

"Riconoscimento dei difetti negli oli vergini di oliva: confronto fra panel test e sistemi olfattivi artificiali"

F. Camurati^a, G. Cristofanilli^b, M. Bonadonna^b, E. Colle^b, E. Dalcanale^b

^a SSOG Stazione Sperimentale Oli e Grassi, Via Giuseppe Colombo 79, 20133 Milano

^b Università degli Studi di Parma, Dipartimento di Chimica Organica ed industriale, Viale delle Scienze 17/A, 43100 Parma, e-mail: cristofa@nemo.unipr.it

La ricerca di un metodo strumentale che possa sostituire l'elemento umano nell'analisi sensoriale degli oli vergini di oliva è perseguita da tempo: si è evidenziata con l'introduzione della valutazione organolettica quale parametro obbligatorio nel Regolamento CE 2568/91 in cui, nell'Allegato I, è stato per la prima volta indicato un valore derivato dalla valutazione organolettica a cui riferirsi per definire le varie categorie di oli vergini di oliva.

Il gran numero di campioni da controllare per dare loro la corretta classificazione costituisce quindi ancora oggi un impegno non trascurabile per le aziende che confezionano gli oli di oliva (extra vergine o vergine): si parla addirittura di 6000 campioni informativi in un anno!

A fronte di tali numeri risulta evidente l'interesse verso uno screening strumentale di tale massa di campioni per rendere più veloce, agile ed economica la classificazione degli oli vergini di oliva.

Allo scopo sono state unite le competenze della SSOG nel campo dell'olio di oliva con quelle maturate all'Università di Parma nel settore dei sistemi olfattivi artificiali (SOA).

La SSOG, a partire dal 1982 ha partecipato alla messa a punto del metodo "panel test" divenuto poi ufficiale sia nella forma in vigore fino al maggio 2002 sia in quella attuale.

Presso il Dipartimento di Chimica Organica ed industriale dell'Università degli Studi di Parma è da anni attivo un gruppo di ricerca nel campo della sensoristica alimentare [1, 2].

I SOA detti anche nasi elettronici sono strumenti formati da un array di sensori con parziale specificità ed un appropriato sistema di trattamento dati, in grado di caratterizzare e riconoscere odori semplici e complessi. Questa tecnologia si discosta da quelle normalmente utilizzate nelle analisi quali/quantitative (HPLC, GC, GC-MS) in quanto non identifica i singoli composti che costituiscono un odore e la loro quantità relativa, ma ne offre un'analisi complessiva operando in maniera concettualmente simile all'olfatto umano. I vantaggi principali connessi all'uso dei SOA sono la semplicità e sinteticità di giudizio, l'immediatezza della valutazione e l'assenza di pretrattamenti del campione.

La ricerca sviluppata ha avuto come scopo la valutazione della capacità del sistema olfattivo artificiale di determinare la qualità organolettica di oli vergini d'oliva basandosi sui dati ottenuti dalla valutazione sensoriale effettuata da un panel selezionato e addestrato. In particolare è stata posta l'attenzione alla discriminazione tra oli esenti da difetti e oli con presenza di difetti, giudicati tali dal panel.

L'uso del SOA nella rivelazione di difetti valutati da un "panel" di assaggiatori selezionati e allenati è stato studiato da molti ricercatori usando SOA con diverse tipologie di sensori [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Una parte delle acquisizioni dei dati e della messa a punto del sistema è stata fatta durante un precedente lavoro, in cui si erano valutati oli di oliva vergini monocultivar provenienti da tre differenti regioni italiane. In seguito sono stati utilizzati i valori relativi a campioni di oli del commercio di cui non si conosceva l'origine.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali

I campioni di olio analizzati sia dal panel di SSOG (Stazione Sperimentale Oli e Grassi) che dal SOA, sono quelli pervenuti a SSOG relativi alle campagne olearie del 2000/01 e 2001/02. Essi sono stati così suddivisi secondo il criterio che deriva dall'utilizzo dell'Allegato XII del Reg. CE 2568/91 (il punteggio medio è tal quale, senza aggiunta della tolleranza pari a 1):

- Oli extra vergini: oli con punteggio medio della valutazione organolettica (\bar{X}) ≥ 6.5
- Oli non extra vergini: oli con punteggio medio della valutazione organolettica (\bar{X}) < 6.5

Il panel è formato da un numero di assaggiatori compreso tra 8 e 12.

Nelle analisi strumentali sono stati utilizzati due SOA; uno a 12 sensori commerciali Capteur a strato sottile ed uno a 6 sensori commerciali Figaro a strato spesso.

Condizioni Operative del SOA

- tempo di acquisizione 150sec
- iniezione 20sec
- delay 400sec
- flusso 250ml/min

Le condizioni operative sono state ottimizzate cercando di imitare il più possibile le condizioni del panel test e di non effettuare pretrattamenti del campione.

Trattamento statistico dei dati:

I dati ottenuti sono stati trattati con il metodo della DFA (Discriminant Function Analysis), che è un tipo di analisi multivariata ed un metodo di classificazione o “pattern recognition”. Questi sistemi forniscono un metodo automatizzato per l’individuazione di classi distinte all’interno dell’insieme dei dati. La DFA individua le funzioni discriminanti migliori tali da minimizzare la varianza tra i campioni appartenenti alla stessa classe e massimizzare la varianza tra le diverse categorie. Graficamente la DFA fornisce una rappresentazione bidimensionale dello spazio a n dimensioni generato dai punti rappresentativi (features) scelti per i sensori. In questo lavoro sono stati utilizzati i coefficienti dei moduli della trasformata di Fourier ottenuti dalla curva di risposta dei sensori.

Tutte le analisi effettuate sono state trattate, per una valutazione statistica, col metodo della cross validation, in modo da definire la percentuale di riconoscimento del metodo stesso.

La cross validation consiste nel dividere in n parti l’insieme dei propri campioni e considerarne di volta in volta, casualmente, 1/n come incogniti e il rimanente come “training set” sul quale viene effettuata l’elaborazione. Sono considerate soddisfacenti percentuali di riconoscimento superiori all’80%.

Nelle seguenti elaborazioni è stato scelto n=10.

La riproducibilità delle giornate e la stabilità del sistema sono stati studiati con l’ANOVA (SPSS 10.0).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto un SOA in grado di discriminare e riconoscere gli oli extra vergini di oliva da quelli non extra vergini, definiti come già indicato. Il sistema di campionamento e le condizioni operative sono state precedentemente ottimizzate utilizzando oli di oliva monocultivar. Il passaggio successivo è stato quello di verificare l'applicabilità del metodo anche su oli commerciali, che possono essere formati da miscele di oli di provenienza diversa. Abbiamo innanzitutto valutato il tipo di sensori migliori per questa problematica, utilizzando due SOA con sensori MOS diversi; uno dotato di 12 sensori a strato sottile, più sensibili, ma anche più delicati; uno dotato di 6 sensori a strato spesso, più resistenti. La prova è stata effettuata utilizzando lo stesso set di oli su entrambi gli strumenti, allo scopo di verificare se la metodologia applicata permettesse di discriminare anche gli oli commerciali in base alla presenza di difetti e soprattutto per verificare il tipo di sensori più adatto. Nella tabella sono riportati, per ogni olio utilizzato nell'analisi strumentale, il codice e il punteggio medio dell'analisi organolettica.

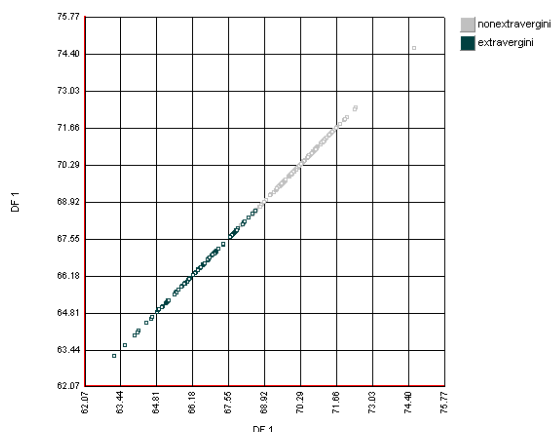
OLI EXTRAVERGINI		OLI NON EXTRA VERGINI	
Sigla	\bar{X}	Sigla	\bar{X}
BA	7.6	VA	5
BB	7.1	VB	5.7
BC	7.3	VC	5.8
BD	6.8	VD	6.4
BE	6.8	VE	6.2
BF	6.6	VF	6.3
BG	6.5	VG	6.3
		VH	5.2
		VI	5.7
		VL	4.6
		VM	5.4

Tabella 1: Punteggio medio (\bar{X}) dei campioni della I prova

Utilizzando il SOA a 12 sensori a strato sottile sono state fatte circa 250 misure in 3 giorni, con una buona riproducibilità tra le giornate.

L'elaborazione dei dati in DFA ha portato ad un tasso di riconoscimento del 98.6% utilizzando i primi 3 coefficienti del modulo della trasformata di Fourier e solo 9 sensori dei 12 disponibili; i rimanenti tre sensori sono stati scartati in quanto le loro risposte risultavano ininfluenti per la discriminazione.

La cross validation ha portato ad un riconoscimento del 98.4% sul training set e del 92.3% sul test.



Tasso di riconoscimento complessivo: 98.6%

Fig 1: DFA della discriminazione tra oli con presenza di difetti e senza difetti utilizzando il SOA a 12 sensori a film sottile.

La discriminazione tra i due gruppi è risultata buona, le analisi dei due gruppi infatti non si sovrappongono e cadono in due zone diverse dello spazio; ciò è legato al fatto che i profili aromatici dovrebbero essere molto diversi, in quanto la presenza, anche lieve, di difetti porta alla formazione e allo sviluppo di sostanze volatili differenti.

Lo stesso set di oli è stato analizzato utilizzando il SOA dotato di 6 sensori MOS a strato spesso. In 3 giorni sono state eseguite circa 180 misure ottenendo un riconoscimento mediante cross validation dell'85.7% sul training set e del 77.9 % sul test, utilizzando i primi tre coefficienti del modulo della Trasformata di Fourier e tutti e 6 i sensori disponibili.

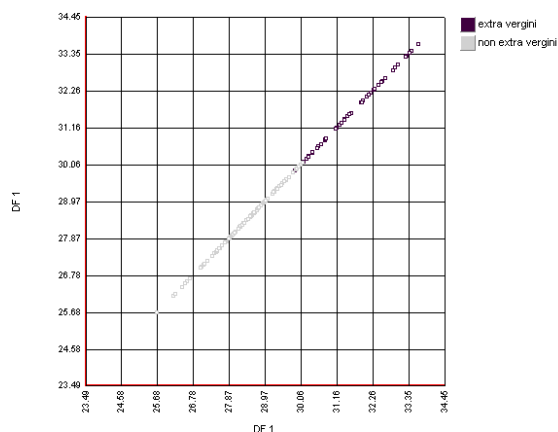


Fig 2: DFA della discriminazione tra oli con presenza di difetti e senza difetti utilizzando il SOA a 6 sensori a film spesso.

Tasso di riconoscimento complessivo: 97.5%

Le ottime percentuali di riconoscimento, ottenute utilizzando entrambi gli strumenti, hanno dimostrato come la metodologia sviluppata risulta valida anche per oli vergini di oliva commerciali; la percentuale di riconoscimento è diminuita utilizzando il SOA a sei sensori a strato spesso, ciò è probabilmente da attribuirsi al minor numero di sensori utilizzati (6 contro 9) e non alla differente tipologia di sensori.

Utilizzando il SOA a 12 sensori a strato sottile, che ha dato i risultati migliori, sono state eseguite quindi prove per verificare ulteriormente il potere discriminante del sistema ed il suo campo di applicabilità, variando soprattutto il range di difettosità degli oli analizzati.

Allo scopo sono state effettuate altre prove, una seconda utilizzando come oli non extra vergini oli che hanno ottenuto un basso punteggio organolettico (<5,5; tabella 2), ed una terza prova cambiando il set di oli extra vergini ed utilizzando, come oli non extra vergini, oli con punteggi organolettici tra 5,5 e 6,5 (tabella 3).

Nella seconda prova sono stati utilizzati i seguenti oli:

OLI EXTRA VERGINI		OLI NON EXTRA VERGINI			
Sigla	\bar{X}	Sigla	\bar{X}	Sigla	\bar{X}
E1	7,3	V1	5.4	V9	5.4
E2	7,3	V2	5.2	V10	5.0
E4	7,3	V3	5.3	V11	4.5
E5	7,1	V4	5.3	V12	4.6
E6	7,3	V5	5.3	V13	5.1
E7	7,0	V6	5.3	V14	5.1
		V7	5.2	V15	5.1
		V8	5.4		

Tabella 2: Punteggio medio dei campioni della II prova

Sono state fatte 322 misure in 5 giorni utilizzando come detto SOA a 12 sensori MOS a strato sottile con i primi tre coefficienti del modulo della trasformata di Fourier; il riconoscimento mediante cross validation è del 95.6% sul training set e del 93.9% sul test.

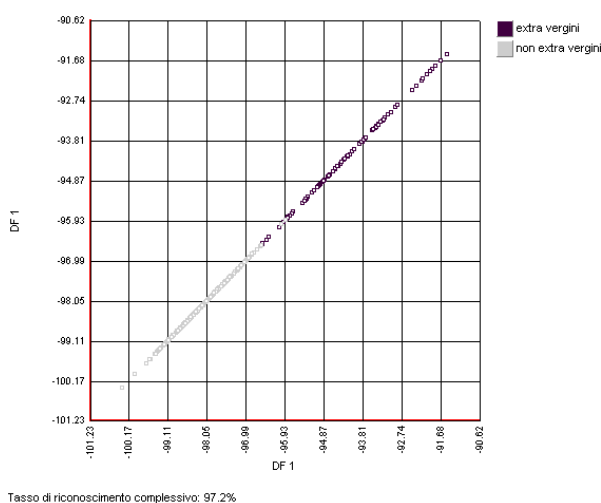


Fig 3: DFA della discriminazione tra oli con presenza di difetti e senza difetti utilizzando il SOA a 12 sensori

Lo strumento è quindi risultato perfettamente in grado di discriminare tra oli extra vergini ed oli con basso punteggio.

Abbiamo quindi provato a vedere come si comportava in presenza di oli con difetti di leggera intensità.

Si è eseguita quindi una terza prova su un ulteriore set di oli, anch'essi classificati secondo il precedente criterio, in modo da confermare la capacità discriminante dello strumento.

OLI EXTRAVERGINI		OLI NON EXTRA VERGINI	
Sigla	\bar{X}	Sigla	\bar{X}
BB	7.1	AS	6.3
BC	7.3	AU	5.7
BD	6.8	AW	5.9
BE	6.8	AV	6
BA	7.6	AZ	5.4
BF	6.6	AK	6.3
		AJ	6.1
		AX	6.2
		AY	6.2
		AQ	5.5
		AR	5.5

Tabella 3: Punteggio medio dei campioni della III prova

Sono state effettuate 300 misure in 6 giornate con una buona riproducibilità tra le stesse con i primi tre coefficienti del modulo della trasformata di Fourier e 9 sensori.

Anche con questi oli è stato ottenuto un tasso complessivo di riconoscimento molto alto, del 98.7%; la percentuale di riconoscimento mediante cross validation è stata del 97.4% sul training set e del 96.4% sul test.

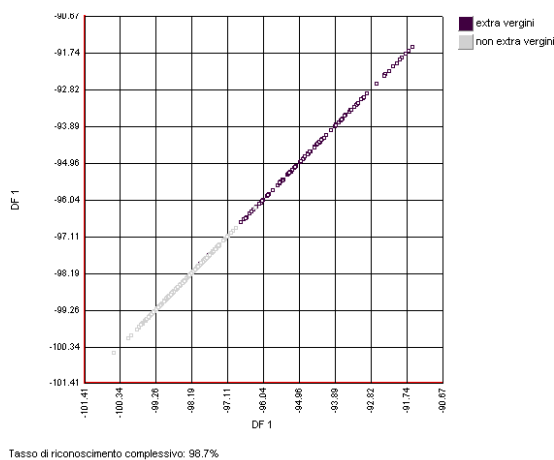


Fig 4: DFA della discriminazione tra oli con presenza di leggeri difetti e senza difetti utilizzando il SOA a 12 sensori

La metodica sviluppata è quindi risultata perfettamente in grado di discriminare oli extra vergini non solo da oli con bassi punteggi, ma anche da oli a bassa difettosità e con punteggi organolettici al limite tra le due classi.

Una volta analizzato e verificato positivamente il potere discriminante del SOA nei confronti della qualità degli oli vergini di oliva, abbiamo provato a mimare un controllo qualità reale. Lo strumento è stato infatti utilizzato per un mese consecutivamente allo scopo di verificare la stabilità del sistema nel tempo; inoltre durante le analisi sono stati inseriti nella banca dati campioni incogniti per valutare la capacità di classificazione e riconoscimento dello strumento, una volta addestrato.

Le analisi sono state condotte per un mese consecutivamente, per un totale di 900 misure; la banca dati è stata costruita utilizzando gli oli riportati nella seguente tabella; in questo caso gli oli non extra vergini analizzati coprono tutto il range di difettosità possibile.

OLI NON EXTRA VERGINI		OLI EXTRA VERGINI (E)	
CODICE	VOTO	CODICE	VOTO
DA	5.1	EA	7,3
DB	4.6	EB	7,3
DC	6.3	ED	7,3
DE	5.7	EF	7,1
DF	6.2	EG	7,3
DG	5.8	EH	7,0
DH	5.1	EI	7,3
DI	5.0	EL	7,3
DL	5.1	EM	6.8
DM	6.3	EN	7.6
DP	5.4	EO	7.3
DQ	5.2	EP	7.1
		EQ	6.8

Tabella 4: oli utilizzati per la costruzione della banca dati.

Per questa analisi è stata innanzitutto studiata in maniera approfondita la riproducibilità delle giornate mediante ANOVA (ANalysis Of VAriance).

Allo scopo è stato utilizzato il software statistico SPSS 10.0, costruendo librerie ad hoc ed utilizzando il valore massimo di ogni curva di risposta del sensore, dato come variazione di resistenza percentuale.

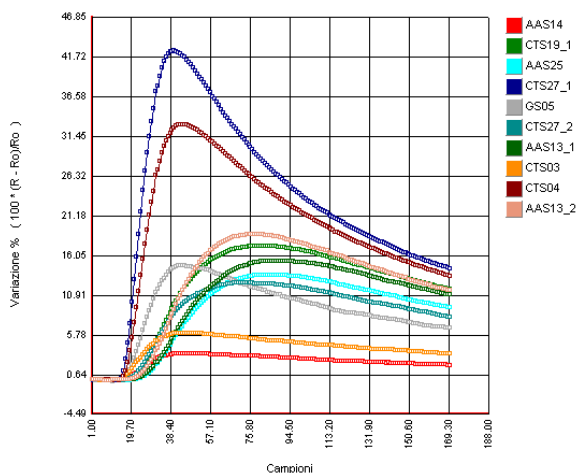


Fig. 5: “impronta digitale di un olio vergine di oliva”. Ogni curva esprime la risposta di un sensore.

Con questo studio è stato verificato che le analisi effettuate nei vari giorni (n=20) non sono significativamente diverse, condizione necessaria per avere stabilità del sistema. Uno dei problemi maggiori dovuti all’utilizzo dei sensori di tipo MOS è legato infatti al drift della linea di base, fenomeno intrinseco in questo tipo di sensori. Allo scopo sono stati utilizzati campioni rappresentativi dei due gruppi: un olio extra vergine ed uno CON difetti.

E’ stata inizialmente verificata l’omogeneità della varianza attraverso il test di Levene. I risultati ottenuti hanno evidenziato come non ci siano differenze significative ($p > 0,05$) fra le varianze dei dati sperimentali (tabella 5).

E’ quindi stata studiata la riproducibilità dei dati confrontando mediante T-test le medie ottenute nei vari giorni di analisi. I risultati sono dati come livelli di significatività p (tabella 5), considerando un intervallo di confidenza del 95%. Valori maggiori di 0,05 indicano l’ottima riproducibilità del sistema nel periodo di tempo considerato.

E’ importante anche la precisione del metodo, cioè quanto le misure si discostano dalla media; è stata utilizzata, per calcolare questo parametro la RSD (Relative Standard Deviation) calcolata come $(\sigma \times 100) / X_m$ (σ = deviazione standard, X_m = valore medio).

Solitamente risultano accettabili valori di $RSD < 10\%$.

I risultati riportati nella tabella sottostante dimostrano come le risposte siano stabili e riproducibili nel periodo temporale analizzato.

Sensore	<i>Extra vergine (EI)</i>				<i>Non extra vergine (DG)</i>			
	Media altezza massima ^a	RSD % ^b	Omogeneità della varianza ^c	ANOVA ^d	Media altezza massima ^a	RSD % ^b	Omogeneità della varianza ^c	ANOVA ^d
S2	0,020	8,2	0,274	0,356	0,024	7,5	0,268	0,099
S3	0,134	5,4	0,339	0,647	0,153	6,6	0,459	0,347
S4	0,098	5,7	0,407	0,642	0,121	7,4	0,724	0,717
S5	0,345	4,6	0,372	0,367	0,378	4,3	0,273	0,151
S6	0,104	5,1	0,435	0,587	0,126	6,7	0,690	0,756
S7	0,085	7,0	0,233	0,223	0,095	7,4	0,221	0,106
S8	0,108	5,7	0,302	0,666	0,124	7,0	0,388	0,363
S9	0,037	7,2	0,317	0,557	0,041	6,3	0,036	0,130
S10	0,258	4,6	0,319	0,496	0,284	5,3	0,291	0,246
S11	0,148	5,9	0,326	0,570	0,175	6,7	0,620	0,337

Tabella 5

- ^a calcolato come: $\Delta R/R_0$
- ^b giorni 20 (n=60)
- ^c Significatività 95%
- ^d ANOVA tra gruppi ed entro i gruppi. Livello di significatività 95%

Una volta verificata la stabilità del sistema e la riproducibilità delle giornate, è stata valutata la capacità discriminante dello strumento tra oli extra vergini ed oli con difetti sulla banca dati che servirà per addestrare lo strumento alla classificazione di campioni incogniti.

Il grafico sotto riportato mostra i risultati dell'analisi con DFA utilizzando i primi 4 coefficienti della trasformata di Fourier e 10 dei 12 sensori a disposizione. La percentuale di discriminazione è particolarmente alta, così come la percentuale di riconoscimento mediante cross-validation: 97.1% per il training set e 95.7% sul test.

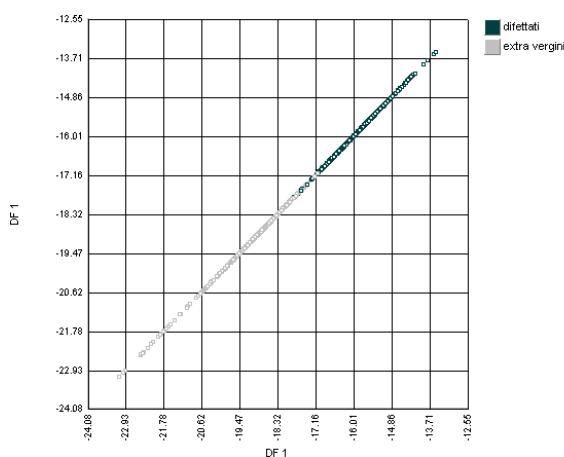


Fig 6: DFA della discriminazione tra oli con presenza di difetti e senza difetti su una banca dati di un mese

Tasso di riconoscimento complessivo: 97.0%

Dopo 10 giorni dall'inizio dell'analisi si è proceduto all'analisi di oli incogniti all'interno della banca dati che si stava costruendo.

Su questa banca dati sono stati classificati e riconosciuti gli oli incogniti. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Sigla	Qualità organolettica	Classificazione SOA	
I1	Non Extra Vergine	Extra Vergine	NO
I2	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I3	Non Extra Vergine	Extra Vergine (presenta un forte odore di avvinato ed ha un elevato segnale, non sono presenti nella banca dati oli difettati di avvinato così intenso)	NO
I4	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I5	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I6	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I7	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I8	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I9	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I10	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I11	Extra Vergine	Extra Vergine	OK
I12	Extra Vergine	Extra Vergine	OK
I13	Non Extra Vergine	Non Extra Vergine	OK
I14	Extra Vergine	Extra Vergine	OK
I15	Extra Vergine	Extra Vergine	OK
I16	Extra Vergine	Extra Vergine	OK
I17	Extra Vergine	Extra Vergine	OK

Tabella 6 : riconoscimento oli incogniti

La quasi totalità dei campioni è stata correttamente classificata nella giusta classe di appartenenza. Per l'olio I3, che all'analisi organolettica risulta avere come difetto predominante l'avvinato, è stato necessario aggiornare la banca dati con oli avvinati, dopodiché è stato effettivamente riconosciuto come cattivo.

Tra gli oli difettati analizzati come incogniti, solo l'olio I1 è stato erroneamente riconosciuto dal SOA. Gli oli commerciali sono stati tutti correttamente riconosciuti, ad eccezione di I17.

CONCLUSIONI

Alla luce di questi risultati si può ritenere il SOA a sensori MOS uno strumento analitico-sensoriale efficace per sostituire gli assaggiatori nel controllo routinario della qualità degli oli vergini di oliva; risulta infatti in grado di discriminare tra oli esenti da difetti e oli con presenza di difetti. Inoltre le numerose prove effettuate hanno confermato una buona stabilità del sistema nel tempo, rendendolo adatto ad un controllo qualità reale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] *Applicazione dei Sistemi Olfattivi Artificiali a base di polimeri compositi nel controllo qualità di imballi stampati*, M. SUMAN, C. RICCI, E. DALCANALE, U. BERSELLINI, Imballaggio, 540, 70-76 (2001).
- [2] *AOS: from study to quality control*, M. SUMAN, C. RICCI, E. DALCANALE, U. BERSELLINI, L. SENSI, Italia Imballaggio, 195-206 (2002)
- [3] *Detention of defects in virgin olive oil by the electronic nose*, M.T. MORALES, R. APARICIO, R. APARICIO-RUIZ, D.L. GARCIA-GONZALEZ. Flavour and fragrance chemistry, 151-161 (2000).
- [4] *Detencion of rancid defect in virgin olive oil by the electronic nose*, R. APARICIO, S. ROCHA, I. DELGADILLO, M.T. MORALES. J. Agr. Food Chem., 48, 853-860 (2000).
- [5] *Is it possible to use an "electronic nose" for the detection of sensorial defects in virgin olive oil?*, F. LACOSTE, F. BOSQUE, R. RAOUX. OCL, 1, 78-81 (2001)
- [6] *Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils*, M.C. CERRATO OLIVEROS, J.L. PEREZ PAVON, C.G. PINTO, E.F. LAESPADA, B.M. CORDERO, M. FORINA. Analytica Chimica Acta, 459, 219-228 (2002)
- [7] *Detection of defective virgin olive oils by metal-oxide sensors*, D.L. GARCIA-GONZALES, R. APARICIO, J. Agric. Food Chem., 50, 1809-1814 (2002)
- [8] *The electronic nose in the food industry, the extra virgin olive oil case*, E. DALCANALE, M. S. GARDINI, M. ALLAI, Chim. Ind. (Milan), 81, 465-469 (1999)
- [9] *Comparison between MOS and CP-based Electronic Noses in the discrimination of extra virgin olive oil*, M. S. GARDINI, M. ALLAI, E. DALCANALE, F. DI FRANCESCO, G. PIOGGIA, Sensors and Microsystem (World Scientific Publ, singapore), 265 (2000)
- [10] *Valutazione della qualità dell'olio extra vergine di oliva mediante SOA a sensori MOS*, C. RICCI, M. ALLAI, L. RIBECCHINI, E. DALCANALE, L. CAGLIOTI. Riv. Ital. Sostanze Grasse, 78, 85-92 (2001).
- [11] *Use of the electronic nose in virgin olive oil-flavour evaluation*, M.T. MORALES, G. LUNA, R. APARICIO. Abstracts of the Phytochemical Society of Europe, 151 (2000)
- [12] *Detection of sensory defects in virgin olive oil by electronic nose*. R. APARICIO, S.M. ROCHA, I. DELGADILLO, M.T. MORALES. Pittsburgh Conference Abstracts, 1651 (2000)

Si ringraziano i componenti del Panel della SSOG per l'impegno e la collaborazione e la Dott.ssa Lisa Elviri per l'aiuto nell'elaborazione statistica dei dati.