l'estrazione di olio di oliva, vengono lavati e defogliati.

Con il processo di defogliazione, si produce una vasta quantità di materiale vegetale organico rappresentante circa il 10% di tutta la materia prima che arriva al mulino (Goldsmith *et al.*, 2015).

Le foglie di olivo posseggono delle attività benefiche per l'uomo a scopo terapeutico già note in epoca romana a tutti i popoli del bacino del Mediterraneo. Infatti, in tale epoca, venivano sfruttate le molteplici proprietà nutraceutiche e salutistiche di questo prodotto, tanto da utilizzare gli estratti delle foglie di olivo in varie applicazioni domestiche, quali: preparazione di bevande, infusi e conservanti alimentari, e produzioni di cosmetici (Roselló-Soto *et al.*, 2015).

Dal punto di vista della composizione chimica, le foglie di olivo contengono sostanze polifenoliche e lipidiche che costituiscono una potenziale fonte naturale di molecole ad azione antiinfiammatoria, antiossidante, ipoglicemica e antimicrobica. In dettaglio la componente fenolica è rappresentata da molecole come l'oleuropeina, il tirosolo, l'idrossitirosolo e i tocoferoli, mentre la frazione lipidica è formata principalmente da acido linolenico (34-41%) e da numerosi acidi grassi in quantità variabili, tra cui acido idrossibenzoico, acido caffeico, siringico, elenoico e clorogenico. Inoltre, alcuni esperimenti riportano la presenza di un'ingente quantità di sali minerali, come ferro (11%) e rame (13%), e di sostanze proteiche (9-33%) (Erbay & Icier 2009). Tali percentuali, però, sono soggette a delle variazioni che dipendono dalle differenti cultivar di olive, dal clima e dalle varie tecniche di coltivazione usate (Herrero *et al.*, 2011).

Considerate le molteplici proprietà benefiche dei composti lipidici e fenolici contenutivi sopra citati è di fondamentale importanza per i ricercatori capire come tali molecole esse possano essere valorizzate ed impiegate. In ambito alimentare, la ricerca si sta concentrando sull'utilizzazione di tali composti sia per migliorare la struttura dei materiali di confezionamento dei prodotti sia per migliorare la conservabilità degli stessi, estendendo la loro *shelf-life* ed aumentano inoltre, il loro valore biologico.

Infatti, l'utilizzo di foglie di olivo derivanti dal ciclo di estrazione dell'olio di oliva sembra avere un riscontro molto positivo nel settore del packaging. Tale settore si sta concentrando sulla ricerca di materiali sempre più sostenibili, che siano quindi biodegradabili, economici ed altamente funzionali. In primo luogo, investire energie e risorse economiche per lo sviluppo di nuovi materiali di imballaggio e/o confezionamento riciclabili significherebbe ridurre drasticamente l'inquinamento globale. Infatti, molti dei materiali comunemente usati come involucro per gli alimenti, in particolar modo la plastica e derivati, risultano essere poco degradabili e altamente tossici se smaltiti in modo non adeguato nei diversi habitat, impattando gravemente sull'ecosistema. In secondo luogo, il riutilizzo di sottoprodotti che vengono comunemente considerati materiale di scarto gioverebbe sulle tasche dei produttori, in quanto diminuirebbe eventuali costi associati al trasporto e allo smaltimento di tali rifiuti. Le foglie di olivo che sono allontanate durante i processi di pulizia e lavaggio delle olive rappresentano un'ingente quantità di materiale organico da dover smaltire, e sembrano dunque rispondere in modo adeguato a queste esigenze. Inoltre, sono tuttora in corso degli studi che si occupano di recuperare e applicare in modo ottimale le molecole estratte da tali foglie, sperimentando la possibilità di associarle ad altri composti fibrosi già noti alle industrie alimentari, tra cui lignina e/o cellulosa, per la produzione di nuovi modelli di packaging. L'attenzione della comunità scientifica è soprattutto focalizzata verso l'ideazione di materiali di confezionamento innovativi contenenti molecole ad azione antimicrobica ed antiossidante, che, a contatto con la superficie dell'alimento, siano in grado di agire come agenti conservanti, preservando più a lungo la qualità del prodotto e ritardando un'eventuale proliferazione microbiologica. Infatti, alcuni ricercatori hanno investigato sulla possibilità di sviluppare matrici polimeriche altamente funzionali e, allo stesso tempo, totalmente riciclabili, progettando delle pellicole alimentari destinate a prodotti con una *shelf-life* piuttosto breve (3-4 giorni) contenenti il 21% di oleuropeina e di α -tocoferoli provenienti dalle foglie di olivo.

Inoltre, lo scopo di ulteriori studi effettuati da numerosi scienziati è stato quello di verificare la potenziale migrazione di molecole di natura organica, derivanti dalle foglie di olivo, dalla confezione all'alimento stesso, tracciando e monitorando alcune delle loro proprietà. Tra queste ultime è stata presa in considerazione la capacità antiossidante dei polifenoli, in grado di contrastare e rallentare i tipici fenomeni di ossidazione che

determinano una scadenza qualitativa del prodotto (Herrero *et al.*, 2011; Roselló-Soto *et al.*, 2015; Rahmanian *et al.*, 2015).

1.4.4. Oli edibili arricchiti con composti fenolici

Negli oli edibili vengono integrate molecole antiossidanti di origine sintetica, con lo scopo di ritardare o inibire l'ossidazione lipidica e la formazione dei composti volatili responsabili di odori e sapori sgradevoli nel prodotto finito. Nonostante questa pratica sia molto diffusa in vari paesi del mondo, la somministrazione di elevate quantità di molecole antiossidanti di origine sintetica è stata associata a molteplici problemi di salute (Bouaziz *et al.*, 2008; Farag *et al.*, 2003; Farag *et al.*, 2007; Keceli & Harp 2014; Malheiro *et al.*, 2013; Paiva-Martins *et al.*, 2007; Rafiee *et al.*, 2012; Taghvaei *et al.*, 2015). Infatti, l'uso frequente di elevate concentrazioni di tali composti è stato associato a lesioni del fegato in topi da laboratorio e al danneggiamento degli acidi nucleici nelle cellule animali (Shahidi *et al.*, 2015).

Al fine di identificare strategie alternative all'uso di antiossidanti di origine sintetica, alcuni ricercatori hanno provato ad impiegare le sostanze fenoliche naturalmente presenti nelle foglie di olivo come additivi naturali (FN *et al.*, 2007). Note le loro proprietà antiossidanti, lo scopo principale del loro utilizzo era mirato al controllo del fenomeno di ossidazione lipidica, che porta all'idrolisi dei trigliceridi e all'irrancidimento dei prodotti contenenti elevate quantità di sostanze grasse. L'attenzione è stata principalmente focalizzata sull'arricchimento di oli impiegati, sia in ambito domestico che industriale, nel metodo di cottura denominato frittura-profonda, ampiamente utilizzato nella preparazione di svariati prodotti alimentari. Nelle ricerche sono stati presi in considerazione differenti tipi di olio (olio di girasole, di palma e di oliva) aggiunti di due differenti quote di sostanze polifenoliche estratte dalle foglie di olivo, che si attestavano a 120 e 240 mg di polifenoli per kg di olio. Gli oli arricchiti di tali sostanze sono stati utilizzati per la cottura di patate mediante frittura-profonda. A seguito della cottura, le patate sono state analizzate per la determinazione del contenuto di composti polifenolici presenti al loro interno. I risultati hanno mostrato che le patate cotte utilizzando gli oli arricchiti contenevano livelli di sostanze polifenoliche, come tocoferoli e fitosteroli, nettamente maggiori rispetto a quelle fritte impiegando oli tradizionali.

L'utilizzo di molecole ad azione antiossidante di origine botanica e soprattutto provenienti da materiale organico di scarto, è stato quindi impiegato con successo sia per l'aumento della stabilità di prodotti convenzionali, come in questo caso in oli di oliva o di semi, sia per incrementare il contenuto finale del prodotto in sostanze nutraceutiche ad azione benefica per l'organismo umano. Questo, quindi, dimostra come l'impiego di un'economia circolare possa essere applicato ad una vasta gamma di prodotti, soprattutto nel settore alimentare, e soddisfare più di una esigenza.

2. SCOPO DEL LAVORO

Nell'ultimo decennio, a seguito degli imponenti cambiamenti che hanno interessato le condizioni climatiche mondiali, si è andata affermando una maggiore consapevolezza da parte dei consumatori sulle problematiche socio-economiche e ambientali legate ai processi produttivi del settore alimentare. In particolare, è evidente una crescente attenzione nei confronti di un mercato sempre più eco-sostenibile, in grado di garantire prodotti sani e salutari, e allo stesso tempo poco elaborati e a basso impatto ambientale. Per soddisfare tali esigenze, il mercato, e in particolar modo le aziende agroalimentari, sono sempre più orientate verso l'adozione di una politica "eco-friendly" attraverso l'applicazione dei principi dell'economia circolare, il cui obiettivo primario riguarda la riduzione dei prodotti di scarto tramite il riutilizzo degli stessi.

In questo contesto, al fine di rispondere adeguatamente alle nuove richieste di mercato, l'industria oleifera sta sviluppando nuove strategie di produzione, tra cui la valorizzazione di prodotti secondari come il paté di oliva. Quest'ultimo, per molto tempo non valorizzato, è oggi ampiamente studiato in relazione alla presenza di molecole bioattive con proprietà nutraceutiche. Per questo motivo, il paté di oliva risulta un potenziale ingrediente per la preparazione di alimenti innovativi, come prodotti da forno funzionali con apprezzabili caratteristiche organolettiche.

L'obiettivo del presente lavoro di Tesi è quello di valutare l'impatto dell'aggiunta di concentrazioni crescenti di paté di oliva (10, 15 e 20%) come ingrediente innovativo per la produzione di pane. A tale scopo sono stati prodotti differenti tipi di pane utilizzando farina di frumento tenero di tipo 0 e farina di frumento tenero integrale. In seguito, il pane prodotto è stato sottoposto a i) analisi microbiologiche, per l'enumerazione di batteri lattici e di lieviti prima e dopo la lievitazione, e per l'enumerazione dei batteri sporigeni in seguito alla cottura; ii) analisi chimico-fisiche, per la determinazione del contenuto di polifenoli, del volume e della texture del prodotto finale; e iii) analisi sensoriale (*panel test*), per la valutazione delle eventuali differenze rilevabili tra i prodotti ottenuti con e senza aggiunta di paté di oliva.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Disegno sperimentale

Per l'allestimento della prova sperimentale, costituita da 2 panificazioni successive, sono stati utilizzati: (i) un *batch* di farina di frumento tenero (*Triticum aestivum*) di tipo 0 fornito dal molino Corradini sas (Mogliano, MC); (ii) un *batch* di farina integrale biologica di frumento tenero fornito dal molino Fratini snc (Pollenza, MC); (iii) un *batch* di pat  di oliva ottenuto con metodo di estrazione a due fasi presso l'oleificio Corradini sas (Mogliano, MC).

Per entrambe le tipologie di farina utilizzata,   stata condotta una prova di panificazione secondo le tesi sperimentali illustrate in figura 3.1 e di seguito elencate:

tesi 1 - (CB) – pane prodotto senza aggiunta di pat  di oliva (controllo);

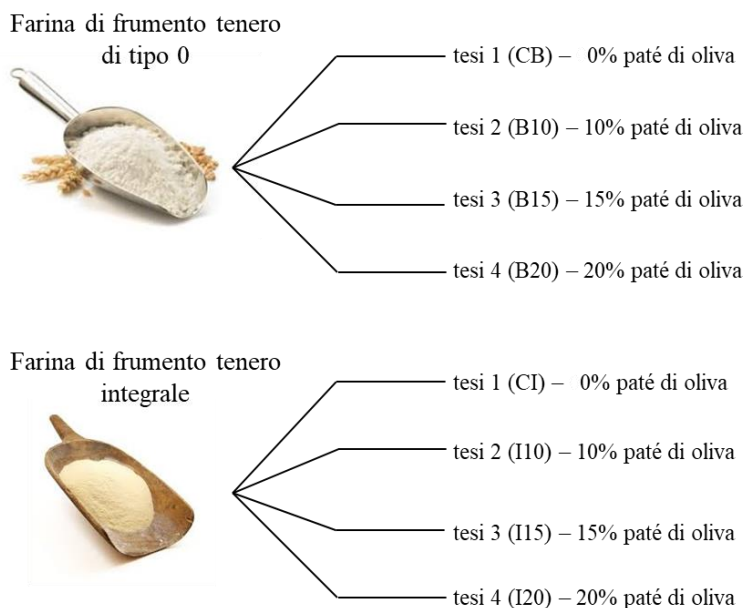
tesi 2 - (B10) – pane prodotto con l'aggiunta di 10% di pat  di oliva;

tesi 3 - (B15) – pane prodotto con l'aggiunta di 15% di pat  di oliva;

tesi 4 - (B20) – pane prodotto con l'aggiunta di 20 % di pat  di oliva.

Per ciascuna tesi sperimentale sono state prodotte tre filoni del peso di circa 300 gr (repliche biologiche), sottoposte, a seguito di cottura e raffreddamento, alle analisi descritte nei paragrafi 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8.

Figura 3.1. Tesi sperimentali saggiate durante il processo di panificazione con farina di tipo 0 e farina integrale di frumento.



3.2. Allestimento prova di panificazione con farina 0

La panificazione è stata condotta presso i laboratori di microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali (D3A) dell'Università Politecnica delle Marche secondo le indicazioni e le formulazioni fornite dal panificio industriale Gastreghini srl (Jesi, AN), illustrate in Tabella 3.3 e in Figura 3.2. L'agente lievitante utilizzato nelle prove di panificazione (biga) è stato preparato secondo il diagramma di flusso illustrato in Figura 3.4.

Gli impasti prodotti sono stati lavorati meccanicamente con un'impastatrice a spirale mod. K12-2V della ditta Kosmitech srl (Morrovalle, MC) per ~10 min alla massima velocità. Gli impasti così ottenuti sono stati successivamente lavorati manualmente al fine di ottenere 3 filoni dal peso di ~300 g caduno, lievitati circa 90 minuti a 30 °C e ~70% UR.

Figura 3.2. Diagramma di flusso processo di panificazione

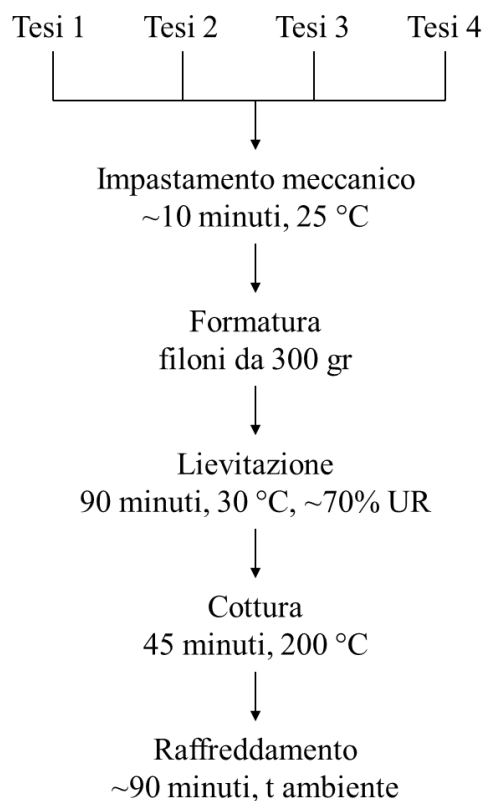
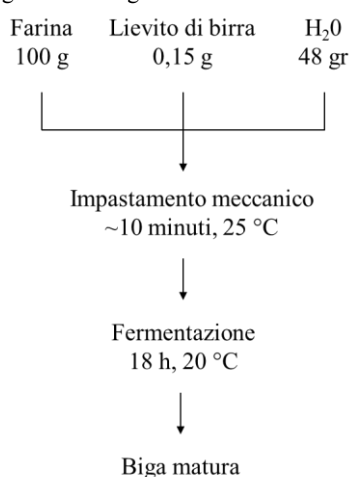


Tabella 3.3. Formulazione delle tesi sperimentali saggiate nella prova di panificazione con farina di frumento tenero di tipo 0.

	CB	B10	B15	B20
Farina 0	721,7 gr	649,5 gr	613,4 gr	577,4 gr
Biga	71,8 gr	71,8 gr	71,8 gr	71,8 gr
Lievito di birra	4,3 gr	4,3 gr	4,3 gr	4,3 gr
Patè di oliva	/	120,0 gr	180,0 gr	240,0 gr
H ₂ O	402,1 gr	354,9 gr	330,8 gr	306,7 gr
Totale	1199,9 gr	1200,5 gr	1200,3 gr	1200,2 gr

CB: pane di controllo prodotto con farina di tipo 0 senza aggiunta di patè di oliva; B10: pane con farina di tipo 0 prodotto con aggiunta del 10% di patè di oliva; B15: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 15% di patè di oliva; B20: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 20% di patè di oliva.

Figura 3.4. Diagramma di flusso della produzione della biga.



Il pane prodotto è stato sottoposto a cottura a 200 °C per circa 45 minuti e le successive analisi sono state condotte solo a seguito del totale raffreddamento dei filoni a T ambiente.

3.3. Allestimento prova di panificazione con farina integrale

Per l'allestimento della prova di panificazione con farina integrale, i metodi e le condizioni di produzione e cottura sono stati i medesimi descritti nel paragrafo 3.1.1., mentre le formulazioni utilizzate nelle tesi sperimentali sono quelle descritte in Tabella 3.5.

Tabella 3.5. Formulazione delle tesi sperimentali saggiate nel processo di panificazione con farina di frumento tenero integrale.

	CI	I10	I15	I20
Farina 0	247,5 gr	224,3 gr	211, 8 gr	199,4 gr
Farina integrale	458,2 gr	410,7 gr	387,9 gr	365,1 gr
Biga	70,2 gr	70,2 gr	70,2 gr	70,2 gr
Lievito di birra	2,8 gr	2,8 gr	2,8 gr	2,8 gr
Patè di oliva	/	120,0 gr	180,0 gr	240,0 gr
H ₂ O	421,3 gr	372,2 gr	348, 1 gr	323,0 gr
Totale	1200,0 gr	1200,2 gr	1200 gr	1200,5 gr

CI: pane di controllo prodotto con farina integrale senza aggiunta di patè di oliva; I10: pane con farina integrale prodotto con aggiunta del 10% di patè di oliva; I15: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 15% di patè di oliva; I20: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 20% di patè di oliva.

3.4. Analisi microbiologiche

Per l'enumerazione delle conte vitali dei microrganismi, 10 g di ciascun impasto prima della lievitazione e 10 g di ciascun impasto dopo la lievitazione sono stati prelevati in condizioni di sterilità e aggiunti di 90 mL di acqua peptonata sterile (1 g L⁻¹ peptone). I campioni sono stati sottoposti a trattamento con omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator (VWR International PBI, Milan, Italy) per 3 minuti a 260 rpm. In seguito, 1 mL di omogenato è stato aggiunto di 9 mL di acqua peptonata sterile, fino ad ottenere una serie di diluizioni scalari decimali per la successiva semina in piastra.

Un mL di ciascuna diluizione decimale è stato prelevato per l'allestimento della semina per inclusione nel terreno di coltura *De Man Rogosa e Sharpe* (MRS) agar addizionato di cicloesimide (0,250 g L⁻¹). Il terreno, parzialmente selettivo per la crescita dei lattobacilli, è stato incubato a 37 °C per 48 h (De Man *et al.*, 1960). La sua composizione chimica è la seguente:

- digerito enzimatico di caseina 10,00 g L⁻¹
- estratto di carne 10,00 g L⁻¹
- estratto di lievito 4,00 g L⁻¹
- glucosio 20,00 g L⁻¹
- idrogenofosfato di potassio 2,00 g L⁻¹
- sodio acetato 5,00 g L⁻¹
- tri-ammonio citrato 2,00 g L⁻¹
- magnesio solfato 0,20 g L⁻¹
- manganese solfato 0,05 g L⁻¹

- agar 13,00 g L⁻¹
- tween 80 (Sorbitan mono-oleato) 1,06 g L⁻¹

Cento µL di ciascuna diluizione decimale sono stati prelevati per l'allestimento delle conte vitali su piastra mediante semina per spandimento su terreno di coltura *Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)* agar con aggiunta di cloramfenicolo (0,100 g L⁻¹). Questo terreno, selettivo per la crescita di lieviti e muffe, è stato incubato a 25 °C per 24-48 h (Ausubel *et al.*, 1994). La sua composizione chimica è di seguito descritta:

- estratto di lievito (1%) 10 g L⁻¹
- peptone (2%) 20 g L⁻¹
- glucosio (2%) 20 g L⁻¹
- agar (1,8%) 18 g L⁻¹

Analogamente per quanto descritto per gli impasti, 10 g di pane (mollica) sono stati prelevati in condizioni di sterilità, aggiunti di 90 mL di acqua peptonata sterile e sottoposti a trattamento con omogeneizzatore peristaltico. Un mL di ciascun omogenato è stato utilizzato per l'allestimento delle diluizioni scalari decimali; 1 mL di ciascuna diluizione è stata seminata per inclusione su terreno *Plate Count Agar (PCA)*. Questo terreno, inoculato a 30 °C per 48 h, ha permesso di enumerare la carica di batteri sporigeni presenti nel pane. In dettaglio la composizione chimica del terreno è di seguito descritta:

- digerito enzimatico di caseina 5,0 g L⁻¹
- estratto di lievito 2,5 g L⁻¹
- glucosio anidro 1,0 g L⁻¹
- agar 15 g L⁻¹

Tutti i dati sono espressi come media dei logaritmi delle Unità Formanti Colonia (UFC) per g di impasto o pane analizzato ± deviazione standard.

3.5. Determinazione del volume del pane

Il pane prodotto in entrambe le prove di panificazione, dopo circa 30 minuti dal suo completo raffreddamento, è stato sottoposto a determinazione del volume mediante il metodo *Rapeseed displacement* AACC 10-05.01 (AACC, 2000).

In dettaglio, ogni filone è stato posto in un *becker* graduato da 5 L, riempito fino al raggiungimento del volume massimo misurabile (5000 mL) con semi di cime di rapa; successivamente il pane è stato rimosso dal becker ed è stato misurato il volume occupato dai semi di cime di rapa presenti all'interno del *becker*. Il volume del pane è stato quindi calcolato per differenza tra il volume massimo (5000 mL) e il volume dei semi presenti nel *becker* dopo la rimozione del pane. I dati sono stati espressi come valore medio in mL di tre repliche biologiche \pm deviazione standard.

3.6. Determinazione della *texture* del pane

La *texture* dei pani sperimentali è stata misurata utilizzando l'analizzatore *texture analyzer* CT3-4500 (Brookfield Engineering Laboratories INC, Stati Uniti) dotato di sonda da 36 mm di diametro, limite di compressione del 40%, profondità di compressione di 10 mm e velocità di compressione di $1,6 \text{ mm s}^{-1}$, sulla base del metodo AACC 74-09.01 (AACC, 2000) e delle caratteristiche tecniche dello strumento stesso. L'analisi è stata eseguita su una fetta di spessore omogeneo pari a circa 25 mm ottenuta nella parte centrale del filone. Per ogni tesi sperimentale sono state analizzate due fette di pane ottenute da ciascuno dei tre filoni (repliche biologiche). I dati sono stati espressi come valore medio in gr del doppio tecnico delle tre repliche biologiche \pm deviazione standard.

3.7. Determinazione del contenuto di polifenoli del pane

Per la determinazione del contenuto di polifenoli nei pani sperimentali, i campioni sono stati trattati in doppio seguendo il protocollo descritto da Beta e collaboratori (2005).

In dettaglio, 2 g di campione (crosta + mollica) sono stati addizionati di 16 mL di una soluzione di HCl: metanolo: H₂O (1 : 80 : 10) e posti in agitazione per 2 h a temperatura ambiente. La sospensione risultante è stata successivamente centrifugata tramite lo strumento Rotofix 32 A (Hettich, Tuttlingen, Germania) a 3000 rpm per 10 minuti. In seguito, 200 μ L di surnatante (estratto ottenuto) sono stati prelevati, addizionati di 1,5

mL di reattivo di Reattivo di Folin-Ciocalteu (diluito 1:10) e lasciati riposare a temperatura ambiente per 5 minuti. Il campione risultante è stato poi aggiunto di 1,5 mL di CaCO_3 (60 g L^{-1}) e lasciato reagire a temperatura ambiente per 1 h. A seguito di tale periodo, per ogni campione è stata condotta una lettura spettrofotometrica con spettrofotometro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) ad una lunghezza d'onda di 725 nm.

Il contenuto di polifenoli del pane è stato espresso come mg di acido gallico per g di prodotto, in relazione alla retta di taratura precedentemente costruita con concentrazioni note di acido gallico. I dati sono stati espressi come valore medio del doppio tecnico del *pool* delle tre repliche biologiche \pm deviazione standard.

3.8. Analisi sensoriale

Per la valutazione del profilo sensoriale dei pani sperimentali, 10 assaggiatori non addestrati ma familiari al consumo di pane sono stati coinvolti nel *panel test* proposto da Resurreccion (1998).

Il pane raffreddato a temperatura ambiente è stato tagliato a fettine dello stesso spessore e somministrate agli assaggiatori previa descrizione delle tesi sperimentali saggiate; gli assaggiatori sono stati invitati a bere acqua tra l'assaggio di una tesi e l'altra.

In dettaglio, per ciascun pane assaggiato, ciascun operatore è stato invitato a fornire un punteggio compreso da 1 a 9 per ciascuno dei parametri in elenco nella scheda di valutazione, e di seguito esplicitati:

1. aspetto globale;
2. odore;
3. gusto;
4. percezione dei quattro sapori di base (dolce, salato, amaro e acido) durante l'assaggio;
5. percezione del sapore d'oliva durante l'assaggio;
6. persistenza del sapore in bocca alcuni minuti dopo l'assaggio;
7. Valutazione differenza di gusto tra il pane prodotto con aggiunta di paté di oliva e pane di controllo prodotto con farina tipo 0 o integrale;
8. Valutazione differenza di croccantezza tra il pane prodotto con aggiunta di paté di oliva e pane di controllo prodotto con farina tipo 0 o integrale;

Esclusivamente per i pani di controllo, prodotti con farina di tipo 0 e con farina integrale, i quesiti 7 e 8 non sono stati valutati. Per ciascun parametro, i dati sono stati espressi come media dei punteggi ottenuti \pm deviazione standard.

3.9. Analisi statistica

I dati ottenuti dalle analisi microbiologiche sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) con il test di Tukey-Kramer ($\alpha= 0,05$) utilizzando il software JMP, Versione 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Caratterizzazione microbiologica degli impasti prima e dopo la lievitazione.

I risultati delle analisi microbiologiche condotte sugli impasti sono mostrati in Tabella 4.1.

Per gli impasti prodotti con farina di frumento tenero di tipo 0, le conte vitali dei batteri lattici prima del processo di lievitazione hanno fatto registrare dei valori compresi tra $2,60 \pm 0,00$ (tesi 1) e $2,96 \pm 0,17$ UFC g⁻¹ (tesi 4). In dettaglio, sono emerse delle differenze statistiche significative tra l'impasto della tesi 1 e gli impasti della tesi 3 e 4, mentre non si evidenziano differenze significative tra la tesi 2 e le altre tesi sperimentali. A seguito del processo di lievitazione, per le tesi 1 e 2, si è assistito ad un aumento della carica di batteri lattici passando, rispettivamente, da una carica di $2,60 \pm 0,00$ e $2,84 \pm 0,09$ Log UFC g⁻¹ a $3,58 \pm 0,13$ e $3,78 \pm 0,05$ Log UFC g⁻¹. Al contrario, per la tesi 4 è stata osservata una riduzione di batteri lattici di circa due ordini logaritmici, con conte passate da $2,95 \pm 0,00$ a $0,74 \pm 0,06$ Log UFC g⁻¹. Pertanto, sono state evidenziate differenze statistiche significative tra le tesi 1 e 2 rispetto alle tesi 3 e 4 con differenze statistiche significative anche tra queste ultime.

Per quanto riguarda le conte vitali degli eumiceti registrate negli impasti prodotti con farina di frumento di tipo 0, dalle analisi non sono emerse differenze statistiche significative tra le quattro tesi saggiate prima del processo di lievitazione, con conte comprese tra $7,65 \pm 0,11$ (tesi 1) e $7,91 \pm 0,02$ Log UFC g⁻¹ (tesi 3). Al contrario, dopo il processo di lievitazione sono state osservate differenze statistiche tra le tesi 3 e 4 rispetto alle tesi 1 e 2. In particolare, per quanto riguarda la popolazione eumicetica, è stata evidenziata una riduzione significativa della carica durante il processo di lievitazione esclusivamente per la tesi 2, passando da conti pari a $7,90 \pm 0,02$ a $6,95 \pm 0,24$ Log UFC g⁻¹. Contestualmente, non si sono state evidenziate differenze statistiche per le altre tesi saggiate prima e dopo il processo di lievitazione, con una carica eumicetica caratterizzata da valori piuttosto stabili.

Per gli impasti prodotti con farina di frumento tenero integrale, le conte vitali dei batteri lattici determinate prima della lievitazione hanno fatto registrare valori compresi tra $0,74 \pm 0,06$ (tesi 4) e $3,78 \pm 0,05$ (tesi 2) Log UFC g⁻¹. Pertanto, la carica dei batteri lattici

della tesi 4 è risultata statisticamente più bassa rispetto alle altre tre tesi sperimentali. Inoltre, tale differenza è risultata mantenersi anche a seguito del processo di lievitazione, con una carica di batteri lattici nella tesi 4 che si è attestata a $1,84 \pm 0,34$ Log UFC g^{-1} , a fronte di conte significativamente più elevate nelle altre tesi, con valori compresi tra $2,67 \pm 0,04$ e $2,92 \pm 0,03$ Log UFC g^{-1} .

Per quanto concerne la carica eumicetica degli impasti prodotti con farina di frumento tenero integrale registrata prima della lievitazione, si evidenzia una differenza statistica significativa tra la tesi 3, con $6,90 \pm 0,01$ Log UFC g^{-1} , e le altre tesi analizzate, per le quali sono stati registrati valori compresi tra $7,09 \pm 0,11$ (tesi 2) e $7,54 \pm 0,09$ Log UFC g^{-1} (tesi 1). Al contrario, differenze statistiche significative sono state evidenziate tra le quattro tesi dopo il processo di lievitazione, con valori piuttosto eterogenei, compresi tra $6,91 \pm 0,20$ (tesi 3) e $8,80 \pm 0,21$ Log UFC g^{-1} (tesi 1). Inoltre, l'incremento della carica eumicetica nella tesi 1 risulta statisticamente significativo; per le altre tesi sperimentali non si evidenziano differenze statistiche significative tra la carica microbica prima e dopo la lievitazione.

Tabella 4.1. Conte vitali impasti con farina di frumento tenero di tipo 0 e farina di frumento tenero integrale prima o dopo la lievitazione.

		Farina di tipo 0		Farina integrale	
		MRS	YPD	MRS	YPD
Impasto prima della lievitazione	Tesi 1	$2,60 \pm 0,00^c$	$7,65 \pm 0,11^{ab}$	$2,54 \pm 0,06^{ab}$	$7,54 \pm 0,09^b$
	Tesi 2	$2,84 \pm 0,09^{bc}$	$7,90 \pm 0,02^a$	$2,57 \pm 0,03^{ab}$	$7,09 \pm 0,11^{bc}$
	Tesi 3	$2,96 \pm 0,17^b$	$7,91 \pm 0,02^a$	$2,33 \pm 0,04^{bc}$	$6,90 \pm 0,01^c$
	Tesi 4	$2,95 \pm 0,00^b$	$7,82 \pm 0,15^{ab}$	$1,84 \pm 0,34^{cd}$	$7,11 \pm 0,18^{bc}$
Impasto dopo della lievitazione	Tesi 1	$3,58 \pm 0,13^a$	$7,32 \pm 0,20^{bc}$	$2,92 \pm 0,03^a$	$8,80 \pm 0,21^a$
	Tesi 2	$3,78 \pm 0,05^a$	$6,95 \pm 0,24^c$	$2,82 \pm 0,04^{ab}$	$7,28 \pm 0,18^{bc}$
	Tesi 3	$2,85 \pm 0,00^{bc}$	$7,92 \pm 0,07^a$	$2,67 \pm 0,04^{ab}$	$6,91 \pm 0,20^c$
	Tesi 4	$0,74 \pm 0,06^d$	$7,88 \pm 0,03^a$	$1,65 \pm 0,07^d$	$7,28 \pm 0,03^{bc}$

Tesi 1: impasto prodotto senza aggiunta di paté di oliva (controllo);

Tesi 2: impasto prodotto con l'aggiunta di 10% di paté di oliva;

Tesi 3: impasto prodotto con l'aggiunta di 15% di paté di oliva;

Tesi 4: impasto prodotto con l'aggiunta di 20 % di paté di oliva.

Le lettere in apice indicano le differenze statistiche sulla base del *Tukey test* ($\alpha=0,05$).

4.2. Caratterizzazione del pane

I risultati delle analisi eseguite sui pani sperimentali sono mostrati in Tabella 4.2.

In particolare, dalle conte vitali in piastra è emersa la totale assenza di batteri sporigeni in tutti i campioni, ad eccezione del pane prodotto con farina integrale aggiunto del 20% di paté di oliva, in cui è stata evidenziata una carica di sporigeni pari a $2,81 \pm 0,21$ Log UFC g⁻¹.

La determinazione del volume del pane mediante metodo *Rapeseed displacement* ha permesso di evidenziare l'assenza di differenze statistiche significative tra le quattro tesi sperimentali, indipendentemente dal tipo di farina utilizzato. In dettaglio, il pane prodotto con farina di frumento tenero di tipo 0 ha mostrato un volume compreso tra $3'767 \pm 153$ cm³ (PB10) e $4'000 \pm 0$ cm³ (PB); mentre, per il pane prodotto con farina di frumento tenero integrale il volume si è attestato su valori compresi tra $4'100 \pm 173$ cm³ (PB10) e $4'400 \pm 100$ cm³ (PI). In linea generale, l'uso di paté di oliva sembra aver influito sul volume finale del pane, indipendentemente dal tipo di farina testata. Infatti, i valori più alti che sono stati registrati appartengono in entrambi i casi al controllo (PB e PI). Ciò indica che il paté di oliva potrebbe incidere negativamente sulla struttura dell'impasto, limitando la crescita volumetrica dello stesso durante la lievitazione e/o cottura. Tale evidenza è in accordo a quanto riportato da Cedola e collaboratori (2019) su pane fortificato con aggiunta del 10% di paté di oliva essiccato. Inoltre, come descritto da Hemdane e collaboratori (2015), l'aggiunta di paté sembra interferire con la formazione della maglia glutinica e, quindi, con il conseguente trattenimento della CO₂ principalmente prodotta dai lieviti durante la lievitazione.

La determinazione della *texture* dei pani contenenti farina di frumento tenero di tipo 0 ha fatto registrare valori compresi tra $3'80,42 \pm 55,33$ (PB15) e $1'055,33 \pm 223,34$ g (PB), mentre nei pani contenenti farina di frumento tenero integrali i valori registrati sono compresi tra $1'791,33 \pm 191,25$ (PI15) e $2'267,50 \pm 989,68$ g (PI). L'analisi statistica ha permesso di evidenziare una differenza significativa tra i pani prodotti con le diverse tipologie di farina, con valori di *texture* nettamente superiori per il pane integrale. Contestualmente, l'analisi ha permesso di evidenziare la totale assenza di differenze

statistiche significative tra le quattro tesi sperimentali ottenute dalla stessa tipologia di farina, di tipo 0 o integrale. Alla luce di questi dati è possibile affermare che la presenza di pat  a diverse concentrazioni non influenza in modo evidente la *texture* e dunque non determina modificazioni evidenti delle caratteristiche strutturali del pane.

La determinazione del contenuto di polifenoli nei pani prodotti con entrambe le tipologie di farina ha mostrato un incremento nel contenuto di tali composti proporzionale al contenuto di pat  di oliva. In dettaglio, nel pane prodotto con farina di frumento tenero di tipo 0 sono state registrate differenze statistiche significative tra le quattro tesi sperimentali. Per quanto riguarda il pane a base di farina di frumento tenero integrale, sono state evidenziate differenze statistiche significative tra le differenti tesi sperimentali, ad esclusione dei prodotti contenenti il 15 e il 20% di pat  di oliva. Dall'analisi   possibile, comunque, evincere come i pani prodotti con entrambe le tipologie di farina e con l'aggiunta del 20% di pat  di oliva non siano statisticamente diversi tra loro, con valori compresi tra $0,81 \pm 0,24$ e $1,16 \pm 0,28$ mg GAE g dw⁻¹. I dati appena descritti sono confrontabili con quelli ottenuti da Cedola e collaboratori (2019) su pani prodotti con farina di frumento tenero e aggiunta di 10% di pat  di oliva essiccato, in cui la quantit  di polifenoli rilevata si attesta attorno a $1,96 \pm 0,04$ mg GAE g dw⁻¹. La discordanza tra i dati del presente studio quelli riportati da Cedola e collaboratori (2019) pu  essere correlata alla qualit  di pat  aggiunto e/o al differente trattamento dello stesso. In particolare, il diverso grado di idratazione del pat  di oliva potrebbe influenzare la concentrazione finale di composti polifenolici.

Tabella 4.2. Caratterizzazione microbiologica e chimico-fisica del pane prodotto con farina di frumento tenero di tipo 0 e farina di frumento tenero integrale.

	Batteri sporigeni Log UFC g ⁻¹	Volume mL	Texture g	Contenuto polifenoli mg GAE g dw ⁻¹
PB	0	4000 ± 0 ^{abc}	1055,33 ± 223,34 ^b	0,00 ± 0,00 ^d
PB10	0	3833 ± 208 ^{bc}	457,42 ± 109,45 ^b	0,33 ± 0,62 ^c
PB15	0	3767 ± 153 ^c	380,42 ± 55,33 ^b	0,70 ± 0,09 ^b
PB20	0	3900 ± 100 ^{bc}	511,42 ± 59,88 ^b	0,81 ± 0,24 ^a
PI	0	4400 ± 100 ^a	2267,50 ± 989,68 ^a	0,23 ± 0,10 ^d
PI10	0	4100 ± 173 ^{abc}	1951,08 ± 48,82 ^a	0,56 ± 0,36 ^{bc}
PI15	0	4200 ± 200 ^{ab}	1791,33 ± 191,25 ^a	0,89 ± 0,11 ^a
PI20	2,81 ± 0,21	4103 ± 170 ^{abc}	1828,08 ± 199,94 ^a	1,16 ± 0,28 ^a

PB: pane di controllo prodotto con farina di tipo 0 senza aggiunta di paté di oliva;

PB10: pane con farina di tipo 0 prodotto con aggiunta del 10% di paté di oliva;

PB15: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 15% di paté di oliva;

PB20: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 20% di paté di oliva;

PI: pane di controllo prodotto con farina integrale senza aggiunta di paté di oliva;

PI10: pane con farina integrale prodotto con aggiunta del 10% di paté di oliva;

PI15: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 15% di paté di oliva;

PI20: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 20% di paté di oliva.

GAE: gallic acid equivalents.

Le lettere in apice indicano le differenze statistiche sulla base del *Tukey test* ($\alpha=0,05$).

Infine, l'analisi sensoriale dei pani prodotti con farina di frumento tenero di tipo 0 e integrale ha permesso di evidenziare l'assenza di differenze statistiche significative tra le quattro tesi sperimentali per quanto riguarda l'aspetto globale, l'odore, il gusto e la percezione dei sapori fondamentali dolce, salato e acido.

Relativamente alla persistenza del sapore dopo l'assaggio sono stati registrati valori significativamente più elevati per i pani prodotti con farina di tipo 0 con aggiunta del 15 e 20% di paté di oliva rispetto al pane di controllo. Mentre, non sono state registrate differenze significative tra i pani prodotti con farina integrale contenenti paté di oliva e pane di controllo.

Per quanto riguarda il sapore d'oliva sono stati registrati dei valori significativamente più elevati nei pani contenenti paté di oliva rispetto a quelli di controllo, indipendentemente dalla tipologia di farina utilizzata.

Relativamente alla percezione dell'amaro per i pani prodotti con farina di tipo 0 e paté di oliva sono stati registrati dei valori significativamente più elevati rispetto a quelli di controllo; mentre per i pani con farina integrale e 20% di paté di oliva sono stati registrati valori statisticamente più elevati rispetto al pane di controllo. La maggiore percezione di amaro è stata confermata nello studio condotto da Cecchi e collaboratori (2019), su alimenti fortificati con paté di oliva essiccato, tra cui il pane.

Inoltre, come precedentemente descritto da Keast e Breslin (2003) e confermato nel presente lavoro di tesi, la percezione dell'amaro è correlabile ad una minore percezione del sapore dolce, sebbene quest'ultimo non abbia fatto registrare differenze statisticamente significative.

In dettaglio, dalle valutazioni della percezione del sapore d'oliva è emersa una differenza statistica significativa tra i pani prodotti con farina di frumento tenero di tipo 0 aggiunti del 20% di paté di oliva e i restanti prodotti, confermando come la percezione del sapore di oliva sia estremamente più evidente nel pane prodotto con farina di tipo 0 rispetto al pane prodotto con farina integrale.

Complessivamente, i pani prodotti con entrambe le tipologie di farina aggiunti di paté di oliva non mostrano differenze sostanziali per quanto concerne le differenze di gusto e di croccantezza rispetto ai pani di controllo.

Tabella 4.3, Analisi sensoriale di campioni di pane prodotto con farina di frumento tenero di tipo 0 e farina di frumento tenero integrale.

	Aspetto globale	Gradevolezza odore	Gradevolezza gusto	Persistenza sapore	Percezione quattro sapori fondamentali				Sapore d'oliva	Differenze di gusto	Differenze di croccantezza
					dolce	salato	amaro	acido			
PB	5,91 ± 1,45 ^a	5,91 ± 1,22 ^a	5,18 ± 1,54 ^a	3,64 ± 1,69 ^b	3,91 ± 2,02 ^a	2,36 ± 1,96 ^a	2,00 ± 1,41 ^d	2,00 ± 0,89 ^a	1,09 ± 0,30 ^c	/	/
PB10	7,09 ± 1,45 ^a	6,73 ± 0,90 ^a	6,45 ± 1,29 ^a	5,45 ± 1,63 ^{ab}	2,91 ± 1,58 ^a	2,09 ± 2,99 ^a	4,64 ± 2,01 ^{abc}	3,18 ± 1,99 ^a	5,09 ± 1,45 ^b	5,73 ± 1,49 ^{ab}	3,64 ± 1,29 ^a
PB15	7,27 ± 1,14 ^a	6,73 ± 0,96 ^a	6,27 ± 1,35 ^a	6,00 ± 2,14 ^a	2,36 ± 1,72 ^a	1,64 ± 0,98 ^a	5,55 ± 1,50 ^{ab}	3,27 ± 2,34 ^a	6,18 ± 1,59 ^{ab}	6,36 ± 1,30 ^{ab}	3,36 ± 1,43 ^a
PB20	6,82 ± 1,60 ^a	6,91 ± 0,94 ^a	5,91 ± 1,92 ^a	6,73 ± 1,56 ^a	2,45 ± 1,63 ^a	1,73 ± 1,01 ^a	6,55 ± 1,97 ^a	2,82 ± 1,89 ^a	7,45 ± 1,29 ^a	7,27 ± 1,19 ^a	4,36 ± 1,86 ^a
PI	6,30 ± 1,06 ^a	6,00 ± 1,05 ^a	5,80 ± 1,32 ^a	5,00 ± 1,63 ^{ab}	3,50 ± 2,12 ^a	2,30 ± 1,57 ^a	2,40 ± 1,90 ^{cd}	1,50 ± 0,71 ^a	1,30 ± 0,67 ^c	/	/
PI10	6,70 ± 0,82 ^a	6,60 ± 0,84 ^a	6,40 ± 1,26 ^a	5,60 ± 1,78 ^{ab}	2,40 ± 1,65 ^a	2,30 ± 1,83 ^a	4,00 ± 1,63 ^{bcd}	2,10 ± 1,20 ^a	5,00 ± 1,56 ^b	5,10 ± 1,29 ^b	5,00 ± 1,70 ^a
PI15	6,70 ± 1,42 ^a	6,20 ± 1,03 ^a	6,30 ± 1,70 ^a	6,10 ± 1,29 ^a	2,20 ± 1,69 ^a	2,00 ± 1,70 ^a	4,60 ± 1,58 ^{abc}	2,10 ± 1,20 ^a	6,10 ± 1,73 ^{ab}	6,40 ± 1,43 ^{ab}	5,20 ± 2,57 ^a
PI20	6,60 ± 0,97 ^a	6,20 ± 1,03 ^a	6,50 ± 1,43 ^a	7,00 ± 0,71 ^a	2,10 ± 1,45 ^a	2,10 ± 1,85 ^a	5,10 ± 2,02 ^{ab}	1,90 ± 0,88 ^a	6,60 ± 1,78 ^{ab}	7,44 ± 1,13 ^a	5,20 ± 1,55 ^a

PB: pane di controllo prodotto con farina di tipo 0 senza aggiunta di paté di oliva;

PB10: pane con farina di tipo 0 prodotto con aggiunta del 10% di paté di oliva;

PB15: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 15% di paté di oliva;

PB20: pane prodotto con farina di tipo 0 e aggiunta di 20% di paté di oliva;

PI: pane di controllo prodotto con farina integrale senza aggiunta di paté di oliva;

PI10: pane con farina integrale prodotto con aggiunta del 10% di paté di oliva;

PI15: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 15% di paté di oliva;

PI20: pane prodotto con farina integrale e aggiunta di 20% di paté di oliva.

Le lettere in apice indicano le differenze statistiche sulla base del *Tukey test* ($\alpha=0$).

5. CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio, la valorizzazione dei sottoprodotti dei processi industriali e in particolare dei sottoprodotti dell'industria olearia è stata oggetto di forte interesse da parte della comunità scientifica internazionale, nell'ottica di un maggiore sviluppo dell'economia circolare. In particolare, il riutilizzo di paté di oliva ottenuto dal processo di molitura delle olive è stato ampiamente valutato e la sua applicazione nella produzione di prodotti da forno arricchiti può rappresentare un metodo innovativo per la produzione di alimenti funzionali, ivi inclusi i pani fortificati.

Complessivamente, i risultati ottenuti nella presente Tesi sperimentale sembrano dimostrare che l'aggiunta di paté di oliva all'impasto contribuisca ad aumentare il contenuto in polifenoli dei pani sperimentali, modificandone il profilo aromatico, attraverso la comparsa del tipico sentore di oliva. Inoltre, l'aggiunta di paté sembra non influenzare la texture finale del pane e la carica di sporigeni nel prodotto finale, mentre, questa interferisce in modo negativo con la formazione della maglia glutinica, determinando una riduzione del volume finale dei pani.

Risultano tuttavia necessari ulteriori studi ed esperimenti per stabilire l'impatto del paté di oliva nella definizione delle caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche e nutrizionali del pane prodotto al fine di valutarne gli effetti benefici sulla salute del consumatore.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alshraideh, H.; H. Qdais. "Selection of management option for solid waste from olive oil industry using the analytical hierarchy process." *Journal of Material Cycles and Waste Management*, no. 18(1) (2016): 177-185.
- Asfi, Ouzounidou, Panajiotidis, Therios, Moustakas. 2012.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhk K.:
Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1994.
- Balasundram, N.; S. Kalyana, S. Samman. "Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses." *Food Chem*, no. 99 (2006): 191-203.
- Bertin, L, F. Ferri, A. Scoma, L. Marchetti, F. Fava. "Recovery of high added value natural polyphenols from actual olive mill wastewater through solid phase extraction." *Chem Eng J*, no. (3) (2011): 1287-1293.
- Beta, T.; Nam, S.; Dexter, J.; Sapirstein, H.; (2005), Phenolic content and antioxidant activity of
pearled wheat and roller milled fractions, *Cereal Chem*, 82, 390-393,
- Bianco, A, F. Buiarelli, G. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska, P. Margherita.
"Analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters, Part I." *J Sep Sci*, no. 26 (2003): 409-416.
- Bleve, G.; Tufariello, M.; Durante M.; Perbellini ,E.; Ramires, F.A.; Grieco, F.; Capplo, M.S.; De Domenico, S. Giovanni, M.; Tasioula-Margari, M.; et al."Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives." *Front. Microbiol.*, no. 5 (2014): 570.
- Bouaziz, M., I. Fki, H. Jemai, M. Ayadi, and S Sayadi. "Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves." *Food Chemistry*, no. 108(1) (2008): 253-262.
- Caponio, F., C. Summo, V. M. Paradiso, A. Pasqualone, and T. Gomes. "Evolution of the oxidative and hydrolytic degradation of biscuits fatty fraction during storage." *J. Sci. Food Agric.*, no. 89 (2009): 1392-1396.
- Caponio, F., D. Delcuratolo, C. Summo, and A. Pasqualone. "Quality of the lipid fraction of Italian biscuits." *J. Sci. Food Agric.*, no. 86 (2006): 356-361.
- Caponio, F., L. Cosmai, M. Giarnetti, T. Gomes, C. Summo, and V. M. Paradiso. "A comparative study on oxidative and hydrolytic stability of manovarietal extra virgin olive oil in bakery products." *Food Res. Int.*, no. 54 (2013): 1995-2000.
- Caruso, M. C.; Galgano, F.; Colangelo, M.A.; Condelli, N.; Scarpa, T.; Tolve, R.; Favati, F. "Evaluation of the oxidative stability of bakery products by OXITEST method and sensory analysis." *Eur. Food Res. Technol.*, no. 243 (2017): 1183-1191.
- Cassano A, Conidi C, Giorno L. "Fractionation of olive mill wastewater by membrane separation

- techniques". *J Hazard Mater* 248–249 (2013): 185–193.
- Cavalheiro, C. V.; Picolotto, R. S.; Cichoski, A, J.; Wagner R. de Menezes C. R.; Zepka, L. Q., Barins, J. S. "Olive leaves offer more than phenolic compounds - Fatty acids and mineral composition of varieties from Southern Brazil." no. 71 (2015): 122-127.
- Cedola A, Cardinali A, Del Nobile M A, Conte A. 2019. Enrichment of Bread with Olive Oil Industrial By-Product *Journal of Agricultural Science and Technology B* 9 119-127
- Chiou, A., F. N. Salta, N. Kalogeropoulos, A. Mylona, I. Ntalla, N. K. Andrikopoulos. "Retention and distribution of polyphenols after pan-frying of French fries in oils enriched with olive leaf extract." *Journal of Food Science* 72(8) (2007): S574–S584.
- Choe, E.; D. B. Min. "Mechanisms and factors for edible oil oxidation." *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, no. 5 (2006): 169-186.
- Clodoveo, Maria Lisa. "Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future — An overview." *Trends in Food Science & Technology*, no. 25(1) (2012): 13-23.
- Cuevas, M., J. F. García, G. Hodaifa, and S. Sánchez. "Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis." *Industrial Crops and Products*, no. 70 (2015): 100-106.
- De Marco, E, M Savarese, A Paduano, and R Sacchi. "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters." *Food Chem*, no. 104(2) (2007): 858-867.
- Dermeche, S, M Nadour, C Larroche, F Moulti-Mati, and P Michaud. "Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies." *Process Biochem*, no. 48(10) (2013): 1532-1552.
- D'Antuono, I, Padalino, L; Durante, M; Conte, A; Cardinali, A; Linsalata, V; Mita, G; Logrieco, A.F.; Del Nobile, M.A. "Use of Olive Oil Industrial By-Product for Pasta Enrichment." *Antioxidants*, 2018.
- Durante, M, G Bleve, R Selvaggini, G Veneziani, M Servili, and G Mita. "Bioactive Compounds and Stability of a Typical Italian Bakery Products “Taralli” Enriched with Fermented Olive Paste." *Molecules*, Settembre 2019.
- Erbay, Z, and F Icier. "Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology." *Journal of Food Engineering*, no. 91(4) (2009): 533-541.
- Esposito, S.; Veneziani, G.; Taticchi, A.; Selvaggini, R.; Urbani, S.; Di Maio, I.; Sordini, B.; Minnocci, A.; Sebastiani, L.; Servili, M. "Flash thermal conditioning of olive pastes during the olive oil mechanical extraction process: Impact on the structural modifications of pastes and oil quality." *J. Agric. Food Chem*, no. 61 (2013): 4953-4960.
- Esteve, C., M. L. Marina, M. C. García. "Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides." *Food Chemistry*, no. 167(0) (2015): 272-280.
- Fabiani, R, P. Rosignoli, A De Bartolomeo, R. Fuccelli, M. Servili, GF Montedoro. "Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells." *J Nutr*, no. 138(8) (2008): 1411-1416.

- Fabiani, RDBA, P. Rosignoli, M. Servili, GF Montedoro, G. Morozzi. "Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis." *Eur J Cancer Prev*, no. 11(4) (2002): 351-810.
- Farag, R. S., E. A. Mahmoud, A. M. Basuny. "Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating." *International Journal of Food Science & Technology*, no. 42(1) (2007): 107-115.
- Farag, R. S., G. S. El-Baroty, and A. M Basuny. "The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil." *International Journal of Food Science & Technology*, no. 38(1) (2003): 81-87.
- Fernández-Bolaños, J., B. Felizón, A. Heredia, R. Rodríguez, R. Guillén, and A. Jiménez. "Steam-explosion of olive stones: Hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose." *Bioresource Technology*, no. 79(1) (2001): 53-61.
- FN, Salta, A. Mylona, A. Chiou, G. Boskou, NK Andrikopoulos. "Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract." *Rev Agaroqu Tecnol Alim*, no. 13(6) (2007): 413-421.
- Frankel, E.N. "Volatile lipid oxidation products." *Prog. Lipid Res*, no. 22 (1983): 1-33.
- Galanakis, C. M., E Tornberg, and V Gekas. "Dietary fiber suspensions from olive mill wastewater as potential fat replacements in meatballs." *LWT — Food Science and Technology*, no. 43(7) (2010): 1018-1025.
- Galanakis, C.M. "Olive fruit dietary fiber: Components, recovery and applications." *Trends in Food Science Technology*, no. 22(4) (2011): 175-184.
- Ghanbari, R, F Anwar, KM Alkharfy, AH Gilani, and N Saari. "Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) - A review." *Int J Mol Sci*, no. 13(3) (2012): 3291-3340.
- Goldsmith, C., Q. Vuong, E. Sadeqzadeh, C Stathopoulos, P. Roach, and C Scarlett. "Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf extracts against pancreatic cancer cells." *Molecules*, no. 20(7) (2015): 12992-13004.
- Gonzalez-Santiago, M, J Fonolla, and E Lopez-Huertas. "Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, evidence its transient association with low-density lipoproteins." *Pharmacol Res*, no. 61 (2010): 364-370.
- Goula, A.M., and H.M. Lazarides. "Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes." *Journal of Food Engineering*, no. 167(Part A) (2015): 45-50.
- Grigelmo-Miguel, and et al. (1999).
- Hemdane S., Leys, S., Jacobs, P. J., Dornez, E., Delcour, J. A., and Courtin, C. M. 2015. "Wheat Milling By-Products and Their Impact on Bread Making." *Food Chemistry* 187 (15): 280-9.
- Herrero, M., T. N. Temirzoda, A. Segura-Carretero, R. Quirantes, M. Plaza, and E. Ibañez. "New possibilities for the valorization of olive oil by-products." *Journal of Chromatography A*, no. 1218(42) (2011): 7511-7520.
- IOOC. *International Olive Oil Council*. 2017. <http://www.internationaloliveoil.org>.

- Keast, R. S. J.; & Breslin, P. A. S. (2003). An overview of binary taste-taste interactions. *Food Quality and Preference*, 14(2), 111–124. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00110-6)
- Keceli, T., and F. Harp. "The effect of olive leaves and their harvest time on radical scavenging activity and oxidative stability of refined olive oil." *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, no. 6(2) (2014): 141-149.
- Khoddami, A.; Wilkes M.; Roberts T. H. (2013). "Techniques for analysis of plant phenolic compounds". *Molecules* 18: 2328-2375.
- Lenucci, M. S., M. Durante, B. Laddomada, G. Mita, and S. Caretto. "Effects of sodium alginate bead encapsulation on the storage stability of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) bran oil extracted by supercritical Co₂." *Food Chem.*, no. 60 (2012): 10689-10695.
- Lesage-Meessen L.; Navarro D.; Maunier S.; Sigoillot J.; Lorquin J.; Delattre M.; Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chem* 75(4): 501–507.
- Liakopoulou, Komnitsas, Doula, and Kavvadias. 2010.
- Malheiro R., S. Casal, H. Teixeira, A. Bento, and J. Pereira. "Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality." *Food and Bioprocess Technology*, no. 6(2) (2013): 509-521.
- Manna, C.; Migliardi V.; Golino P.; Scognamiglio A.; Galletti P.; Chiariello M.; Zappia V. "Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion." *J. Nutr. Biochem*, no. 15 (2004): 461-466.
- McNamara, CJ, CC Anastasiou, V Flaherty, and Mitchell R. "Bioremediation of olive mill wastewater." *Int Biodeterior Biodegradation*, no. 6(2) (2008): 127-134.
- Mansour, A. B., Flamini, G., Ben Selma, Z., Le Dréau, Y., Artaud, J., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2015a). "Comparative study on volatile compounds, fatty acids, squalene and quality parameters from whole fruit, pulp and seed oils of two tunisian olive cultivars using chemometrics". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(7), 976–987.
- Medina, E.; A. de Castro, C. Romero, M. Brenes. "Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity." *J Agric Food Chem*, no. 54 (2006): 4954-4961.
- Mirabella, N, V. Castellani, S. Sala. "Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review." *Journal of cleaner production*, no. 65(0) (2014): 28-41.
- Mulinacci, N, A. Romani, C. Galardi, P. Pinelli, C. Giaccherini, FF Vincieri. "Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples." *J Agric Food Chem*, no. 49 (2001): 3509-3514.
- Niaounakis, Halvadakis. "Olive processing waste management." *London: Elsevier*, 2006: 23-24, 237-240.

- Pagani, M. A., M. Lucisano, M. Mariotti. "Traditional Italian products from wheat and other starchy flours." In *Handbook of Food Products Manufacturing. Principles, Bakery, Beverages, Cereals, Cheese, Confectionery, Fats, Fruits, and Functional Foods*, 327-388. Mila: Wiley-Interscience, 2007.
- Paini, M., B. Aliakbarian, A. A. Casazza, A. Lagazzo, R. Botter, and P. Perego. "Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters." *LWT — Food Science and Technology*, no. 62(1, Part 1) (2015): 177-186.
- Paiva-Martins, F., R. Correia, S. Félix, P. Ferreira, M. H Gordon. "Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 55(10) (2007): 4139-4143.
- Paraskeva, CA, VG Papadakis, E Tsarouchi, DG Kanellopoulou, and PG Koutsoukos. "Membrane processing for olive mill wastewater fractionation." *Desalination*, no. 213 (2006): 218-229.
- Paraskeva CA.; Papadakis VG.; Tsarouchi E.; Kanellopoulou DG.; Koutsoukos. "Membrane processing for olive mill wastewater fractionation." *Desalination* no. 213 (2007): 218-229.
- Pasqualone, A., et al. "Functional, textural and sensory properties of dry pasta supplemented with lyophilized tomato matrix or with durum wheat bran extracts produced by supercritical carbon dioxide or ultrasound." *Food Chem.*, no. 213 (2016): 545-553.
- Pietta, PG. "Flavonoids as antioxidants." *J Nat Prod*, no. 63 (2000): 1035-1042.
- Procházková, D, I. Bou ov, N. Wilhelmová. "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids." *Fitoterapia*, no. 82 (2011): 513-523.
- Rafiee, Z., S. M. Jafari, M. Alami, and M. Khomeiri. "Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil." *Journal of Agricultural Science and Technology*, no. 14 (Supplementary Issue) (2012): 1497-1509.
- Rahmanian, N., S. M. Jafari, T. A. Wani. "Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves." *Trends in Food Science & Technology*, no. 42(2) (2015): 150-172.
- Ranalli, A., L. Pollastri, S. Contento, G. Di Loreto, E. Iannucci, and L.: Russi, F Lucera. "Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed, and whole olive fruit oils. Their use to characterize fruit variety by chemometrics." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 50(13) (2002): 3775-3779.
- Ranalli, A, Lucera L, Contento S. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive mill wastewater. *J Agric Food Chem* 51 (2003): 7636-7641.
- Rodríguez, G., A. Lama, R. Rodríguez, A. Jiménez, R. Guillén, J. Fernández-Bolaños. "Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds." *Bioresource Technology*, no. 99(13) (2008): 5261-5269.
- Rodríguez-Gutiérrez, Rubio-Senent, Lama-Munoz, García, Fernandez-Bolanos. (2014).
- Roig, A, M.L. Cayuela, and Sánchez-Monodero. "An overview on olive mill wastes and their valorisation methods." *Waste Management*, no. 26(9) (2006): 960-969.
- Romero, C, M. Brenes, P. Garcia, and A. Garrido. "Hydroxytyrosol 4- β -D- glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products." *J Agric Food Chem*, no. 50 (2002): 3835-3839.

- Romero, Thereby, Rubió, Motilva, Macià, and Ramo. 2012.
- Roncalés, Beltrán, Djenane, Lorés, and Camo. 2011.
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A.; Lopes, R. P., Saraiva, J.A., Boussetta, N., Barba, F.J. "Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds." *Trends in Food Science & Technology*, no. 45(2) (2015): 296-310.
- Rubió, L, M. J. Motilva, A. Macià, T. Ramo, M. P. Romero. "Development of a phenol-enriched olive oil with both its own phenolic compounds and complementary phenols from thyme." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no. 60(12) (2012): 3105-3112.
- Ruiz-Moreno, M. J.; Raposo, R.; Moreno-Rojas, J.M.; Zafrilla, P.; Cayuela, J. M.; Mulero, J.; Cantos-Villar, E "Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model." *LWT — Food Science and Technology*, no. 61(1) (2015): 117-123.
- Servili, M, A. Taticchi, S. Esposto, B. Sordini, S. Urbani. "Technological aspects of olive oil production." *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. (InTech) I (2012): 372.
- Servili, M.; Esposto, S.; Fabiani, R.; urbani, S.; Taticchi, A.; Mariucci, F.; Selvaggini, R.; Montedoro, G.F. "Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure." *Inflammopharmacology*, no. 17 (2009): 1-9.
- Servili, M., R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G. Montedoro, G. Morozzi. "Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. ." *Journal of Chromatography A*, no. 1054(1-2) (2004): 113-127.
- Shahidi, F.; P. Ambigaipalan. "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review." *J Funct Foods*, no. 18 (2015): 820-897.
- Suhaj, M. ‘‘Spice antioxidants isolation and their antiradical activity’’: A review. *J Food Compost Anal.* 19(6–7) (2006): 531–537.
- Taghvaei, M.; S. Jafari. "Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives." *Journal of Food Science and Technology*, no. 52(3) (2015): 1272-1282.
- Tufariello, M., Durante, M; Bleve, G.; Veneziani, G.; Taticchi, A.; Servili, M.; Mita, G. "Patè olive cake: Possible exploitation of a by-product for food applications." *Front. Nutr.*, no. 8 (2019): 83.
- Uribe, E, A. Pasten, R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Galvez, I. Quispe-Fuentes, and J. Ortiz. "Comparison of chemical composition, bioactive compounds and antioxidant activity of three olive-waste cakes." *J Food Biochem*, no. 39 (2015): 189-198.
- Vazquez-Velasco, M., L. Esperanza Diáz, R. Lucas, S. Gómez-Martinez, A. Marcos. "Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors." *Br J Nutr*, no. 105 (2011): 1448-1452.
- Vierhuis. (2003).

- Zagmutt, S, L. Guzmán, R. Orrego, S. Wehinger, E. Leiva. "Phenolic compounds identification and antioxidant capacity of alperujo extracts from region del Maule, Chile." *Int J Food Prop* 2002, no. 19 (2016): 2016-2025.
- Zirehpour, A, A. Rahimpour, M. Jahanshahi, M. Pwyravi. "Mixed matrix membrane application for olive oil wastewater treatment: process optimization based on Tgauchi design method." *J environm. Manag*, no. 132 (2014): 113-120.