



CENTRO DI RICERCA OLIVICOLTURA, FRUTTICOLTURA ED AGRUMICOLTURA



## PROGETTO INNOLITEC

*Innovazioni tecnologiche nella filiera dell'oliva  
da olio e da mensa. Risultati finali del progetto*

Martedì 6 dicembre 2022 | ore 9:00 - 13:30 | Sala "Giacomo Lanza"

Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, C.so Savoia 190 Acireale (CT)

*Valorizzazione dei prodotti secondari dell'industria olearia*

**DOTT. GABRIELE BALLISTRERI**

CREA - CENTRO DI RICERCA OLIVICOLTURA, FRUTTICOLTURA E AGRUMICOLTURA (ACIREALE)



oof  
olivificina



SOI

Innolitec

ORDINE DEI  
TECNOLOGI ALIMENTARI  
DI SICILIA E SARDEGNA



Ministero dell'agricoltura,  
della sovranità alimentare  
e delle foreste

crea  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
e l'ente dell'agricoltura

<https://innolitec.crea.gov.it>

[gabriele.ballistreri@crea.gov.it](mailto:gabriele.ballistreri@crea.gov.it)

**WP5-VALORIZZAZIONE DEI PRODOTTI SECONDARI DELL'INDUSTRIA OLEARIA**

(CREA-OFA Acireale e Rende, CREA-IT Pescara, due enti di ricerca in convenzione)

WP Leader: **Gabriele Ballistreri**

**Obiettivi dell'attività:** estrazione e recupero di sostanze bioattive utilizzabili in campo alimentare, cosmetico, e fitoterapico da acque di vegetazione, foglie e sanse.





**PRODOTTI  
PRINCIPALI**

Olive

Olio



**PRODOTTI SECONDARI E SOTTOPRODOTTI**

Acque di  
vegetazione

Foglie di olivo

Sanse

## ***TASK WP5***

***Task 5.1 Estrazione dei polifenoli dalle acque di vegetazione olearie con un impianto innovativo di estrazione liquido/liquido (CREA-OFA-ACI)***

***Task 5.2 Estrazione di composti bioattivi dalle foglie di ulivo con un impianto di estrazione in continuo solido/liquido a bassa temperatura (CREA-OFA-ACI)***

***Task 5.3 Valorizzazione degli scarti solidi dell'industria olearia da utilizzare per lo sviluppo di metodiche di allevamento del dittero *Hermetia illucens* da impiegare quale integratore proteico di mangimi a base di sansa (CREA-OFA-ACI - DIST. TEC. AGROBIOPESCA)***

***Task 5.4 - Utilizzo di patè da decanter multifase DMF come alimento probiotico nell'alimentazione umana (CREA-IT-PESCARA - CREA-OFA-ACI)***

***Task 5.5 Produzione di paté da sansa denocciolata da frantoio a due fasi a basso contenuto di umidità e di estratti fenolici per l'integrazione umana e l'alimentazione zootecnica (CREA-OFA-REN)***

***Task 5.6 Produzione di aceto da acque di vegetazione olearie (UNIMoRe)***



**Impianto a resine per l'estrazione di sostanze biologicamente attive**



**Impianto di pastorizzazione del succo a freddo con CO2 in fase supercritica**



## **CENTRO di TESTING**

**PER L'INDUSTRIA DEI DERIVATI AGRUMARI**



**Impianto di deterpenazione a freddo degli oli essenziali.**





# crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

## CREA-OFA

### Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura



*Laboratorio di chimica degli alimenti.*



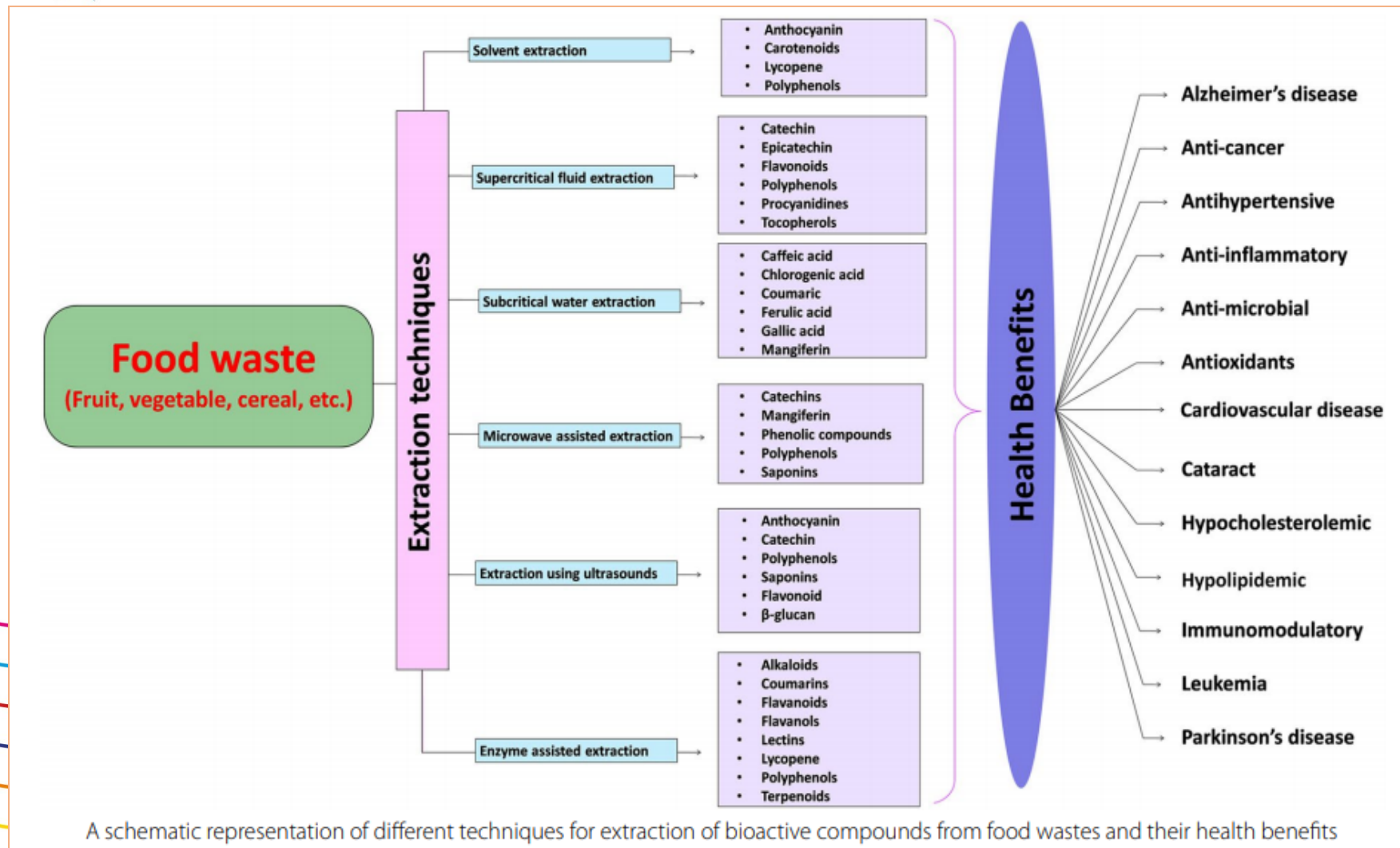


# crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

## CREA-OFA

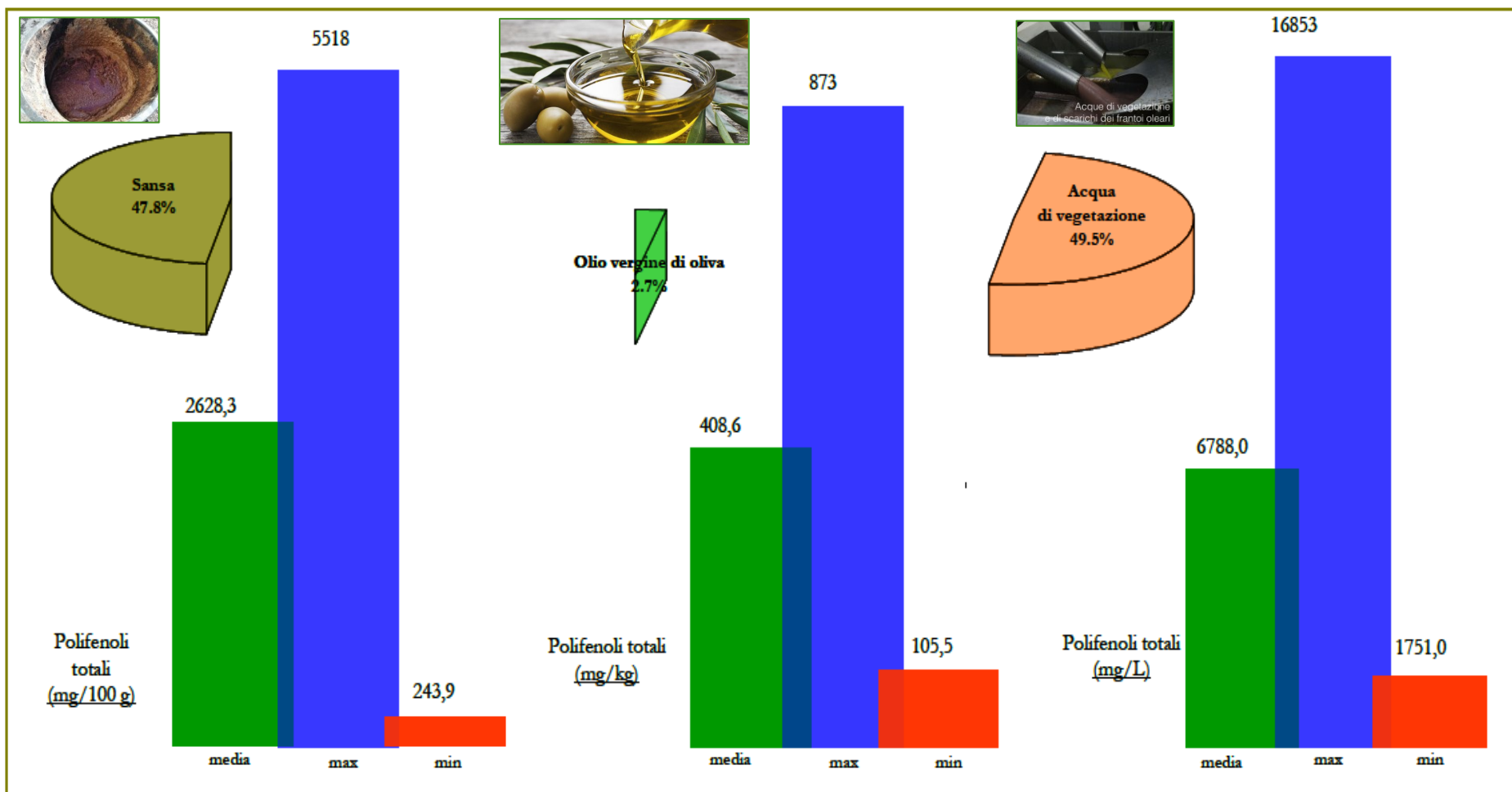
### Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura

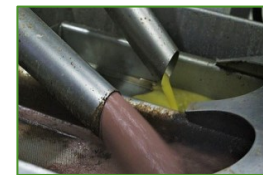


**Descrizione attività:** produzione di estratti da acque di vegetazione attraverso l'impiego di tecnologie separative innovative mediante estrazione liquido-liquido.

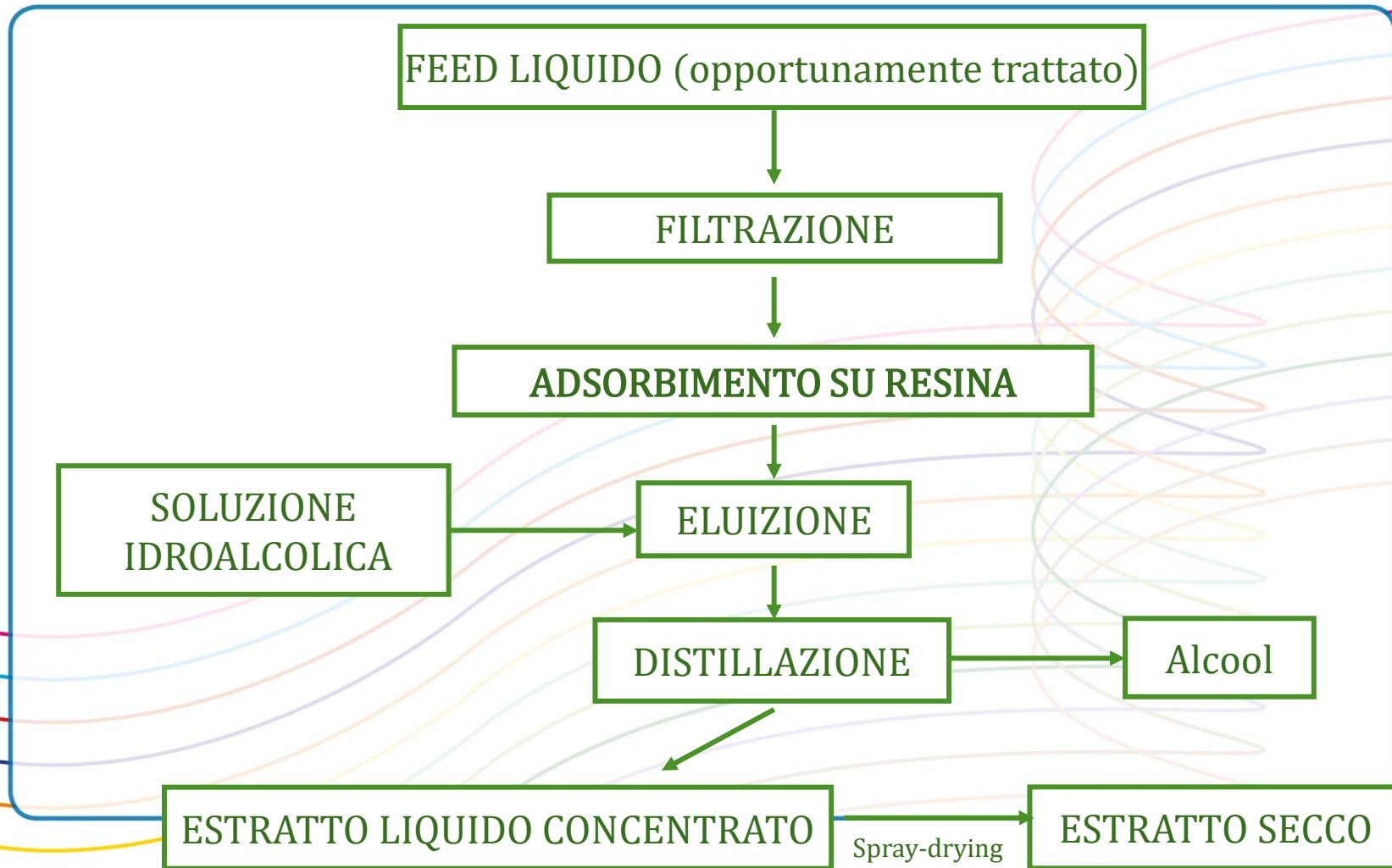


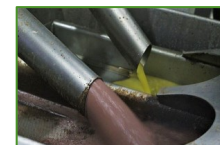
## Distribuzione percentuale e valori assoluti medi, minimi e massimi dei composti fenolici espressi come fenoli totali nell'olio vergine di oliva e nei suoi prodotti secondari



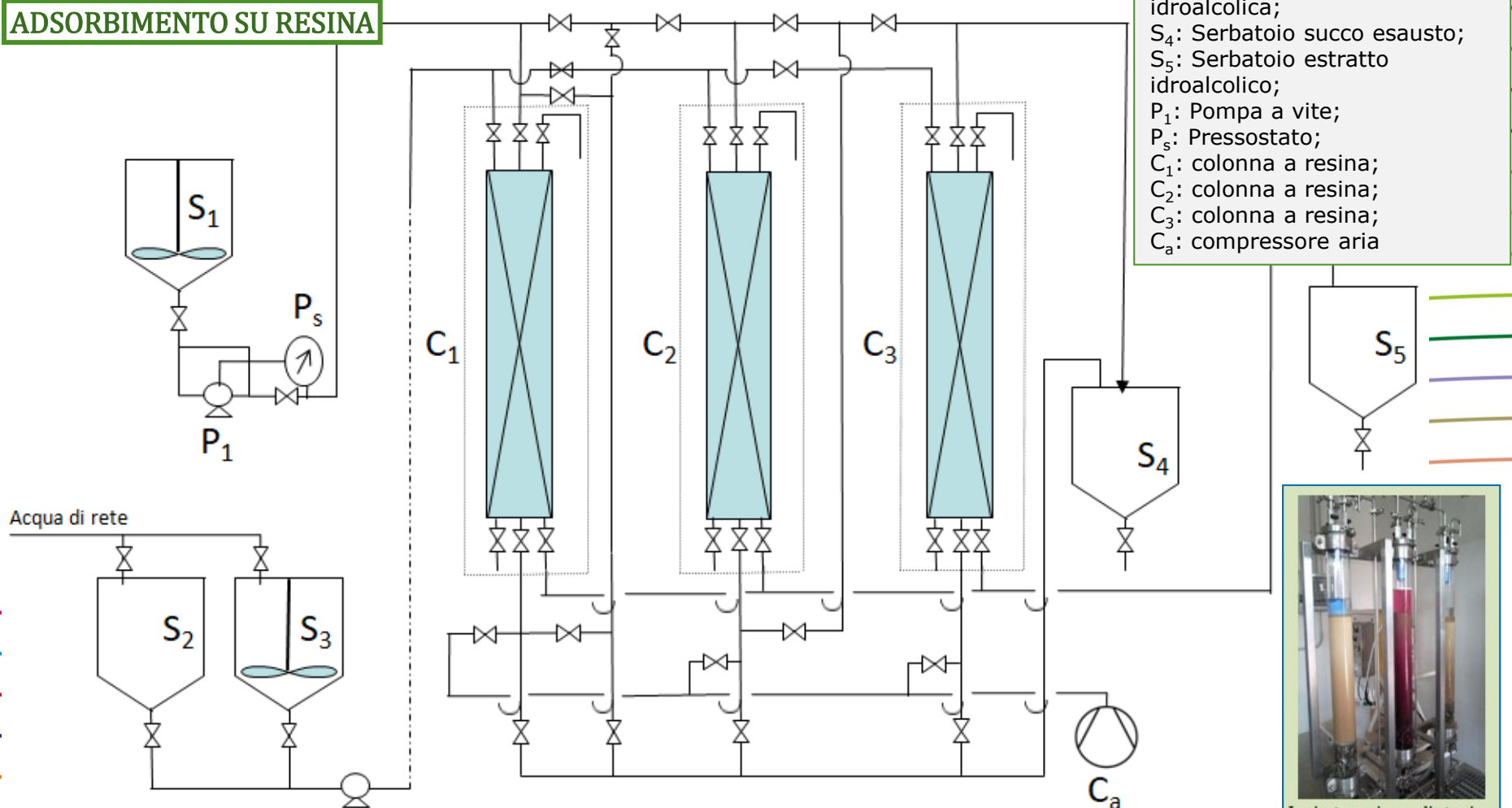


**FLOW CHART DI PRODUZIONE DI UN ESTRATTO MEDIANTE ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA**

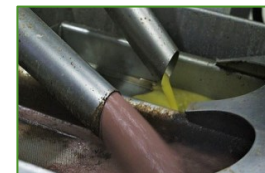




## ADSORBIMENTO SU RESINA

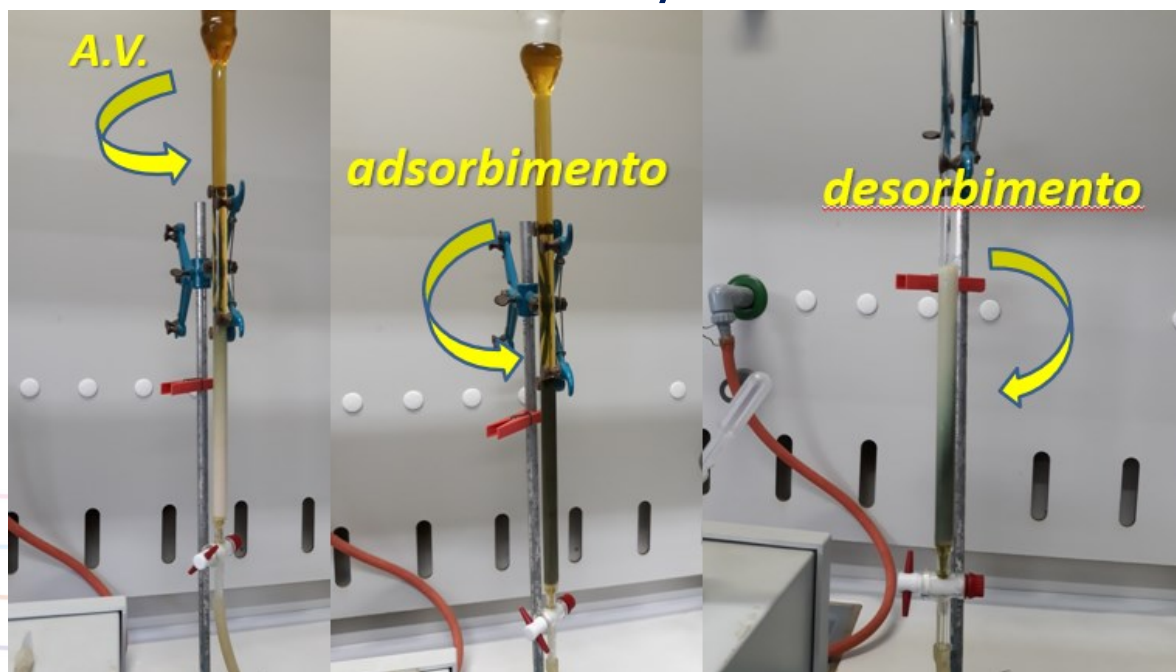


Impianto a resine per l'estrazione di sostanze biologicamente attive



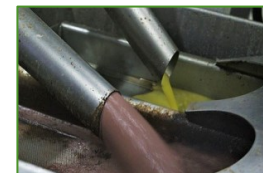
## ADSORBIMENTO SU RESINA

- Resina adsorbente: SP-207
- Volume resina: 2.000 ml
- Flusso: 1BV/h



## Desorbimento

- etanolo/acqua  
(60:40, v/v)



DESORBIMENTO EtOH 60%

**Distillazione sottovuoto**



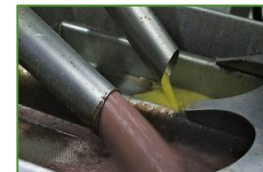
**Recupero alcool**



**Filtrazione**



ESTRATTO LIQUIDO CONCENTRATO





molecules



Article

# Microbial Application to Improve Olive Mill Wastewater Phenolic Extracts

Flora V. Romeo <sup>1,\*</sup> , Gina Granuzzo <sup>1</sup>, Paola Foti <sup>2</sup>, Gabriele Ballistreri <sup>1</sup> , Cinzia Caggia <sup>2</sup> and Paolo Rapisarda <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Council for Agricultural Research and Economics (CREA), Research Centre for Olive, Fruit and Citrus Crops, 95024 Acreale, Italy; gina.granuzzo@gmail.com (G.G.); gabriele.ballistreri@crea.gov.it (G.B.); paolo.rapisarda@crea.gov.it (P.R.)

<sup>2</sup> Department of Agricultural, Food and Environment, University of Catania, 95123 Catania, Italy; paola.foti@phd.unict.it (P.F.); ccaggia@unict.it (C.C.)

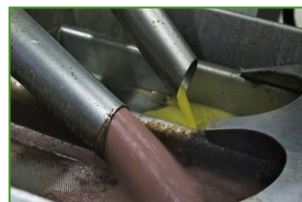
\* Correspondence: floravaleria.romeo@crea.gov.it; Tel.: +39-095-765-3136

**Abstract:** Olive mill wastewater (OMW) contains valuable and interesting bioactive compounds, among which is hydroxytyrosol, which is characterized by a remarkable antioxidant activity. Due to the health claims related to olive polyphenols, the aim of this study was to obtain an extract from OMW with an increased level of hydroxytyrosol by means of microbial enzymatic activity. For this purpose, four commercial adsorbent resins were selected and tested. The beta-glucosidase and esterase activity of strains of *Wickerhamomyces anomalus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Saccharomyces cerevisiae* were also investigated and compared to those of a commercial enzyme and an *Aspergillus niger* strain. The *W. anomalus* strain showed the best enzymatic performances. The SP207 resin showed the best efficiency in selective recovery of hydroxytyrosol, tyrosol, oleuropein, and total phenols. The bioconversion test of the OMW extract was assessed by using both culture broths and pellets of the tested strains. The results demonstrated that the pellets of *W. anomalus* and *L. plantarum* were the most effective in hydroxytyrosol increasing in phenolic extract. The interesting results suggest the possibility to study new formulations of OMW phenolic extracts with multifunctional microorganisms.

**Keywords:** adsorbent resins; beta-glucosidase; esterase; hydroxytyrosol; *Lactiplantibacillus plantarum*; oleuropein; tyrosol; *Wickerhamomyces anomalus*



**Citation:** Romeo, F.V.; Granuzzo, G.; Foti, P.; Ballistreri, G.; Caggia, C.; Rapisarda, P. Microbial Application to Improve Olive Mill Wastewater Phenolic Extracts. *Molecules* **2021**, *26*, 1944. <https://doi.org/10.3390/molecules26071944>

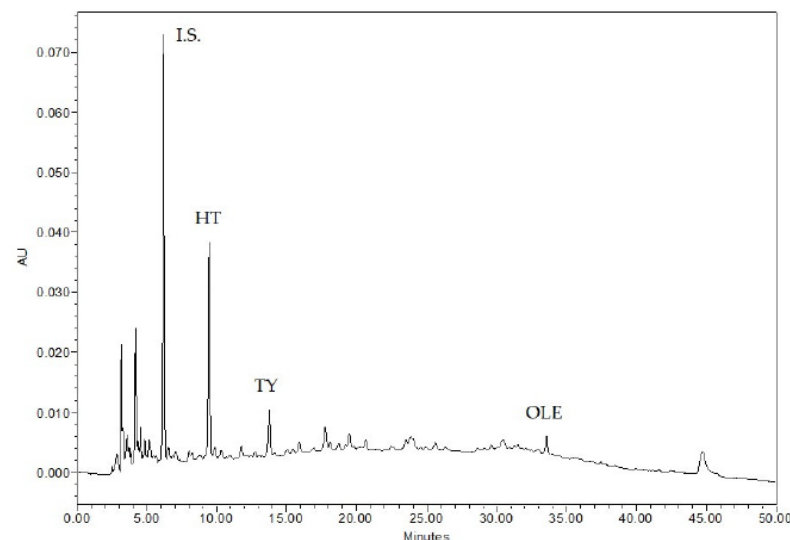


**Table 1.** Chemical parameters of olive mill wastewater (OMW) after pretreatment (centrifugation and filtration).

Parameters	Means $\pm$ SD
pH	4.80 $\pm$ 0.06
Dry matter (g/100 mL)	6.24 $\pm$ 0.02
Hydroxytyrosol (HT) (mg/L)	218.29 $\pm$ 4.94
Tyrosol (TY) (mg/L)	67.24 $\pm$ 5.57
Oleuropein (OLE) (mg/L)	207.49 $\pm$ 56.37
<b>Total phenols (mg/L)</b>	<b>1343.26 <math>\pm</math> 0.54</b>

ACQUE DI VEGETAZIONE

TP = 0.13 g/100 g



**Figure 1.** HPLC phenolic profile (at 280 nm) of OMW sample (I.S. = Internal Standard).

**Table 2.** Phenols detected in OMW extracts obtained with the different tested resins.

Adsorbent Resin	Hydroxytyrosol (HT)	Tyrosol (TY)	Oleuropein (OLE)	Total Phenols
SP207	3239.7 $\pm$ 57.34 a	2016.8 $\pm$ 49.36 a	11,336.6 $\pm$ 199.65 a	<b>16,447.9 <math>\pm</math> 16.31 a</b>
XAD16	1381.7 $\pm$ 66.45 b	1000.3 $\pm$ 120.75 b	10,047.8 $\pm$ 120.29 ab	13,144.6 $\pm$ 21.75 b
PAD900C	294.3 $\pm$ 2.67 c	90.0 $\pm$ 10.59 c	4443.8 $\pm$ 176.32 c	4880.3 $\pm$ 10.87 d
C18	191.1 $\pm$ 16.59 c	50.4 $\pm$ 10.34 c	8092.3 $\pm$ 218.15 b	8763.6 $\pm$ 43.50 c

Data are expressed as mg/L of means  $\pm$  standard deviations. Different letters indicate statistical differences within the same column (Significance at  $p < 0.001$ ).

ESTRATTO LIQUIDO CONCENTRATO

TP = 1.64 g/100 g

**Descrizione attività:** messa a punto di un nuovo processo estrattivo dedicato al recupero e riutilizzo di sostanze ad alto valore aggiunto da foglie di ulivo.



*Estrattore combinato ad ultrasuoni e microonde*



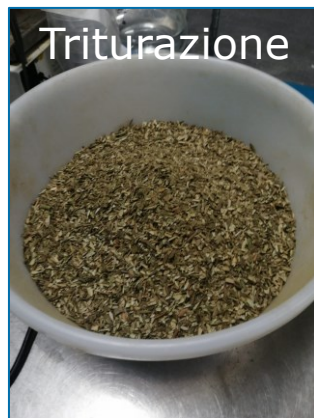
*Figura 1-Impianto a ultrasuoni*

- Capacità nominale: 30 L
- Agitatore a velocità variabile
- 3 trasduttori a ultrasuoni
- Sistema di filtrazione sottovuoto



*Figura 2-Impianto a microonde*

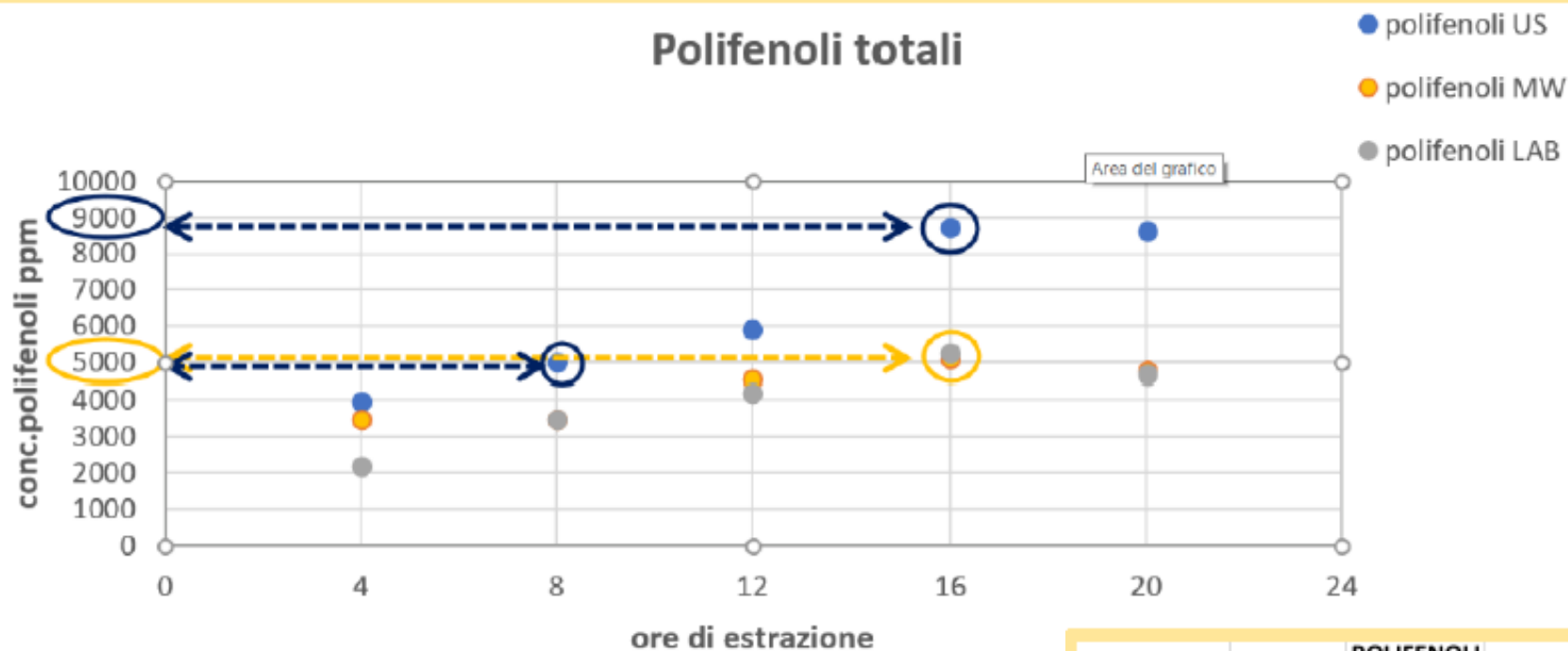
- Capacità nominale: 30 L
- Agitatore a velocità variabile
- Camera di estrazione a temperatura controllata
- Sorgente Magnetron



**ESTRATTO LIQUIDO CONCENTRATO**

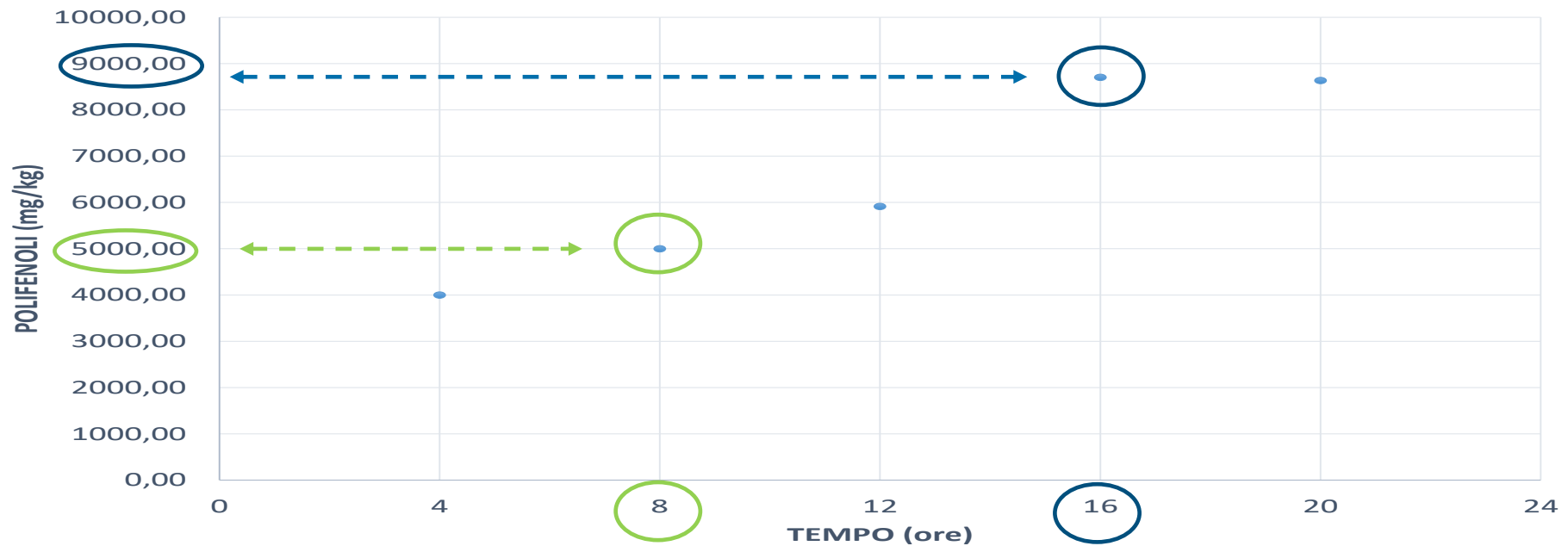


## Polifenoli totali



ORE ESTRAZ.	POLIFENOLI		
	MW	US	LAB
4	3473,214	3998,6607	2203,125
8	3473,214	4999,4442	3471,243
12	4537,946	5912,9494	4207,22
16	5115,625	8702,2321	5272,247
20	4773,214	8632,5149	4694,202

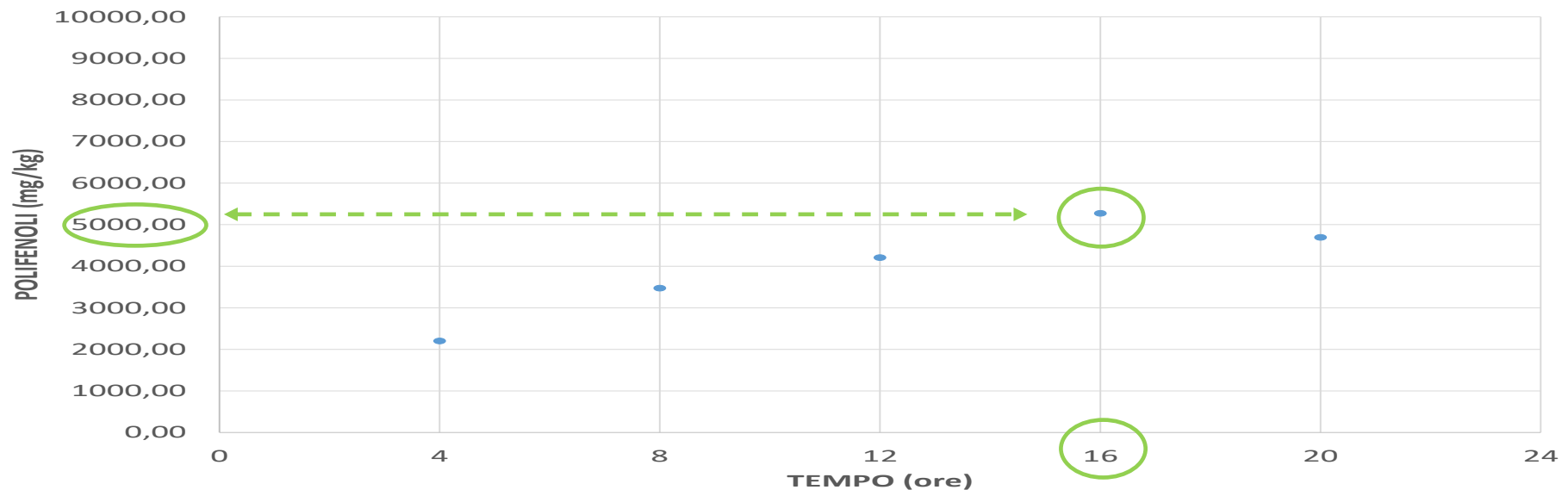
## IMPIANTO US-MW



ESTRATTO LIQUIDO CONCENTRATO

TP = 1.00 g/100 g

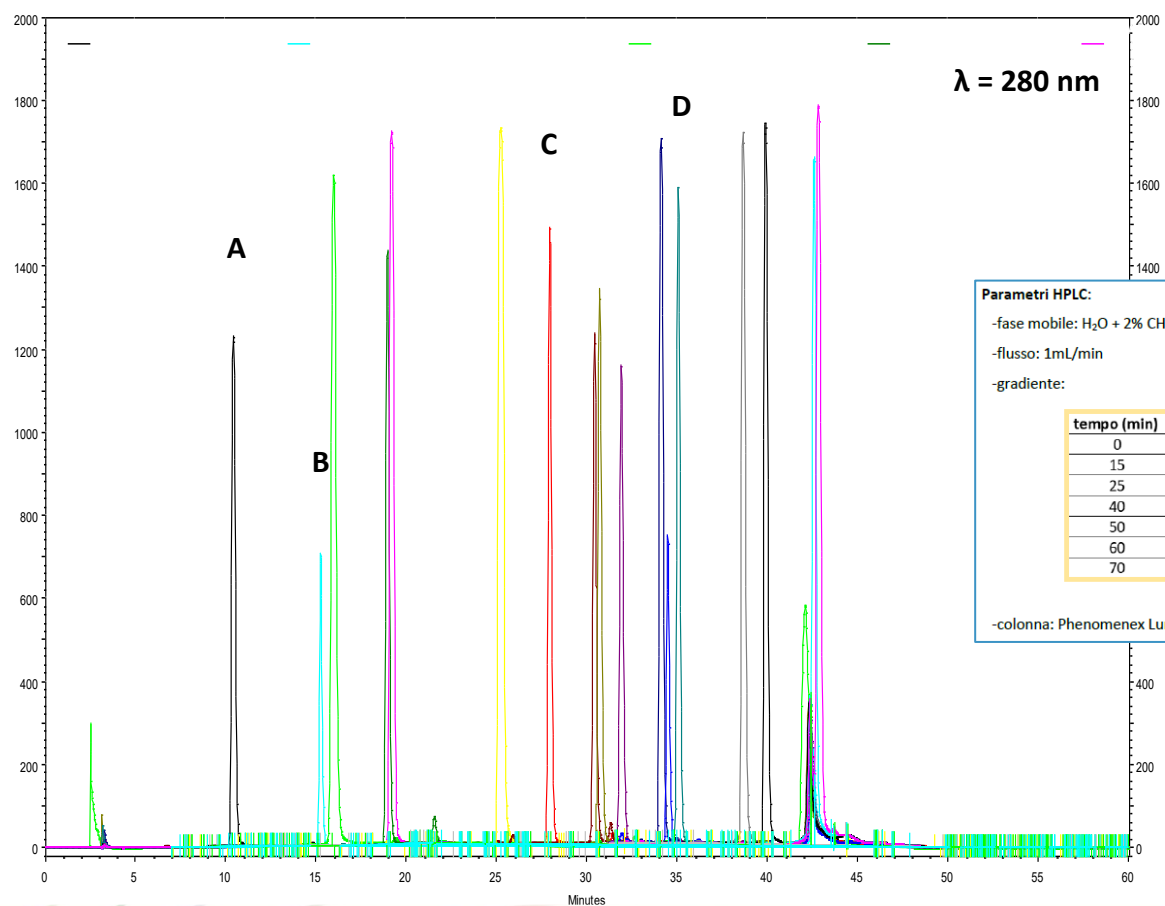
## LAB-SCALE





**A – Idrossitirosolo**  
**B – Tirosolo**  
**C – Verbascoside**  
**D – Oleuropeina**

Acido clorogenico  
Acido vanillico  
Acido caffeico  
Acido *p*-cumarico  
Verbascoside  
Luteolina 7-rutinoside  
Luteolina 7-glucoside  
Rutina  
Apigenina 7-glucoside  
Luteolina 4-glucoside  
Quercetina  
Luteolina  
Apigenina  
Diosmetina



**Parametri HPLC:**

-fase mobile: H<sub>2</sub>O + 2% CH<sub>3</sub>COOH (A), MeOH (B)

-flusso: 1mL/min

-gradiente:

tempo (min)	% A	% B
0	90	10
15	70	30
25	60	40
40	40	60
50	30	70
60	90	10
70	90	10

-colonna: Phenomenex LunaC18 – 5μm – 250x4,6mm



## ESTRATTO LIQUIDO CONCENTRATO

Spray-drying ↓

TP = 1.00 g/100 g

## ESTRATTO SECCO

Total Polyphenols	3.82 g/100 g
Hydroxytyrosol	0.10 g/100 g
Tyrosol	0.05 g/100 g
Oleuropein	0.40 g/100 g
Total Phenols	0.55 g/100 g

TP = 3.82 g/100 g

### CERTIFICATE OF ANALYSIS: OLIVE LEAF EXTRACT

Country of origin	Italy
Botanical name	Olea Europaea L.
Plant part used	leaf

### PHYSICAL/CHEMICAL TEST

Analysis	Specification	Results
Total polyphenols (w/w)	> = 3.00	3.82
Oleuropein (w/w)	> = 0.20	0.40
Form	Powder	Conform
Color	Yellow/Green	Conform
Taste	Typical of olive	Conform
Smell	Typical of olive	Conform
pH	> 2.0	Conform
Solubility	Moderately soluble in water	Conform
Lead (Pb)	< 3ppm	Conform
Arsenic (As)	< 3ppm	Conform
Cadmium (Cd)	< 1ppm	Conform
Mercury (Hg)	< 0.1ppm	Conform
Pesticides	Conform to Reg CE 396/2005	Conform
PAH	Conform to Reg CE 1881/2006	Conform
Benzo(a)pyrene	< 10 µg/kg	Conform
Sum of Benzo(a)pyrene,	< 50 µg/kg	Conform
Residual solvent (ethanol)	< 0.2%	Conform
Total plate count (CFU/g)	< 1000	Conform
Yeast and Mould (CFU/g)	< 100	Conform
Enterobacteriaceae (CFU/g)	< 100	Conform
Escherichia coli	Absent	Conform
Pseudomonas aeruginosa	Absent	Conform
Staphylococcus aureus	Absent	Conform
Salmonella specie	Absent	Conform
Particle size	More than 90% pass 300 µm	Conform



# crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

CREA-OFA

Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura  
e Agrumicoltura

Industrial Crops and Products 38 (2012) 146–152

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/indcrop](http://www.elsevier.com/locate/indcrop)



## The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations

Faten Brahmi<sup>a</sup>, Beligh Mechri, Samia Dabbou, Madiha Dhibi, Mohamed Hammami

Laboratory of Biochemistry, UR03/ES-08 "Human Nutrition and Metabolic Disorder", Faculty of Medicine, University of Monastir, Tunisia

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 13 October 2011  
Received in revised form 11 January 2012

### ABSTRACT

Recent studies suggest that olive leaf is a significant source of bioactive phenolic compounds compared to olive oil and fruits. Identifying appropriate extraction methods is thus an important step to increase the yield of such bioactive components from olive leaf. In the present study, the antioxidant

*Antioxidants* 2015, 4, 682–698; doi:10.3390/antiox4040682

OPEN ACCESS

**antioxidants**

ISSN 2076-3921

[www.mdpi.com/journal/antioxidants](http://www.mdpi.com/journal/antioxidants)

Review

## Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds

Leila Abaza, Amani Taamalli<sup>\*</sup>, Houda Nsir and Mokhtar Zarrouk

Laboratoire de Biotechnologie de l'Olivier, Centre de Biotechnologie de Borj Cedria B.P. 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia; E-Mails: [abaza1tn@yahoo.com](mailto:abaza1tn@yahoo.com) (L.A.); [houda.nsir@gmail.com](mailto:houda.nsir@gmail.com) (H.N.); [zarrouk.mokhtar@gmail.com](mailto:zarrouk.mokhtar@gmail.com) (M.Z.)

<sup>\*</sup> Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: [taamalli\\_ameni@yahoo.fr](mailto:taamalli_ameni@yahoo.fr); Tel./Fax: +216-79-325-083.

Academic Editors: Antonio Segura-Carretero and David Arráez-Román



Journal of Biotechnology 93 (2002) 109–119

JOURNAL OF  
**Biotechnology**

[www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec)

## Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts

Raffaella Briante<sup>a</sup>, Francesco La Cara<sup>a</sup>, Ferdinando Febbraio<sup>a</sup>,  
Maurizio Patumi<sup>b</sup>, Roberto Nucci<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Istituto di Biochimica delle Proteine ed Enzimologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Marconi 10, 80125 Napoli, Italy  
<sup>b</sup> Istituto di Ricerche per la Olivicoltura del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Madonna Alta 128, 60128 Perugia, Italy

Received 7 May 2001; received in revised form 20 July 2001; accepted 15 August 2001

### Abstract

A very simple method is proposed to produce, using non-homogeneous hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase immobilised on chitosan, 3,4-dihydroxy-nphenylethanol (hydroxytyrosol), a commercially unavailable compound with well

J Am Oil Chem Soc (2010) 87:369–376  
DOI 10.1007/s11746-009-1517-x

ORIGINAL PAPER

## Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars

Kostas Kiritsakis · M. G. Kontominas ·  
C. Kontogiorgis · D. Hadjipavlou-Litina ·  
A. Moustakas · A. Kiritsakis

Received: 14 July 2009 / Revised: 30 October 2009 / Accepted: 10 November 2009 / Published online: 10 December 2009  
© AOCs 2009

**Abstract** The olive leaf phenolic composition of the Greek cultivars *koroneiki*, *megaritiki* and *kalamon* was determined. secologanose, dimethyloleuropein, oleuropein diglucoside, luteolin-7-O-glucoside, oleuropein, oleurosides, quer-

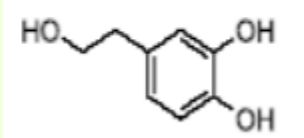
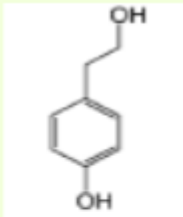
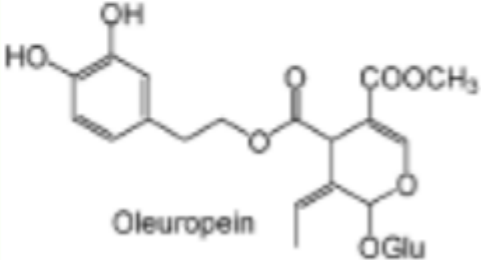


# crea

Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

## CREA-OFA

### Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura

COMPOSTI FENOLICI	BIOATTIVITÀ DIMOSTRATE	STRUTTURA
Idrossitirosolo	Antiossidante Cardioprotettiva Chemoprotettiva Antimicrobica Antinfiammatoria	
Tirosolo	Antiossidante Antinfiammatoria Antiaterogenica Cardioattiva	
Oleuropeina	Antiossidante Cardioprotettiva Ipoglicemica Antimicrobica e antivirale Antinfiammatoria Modulazione di enzimi	 Oleuropein



**crea**

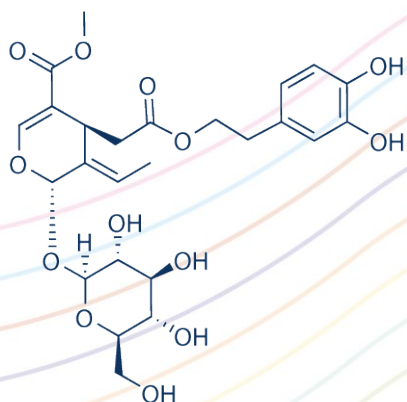
Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

CREA-OFA

Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura  
e Agrumicoltura

## Secoiridoidi

- ❖ Proprietà antiossidante
- ❖ Proprietà antinfiammatoria
- ❖ Proprietà antimicrobica
- ❖ Proprietà antitumorale



**Descrizione attività:** messa a punto di un nuovo processo estrattivo dedicato al recupero e riutilizzo di sostanze ad alto valore aggiunto da foglie di ulivo.



*Cavizzatore centrifugo*



Cavitatore centrifugo	Acciaio Inox SS316 - Facile da aprire e pulire -doppia tenuta flussata Potenza installata: 5,5 kW	
Pompa volumetrica	Pmax: 10 bar Max granulometria: 10-15 mm Max viscosità: 10.000.000 Mpa Max portata: 0,55 m3/h	
PT1/PT3	Sensori di pressione - 1-10 bar 4-20 mA	
TT2/TT4	Sensori di temperatura 0-150°C 4-20 mA	
FC6	Sensori di portata 4-20 mA	
Quadro elettrico	con inverter (VFD) 5,5 kW, PLC, HMI Touch	



- Cavitatore centrifugo  
5,5 kW
- Pompa volumetrica  
portata max 0,55 m3/h



## APPLICATIONS



**Chemical reactions**



**Biomass pre-treatment  
(Biogas & bioethanol plants)**



**Biodiesel**



**Food**

# CAVITAZIONE

**Extraction**



**Wastewater**

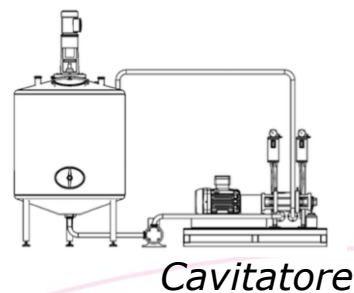


**Cosmetic**



*Serbatoio con solvente  
(acqua) e matrice vegetale*

<https://innolitec.crea.gov.it>



*Filtrazione*

*Estratto Liquido*

**ESTRATTO LIQUIDO**

**TP = 18.50 g/100 g**

## CONCLUSIONI

***Gli scarti e i sottoprodotti della filiera olivicola sono una ricchezza da non sottovalutare.***

***Il loro riutilizzo trova applicazione nel recupero di sostanze ad alto valore aggiunto da sfruttare nei settori della **nutraceutica e della cosmetica**.***

***Inoltre è possibile un impiego degli estratti purificati per applicazioni **Farmaco-Chimiche**.***

***Tutto ciò si traduce per le aziende di trasformazione in recupero di reddito quando l'imprenditore decide di sfruttare gli scarti e i sottoprodotti nell'ottica di un'economia circolare.***





**crea**

Consiglio per la ricerca in agricoltura  
e l'analisi dell'economia agraria

CREA-OFA

Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura  
e Agrumicoltura



**GRAZIE**

**RICERCATORI:**

*Dott. Paolo Rapisarda*

*Dott.ssa Flora Valeria Romeo*

*Dott.ssa Margherita Amenta*

*Dott.ssa Simona Fabroni*

*Dott.ssa Nicolina Timpanaro*

**ASSEGNISTI:**

*Dott.ssa Federica Musumeci*

*Dott.ssa Alessia Accardo*