



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας
Π.Μ.Σ.: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη των πτητικών συστατικών ελαιολάδου, ποικιλίας Κορωνέικης με SPME – GC – MS και γεωγραφική διαφοροποίηση με χρήση χημειομετρικών μεθόδων»



Λιόντου Ν. Πηνελόπη

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

*Αθήνα
Ιανουάριος 2020*



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γενικής Χημείας
Π.Μ.Σ.: Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων*

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη των πτητικών συστατικών ελαιολάδου, ποικιλίας Κορωνέικης με SPME – GC – MS και γεωγραφική διαφοροποίηση με χρήση χημειομετρικών μεθόδων»

«Study of volatile compounds of Koroneiki cultivar's olive oil applying SPME-GC-MS and geographical differentiation using chemometrics»

ΛΙΟΝΤΟΥ Ν. ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.,

Παππάς Χρήστος, Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επ. Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθήνα, Ιανουάριος 2020

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Πέτρου Ταραντίλη στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η διεξαγωγή και περαίωση μιας διπλωματικής εργασίας αποτελεί μια επίπονη και συγχρόνως εποικοδομητική εμπειρία. Φθάνοντας στο τέλος της συγγραφής της συνειδητοποίησα ότι αποτέλεσε τον καρπό προσωπικού αγώνα αλλά συγχρόνως και συμβολής και υποστήριξης ορισμένων ανθρώπων που στάθηκαν αρωγοί σε αυτή την προσπάθειά μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κ. Πέτρο Ταραντίλη για την ανάθεση του ενδιαφέροντος θέματος της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε σε μένα. Παρά τον φόρτο εργασίας ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει στην επίλυση διάφορων θεμάτων. Τον ευχαριστώ θερμά καθώς χωρίς την στήριξη και την επιστημονική του καθοδήγηση η εργασία αυτή δεν θα ήταν εφικτή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Χαράλαμπο Κανάκη και στην Δρ. Παναγιώτα Ρεβέλου για την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη σε όλα τα στάδια εκπόνησης του πειράματος και συγγραφής της μελέτης μου και πάνω απ' όλα για την πολύ καλή συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου για την ηθική και υλική υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου διότι χωρίς την στήριξή τους δεν θα είχα καταφέρει να υλοποιήσω τους στόχους μου.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής μελέτης αποτέλεσε η ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδων Κορωνέικης ποικιλίας με σκοπό τη γεωγραφική τους διαφοροποίηση. Τα δείγματα ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τρεις διαφορετικές περιοχές, τη Λακωνία, το Ηράκλειο και την Μεσσηνία. Μέσω της ανάλυσης προσδιορίστηκαν τα πτητικά συστατικά των ελαιολάδων και ακολούθησε η πιστοποίηση της γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων.

Η παραλαβή των πτητικών συστατικών από τα δείγματα των ελαιολάδων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Για τον διαχωρισμό και την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μάζας (GC – MS). Η γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε μέσω στατιστικής επεξεργασίας των αριθμητικών δεδομένων των χρωματογραφημάτων που λήφθηκαν με χρήση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης (MANOVA) και της κανονικής διαχωριστικής ανάλυσης (CDA).

Τα δείγματα των ελαιολάδων παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη σύστασή τους ανάλογα με την περιοχή προέλευσής τους και έτσι ο προσδιορισμός της γεωγραφικής τους ένδειξης πραγματοποιήθηκε με ευκολία και ήταν επιτυχής.

Επιστημονική περιοχή διατριβής: Αθήνα

Λέξεις κλειδιά: ελαιόλαδο, Κορωνέικη ποικιλία, πτητικά συστατικά, γεωγραφική διαφοροποίηση.

ABSTRACT

This thesis is about analyzing olive oil samples of Koroneiki cultivar in order to differentiate them geographically. The olive oil samples were from three different regions, Lakonia, Heraklion and Messinia. The validation of the origins of each sample took place after thorough analysis of their volatile compounds.

The volatile compounds were extracted from the olive oil samples by the SPME method. Gas chromatography technique was used for their separation and identification. The mass spectrometer was used as a detector (GC- MS). The final geographical differentiation emerged through examining the former results with the multivariate analysis of variance (MANOVA) and the canonical discriminant analysis (CDA) statistical methods.

The samples were found to have significantly different properties according to their origins, thus facilitating the whole differentiation process which was successfully terminated.

Scientific area of thesis: Athens

Key words: olive oil, Koroneiki cultivar, volatile compounds, geographical origin.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
A.1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	8
A. 1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	10
A.1.3 ΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	12
A.2 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	14
A.2.1 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	14
A.2.2 Η ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	16
A.2.3 ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	17
A.2.4 Το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου	18
A.2.5 Πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου	21
A.2.6 Οι παράγοντες που επηρεάζουν το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου	24
A.2.7 Μέθοδοι παραλαβής πτητικών συστατικών	28
A.2.7.1 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME)	29
A.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	33
A.3.1. Αέρια Χρωματογραφία	33
A.3.2 Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC - MS)	36
A.3.2.1 Ιονισμός με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)	38
A.3.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ	39
A. 4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:	42
B ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
B.1.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	43
B.1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ SPME	43
B.1.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	44

B.1.4 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ	45
B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
B.2.1 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ	47
B.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	48
B.2.3 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GC-MS) ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ	55
B.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
B.4.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
B.4.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
B.4.3 ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ.....	67

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά είναι ένα από τα παλαιότερα γνωστά καλλιεργημένα δένδρα στον κόσμο το οποίο υπάρχει πριν την ανακάλυψη της γραφής και σήμερα θεωρείται ο κυριότερος εκπρόσωπος της Μεσογειακής βλάστησης. Η ιστορία της ελιάς αρχίζει πριν την επινόηση της γραφής, πριν 7000 χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου και κυρίως στην ανατολική Μεσόγειο. Στο παρελθόν, ήταν το σύμβολο της φιλίας και των ειρηνευτικών λαών.

Οι πρώτες γραπτές μαρτυρίες για την καλλιέργεια της ελιάς προέρχονται από την Έλβα (Βόρεια Συρία) όπου ανακαλύφθηκαν πινακίδες οι οποίες χρονολογούνται από τα μέσα της 3ης χιλιετίας π.Χ. και μιλάνε για μεγάλη παραγωγή λαδιού στην περιοχή. Ανάλογες πληροφορίες χρονολογούμενες από τη δεύτερη χιλιετία υπάρχουν και για την περιοχή της Παλαιστίνης. Ο De Candolle στη μελέτη του «Origin des plantes cultivees», αναφέρει ότι η καλλιέργεια της ελιάς ήταν γνωστή 4000 έτη π.Χ. και ότι το δέντρο κατάγεται από τα παράλια της Μ. Ασίας βασιζόμενος στην ύπαρξη αυτοφυούς βλάστησης άγριας ελιάς καθώς και στα κείμενα αρχαίων συγγραφέων και σε ευρήματα ανασκαφών.



Εικόνα Α.1.1: Ιστορική εξέλιξη της ελιάς

Ο Αναγνωστόπουλος (1951) υποστήριξε, βάσει των ευρημάτων των ανασκαφών της Κνωσού, ότι η πατρίδα της ελιάς είναι η Κρήτη. Την υπόθεση αυτή ενισχύει και το γεγονός ότι, το όνομα της ελιάς είναι ελληνικό και διατηρήθηκε σε όλες τις γλώσσες. Πρόσφατες έρευνες στις Κυκλάδες έφεραν στο φως απολιθωμένα φύλλα ελιάς τα οποία σύμφωνα με τις σύγχρονες μεθόδους χρονολόγησης φαίνεται να είναι ηλικίας 60.000 ετών.



Εικόνα Α.1.2: Απολιθωμένα φύλλα ελιάς

Κατ' άλλους συγγραφείς, τόπος προέλευσής της είναι η Αφρική (Αβησσυνία, Αίγυπτος). Στην περιοχή αυτή καλλιεργήθηκε συστηματικά από τους σημιτικούς λαούς και απ' εκεί διαδόθηκε στην Κύπρο και στα βόρεια παράλια της Αφρικής.

Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται από τους πολύ παλιούς χρόνους, όπως αποδεικνύεται από τα ευρήματα των ανασκαφών. Στις Μυκήνες βρέθηκε κομμάτι ασημένιου αγγείου που απεικονίζει ελιά. Στη Θήρα και Κνωσό βρέθηκαν τοιχογραφίες με θέμα την ελιά καθώς και συσκευές που έμοιαζαν με ελαιοπιεστήρια.

Από την αρχαία Ελλάδα έως και σήμερα η ελιά είναι το ιερότερο δέντρο του τόπου μας και συνδέεται άμεσα με την κουλτούρα και την διατροφή της χώρας μας. Στην Ελλάδα, οι ρίζες του ιερού δέντρου φτάνουν μέχρι την αρχαιότητα. Η διατροφή, η θρησκεία και η τέχνη των αρχαίων Ελλήνων περιείχαν στοιχεία της ελιάς, το κλαδί της οποίας, χρησιμοποιούταν ως σύμβολο ειρήνης, σοφίας και νίκης, ενώ η θεά Αθηνά καθιερώθηκε ως θεά της Αττικής προσφέροντας το δέντρο της ως πηγή πλούτου.

Η Ελληνική Μυθολογία αναφέρει την ελιά ως δώρο της θεάς Αθηνάς όταν έγινε διαγωνισμός ανάμεσα σ' αυτήν και το θεό Ποσειδώνα για το ποιος από τους δυο θα έδινε το όνομα του στην πόλη. Λέγεται ότι ο Ποσειδώνας χτύπησε τον ιερό βράχο της Ακρόπολης και αμέσως ξεπήδησε ένα κύμα αλμυρού νερού που αργότερα ονομάστηκε "Ερεχθίδα" θάλασσα. Όταν χτύπησε η Αθηνά με τη σειρά της, τότε ξεπετάχτηκε ένα δέντρο ελιάς γεμάτο καρπό, το οποίο θεωρήθηκε ως η υπόσχεση για δόξα και ευημερία της πόλης.

Ακόμα και οι νικητές των Ολυμπιακών Αγώνων έπαιρναν ως έπαθλο για τη νίκη τους ένα κλαδί αγριελιάς, παράδοση που διατηρήθηκε από τους πρώτους Ολυμπιακούς αγώνες του 776 π.Χ. μέχρι το τέλος των αρχαίων Ολυμπιακών αγώνων. (Kapellakis , 2007)

A. 1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ελιά ή ελαιόδεντρο ή λιόδεντρο (επιστ. Ελαιία, *Olea*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (*Oleaceae*), το οποίο συναντάται πολύ συχνά και στην Ελλάδα. Ο καρπός του ονομάζεται επίσης ελιά και από αυτόν παράγεται το ελαιόλαδο. Είναι δέντρο αειθαλές, έχει φύλλα αντίθετα, λογχοειδή, δερματώδη, σκουροπράσινα στην άνω επιφάνεια και αργυρόχρωμα στην κάτω. Τα άνθη της είναι λευκωπά, μονοπέταλα και πολύ μικρά, σχηματίζουν ταξιανθία βότρυος και εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Ο κορμός της ελιάς είναι οζώδης και καλύπτεται από τεφρόφαιο φλοιό.

Στην βιβλιογραφία αναφέρονται και έχουν γίνει αποδεκτά τρία υποείδη, τα οποία είναι τα εξής:

- *Olea europaea* var. *sativa*
- *Olea europaea* var. *olivaster*
- *Olea europaea* var. *oleaster*

Το πρώτο υποείδος έχει συμπεριλάβει το σύνολο των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελαιοδέντρου, οι οποίες από πλευράς τεχνολογικής χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο χρησιμοποίησης του καρπού τους σε:

- α) επιτραπέζιες ή βρώσιμες που παράγουν καρπό για επιτραπέζια κατανάλωση,
- β) ελαιοποιήσιμες που παράγουν καρπό για ελαιοποίηση
- γ) ποικιλίες διπλής χρήσης που παράγουν καρπό και για τους δύο σκοπούς.

Το δεύτερο υποείδος συμπεριλαμβάνει όλες τις αγριελιές που αυτοφύονται σε ορισμένες περιοχές της Μεσογείου. Το τρίτο υποείδος συμπεριλαμβάνει τα δενδρύλλια που προέρχονται από τα κουκούτσια των ποικιλιών της ήμερης ελιάς και έχουν χαρακτηριστικά αγριελιάς (Κυριτσάκης, 2007).



Η ελιά ευδοκίμει σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16οC) και υγρασίας, για αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη (όπως στην Ελλάδα, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Τουρκία, την Αλγερία και αλλού). Ευδοκίμει σε πολλές περιοχές του κόσμου, αρκεί η θερμοκρασία να μη κατέρχεται πολύ και για μεγάλα χρονικά διαστήματα κάτω από το μηδέν. Γι' αυτό και ιδιαίτερα κατάλληλες περιοχές για την καλλιέργειά της είναι οι παραθαλάσσιες. Τα δένδρα φυτεύονται σε ευθείες σειρές ή σε ρομβοειδείς διατάξεις. Ανάλογα με την ποικιλία και την ποιότητα του εδάφους η απόσταση μεταξύ των σειρών κυμαίνεται από 7 έως 20 μέτρα. (Κωνσταντίνος Ποντίκης, "Ελαιοκομία")

A.1.3 ΟΙ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η καλλιέργεια της ελιάς έχει ξεκινήσει χιλιάδες χρόνια πριν, σε διάφορα μέρη κάτω από διαφορετικές εδαφικές και κλιματικές συνθήκες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μεγάλου εύρους ποικιλιών οι οποίες προσαρμόζονται στις αντίστοιχες εδαφοκλιματικές συνθήκες της κάθε περιοχής. Παγκοσμίως υπολογίζεται ότι υπάρχουν σχεδόν 600 διαφορετικές ποικιλίες. Για τη διάκριση των καλλιεργούμενων ποικιλιών της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, διάφοροι χαρακτήρες, όπως είναι το μέγεθος των φύλλων, το σχήμα και το μέσο βάρος των καρπών, το σχήμα των πυρήνων καθώς και ο αριθμός και το βάθος των γλυφών αυτών. Σήμερα, για την καλύτερη περιγραφή, αλλά κυρίως για την αξιολόγηση των ποικιλιών, λαμβάνονται υπ όψιν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Το μέγεθος του δέντρου
2. Η μορφή και ο τρόπος βλάστησης
3. Η προσαρμοστικότητα σε διάφορες συνθήκες του περιβάλλοντος
4. Η ανθεκτικότητα ή η ευπάθεια σε ασθένειες ή έντομα
5. Η μορφολογία των φύλλων
6. Το ποσοστό τέλειων ανθέων και το ποσοστό καρπόδεσης
7. Τα παραγωγικά χαρακτηριστικά του δέντρου (ποιότητα και ποσότητα απόδοσης)
8. Η μορφολογία και η ωρίμανση του καρπού
9. Η ακαταλληλότητα για μηχανική συγκομιδή
10. Ευαισθησία στις κλιματικές συνθήκες του εδάφους. (Αλυγιζάκης, 1982)

Οι σημαντικότερες ελαιοποιήσιμες ποικιλίες είναι:

1. **Κορωνέϊκη:** Η Κορωνέϊκη αποτελεί την πιο σημαντική ελαιοποιήσιμη ποικιλία ελιάς στην Ελλάδα και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την παραγωγή λαδιού. Είναι πολύ παραγωγική ποικιλία, ανθεκτική στις ξηροθερμικές συνθήκες της Ελλάδας και παράγει λάδι υψηλής ποιότητας.
2. **Λιανολιά Κέρκυρας:** Ποικιλία ελιάς η οποία καλλιεργείται για την παραγωγή λαδιού καλής ποιότητας κυρίως στην δυτική Ελλάδα και στα Ιόνια νησιά.

3. **Κουτσουρελιά:** Ποικιλία ελιάς η οποία καλλιεργείται για την παραγωγή λαδιού ικανοποιητικής ποιότητας σε περιοχές με αυξημένη υγρασία όπως Κέρκυρα, Νησιά Ιονίου και Δυτική Ελλάδα.
4. **Βαλανολιά:** Ποικιλία ελιάς η οποία καλλιεργείται κυρίως στην Μυτιλήνη και παράγει λάδι εξαιρετικής ποιότητας.
5. **Δαφνελιά:** Ποικιλία που συναντάται στην Σάμο, Χίο και Κυκλάδες όπου καλλιεργείται για την παραγωγή λαδιού καλής ποιότητας.
6. **Αδραμυττινή:** Ποικιλία ελιάς η οποία καλλιεργείται στην Μυτιλήνη για την παραγωγή λαδιού ικανοποιητικής ποιότητας.
7. **Τραγολιά:** Ποικιλία ελιάς η οποία καλλιεργείται στην Μεσσηνία και στην Κεφαλονιά για την παραγωγή λαδιού μέτριας ποιότητας.
8. **Μαυρελιά Μεσσηνίας:** Καλλιεργείται στην Μεσσηνία και στο Λασίθι για την παραγωγή λαδιού. Είναι ποικιλία απαιτητική σε εδαφική υγρασία.
9. **Μυρτολιά:** Ποικιλία ελιάς για την παραγωγή λαδιού. Ανθεκτική στο ψύχος και στην ξηρασία.
10. **Θιακή:** ποικιλία ελιάς για παραγόμενο λάδι καλής ποιότητας.
11. **Αθηνολιά:** Ποικιλία ελιάς η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή λαδιού εκλεκτής ποιότητας.

Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα



A.2 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

A.2.1 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Ελαιόλαδο είναι ο ελαιώδης χυμός ο οποίος έχει διαχωριστεί από τα υπόλοιπα συστατικά του καρπού της ελιάς. Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών, ως ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της Ελιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea europaea*), με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή

επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του προϊόντος (Bendini, 2012).

Το ελαιόλαδο είναι η πιο βασική λιπαρή ύλη στη δίαιτα των χωρών της Μεσογείου, λόγω του ξεχωριστού του αρώματος, της δυνατότητας διατήρησής του και των λειτουργικών ιδιοτήτων του. Ο συσχετισμός της κατανάλωσης ελαιολάδου με τη μακροζωία και τη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας καθιστά την καλλιέργεια της ελιάς και την παραγωγή του ελαιολάδου εξαιρετικά σημαντικές. Οι περισσότερες μελέτες επιβεβαιώνουν ότι οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου οφείλονται στα φαινορικά συστατικά που περιέχει (Servili 2011).

Το παρθένο ελαιόλαδο προτιμάται από τους κατοίκους της λεκάνης της Μεσογείου για τις θεραπευτικές ιδιότητες των συστατικών του. Η Μεσογειακή διατροφή συνδέεται με μειωμένη εμφάνιση ορισμένων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, καρδιαγγειακές νόσοι και ορισμένοι τύποι καρκίνων, αλλά και το αυξημένο προσδόκιμο ζωής (Herrera κ.ά. 2001), που σε σημαντικό βαθμό οφείλεται στις ευεργετικές ιδιότητες των συστατικών του ελαιολάδου. Οι ευεργετικές ιδιότητες του ελαιολάδου δεν οφείλονται μόνο στην υψηλή αναλογία ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα, αλλά και στα περιεχόμενα συστατικά με αντιοξειδωτική δράση, όπως είναι η βιταμίνη E (τοκοφερόλες), τα καροτενοειδή και κυρίως οι φαινολικές ενώσεις. Πράγματι, ένας αυξανόμενος αριθμός επιδημιολογικών και πειραματικών μελετών αναφέρει ότι το ελαιόλαδο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου, των νοητικών δυσλειτουργιών (π.χ. Alzheimer), του καρκίνου του παχέος εντέρου, του στήθους και των ωοθηκών, του διαβήτη και κάποιων αυτοάνοσων νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Επίσης, το ελαιόλαδο έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη μείωση της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) (De la Lastra κ.ά. 2001).

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, μια μεγάλη ερευνητική προσπάθεια έχει επικεντρωθεί στον εμπλουτισμό του ελαιολάδου με αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές, όπως τα φυτά και τα βότανα, δημιουργώντας προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως «γκουρμέ». Το ενδιαφέρον αυτό αποδίδεται στην ικανότητα αυτών των ενώσεων να προστατεύουν όχι μόνο το ίδιο το προϊόν από οξειδωτική υποβάθμιση, αλλά και τον ανθρώπινο οργανισμό από ασθένειες που σχετίζονται με τις βλαβερές συνέπειες

των ελεύθερων ριζών στο σώμα. Εμπλουτισμένα ελαιόλαδα εμφάνισαν παρατεταμένη διάρκεια ζωής και αυξημένη αντίσταση σε ανεπιθύμητες αλλοιώσεις κατά το μαγείρεμα ή την αποθήκευση διατηρώντας τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητές τους (Antoun & Tsimidou 1997).

A.2.2 Η ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Μετά την συγκομιδή οι καρποί μεταφέρονται στο ελαιοτριβείο όπου γίνεται η επεξεργασία για την παραλαβή του ελαιολάδου. Το ελαιοτριβείο είναι ο χώρος που παίζει καθοριστικό ρόλο στην επεξεργασία του ελαιοκάρπου και στην τελική εξαγωγή ποιοτικού ελαιολάδου. Η μεταφορά γίνεται σε πλαστικά τελάρα με οπές αερισμού ή σε πλαστικές σακούλες. Στην μεταποιητική μονάδα θα πρέπει να κατεργάζεται αμέσως. Σε περίπτωση που χρειάζεται να αποθηκευτεί ο καρπός θα πρέπει να είναι για πολύ μικρό χρονικό διάστημα σε χώρο ξηρό και με καλό αερισμό. Η επεξεργασία του ελαιολάδου περιλαμβάνει σήμερα τα παρακάτω βασικά στάδια:

- Πλύσιμο: Οι καρποί οδηγούνται στο αποφυλλωτήριο όπου απομακρύνονται τα φύλλα και άλλα ξένα υλικά. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση ξένων υλών (σκόνη, χώμα κτλ.)
- Σπάσιμο – Άλεση ελαιοκάρπου: Μετά το πλύσιμο ακολουθεί η άλεση του καρπού η οποία γίνεται με τη χρήση μεταλλικών μύλων ή σπαστήρων με οδοντωτούς δίσκους.
- Μάλαξη: Μετά την άλεση η ελαιοζύμη αναμιγνύεται στο μαλακτήρα μετά την προσθήκη ζεστού νερού. Η μάλαξη αποτελεί βασικό στάδιο της επεξεργασίας και συντελεί στη συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων με μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού. Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας η ελαιοζύμη θερμαίνεται στους 28° C – 30° C. Στο μαλακτήρα προστίθεται νερό μέχρι και 100% της ποσότητας της ελαιοζύμης πριν την εξαγωγή του ελαιολάδου σε φυγοκεντρικό σύστημα.

- Παραλαβή ελαιολάδου: Με τη χρήση φυγοκεντρική οριζόντιας διάταξης γίνεται διαχωρισμός του ελαιολάδου από τα στερεά συστατικά (ελαιοπυρήνας) και τα απόνερα (νερό – φυτικά υγρά).
- Καθαρισμός του ελαιολάδου: Τα στερεά σωματίδια (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού κτλ) που βρίσκονται διαλυμένα στην υγρή φάση απομακρύνονται με τη χρήση παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων.
- Τελικός διαχωρισμός: Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιολάδου από τα φυτικά υγρά γίνεται με τη χρήση φυγοκεντρικών ελαιοδιαχωριστήρων (Αρβανίτης 2005).

A.2.3 ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Τα βασικά κριτήρια αξιολόγησης του ελαιολάδου έχουν καθοριστεί από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (ΔΣΕ) και βασίζονται σε τρεις βασικούς παράγοντες : στην οξύτητα, την οξειδωση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (χρώμα-οσμή- γεύση).

ΟΞΥΤΗΤΑ: Το σημαντικότερο κριτήριο που κατατάσσει το ελαιόλαδο σαν ένα από τα καλύτερα, είναι ο βαθμός οξύτητας (Οξύτητα είναι η μέθοδος μέτρησης της ποιότητας του ελαιολάδου. Με βάση αυτό διακρίνεται σε βρώσιμο (οξύτητα μέχρι 3,3%) και βιομηχανικό (οξύτητα άνω των 3,3%)

Η οξύτητα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια τόσο για τους επαγγελματίες αλλά και για τους απλούς καταναλωτές καθώς καθορίζει την ποιοτική κατάταξη, την διαβάθμιση και τον καθορισμό της τιμής του ελαιολάδου. Τα λιπαρά οξέα στο λάδι είναι είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα με μια αλκοόλη, την γλυκερόλη. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα διαμορφώνουν την οξύτητα του λαδιού. Η οξύτητα που δίνεται εκφράζεται επί τοις εκατό (1,5%...). Όσο πιο υψηλό είναι το νούμερο, τόσο πιο πολλά είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Ο βαθμός ανάπτυξης της οξύτητας οφείλεται

σε διάφορους παράγοντες, οι οποίοι αρχίζουν να επηρεάζουν τον καρπό από πολύ νωρίς, της ο δάκος που τυχόν έχει προσβάλλει την ελιά, το πλήγωμα του καρπού κατά τη συγκομιδή, ο χρόνος και ο τρόπος αποθήκευσης του ελαιοκάρπου, η κυρίως τελική σύνθλιψη του στο ελαιοτριβείο κ.λπ. Τα ελαιόλαδα με υψηλή οξύτητα αλλοιώνονται ευκολότερα και γρηγορότερα από τα άλλα. (Μιχελάκης, 1998).

ΟΞΕΙΔΩΣΗ: Είναι η λεγόμενη «τάγγιση» του ελαιολάδου, αλλοίωση σοβαρότατη που συνδέεται κυρίως με τις ακατάλληλες συνθήκες στις οποίες εκτίθεται το λάδι μετά την εξαγωγή του από το ελαιοτριβείο (ακατάλληλα δοχεία αποθήκευσης, έκθεση στον ήλιο κ.λπ.). Αν η αλλοίωση είναι πολύ σοβαρή, το ελαιόλαδο αυτό μπορεί να αποβεί επιβλαβές για τον ανθρώπινο οργανισμό (Γερεουδάκη, 2006). Ο προσδιορισμός της οξείδωσης γίνεται με εργαστηριακές μετρήσεις και κυρίως με την μέτρηση του αριθμού των υπεροξειδίων.

ΤΑ ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

ΧΡΩΜΑ: Το χρώμα του ελαιολάδου καθορίζεται κυρίως από τις χρωστικές ουσίες που επικρατούν στον καρπό την στιγμή της συγκομιδής του. Επίσης, σημαντικό ρόλο για τον καθορισμό του χρώματος του ελαιολάδου παίζει και το όλο σύστημα σύνθλιψης του ελαιοκάρπου και εξαγωγής του λαδιού, δηλαδή ο τύπος του ελαιοτριβείου.

ΟΣΜΗ-ΓΕΥΣΗ: Ο έλεγχος των δύο βασικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, που συνδέονται στενά μεταξύ τους, δηλαδή του αρώματος και της γεύσης, αποτελεί σίγουρα από τα βασικότερα κριτήρια αξιολόγησης των ελαιόλαδων. Ο οργανοληπτικός έλεγχος γίνεται από εξειδικευμένους δοκιμαστές και σύμφωνα με τους κανόνες και τα στάνταρ που έχουν καθοριστεί από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου. Το φυσικό άρωμα και η γεύση εξαρτώνται σ' ένα βαθμό από την ποιότητα του ελαιολάδου αλλά και από την ίδια την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες στις οποίες αναπτύχθηκε, και φυσικά από τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού (Παπαγεωργίου, 1999).

A.2.4 Το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου

Τα παρθένα ελαιόλαδα που παραλαμβάνονται μηχανικά από τους καρπούς της ελιάς περιέχουν πλήθος πτητικών συστατικών ορισμένα από τα οποία ευθύνονται για

το άρωμά τους το οποίο τα καθιστά ευρέως αποδεκτά ακόμη και από καταναλωτές που δεν ανήκουν στις χώρες της Μεσογείου η οποία αποτελεί την περιοχή του πλανήτη όπου γίνεται η μεγαλύτερη παραγωγή ελαιολάδου. Οι ιδιότητες του ελαιολάδου όπως η υψηλή διατροφική αξία, η εξαιρετική πεπτικότητα, η υψηλή σταθερότητα στην οξείδωση, ακόμα και όταν εκτίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες και η ικανότητα πρόληψης καρδιαγγειακών παθήσεων δεν εξηγούν τους λόγους για την αυξανόμενη δημοτικότητά του σε χώρες που στο παρελθόν δεν ήταν επιθυμητό ως συστατικό τροφής. Η μεγάλη αύξηση στη ζήτηση ελαιολάδου υψηλής στη ζήτηση ελαιολάδου υψηλής ποιότητας φαίνεται ότι συνδέεται κυρίως με τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου. (Angerosa, 2002).

Η οργανοληπτική ποιότητα ενός τροφίμου αντιπροσωπεύει το βαθμό που αυτό είναι αποδεκτό και επιθυμητό. Αυτή προσδιορίζεται κυρίως από ένα σύνολο χαρακτηριστικών που γίνονται αντιληπτά με τις αισθήσεις. Το άρωμα, το χρώμα και η αίσθηση της αφής είναι χαρακτηριστικά που δημιουργούν ευχάριστα συναισθήματα στον καταναλωτή και καθιστούν τα τρόφιμα αποδεκτά. Η διέγερση των αισθητήριων οργάνων από ορισμένα πτητικά συστατικά προάγει ένα φάσμα αντιλήψεων που καταγράφονται στη μνήμη και επιτρέπουν την αναγνώρισή τους κατά την επόμενη επαφή των προϊόντων με τον καταναλωτή. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που γίνονται αντιληπτά με τα αισθητήρια όργανα είναι η εμφάνιση, το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, το ιξώδες, οι κιναισθητικές αντιλήψεις, η αίσθηση της αφής, η οσμή και η γεύση. Στην περίπτωση του ελαιολάδου χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, το σχήμα και οι κιναισθητικές αντιλήψεις δεν έχουν νόημα και έτσι το χρώμα, η γεύση, το άρωμα, η ρευστότητα και η αίσθηση της λιπαρότητας λαμβάνονται υπ όψιν για την εκτίμηση της ποιότητας του ελαιολάδου. Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου που είναι υπεύθυνα για το άρωμα και τη γεύση του. Όσον αφορά το άρωμα η περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά δεν είναι συνήθως επαρκής για την ερμηνεία των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του όπως αυτά γίνονται αντιληπτά με την γεύση και την όσφρηση καθώς καθοριστικό ρόλο παίζει και η οσμή αυτών.

Το εκλεπτυσμένο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου οφείλεται στο σύνολο των ερεθισμάτων που δημιουργούν τα πτητικά συστατικά του κατά τη μεταφορά τους με τα ρεύματα του αέρα στους υποδοχής της όσφρησης που απαντώνται στα νεύρα του

επιθηλίου της ρινικής κοιλότητας κατά την εισπνοή. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αντιληπτή τόσο η ποιότητα των ερεθισμάτων όσο και η έντασή τους δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. (Angerosa, 2000).

Χαρακτηριστικά των πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου είναι:

- Το χαμηλό μοριακό βάρος (<300 Da)
- Η υψηλή πτητικότητα έτσι ώστε ένας επαρκής αριθμός μορίων τους να μπορεί να φθάσει στο επιθήλιο της ρινικής κοιλότητας με τα ρεύματα του αέρα στη διάρκεια της εισπνοής
- Η επαρκής διαλυτότητάς τους στο νερό, για να διαχέονται διαμέσου της βλέννας η οποία καλύπτει τα ευαίσθητα οσφρητικά κύτταρα και στο λίπος προκειμένου να είναι δυνατή η διαλυτοποίηση στις μεμβράνες των υποδοχέων της όσφρησης.
- Τα χημικά χαρακτηριστικά τους ώστε να ευνοείται η σύνδεση με συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Angerosa, 2002).

Η ένταση των επιμέρους χαρακτηριστικών του αρώματος έχει διαπιστωθεί πως επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την πτητικότητα, τον υδρόφοβο χαρακτήρα και τη στερεοχημεία των πτητικών ενώσεων που ευθύνονται γι αυτούς και σε μικρότερο βαθμό από την συγκέντρωσή τους. Το μέγεθος, η διαμόρφωση, ο τύπος κι η θέση της χαρακτηριστικής ομάδας στο μόριο των πτητικών ενώσεων έχειδειχθεί ότι καθορίζουν την ικανότητά τους να συνδέονται με τους οσφρητικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς που υπάρχουν στο επιθήλιο της ρινικής κοιλότητας.

Ορισμένα επιμέρους χαρακτηριστικά του αρώματος επηρεάζονται και από τη γεωμετρική ισομέρεια των ακόρεστων πτητικών συστατικών. Ο Bedoukian (1971) μελέτησε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά επτά ακόρεστων πρωτοταγών αλκοολών και ανακάλυψε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ cis και trans ισομερούς κάθε αλκοόλης. Τα cis ισομερή είχαν πιο έντονο άρωμα από τα trans ισομερή. Η μετάθεση του διπλού δεσμού στο μόριο της πτητικής ένωσης μπορεί να έχει ως συνέπεια μια διαφοροποίηση στην απόχρωση του πράσινου και μια μεταβολή στο βαθμό αρέσκειας. Ο τύπος της χαρακτηριστικής ομάδας που υπάρχει στο μόριο της ένωσης σχετίζεται περισσότερο με την ένταση του αρώματος παρά με τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. (Angerosa, 2000)

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που περιγράφουν το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου είναι α) η φρουτώδης οσμή, που παραπέμπει σε εκείνη της ελιάς, β) η οσμή πράσινων φύλλων που παραπέμπει στην οσμή των μη ώριμων καρπών της ελιάς.

Οι αλδεΐδες και οι αλκοόλες με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους έχουν άρωμα που προσομοιάζει αυτό των φρεσκοκομμένων φύλλων διαφόρων δέντρων, των ανώριμων φρούτων ή λαχανικών και του φρεσκοκομμένου πράσινου χόρτου. Οι ενώσεις αυτές συνεισφέρουν έντονα στο άρωμα ελαιολάδου καλής ποιότητας.

Τα ελαιόλαδα που έχουν παραληφθεί από ανώριμους καρπούς χαρακτηρίζονται από άρωμα που παραπέμπει σε αυτό του φρεσκοκομμένου πράσινου χόρτου ή φρεσκοκομμένων φύλλων ελιάς. Τα ελαιόλαδα αυτά χαρακτηρίζονται από μια έντονη αίσθηση του πικάντικου και από μία περισσότερο ή λιγότερο πικρή γεύση που αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους τόσο σε πτητικές ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα όσο και σε σεκοϊριδοειδείς ενώσεις. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του πικάντικου και του πικρού χαρακτηρίζουν τα ελαιόλαδα που παραλαμβάνονται από υγιείς φρέσκους καρπούς και πρέπει πάντα να αξιολογούνται ως θετικά (Angerosa, 2002).

A.2.5 Πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου

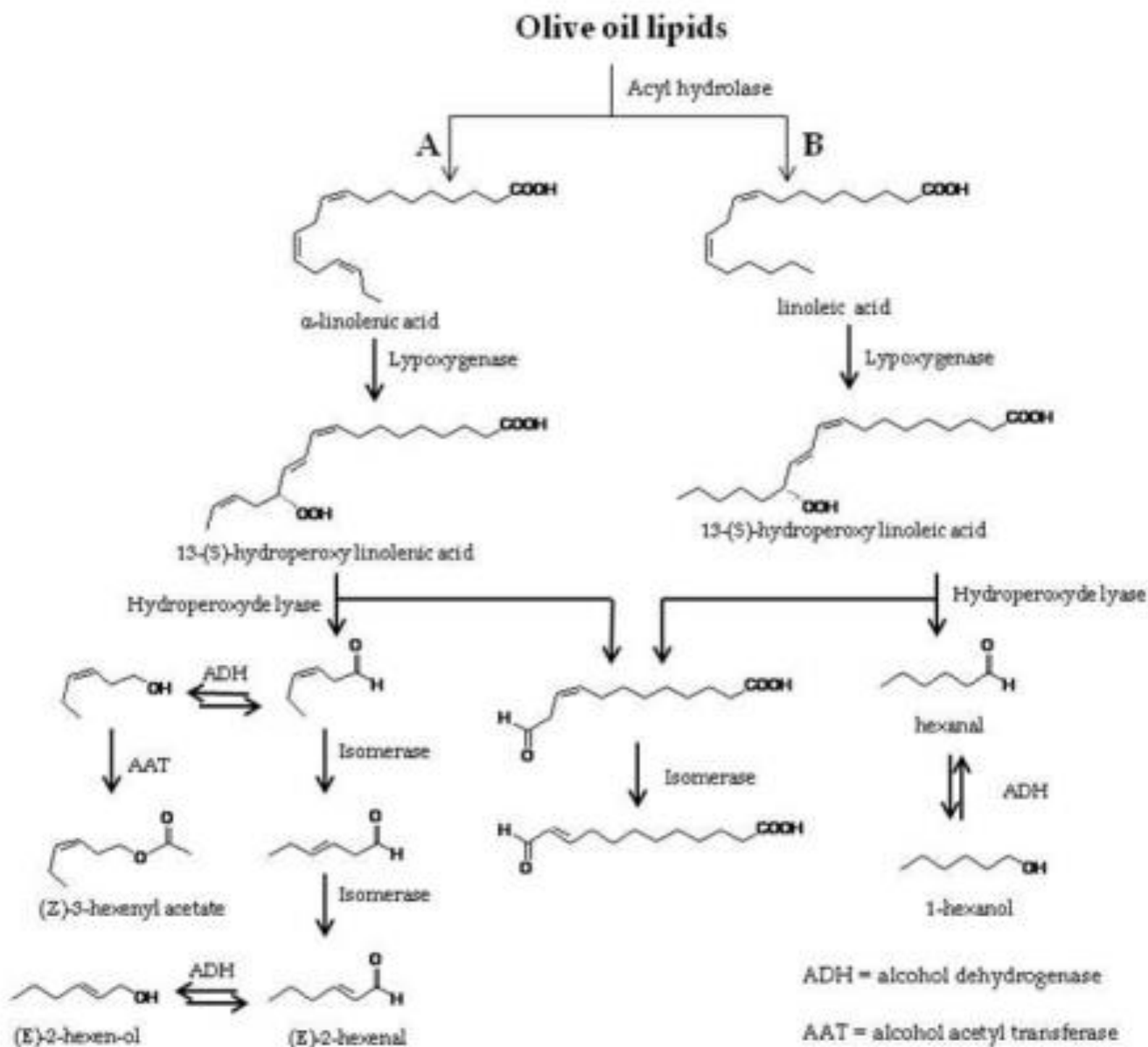
Περίπου διακόσες ογδόντα ενώσεις (280) έχουν ταυτοποιηθεί στο πτητικό κλάσμα του ελαιολάδου και ανήκουν σε τάξεις οργανικών ενώσεων όπως οι υδρογονάνθρακες (> 80) , οι αλκοόλες (45), οι αλδεΐδες (44), οι κετόνες (26), τα οξέα (13), οι εστέρες (55), οι αιθέρες (5), τα παράγωγα του φουρανίου (5), τα παράγωγα του θειοφαινίου (5), οι πυρανόνες (1), οι θειόλες (1) και οι πυραζίνες (1). Από αυτό το μεγάλο αριθμό ενώσεων μόνο 67 έχει βρεθεί ότι μπορεί να περιέχονται στο ελαιόλαδο σε επίπεδα υψηλότερα από το κατώφλι οσμής τους και να συνεισφέρουν στο άρωμά του.

Πίνακας Α.2.1 : Οσμηρά πτητικά συστατικά που βρέθηκαν στο παρθένο ελαιόλαδο (Boskou et al, 2006)

Αλδεΐδες	Εστέρες	Αλκοόλες
Αιθανάλη	Οξικός αιθυλεστέρας	2- Βουτανόλη
Προπανάλη	Προπανοϊκός αιθυλεστέρας	2-Μεθυλοβουτανόλη
2- μεθυλοβουτανάλη	Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	3-Μεθυλοβουτανόλη
3- μεθυλοβουτανάλη	Οκτανοϊκός αιθυλεστέρας	(Z)-3-Εξεν-1-όλη
Πεντανάλη	Κιναμωμικός αιθυλεστέρας	1-Οκτεν-3-όλη
Εξανάλη	2-Μεθυλοπροπανοϊκός αιθυλεστέρας	Εννεαν-1-όλη
(E)-2-Εξενάλη	2-Μεθυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας	2-Φαινυλοαιθανόλη
(Z) – 3- Εξενάλη	3-Μεθυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Κετόνες
Επτανάλη	Κυκλοεξυλοκαρβοξυλικός αιθυλεστέρας	1-Πεντεν-3-όνη
(E)-2-Επτενάλη	Οξικός βουτυλεστέρας	2-Οκτανόνη
Οκτανάλη	Οξικός 3-μεθυλοβουτυλεστέρας	1-Οκτεν-3-όνη
(E)-2-Οκτενάλη	Οξικός (Z)-3-εξενύλ-εστέρας	2-Μεθυλο-2-επτεν-2-όνη
(E)-2-Εννεενάλη	Βουτανοϊκός 2-μεθυλοπροπυλεστέρας	(Z)-1,5-Οκταδιεν-3-όνη
(Z)-2-Εννεενάλη	Οξέα	(E)-β-Δαμασκηνόνη
(Z)-3-Εννεενάλη	Οξικό οξύ	(Z)-β-Δαμασκηνόνη
(E,E) -2,4-Εννεαδιενάλη	Προπανοϊκό οξύ	Άλλες
(E,Z) -2,6-Εννεαδιενάλη	Βουτανοϊκό οξύ	κ-Οκτάνιο
(E) -2- Δεκενάλη	Πεντανοϊκό οξύ	Γουαϊακόλη
(Z)- 2- Δεκενάλη	2-Μεθυλοβουτανοϊκό οξύ	4-Αιθυλογουαϊακόλη
(E,E) -2,4-Δεκαδιενάλη	3-Μέθυλοβουτανοϊκό οξύ	4-μεθοξυ-2-μεθυλο-2-βουτανοθειόλη
(E,Z) -2,4-Δεκαδιενάλη	Εξανοϊκό οξύ	1-Οκτεν-3-υδρουπεροξειδίο
Trans-4,5 – Εποξυ-(E)-2-δεκενάλη	Επτανοϊκό οξύ	2-ισοβουτυλο-3-μεθοξυ-πυραζίνη
Φαινυλακεταλδεΐδη		
Βανιλίνη		

Είκοσι από τις ενώσεις του πίνακα 1 ευθύνονται για τα οργανοληπτικά ελαττώματα που εμφανίζονται στα ελαιόλαδα. Αυτά οφείλονται στην παραλαβή του ελαιολάδου από υπερώριμους καρπούς ή στην ανάπτυξη ζυμομυκήτων, μυκήτων και βακτηρίων στους καρπούς εξαιτίας δυσμενών συνθηκών στους χώρους συλλογής τους ή στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων εξαιτίας της αποθήκευσης του ελαιολάδου σε χώρους που έχουν υψηλή θερμοκρασία. Τα πιο συχνά οργανοληπτικά ελαττώματα του παρθένου ελαιολάδου δημιουργούνται κυρίως από ενώσεις όπως καρβοξυλικά οξέα, εστέρες, αλκοόλες και καρβονυλικές ενώσεις (Boskou et al, 2006).

Η ποιοτική σύσταση του πτητικού κλάσματος των καλής ποιότητας παρθένων ελαιολάδων είναι κατά βάση παρόμοια. Η ποσοτική σύστασή τους διαφοροποιείται ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του αρώματός τους. Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από υγιείς καρπούς ελιάς των οποίων η συγκομιδή έγινε στο σωστό στάδιο ωρίμανσης και με κατάλληλες τεχνικές παραλαβής περιέχει κυρίως πτητικές ενώσεις που προέρχονται από την οξείδωση λιπαρών οξέων όπως το λινολενικό και το λινελαϊκό οξύ η οποία επιτυγχάνεται με το μονοπάτι της λιποξυγενάσης. Από την ενζυμική αποικοδόμηση των 13-μονοϋδροξυπεροξειδίων των οξέων αυτών με την καταλυτική δράση μια λυάσης σχηματίζονται η εξανάλη και η (Z)-3-εξενάλη. Η ισομερείωση της τελευταίας που οφείλεται στην καταλυτική δράση μιας ισομεράσης, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της (E)-2-εξενάλης. Με αναγωγή της εξανάλης, της (Z)-3-εξενάλης και της (E)-2-εξενάλης που καταλύεται από μια δεϋδρογονάση αλκοολών, σχηματίζονται η εξενόλη, (Z)-3-εξενόλη και (E)-2-εξενόλη. Η εξανόλη και η (Z)-3-εξενόλη εστεροποιούνται με τη δράση μιας ακετυλοτρανσφεράσης προς οξικό εξυλεστέρα και οξικό (Z) -3-εξυλενεστέρα. Οι παραπάνω πτητικές ενώσεις ευθύνονται για την οσμή πράσινων φύλλων και την φρουτώδη οσμή του ελαιολάδου και αποτελούν τα κύρια πτητικά συστατικά του. Κατά την αποικοδόμηση του 13-μονοϋδροξυπεροξειδίου του λινολενικού οξέος σχηματίζονται και πτητικές ενώσεις με πέντε άτομα άνθρακα όπως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες και διμερή του πεντανίου των οποίων η συγκέντρωση είναι χαμηλότερη από το κατώφλι οσμής και έτσι δε συνεισφέρουν στο άρωμα του ελαιολάδου (Boskou et al., 2006).



Εικόνα Α.2.1 : Βιοσυνθετικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης στην ελαιοζύμη (Benincasa et al, 2003)

Α.2.6 Οι παράγοντες που επηρεάζουν το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου

Το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου επηρεάζεται τόσο από αγρονομικούς όσο και από εδαφολογικούς παράγοντες και πιο συγκεκριμένα από την ποικιλία, το βαθμό ωρίμανσης των καρπών και τις συνθήκες παραλαβής του ελαιολάδου (Gomez-Rico et al, 2006).

Η ποικιλία της ελιάς αποτελεί καθοριστικό παράγοντα καθώς η ενεργότητα των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις βιογένεσης των πτητικών συστατικών είναι γενετικά χαρακτηριστική (Angerosa, 2002). Μελέτες που έγιναν σε καρπούς διαφορετικών ποικιλιών οι οποίοι είχαν αναπτυχθεί στις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες και είχαν τον ίδιο βαθμό ωρίμανσης, έδειξαν ότι η συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους, προϊόντων της αποικοδόμησης του α-λινολενικού οξέος, ήταν διαφορετική ανεξάρτητα από τις κλιματικές μεταβολές και τον τρόπο ανάπτυξης των δέντρων. Συνεπώς είναι φανερό ότι η ποικιλία παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Angerosa, 1999). Μια άλλη μελέτη που έγινε σε καρπούς 39 ποικιλιών ελιάς από διαφορετικές χώρες οι οποίες καλλιεργήθηκαν στον ίδιο αγρό κάτω από τις ίδιες αγρονομικές και εδαφολογικές συνθήκες και η παραλαβή του ελαιολάδου έγινε με τις ίδιες τεχνολογικές συνθήκες έδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα των επιμέρους πτητικών συστατικών τους γεγονός που οδήγησε στην κατηγοριοποίησή τους με βάση την ποικιλία των καρπών από τους οποίους είχαν παραληφθεί (Luna et al, 2006).

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την άρδευση των ελαιόδεντρων και τον τρόπο με τον οποίο αυτή επιδρά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ελαίου. Το ελαιόδεντρο είναι ένα δέντρο καλά προσαρμοσμένο στο μεσογειακό περιβάλλον καθώς αντέχει στην ξηρασία και διαθέτει πολλούς αμυντικούς μηχανισμούς ώστε να είναι ικανό να επιβιώσει σε συνθήκες έλλειψης νερού (Stefanoudaki et al, 2010). Ο Servili και οι συνεργάτες του, το 2007, παρατήρησαν ότι η κατάσταση του νερού επηρεάζει την συγκέντρωση των πτητικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα, τα ελαιόλαδα που προέρχονται από ελαιόδεντρα στα οποία εφαρμόζεται ο ελλειμματικός τρόπος άρδευσης φαίνεται να έχουν καλύτερη ποιότητα. Το 2008 ο Baccouri και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα ελαιόλαδα που προερχόταν από δέντρα που μεγάλωναν υπό συνθήκες άρδευσης είχαν πιο ενισχυμένο άρωμα. Είναι φανερό ότι δεν είναι ξεκάθαρος ακόμη ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η άρδευση στην ποιότητα του ελαιολάδου. (Gomes da Silva et al, 2008)

Η ανάπτυξη και η ωρίμανση των καρπών ελιάς είναι ένας συνδυασμός βιοχημικών και φυσιολογικών γεγονότων που συμβαίνουν τόσο υπό τον αυστηρό γενετικό έλεγχο όσο και από την επίδραση πολλών περιβαλλοντικών συνθηκών. Πολλαπλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί προκειμένου να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο ο βαθμός

ωρίμανσης του καρπού επιδρά στα επίπεδα των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου (Campestre et al., 2017). Μελέτες που έγιναν σε ελαιόλαδα που παραλήφθηκαν από καρπούς διαφορετικών Ιταλικών (Montedoro et al., 1978) και Ισπανικών ποικιλιών (Olias et al., 1980) έδειξαν ότι η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών (κυρίως των C₅, C₆ αλκοολών και ιδιαίτερα της (Z)- 2 – εξενάλης), που είναι υπεύθυνα για το άρωμα, παρουσίαζε αύξηση ανάλογη με το βαθμό ωρίμανσης των καρπών. Η μέγιστη συγκέντρωσή τους παρατηρήθηκε όταν το χρώμα των καρπών άλλαζε από κιτρινοπράσινο σε μωβ. Έπειτα από αυτό το στάδιο οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση του συνόλου των πτητικών συστατικών μειώνεται λόγω της μικρότερης δραστηριότητας των εμπλεκόμενων ενζύμων στην παραγωγή τους. Αυτή η τάση δεν βρέθηκε από τους Aparicio & Morales (1998) οι οποίοι παρατήρησαν μια σταθερή ελάττωση της συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου όταν ο βαθμός ωρίμανσης των καρπών από τους οποίους παραλαμβάνεται αυξάνεται (Kiritsakis, 1998) (Angerosa, 2002). Σε μια άλλη μελέτη που έγινε το 1998 από τον Μπλέκα και τους συνεργάτες του βρέθηκε ότι τα επίπεδα των επιμέρους πτητικών συστατικών με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους ελαττώνονται με την αύξηση του βαθμού ωρίμανσης εκτός από αυτά της (Z) – 3-εξενάλης. Τα επίπεδα της τελευταίας εμφάνισαν μια μέγιστη τιμή στην πορεία της ωρίμανσης του καρπού η οποία στη συνέχεια ελαττώθηκε. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι απαιτείται μια περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ο βαθμός ωρίμανσης των καρπών της ελιάς επιδρά στη σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου.

Η τελική συγκέντρωση των πτητικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου εξαρτάται και από τις τεχνολογικές παραμέτρους της παραλαβής του και πιο συγκεκριμένα από το βαθμό διάρρηξης των φυτικών ιστών, τη θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια της άλεσης, τη διάρκεια και τη θερμοκρασία μάλαξης και το είδος του ελαιουργικού συστήματος που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του ελαίου.

Οι μεταλλικοί σπαστήρες προκαλούν διάρρηξη μεγάλου αριθμού κυττάρων σε σχέση με τους λίθινους σπαστήρες, ωστόσο η θερμοκρασία της ελαιοζύμης, εξαιτίας της βιαιότητας με την οποία γίνεται η άλεση, αυξάνεται κατά περίπου 10° C σε σχέση με αυτή που παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται λίθινοι σπαστήρες. Τα ελαιόλαδα που λαμβάνονται από λίθινους σπαστήρες βρέθηκε να έχουν υψηλότερη

συγκέντρωση πτητικών συστατικών και ιδιαίτερα (Z)-2-εξενάλης, εξενάλης και (E)-3-εξεν-1-όλης, σε σχέση με εκείνα που λαμβάνονται με τη χρήση μεταλλικών σπαστήρων.

Η μάλαξη της ελαιοζύμης ευθύνεται επίσης για μεταβολές στη σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου. Το στάδιο της μάλαξης κατά το οποίο η ανάδευση είναι βραδεία και συνεχής έχει μεγάλη σημασία επειδή συμβάλλει στη διάσπαση του γαλακτώματος ελαίου/νερού και στη συνένωση των μικρών σταγονιδίων του ελαιολάδου, που σχηματίζονται όταν η άλεση με τη χρήση μεταλλικών σπαστήρων, σε μεγαλύτερες σταγόνες που μπορούν εύκολα να διαχωριστούν (Angerosa, 2002). Ο χρόνος μάλαξης συμβάλλει σε μια αύξηση της συγκέντρωσης των αλκοολών και των καρβονυλικών ενώσεων που έχουν πέντε και έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους, κυρίως αυτή της εξανάλης, η οποία εμφανίζει ένα χαμηλό κατώφλι οσμής. Οι μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τον τρόπο που επιδρά το στάδιο της μάλαξης στην ποιότητα του ελαιολάδου καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα. Οι χαμηλές θερμοκρασίες ($\leq 25^{\circ}\text{C}$) και οι μέσοι χρόνοι μάλαξης (35-45 min) ευνοούν το σχηματισμό των πτητικών συστατικών που είναι υπεύθυνα για τα επιθυμητά οργανοληπτικά συστατικά του ελαιολάδου. Οι συνθήκες αυτές συμβάλλουν επίσης στην αποφυγή σχηματισμού υψηλών συγκεντρώσεων κάποιων πτητικών συστατικών των οποίων η παρουσία στο ελαιολάδο είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του (Angerosa, 2001).

Η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου μπορεί να επηρεαστεί και από τα μηχανικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση του. Ελαιολάδα τα οποία παραλήφθηκαν με χρήση φυγοκέντρου απόχυσης τριών φάσεων είχαν μια χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πτητικά συστατικά σε σχέση με αυτά που παραλήφθηκαν με εφαρμογή υψηλής πίεσης στην ελαιοζύμη. Σημαντική ήταν κυρίως η διαφορά στα επίπεδα των αλκοολών με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους, όπως η εξανόλη και η (E)-2-εξενόλη, οι οποίες απομακρύνονται πιθανόν με το ζεστό νερό που χρησιμοποιείται για την αραίωση της ελαιοζύμης μετά τη μάλαξη της με σκοπό να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός του ελαιολάδου κατά τη φυγοκέντρωση. Η διάθεση στο εμπόριο φυγοκέντρων που μπορούν να διαχωρίζουν την ελαιώδη φάση από την ελαιοζύμη χωρίς την προσθήκη ζεστού νερού μπορούν να προσφέρουν

την παραγωγή ελαίων με άρωμα παρόμοιο αυτού των ελαιολάδων που παραλαμβάνονται με εφαρμογή υψηλής πίεσης στην ελαιοζύμη (Angerosa 2002).

A.2.7 Μέθοδοι παραλαβής πτητικών συστατικών

Σύμφωνα με τις Morales και Tsimidou (2000), για την επιλογή της μεθόδου παραλαβής των πτητικών συστατικών από ένα δείγμα τροφίμου πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι:

- Τα επιμέρους πτητικά συστατικά ενός τροφίμου είναι πάρα πολλά και διαφέρουν ως προς τη χημική σύσταση, το μοριακό βάρος και στη συγκέντρωση στο εξεταζόμενο δείγμα.
- Πρέπει να αποτρέπεται ο σχηματισμός άλλων ενώσεων artifacts κατά τη διάρκεια της απομόνωσης των πτητικών συστατικών.
- Είναι αναγκαίος ο εμπλουτισμός του πτητικού κλάσματος όταν για την παραλαβή των πτητικών συστατικών εκχυλίζεται το εξεταζόμενο δείγμα με διαλύτη ή μείγμα διαλυτών.

Για την εξέταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών που παραλαμβάνεται από ένα δείγμα τροφίμου είναι απαραίτητο να γίνει:

1. Παραλαβή πτητικών συστατικών από το δείγμα.
2. Εμπλουτισμό του πτητικού κλάσματος (κατά περίπτωση).
3. Κλασμάτωση του πτητικού κλάσματος σε τάξεις συστατικών (κατά περίπτωση).
4. Ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών του πτητικού κλάσματος.

Υπάρχουν δυο ομάδες τεχνικών παραλαβής των πτητικών συστατικών από δείγματα τροφίμων:

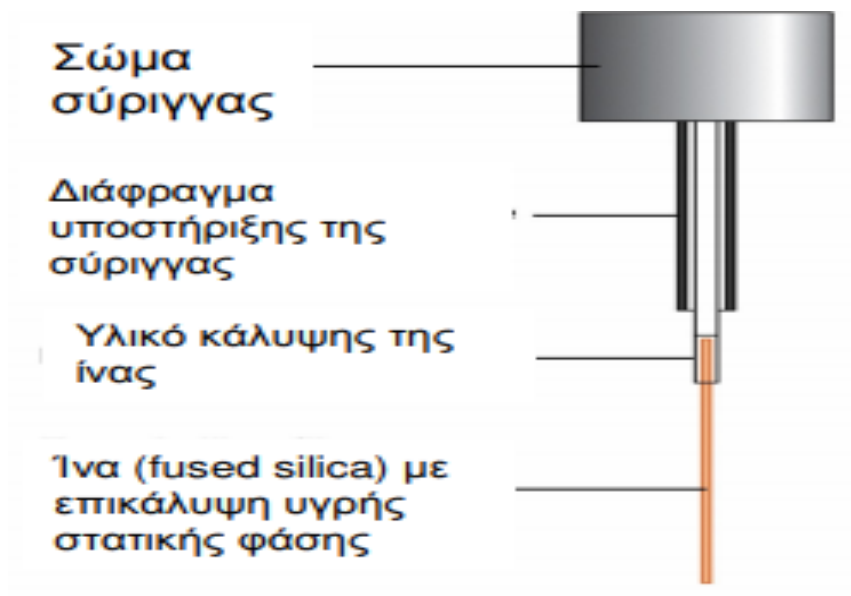
1. Οι τεχνικές που δεν περιλαμβάνουν στάδιο εμπλουτισμού, όπως η τεχνική της απ ευθείας έγχυσης του δείγματος και η τεχνική κατανομής στην υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση ή Static Headspace.
2. Οι τεχνικές που περιλαμβάνουν στάδιο εμπλουτισμού όπως οι τεχνικές εκχύλισης με διαλύτη, απόσταξης με υδρατμούς ή σε συνθήκες ελαττωμένης

πίεσης, απόσταξης και παράλληλης εκχύλισης του αποστάγματος ή SDE, εκχύλισης με ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση ή SCE, μικροεκχύλισης στερεής φάσης ή SPME.

Από τις παραπάνω τεχνικές καμία δεν είναι σε θέση να δώσει απολύτως ακριβείς πληροφορίες για την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών. Έτσι η επιλογή της μεθόδου που εφαρμόζεται κάθε φορά εξαρτάται από τον αντικειμενικό σκοπό της μελέτης για τις ανάγκες της οποίας είναι απαραίτητη η παραλαβή των πτητικών συστατικών από τα δείγματα του προς εξέταση τροφίμου (Molrales et al 2000).

A.2.7.1 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME)

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης ή SPME, που αναπτύχθηκε από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του κατά το έτος 1990, είναι μία γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται επιλεκτική συγκέντρωση πτητικών συστατικών από υγρά και στερεά δείγματα χωρίς χρήση τοξικών διαλυτών. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται τόσο στην εξέταση περιβαλλοντικών δειγμάτων όσο και δειγμάτων τροφίμων (Pawliszyn et al, 1997). Όλα τα στάδια της κλασσικής εκχύλισης υγρού-υγρού έχουν ενσωματωθεί σε ένα στάδιο, με τη χρήση μιας συσκευής, που έχει ως αποτέλεσμα να απλοποιείται η όλη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος. Είναι μια ιδανική τεχνική για χρήση σε συνδυασμό με την τεχνική GC-MS. Στην SPME χρησιμοποιείται μια ίνα κατασκευασμένη από διοξείδιο του πυριτίου, η οποία έχει καλυφθεί με ένα ειδικό πολυμερικό υλικό (στατική φάση). Η στατική φάση την οποία φέρει η ίνα μπορεί να είναι είτε ένα πολυμερικό υγρό υψηλής μοριακής μάζας παρόμοιας φύσης με τη στατική φάση που έχει μια χρωματογραφική στήλη (π.χ. πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο ή PDMS), είτε ένα στερεό υλικό με υψηλό πορώδες (αυξάνει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για προσρόφηση). Η συσκευή SPME είναι πολύ απλή και έχει εμφάνιση ανάλογη με αυτή μιας τροποποιημένης σύριγγας που αποτελείται από διάταξη συγκράτησης της ίνας και αγωγό εντός του οποίου προστατεύεται η ίνα. Η τελευταία μπορεί με τη βοήθεια ειδικού ελατηρίου να εξέλθει από τον αγωγό (Vas & Vekey, 2004).



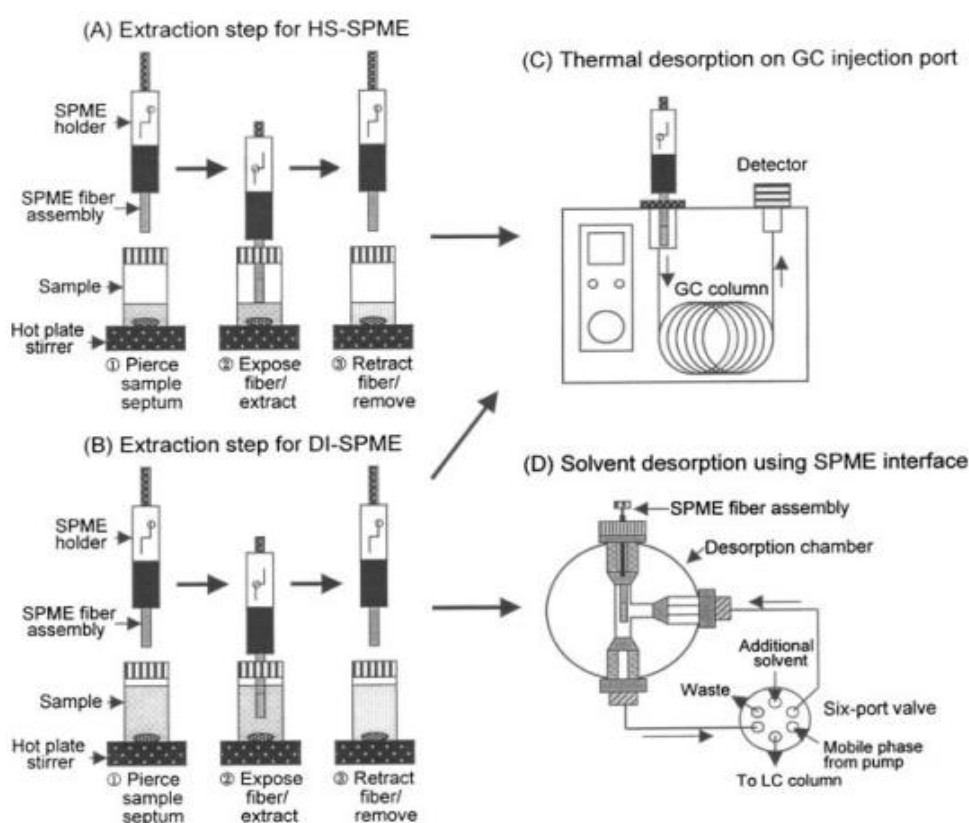
Εικόνα Α.2.2 : Μέρη από τα οποία αποτελείται η SPME ίνα (Μπακεας, 2008).

Η τεχνική SPME εφαρμόζεται με δύο τρόπους οι οποίοι διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση στην οποία τοποθετείται η ίνα στο δείγμα (μέσα στο δείγμα ή στην υπερκείμενη του αέρια φάση). Στην πρώτη περίπτωση η ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα, για παράδειγμα σε ένα υδατικό διάλυμα, με συνέπεια τα πτητικά συστατικά του να συγκρατούνται στο πολυμερικό υλικό. Συνήθως απαιτείται μια επαρκής ανάδευση του δείγματος που αποσκοπεί την ταχύτερη αλληλεπίδραση των πτητικών συστατικών με το πολυμερικό υλικό καθώς ένα χαρακτηριστικό αυτών των συστατικών είναι ο χαμηλός συντελεστής διάχυσης. Στην δεύτερη περίπτωση πρέπει να έχει προηγηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών από το δείγμα στο εσωτερικό διάκενο (headspace) του φιαλιδίου, εντός του οποίου έχει μεταφερθεί το προς εξέταση δείγμα (Pillonel et al, 2002 , Pawliszyn 1997).

Η δειγματοληψία λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις: 1) Φάση προσρόφησης των πτητικών συστατικών στην SPME ίνα και 2) Φάση εκρόφησης των πτητικών συστατικών από την SPME ίνα.

Η SPME ίνα είναι τοποθετημένη στη βελόνη μιας ειδικού τύπου σύριγγας. Στην πρώτη φάση η βελόνη της σύριγγας εισάγεται μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος (septum) στο φιαλίδιο, η ίνα εξέρχεται από την βελόνη με τη βοήθεια ενός εμβόλου και έρχεται σε επαφή με το δείγμα ή την υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση για

ορισμένο χρόνο (2 έως 15 λεπτά περίπου). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συγκρατούνται τα πτητικά συστατικά του δείγματος με προσρόφηση στο πολυμερικό υλικό της. Το φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα θερμοστατείται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 40° C. Στην δεύτερη φάση η ίνα επανέρχεται στη βελόνη και η σύριγγα απομακρύνεται από το φιαλίδιο και αμέσως εισάγεται στη διάταξη έγχυσης του αέριου χρωματογράφου ώστε να απελευθερωθούν με θερμική εκρόφηση τα προσροφημένα στη στατική φάση πτητικά συστατικά και να οδηγηθούν με τη βοήθεια του φέροντος αερίου στην τριχοειδή στήλη του αεριοχρωματογράφου όπου θα διαχωριστούν.



Εικόνα Α.2.3 : SPME δειγματοληψία με δύο τρόπους: Α) Παραλαβή πτητικών συστατικών από το εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου, Β) Παραλαβή πτητικών συστατικών από το υγρό δείγμα (Kataoka H. et al, 2000).

Κατά την εφαρμογή της τεχνικής SPME παράγοντες όπως ο τρόπος ανάδευσης του δείγματος, η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η δειγματοληψία, η τιμή pH του δείγματος, ο όγκος του δείγματος, καθώς και οι συνθήκες προσρόφησης και εκροφησης των πτητικών συστατικών πρέπει να διατηρούνται σταθερές προκειμένου να εξασφαλιστεί η ακρίβεια των μετρήσεων. Η πολικότητα και η πτητικότητα των συστατικών που πρέπει να ληφθούν από το δείγμα παίζουν σημαντικό ρόλο στον

καθορισμό των συνθηκών στις οποίες θα γίνει η δειγματοληψία και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός τους. Η απουσία διαλύτη επιτρέπει την εισαγωγή όλης της ποσότητας των πτητικών συστατικών που εκροφώνται από την ίνα στην τριχοειδή στήλη, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία (Vas & Vekey 2004).

Στο εμπόριο διατίθενται έξι ίνες SPME οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς το πολυμερικό υλικό που φέρουν και ως προς το πάχος του υμενίου του υλικού αυτού. Η επιλογή της ίνας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς σε αυτή στηρίζεται η αξιοπιστία και των αποτελεσμάτων και η επιτυχία της μεθόδου. Η επιλογή γίνεται με βάση:

- α) τη μοριακή μάζα των πτητικών συστατικών των οποίων επιδιώκεται η παραλαβή,
- β) τη συγγένεια που εμφανίζουν τα πτητικά συστατικά λόγω της πολικότητάς τους, ως προς το προσροφητικό υλικό της ίνας (Pawliszyn, 1997).

Το πολυμερικό υλικό αυτών των ινών είναι είτε ένα καθαρό υγρό πολυμερές, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) ή ένας πολυακρυλικός εστέρας (PA), είτε υγρά πολυμερή (PDMS, Carbowax) που έχουν εμποτιστεί σε στερεά πορώδη υλικά όπως Carboxen, Divinylbenzene (DVB), ή μίγμα DVB- Carboxen. Τα μίγματα αυτά συνδυάζουν την ικανότητα προσρόφησης των υγρών πολυμερών και των πορωδών στερεών σωματιδίων. Οι πολικές ίνες χρησιμοποιούνται για την συγκράτηση των πολικών συστατικών σε αντίθεση με τις μη πολικές που χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των μη πολικών συστατικών κατ' αναλογία με ότι συμβαίνει κατά τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό στις τριχοειδείς στήλες (Vas & Vekey, 2004, Pillonel et al, 2002).

Το υλικό PDMS εμφανίζει υψηλή ευαισθησία έναντι των μη πολικών συστατικών, είναι υδρόφοβο, ενώ συγκρατεί ικανοποιητικά τα μέσης και χαμηλής πολικότητας συστατικά. Οι PA ως πολικά υλικά χρησιμοποιούνται για τη συγκράτηση των πολικών συστατικών. Το υλικό PDMS πολλές φορές συνδυάζεται και με άλλα υλικά ώστε να αποκτήσει συγκεκριμένες ιδιότητες. Συνήθως συνδυάζεται με το υλικό Carboxen ένα μοριακό κόσκινο άνθρακα με μακρο- μέσο- και μικροπόρους. Ο συνδιασμός Carboxen – PDMS παρέχει τη δυνατότητα να ελέγχεται το μέγεθος των σωματιδίων που εισχωρούν σε αυτό, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνει τη συγκράτηση μικρών μορίων στο υλικό PDMS. Το πορώδες υλικό DVB έχει μεγαλύτερους πόρους

σε σχέση με το Carboxen και γι αυτό το λόγο ο συνδυασμός του με το PDMS χρησιμοποιείται για την αποτελεσματικότερη συγκράτηση στην ίνα μεγαλύτερου μεγέθους μορίων. Ο συνδυασμός των υλικών DVB και Carboxen με το πολυμερές PDMS καθιστά δυνατή τη συγκράτηση όλων των μορίων ανεξαρτήτου μεγέθους. Το πιο σύνθετο αυτό υλικό αποτελείται από ένα στρώμα PDMS/Carboxen το οποίο επικαλύπτεται από ένα στρώμα PDMS/DVB. Τα μικρού μεγέθους μόρια, λόγω του μεγαλύτερου συντελεστή διάχυσης, διαχέονται ταχύτερα στο πρώτο στρώμα όπου προσροφώνται στο υλικό Carboxen. Αντιθέτως, τα μέσου μεγέθους μόρια προσροφώνται στο υλικό DVB του εξωτερικού στρώματος. Με τον ίδιο τρόπο γίνεται και η θερμική εκρόφιση των προσροφηθέντων στην ίνα μορίων. Για πολύ πτητικά συστατικά χρησιμοποιούνται ίνες οι οποίες φέρουν μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερικού υλικού, ενώ για τα ελάχιστα πτητικά συστατικά ίνες που φέρουν τη μικρότερη δυνατή ποσότητα πολυμερικού υλικού (Pillonel et al, 2002).

Η τεχνική SPME έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την παραλαβή των πτητικών συστατικών, η χρήση μικρής ποσότητας δείγματος, το χαμηλό κόστος, η μη χρησιμοποίηση διαλύτη, η υψηλή ευαισθησία. Για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές στη διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος δειγμάτων παρθένου ελαιολάδου (Flamini et al, 2003, Baccouri et al, 2007, Cavalli et al, 2004, Romero I et al, 2014, Vichi S et al., 2003).

A.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

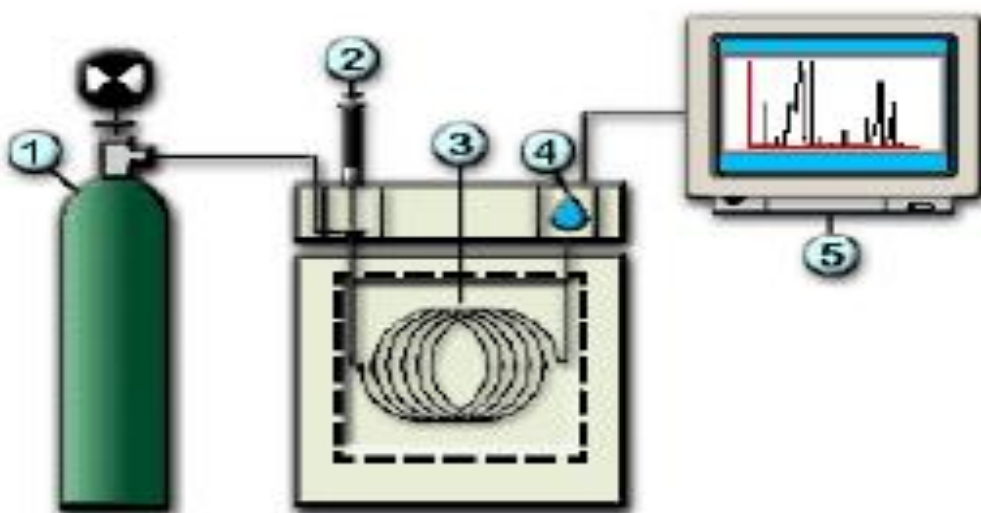
A.3.1. Αέρια Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης. Η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) διακρίνεται σε δύο τύπους, τη χρωματογραφία αερίου-στερεού (Gas – Solid Chromatography, GSC), η οποία βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης και η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης και τη χρωματογραφία αερίου- υγρού (Gas – Liquid Chromatography, GLC), η οποία βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης που είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς αερίου. Απαραίτητη

προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι οι υπό εξέταση ουσίες να είναι πτητικές ή να μετατρέπονται σε πτητικά παράγωγα με τα κατάλληλα αντιδραστήρια. Ο διαχωρισμός κάθε επιμέρους πτητικού συστατικού του δείγματος επιτυγχάνεται λόγω των διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του μίγματος, του υλικού πλήρωσης της στήλης ή του υλικού κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και του φέροντος αερίου. Όσο μεγαλύτερη είναι η χημική συγγένεια των επιμέρους συστατικών του δείγματος με τη στατική φάση τόσο υψηλότερος είναι και ο χρόνος συγκράτησής τους σε αυτή.

Τα βασικά μέρη μιας διάταξης αέριας χρωματογραφίας είναι:

1. η φιάλη που περιέχει το φέρον αέριο, ο ρυθμιστής πίεσης του φέροντος αερίου,
2. το σύστημα εισαγωγής του δείγματος,
3. η στήλη χρωματογραφίας, ο φούρνος της στήλης,
4. ο ανιχνευτής, ο ενισχυτής σήματος και
5. ο καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής – εκτυπωτής.



Εικόνα Α.3.1 : Τα μέρη του αερίου χρωματογράφου (Tarantilis, 2017)

Το φέρον αέριο που αποτελεί την κινητή φάση πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή με τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν.

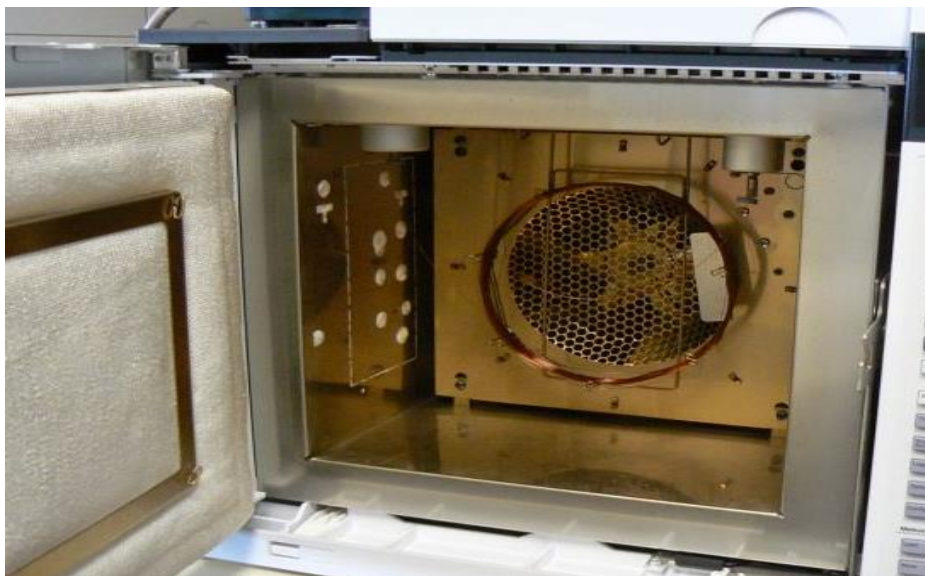
Χρησιμοποιούνται κυρίως το άζωτο (N_2), το ήλιο (He) και το υδρογόνο (H_2). Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται με βάση τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή.

Ο ρυθμιστής πίεσης χρησιμεύει για να ρυθμίζει την πίεση από 100- 200 atm που επικρατούν στη φιάλη στις 1-3 atm που πρέπει να υπάρχουν στην είσοδο της στήλης. Στις πληρωμένες στήλες (packed columns) η ροή του φέροντος αερίου είναι 10-60 mL/min ενώ όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδής στήλες (capillary columns) η ροή είναι 1-6 mL/min.

Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος αποτελείται από μια μικροσύριγγα με την οποία γίνεται η ένεση και το θάλαμο εξαέρωσης εντός του οποίου εισάγεται το δείγμα και εξαερώνεται. Ο όγκος του δείγματος κυμαίνεται μεταξύ 0,5-2mL για τα αέρια και 1-10μL για τα υγρά. Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από τη διαθέσιμη ποσότητα αυτού, τη χωρητικότητα της στήλης, την ευαισθησία ανιχνευτή.

Η στήλη βρίσκεται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο κλίβανο. Η θερμοκρασία είτε είναι σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ισόθερμη ανάλυση, είτε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης από 50° C – 250° C. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα σε μορφή σπειράματος. Το υλικό κατασκευής του είναι ανοξειδωτος χάλυβας, γυαλί ή πλαστικό. Οι πληρωμένες στήλες έχουν μήκος 1-3 m και διάμετρο 3-10mm, ενώ οι τριχοειδείς στήλες έχουν μήκος 10-50m και διάμετρο 0,2-1,2 mm. Οι πληρωμένες στήλες έχουν ως στατική φάση κάποιο υγρό που συγκρατείται πάνω σε αδρανές υλικό όπως το Chromosorb P, Chromosorb W και το Chromosorb G. Οι τριχοειδής στήλες διακρίνονται στις: 1) WCOT (Wall Coated Open Tubular) : υγρή στατική φάση που συγκρατείται απ ευθείας στα τοιχώματα του σωλήνα με τη μορφή λεπτού υμενίου πάχους 1-3μm, 2) SCOT (Support Coated Open Tubular): υγρή στατική φάση εμποτισμένη σε υπόστρωμα που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα και 3) μικροστήλες PLOT (Porous Layer Open Tubular) : στερεή στατική φάση η οποία είναι ένα προσροφητικό υλικό στην εσωτερική επιφάνεια του εσωτερικού σωλήνα. Οι τριχοειδής στήλες παρά το γεγονός ότι έχουν πολύ μικρή χωρητικότητα πλεονεκτούν στο ότι έχουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης μικρής ποσότητας δείγματος και υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Οι στατικές φάσεις μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την πολικότητά τους: σε πολικές, σε σχετικά πολικές και σε μη πολικές. Η καταλληλότερη στατική φάση για

δεδομένο δείγμα είναι εκείνη η οποία είναι χημικά παρόμοια με αυτό, δηλαδή ίδιας πολικότητας.



Εικόνα Α.3.2 : Θερμοστατούμενος κλίβανος και στήλη χρωματογραφίας (Tarantilis, 2017)

Το φέρον αέριο παρασύροντας τα συστατικά του δείγματος εισέρχεται στη στήλη όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών. Στη συνέχεια τα διαχωριζόμενα συστατικά με τη βοήθεια του φέροντος αερίου μεταφέρονται στον ανιχνευτή που μπορεί να είναι ένα φασματοόμετρο μάζας. Το σήμα του ανιχνευτή ενισχύεται και καταγράφεται. Η απεικόνιση των πληροφοριών που λαμβάνονται από τις αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο δίνεται με τη μορφή φάσματος.

Η ερμηνεία του προκύπτοντος φάσματος στηρίζεται στην σύγκριση του χρόνου συγκράτησης της άγνωστης ουσίας με το χρόνο συγκράτησης συγκεκριμένης πρότυπης ουσίας. Ως χρόνος συγκράτησης ορίζεται το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή της ένεσης έως και τη στιγμή λήψης του χρωματογραφήματος. Ο χρόνος συγκράτησης από μόνος του δεν μπορεί να ταυτοποιήσει ένα συστατικό. Για να γίνει ταυτοποίηση χρειάζεται το Φασματοόμετρο Μάζων. (Ταραντίλης, 2017) (Feng et al, 2019).

Α.3.2 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (GC – MS)

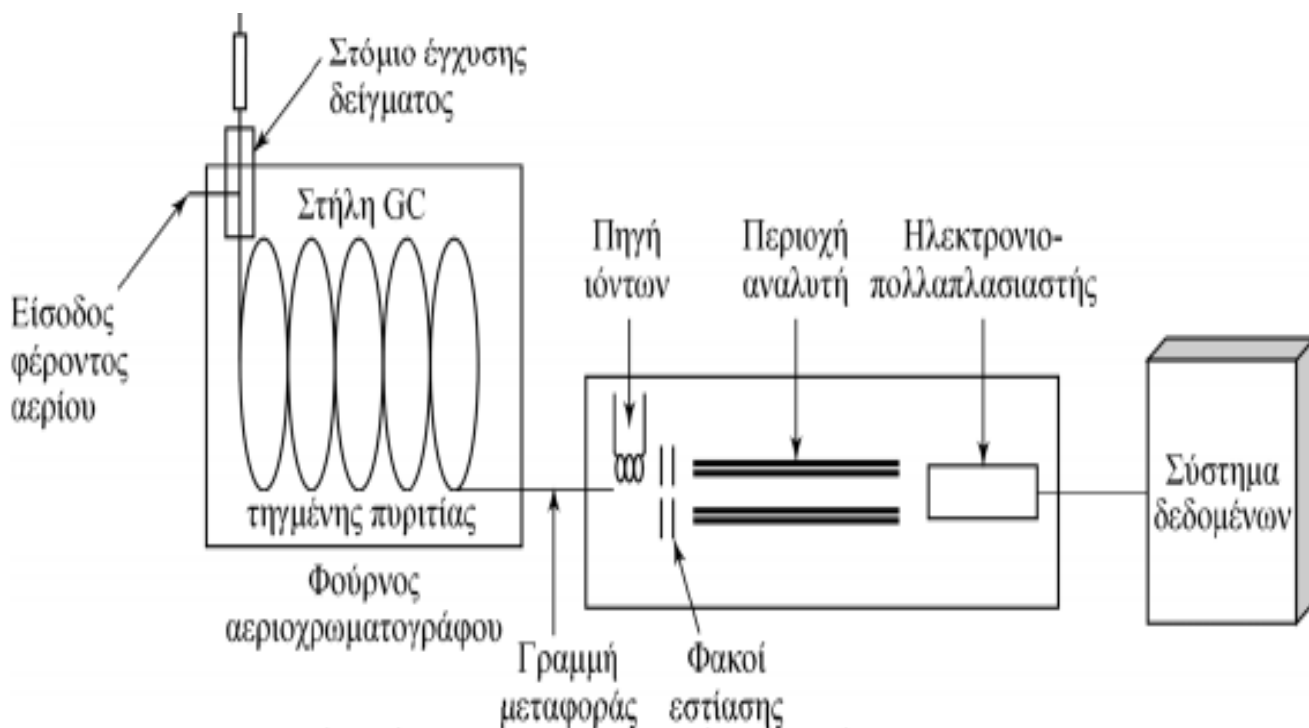
Όταν η αέρια χρωματογραφία, που είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος, συνδυαστεί με τη φασματομετρία μαζών γίνεται ένα ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών είναι μια εξαιρετική αναλυτική τεχνική η οποία

χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.α.

Το υπό εξέταση δείγμα αφού διαχωριστεί στα συστατικά του εξέρχεται από τον αέριο χρωματογράφο και εισέρχεται σε αέρια κατάσταση στο φασματομέτρο μαζών. Η γραμμή μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη διατηρεί τα διαχωρισθέντα συστατικά στην αέρια φάση κατά τη μεταφορά τους στο φασματομέτρο μαζών. Στο θάλαμο ιονισμού του τελευταίου τα συστατικά βομβαρδίζονται από ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας και έτσι προκαλείται ιονισμός των μορίων που οδηγεί σε διάσπαση ώστε να δημιουργηθούν ιόντα με μικρότερη μάζα. Μόλις αυτά δημιουργηθούν επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και ακολούθως αποκλίνουν της αρχικής τους πορείας ανάλογα με το λόγο μάζας/ηλεκτρικό φορτίο (m/z). Το ρεύμα το οποίο παράγεται μετράται με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή. Το διάγραμμα το οποίο θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/z αποτελεί το φάσμα μαζών. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται κυρίως το ήλιο το οποίο σχηματίζει λιγότερα ιόντα σε σχέση με άλλα αέρια που χρησιμοποιούνται, δεν αλληλεπιδρά με τα ιόντα που έχουν χαμηλή μάζα και απομακρύνεται ταχέως από το θάλαμο ιονισμού λόγω του υψηλού συντελεστή διάχυσης.

Η ποιοτική ανάλυση των συστατικών του δείγματος μπορεί να γίνει:

- Με τον προσδιορισμό του δείκτη κατακράτησης Kovats.
- Με τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης των άγνωστων ουσιών με το χρόνο κατακράτησης πρότυπων ενώσεων.
- Με τη σύγκριση των φασμάτων μάζας των άγνωστων ουσιών με τα φάσματα μάζας των προτύπων ενώσεων.
- Με τη σύγκριση των φασμάτων μάζας των συστατικών με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας και των βιβλιοθηκών που υπάρχουν στα φασματομέτρα μάζας. (Ταραντίλης, 2017) (Stauffer, 2008)



Εικόνα A.3.3 : Τα βασικά μέρη ενός συστήματος GC-MS (Feng et al, 2019).

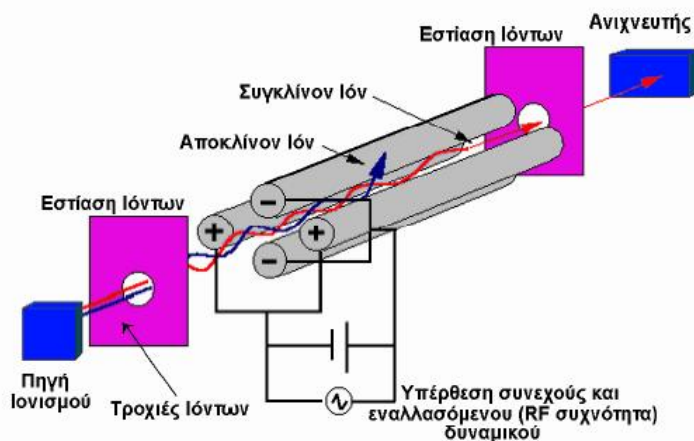
A.3.2.1 Ιονισμός με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μία τάση περίπου 70V. Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των μορίων σχηματίζουν μια ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιοντισμός. Δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιοντική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . Η εκτεταμένη θραύση και ο μεγάλος αριθμός κορυφών είναι ένα πλεονέκτημα, επειδή συχνά κάνει δυνατή τη χωρίς αμφιβολία ταυτοποίηση μιας ουσίας.

Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι : ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμό με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB) (Stauffer et al, 2008).

Τα φασματομέτρα μαζών που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές είναι κυρίως φασματομέτρα που φέρουν ένα τετραπολικό φίλτρο μάζας. Αυτά αποτελούνται από τέσσερις παράλληλες ράβδους τοποθετημένες με τρόπο που οι άξονές τους να διέρχονται από τις κορυφές ενός τετραγώνου. Στο ένα ζεύγος από τις διαγωνίως τοποθετημένες ράβδους εφαρμόζεται τάση $+V_{dc}$ Volts, ενώ στο άλλο ανάλογο ζεύγος τάση $-V_{dc}$ Volts. Τα ιόντα επιταχύνονται στο κέντρο του τετραπολικού φίλτρου. Στα δύο ζεύγη των ράβδων εφαρμόζεται εναλλασσόμενη τάση καθορισμένης συχνότητας ραδιοκυμάτων με διαφορά φάσης 180° οπότε τα ιόντα που πάλλονται με ένα ολόενα αυξανόμενο πλάτος προσκρούουν σε μια ράβδο, ενώ μόνο τα ιόντα με ορισμένο λόγο m/z διέρχονται μέσα από το τετραπολικό φίλτρο και ανιχνεύονται. Δηλαδή ο αναλυτής τετραπολικού φίλτρου μάζας λειτουργεί ως φίλτρο που αποτρέπει τη διέλευση της πλειοψηφίας των ιόντων. (Tarantilis, 2017) (Feng et al, 2019)

Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Quadrupole)



Εικόνα Α.3.4 Τετραπολικοί αναλυτές μαζών (Ταραντίλης, 2017)

A.3.3 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ

Όπως έχει αναφερθεί, οι τεχνικές της αέριας χρωματογραφίας μπορούν να συνδυαστούν με την χημειομετρία, δηλαδή τα αριθμητικά δεδομένα των χρωματογραφημάτων ή των φασμάτων που προκύπτουν μπορούν να επεξεργαστούν στατιστικά για να πιστοποιηθεί η γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων. Η στατιστική επεξεργασία των αριθμητικών δεδομένων πραγματοποιείται με χρήση με χρήση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης (MANOVA) και της κανονικής

διαχωριστικής ανάλυσης (canonical discriminant analysis) με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS version 23.0. Η βασική ιδέα της διαχωριστικής ανάλυσης είναι να κατατάξει δεδομένα σε γνωστούς πληθυσμούς με γνωστές κατανομές για κάθε πληθυσμό.

Η πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης δημιουργεί μια νέα εξαρτημένη μεταβλητή με βάση το γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων μεταβλητών του μοντέλου, η οποία μεγιστοποιεί κατά το δυνατόν τις διαφορές των μέσων όρων μεταξύ των ομάδων-επιπέδων της ανεξάρτητης μεταβλητής. Έτσι, η MANOVA πραγματοποιεί ελέγχους των διαφορών των μέσων όρων σε δύο επίπεδα:

1. Το πολυπαραμετρικό επίπεδο (multivariate tests), όπου εξετάζεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω στο γραμμικό συνδυασμό όλων των εξαρτημένων μεταβλητών, συγχρόνως.
2. Το μονοπαραμετρικό επίπεδο (univariate tests ή between-subjects effects), όπου εξετάζεται η επίδραση της ανεξάρτητης μεταβλητής πάνω σε καθεμιά εξαρτημένη μεταβλητή χωριστά.

Χρησιμοποιούνται διάφορα κριτήρια για να μελετηθούν οι κύριες επιδράσεις και την αλληλεπίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στο πολυπαραμετρικό επίπεδο. Για τον έλεγχο της στατιστικής τους σημαντικότητας χρησιμοποιείται η F-κατανομή. Τα πιο διαδεδομένα (αυτά που υπολογίζει και το SPSS) είναι τα εξής:

- Το κριτήριο Wilks' Lambda (Λ ή U). Είναι ο πιο διαδεδομένος δείκτης, δηλ. αυτός που χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των ερευνών. Χρησιμοποιείται όταν οι συγκρινόμενες ομάδες που δημιουργούνται με βάση τις τιμές-επίπεδα της ανεξάρτητης μεταβλητής είναι περισσότερες από δύο. Όσο μικρότερος ο δείκτης Wilks' Λ , τόσο μεγαλύτερες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων.
- Το κριτήριο Pillai's Trace. Γνωστό και ως Pillai-Bartlett's Trace. Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί ουσιαστικά στη διασπορά μεταξύ των συνδυαστικών ομάδων. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ο πλέον σταθερός πολυπαραμετρικός δείκτης σε περίπτωση που οι συγκρινόμενες ομάδες είναι ανισοπληθείς και μερικές φορές προτείνεται για τον λόγο αυτό (Παυλόπουλος, 2008).

Η Κανονική Διαχωριστική Ανάλυση (Linear Discriminant Analysis, LDA), είναι απλά μια επέκταση της MANOVA και επιτρέπει να καθοριστούν όχι μόνο οι

μεταβλητές οι οποίες δίνουν καλύτερες διακρίσεις ομάδων, αλλά ποιες ομάδες είναι διαφορετικές και ποιες όχι.

Η CDA χρησιμοποιεί διακριτές συναρτήσεις για να καθορίσει ποια ομάδα θα αντιστοιχίσει σε κάθε ένα από τα στοιχεία των δεδομένων. Αυτό γίνεται με χρήση μιας τεχνικής ενδοεπικύρωσης, όπου οι διαχωριστικές συναρτήσεις υπολογίζονται αποκλείοντας μια παρατήρηση (παράμετρο-μεταβλητή) από το σύνολο των δεδομένων και στη συνέχεια χρησιμοποιεί τις συναρτήσεις αυτές για να κατατάξει τη παράμετρο αυτή σε μια ομάδα. Αυτό επαναλαμβάνεται με κάθε μια από τις παραμέτρους-μεταβλητές των δεδομένων και καταγράφονται ποιές κατατάξεις έγιναν σωστά και ποιές λάθος. Όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση, επιστρέφει το ποσοστό της ορθής κατάταξης-ταξινόμησης των δειγμάτων για κάθε ομάδα.

A. 4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:

Το παρθένο ελαιόλαδο προτιμάται από τους κατοίκους της λεκάνης της Μεσογείου για τις θεραπευτικές ιδιότητες των συστατικών του. Πιο συγκεκριμένα, η κατανάλωσή του έχει συσχετιστεί με τη μακροζωία και τη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας. Το ελαιόλαδο ξεχωρίζει μεταξύ των άλλων φυτικών ελαίων για το μοναδικό άρωμά του το οποίο οφείλεται σε ένα πλήθος πτητικών συστατικών που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές τάξεις (αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, αλκοόλες). Η οργανοληπτική ποιότητα παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοχή των τροφίμων από τους καταναλωτές. Πολλές μελέτες έχουν γίνει προκειμένου να καθοριστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του ελαιολάδου ώστε να διασφαλιστεί η παραγωγή ελαίων με καλύτερη ποιότητα. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται οι περιβαλλοντικές και εδαφολογικές συνθήκες κάθε περιοχής και έτσι ο προσδιορισμός της γεωγραφικής προέλευσης των προϊόντων είναι πολύ σημαντικός.

Σήμερα υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη δημιουργία προϊόντων υψηλής ποιότητας με γνωστή γεωγραφική προέλευση. Γι αυτό το λόγο πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής προέλευσης. Αυτοί μπορούν να διαχωριστούν σε α) φασματοσκοπικές τεχνικές (Mass Spectroscopy, Infrared Spectroscopy), β) συζευγμένες τεχνικές χρωματογραφίας - φασματομετρίας (Gas Chromatography –Mass Spectroscopy) και γ) άλλες τεχνικές (sensor technology – electronic nose).

Με βάση τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι:

1. Η μελέτη των πτητικών συστατικών ελαιολάδου ποικιλίας Κορωνέικης,
2. Η γεωγραφική διαφοροποίηση των ελαίων αυτών με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών και της χημειομετρίας.

Η παραλαβή των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου έγινε με εφαρμογή της τεχνικής SPME και μετά τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό τους ταυτοποιήθηκαν με σύγκριση των φασμάτων μάζας που προέκυψαν με την τεχνική GC-MS με αυτά της βιβλιοθήκης Willey.

Για τη γεωγραφική διαφοροποίηση των ελαιολάδων συνδυάστηκε η χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών και της χημειομετρίας.

B ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου Κορωνέικης ποικιλίας. Η προμήθεια του ελαιολάδου έγινε από παραγωγούς της περιοχής της Λακωνίας, της Μεσσηνίας και του Ηρακλείου. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα από την περιοχή της Λακωνίας, 9 δείγματα από την περιοχή της Μεσσηνίας και 12 δείγματα από την περιοχή του Ηρακλείου.

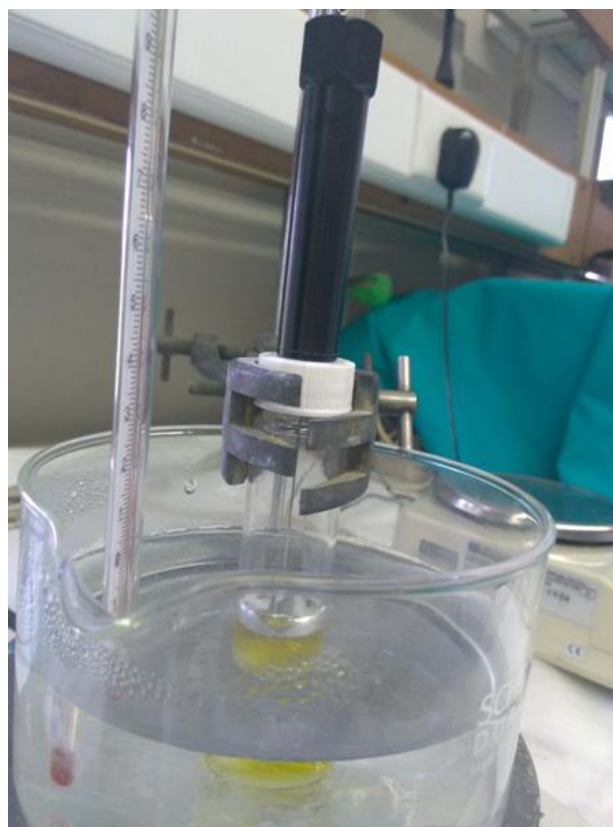
Πίνακας B.1.1 Περιοχές προέλευσης των δειγμάτων ελαιολάδου

Περιοχή Προέλευσης	Κωδικοποίηση	Αριθμός Δειγμάτων
Λακωνία	KOR_LAK	12
Μεσσηνία	KOR_MESS	9
Ηράκλειο	KOR_HRA	12
Σύνολο		33

B.1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΗΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ SPME

Για την απομόνωση των πτητικών συστατικών από τα δείγματα του ελαιολάδου με SPME χρησιμοποιήθηκε μια ίνα DVB/CAR/PDMS 50/30μm του οίκου Supelco.

Αρχικά ζυγίζονται 5,0 g ελαιολάδου σε φιαλίδιο των 15 mL με βιδωτό πώμα και ελαστικό παρέμβυσμα (septum) PTFE/σιλικόνης και στη συνέχεια προστίθενται 1 μL εσωτερικού προτύπου β-ιονόνης με αυτόματη πιπέτα. Η προσθήκη του εσωτερικού προτύπου γίνεται με σκοπό την ημιποσοτικοποίηση των ενώσεων. Έπειτα το δείγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο στους 50°C για 30 λεπτά (χρόνος εξισορόπησης). Παράλληλα η ίνα SPME εισάγεται στο GC-MS και ενεργοποιείται για 30 λεπτά στους 260 °C. Στη συνέχεια εισάγεται στο φιαλίδιο με το δείγμα για 15 λεπτά (χρόνος εκχύλισης) για την πραγματοποίηση της εκχύλισης (Εικόνα B1.1). Ακολούθως, η ίνα που έχει προσροφήσει τα πτητικά συστατικά εισάγεται στο GC-MS για ανάλυση.



Εικόνα Β.1.1: Διαδικασία εκχύλισης πτητικών συστατικών από τα δείγματα ελαιολάδου με την τεχνική SPME.

Β.1.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η ποιοτική ανάλυση των πτητικών συστατικών των ελαιολάδων πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών (GC-MS). Το σύστημα της αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στην εικόνα (Β.1.2).

Για τον διαχωρισμό των παραληφθέντων πτητικών συστατικών εφαρμόστηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας ενώ για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία μαζών. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν αέριος χρωματογράφος Trace GC Ultra, εφοδιασμένος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας DSQ II με απλό τετράπολο της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Για να καταστεί δυνατός ο διαχωρισμός όσο γίνεται περισσότερων πτητικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε μια τριχοειδής στήλη χαμηλής πολικότητας (Rtx – 5MS Restek, 5% diphenyl – 95% diphenyl polysiloxane) που ήταν κατασκευασμένη από τηγμένο

χαλαζία (fused silica). Η στήλη είχε μήκος 30m, εσωτερική διάμετρο 0,25mm και πάχος επένδυσης υμενίου 0,25 μ m. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (He) με ροή 1mL/λεπτό. Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος ήταν 250° C και στη γραμμή διαβίβασης του ανιχνευτή 290° C. Το πρόγραμμα ανάλυσης το οποίο είχε διάρκεια 42,33 λεπτά περιλάμβανε άνοδο της θερμοκρασίας της στήλης η οποία αρχικά παραμένει στους 40° C για 6 λεπτά, μετά αυξάνεται στους 120° C με ρυθμό 5° C/λεπτό, έπειτα αυξάνεται στους 160° C με ρυθμό 3° C/λεπτό και τέλος στους 250° C με ρυθμό 15° C/λεπτό και παρέμεινε σε αυτή τη θερμοκρασία για 1 λεπτό. Ο εισαγωγέας βρισκόταν σε λειτουργία μη διαμοιρασμού (splitless) για 3 min, και κατόπιν απομακρύνθηκε η ίνα και άνοιξε η βαλβίδα διαμοιρασμού του εισαγωγέα (split ratio 1:50).

Η ταυτοποίηση των εκχυλισμένων ουσιών στα δείγματα ελαιολάδου έγινε με τη σύγκριση των φασμάτων μαζών με αυτά που υπάρχουν καταχωρημένα στο λογισμικό του οργάνου (Βιβλιοθήκη Willey).



Εικόνα Β.1.2 : Το σύστημα της αέριας χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε

B.1.4 ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων GC – MS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης (MANOVA) και της κανονικής διαχωριστικής ανάλυσης (Canonical Discriminant Analysis) με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS version 23.0.

Οι μεταβλητές, δηλαδή το επί τοις εκατό ποσοστό του εμβαδού κάθε κορυφής των πτητικών συστατικών εισήχθησαν στο μοντέλο μία προς μία και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η πολυπαραμετρική ανάλυση (MANOVA). Με την ανάλυση αυτή καθορίστηκαν οι μεταβλητές που είναι σημαντικές και συνεισφέρουν στην γεωγραφική διαφοροποίηση των ελαιολάδων. Οι περιοχές προέλευσης των ελαιολάδων αποτέλεσαν την ανεξάρτητη μεταβλητή ενώ τα πτητικά συστατικά τις εξαρτημένες μεταβλητές. Από το μοντέλο εξαιρέθηκαν τιμές οι οποίες ήταν πλεονάζουσες. Έτσι, με τη χρήση των επιλεγμένων μεταβλητών διαφορετικές ανεξάρτητες διαχωριστικές συναρτήσεις υπολογίστηκαν μέσω της κανονικής διαχωριστικής ανάλυσης. Ο μέγιστος αριθμός των συναρτήσεων είναι ίσος είτε με τον αριθμό των μεταβλητών, είτε με τον αριθμό των ομάδων των μεταβλητών, εάν αυτές είναι λιγότερες, μείον ένα. Στην περίπτωση μας ο μέγιστος αριθμός των συναρτήσεων είναι ίσος με τον αριθμό των ομάδων των μεταβλητών, δηλαδή με τις περιοχές από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα μείον ένα.

Από τις διαχωριστικές συναρτήσεις που υπολογίζονται, ποια έχει την υψηλότερη κανονική συσχέτιση και είναι η περισσότερο διαχωριστική, έχει δηλαδή τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό, φαίνεται σύμφωνα με τα κανονικά χαρακτηριστικά της κάθε διάκρισης από τις τιμές Eigen. Το πόσο στατιστικώς σημαντική είναι η κάθε διαχωριστική συνάρτηση υπολογίζεται με τη χρήση του λ του Wilks. Οι τιμές αυτής της παραμέτρου κυμαίνονται από 1,0 για την περίπτωση του μη διαχωρισμού έως 0,0 για την περίπτωση του τέλει διαχωρισμού. Η τιμή σημαντικότητας (P) η οποία πρέπει να είναι $<0,005$ και η τιμή X^2 δείχνουν το αν υπάρχει υψηλή σημαντική διαφορά μεταξύ των κέντρων των ομάδων.

Για την επικύρωση των αποτελεσμάτων και του ορθού διαχωρισμού, χρησιμοποιείται η U-μέθοδος ή μέθοδος της ενδοεπικύρωσης, (με βάση την ορολογία της στατιστικής από το Ελληνικό Στατιστικό Ινστιτούτο, ΕΣΙ). Η μέθοδος αυτή, συχνά αναφέρεται και ως διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation) και συνίσταται στην ταξινόμηση της κάθε παρατήρησης σε μία ομάδα με βάση τη

συνάρτηση διάκρισης, η οποία δημιουργείται από όλες τις υπόλοιπες παρατηρήσεις. Η μέθοδος της ενδοεπικύρωσης είναι περισσότερο «απαισιόδοξη» μέθοδος εκτίμησης ορθής κατάταξης (Field, 2009), εξαιτίας του γεγονότος ότι υπολογίζει τα ποσοστά αποκλείοντας σε κάθε επανάληψη μία παρατήρηση. Δημιουργεί έτσι μία διαχωριστική συνάρτηση και στη συνέχεια με βάση τον διαχωρισμό που δημιουργήθηκε, κατατάσσει την παρατήρηση που αποκλείστηκε. Αυτό γίνεται για όλες τις παρατηρήσεις του δείγματος οδηγώντας έτσι σε πιο αξιόπιστο διαχωρισμό.

B.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

B.2.1 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ

Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία των πτητικών συστατικών των ελαιολάδων μετά την παραλαβή τους με την τεχνική SPME κατέληξε στην αναγνώριση κάποιων κοινών και κάποιων διαφορετικών συστατικών ανάμεσα στα διαφορετικής προέλευσης ελαιόλαδα. Από την ανάλυση GC – MS προέκυψαν 33 χρωματογραφήματα. Η ταυτοποίηση των εκχυλισμένων ουσιών στα δείγματα του ελαιολάδου έγινε με τη σύγκριση του χρόνου συγκράτησης και των φασμάτων μαζών με αυτά που υπάρχουν καταχωρημένα στο λογισμικό του οργάνου (Βιβλιοθήκη Willey). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των πτητικών συστατικών που ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με το επί τοις εκατό ποσοστό που αντιστοιχεί στο εμβαδόν μιας κορυφής σε σχέση με τη συνολική περιοχή κορυφής όλων των προσδιορισμένων ενώσεων σε κάθε χρωματογράφημα. Δηλαδή, υπολογίστηκε το επί τοις εκατό εμβαδόν της κάθε κορυφής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\%RPA = \frac{\text{εμβαδόν της κάθε ένωσης}}{\text{συνολικό εμβαδόν όλων των ενώσεων}} \times 100$$

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εισήχθησαν στο SPSS version 23 και πραγματοποιήθηκε η διαχωριστική ανάλυση.

B.2.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΗΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Στον πίνακα B.2.1 παρουσιάζονται 46 διαφορετικά πηητικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν στα διαφορετικά δείγματα ελαιολάδων. Η σύγκριση έγινε σύμφωνα με το επί τις εκατό ποσοστό που αντιστοιχεί στο εμβαδόν κάθε κορυφής σε κάθε χρωματογράφημα.

Πίνακας B.2.1: Πηητικά συστατικά ελαιολάδου από διαφορετικές περιοχές

A/A	Συστατικά που ανιχνεύθηκαν	KOR_LAK		KOR_HRA		KOR_MESS	
		RT (min)	%RPA Mean±SD	RT (min)	%RPA Mean±SD	RT (min)	%RPA Mean±SD
1	Εθανόλη	1,4	2,73±2,26	1,42	2,39±0,94	1,86	1,24±0,98
2	Ακετόνη	1,48	7,74±4,56	1,5	2,83±1,45	1,94	9,54±13,33
3	Οξικό οξύ	1,9	3,3±2,27	1,92	2,85±1,57	2,57	2,20±1,02
4	2,3-δωδρο-φουράνιο	2,26	0,21±0,43	-	-	-	-
5	2-βουτενάλη	2,34	0,59±0,43	-	-	2,99	0,21
6	1-πεντέν-3-όλη	2,65	2,47±0,75	2,69	4,49±1,94	3,45	2,56±0,87
7	Πεντανάλη	2,82	5,67±2,52	2,88	2,11±2,77	3,66	4,16±1,33
8	3-μεθυλ - 1-βουτανόλη	3,55	0,79±0,61	3,61	0,41±0,20	4,59	0,47±0,25
9	2-μεθύλ - 1 - βουτανόλη	3,66	0,27±0,28	3,72	0,21±0,21	4,7	0,10±0,13
10	2-πεντενάλη	4,03	0,45±0,31	4,09	0,56±0,22	5,14	0,50±0,17
11	Πεντανόλη	4,34	0,22±0,26	5,68	0,13±0,19	5,64	0,24±0,18
12	2-πεντενόλη	4,45	1,30±0,99	4,55	1,58±0,64	5,7	1,16±0,43
13	2-εξανόνη	4,95	0,03±0,04	6,06	0,02±0,04	-	-
14	Οκτένιο	5,12	2,59±6,47	5,26	0,56±0,19	6,52	0,36±0,21
15	Οκτάνιο	5,45	9,39±8,86	5,6	12,15±4,76	6,89	9,12±3,52
16	2-οκτένιο	6,06	0,54±0,71	6,25	0,36±0,18	7,46	0,22±0,19
17	1,3-οκταδιένιο	6,58	0,33±0,43	6,77	0,16±0,12	7,96	0,15±0,15
18	2-εξενάλη	7,79	11,49±8,7	7,67	32,25±9,99	8,83	34,87±13,58
19	2-μεθυλο βουτανικός αιθυλεστέρας	7,46	0,10±0,18	7,83	0,01±0,01	9,00	0,01±0,02
20	2-εξέν-1-όλη	8,42	4,65±2,31	9,82	2,53±2,59	9,69	4,24±2,41
21	Εξανόλη	8,56	5,09±2,48	8,73	2,51±1,17	9,86	2,76±1,36
22	Αιθανικός 3- μεθυλο βουτυλεστέρας	8,88	1,03±0,55	9,02	0,50±0,24	10,15	0,40±0,28
23	2-επτανόνη	9,34	0,35±0,26	9,52	0,36±0,37	10,67	0,06±0,12
24	Επτανάλη	9,86	0,58±0,75	10,03	0,71±0,25	11,13	0,54±0,23
25	2,4-εξαδιενάλη	10,82	0,60±0,21	10,78	0,57±0,28	12,05	0,47±0,27
26	3-μέθυλο-1,5-οκταδιένιο ισομερές 1	11,34	3,00±1,92	11,51	2,89±0,74	12,55	2,05±0,83
27	3-μεθυλο-1,5-οκταδιένιο ισομερές 2	11,61	2,19±1,08	11,76	3,16±0,87	12,82	2,32±1,17
28	2-Επτενάλη	12,28	0,55±0,38	12,24	0,30±0,12	13,28	0,30±0,08

A/A	Συστατικά που ανιχνεύθηκαν	KOR_LAK		KOR_HRA		KOR_MESS	
29	6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη	13,2	0,68±1,03	13,35	0,45±0,17	14,35	0,52±0,26
30	Οκτανάλη	13,89	0,45±0,23	14,04	0,47±0,16	15,02	1,05±2,28
31	Εξανοϊκό οξύ	13,97	16,56±10,05	14,12	8,70±4,16	15,12	10,03±6,11
32	Οξικός εξυλεστεράς	14,24	6,24±3,87	14,39	3,11±1,02	15,37	3,00±1,88
33	3-οκτέν-2-όνη	15,12	0,03±0,05	15,27	0,03±0,02	16,25	0,04±0,03
34	Β-οκιμένιο	15,43	0,20±0,20	15,58	0,35±0,18	16,54	0,25±0,15
35	2-οκτενάλη	15,81	0,03±0,03	18,28	0,03±0,04	16,94	0,03±0,02
36	Εννεανάλη	17,4	4,40±4,47	17,54	5,48±2,33	18,46	2,96±1,78
37	2-αιθενυλο-1,1-διμεθυλο-3-μεθυλενοκυκλοεξάνιο	17,71	2,03±1,47	17,84	3,57±1,10	18,76	1,54±0,6
38	Νέο-άλλο-οκιμένιο	18,92	0,01±0,06	-	-	-	-
39	2-εννεανάλη	19,17	0,02±0,03	19,3	0,05±0,02	20,22	0,02±0,01
40	2-δεκανάλη	22,26	0,06±0,13	22,37	0,07±0,04	23,31	0,06±0,03
41	α-κοπαένιο	25,8	0,15±0,07	25,94	0,15±0,10	26,98	0,07±0,03
42	Δεκατετράνιο	26,59	0,03±0	26,73	0,04±0,11	27,76	-
43	6,8-εννεαδιέν-2-όνη, 6-μεθύλ-5-	26,99	0,08±0,06	26,9	0,09±0,05	28,2	0,04±0
44	Δεκαπεντάνιο	29,99	0,02±0,01	30,14	0,04±0,04	0	-
45	α-φαρνεσένιο	30,08	0,09±0,12	30,24	0,12±0,05	31,31	0,10±0,05
46	Δεκαεξάνιο	33,48	0,01±0	-	-	-	-

KOR_LAK: Δείγμα ελαιολάδου από την περιοχή της Λακωνίας

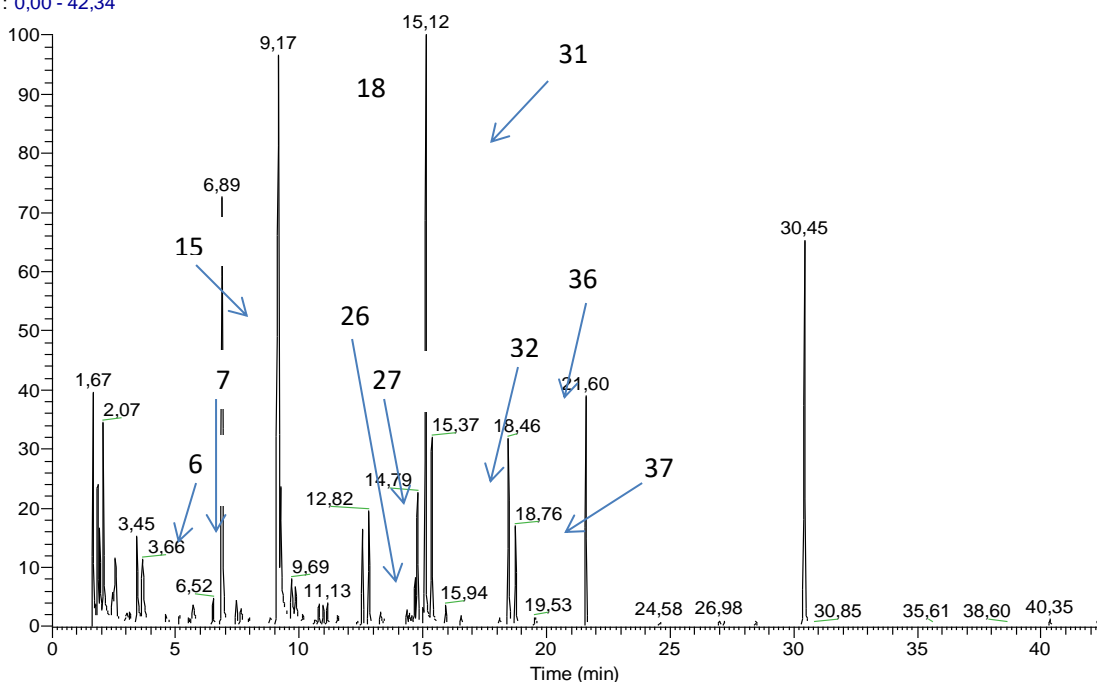
KOR_MESS: Δείγμα ελαιολάδου από την περιοχή της Μεσσηνίας

KOR_HRA: Δείγμα ελαιολάδου από την περιοχή του Ηρακλείου

Rt: Χρόνος κατακράτησης των πτητικών συστατικών

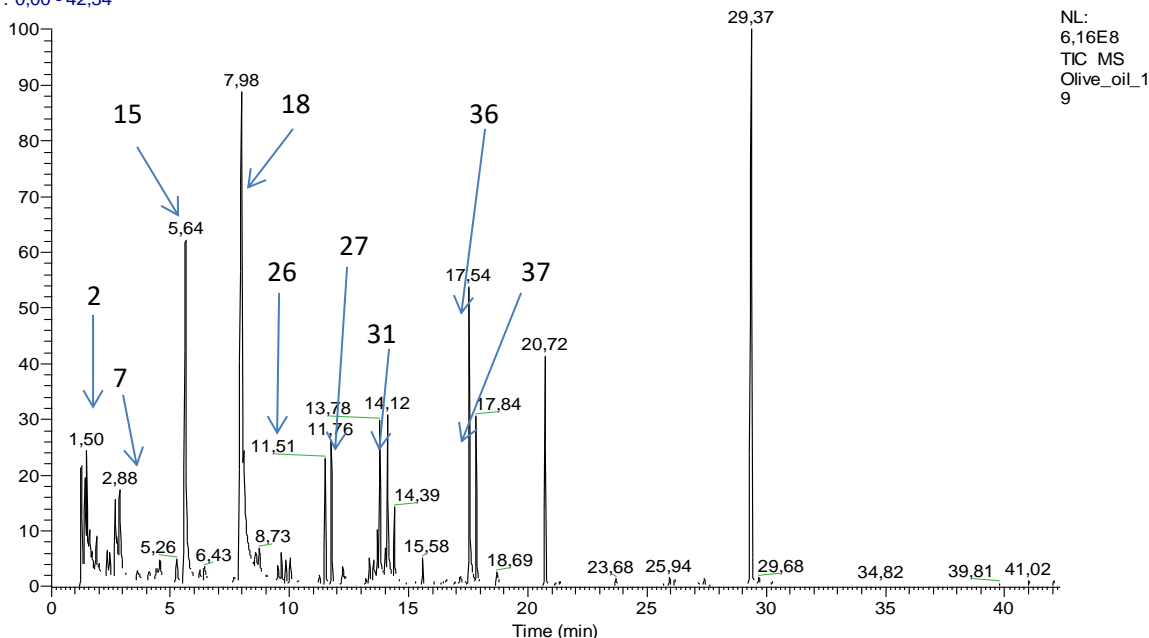
%RPA Mean±SD: Μέσος όρος του επί τοις εκατό ποσοστού του εμβαδού κάθε κορυφής των συστατικών

RT: 0,00 - 42,34



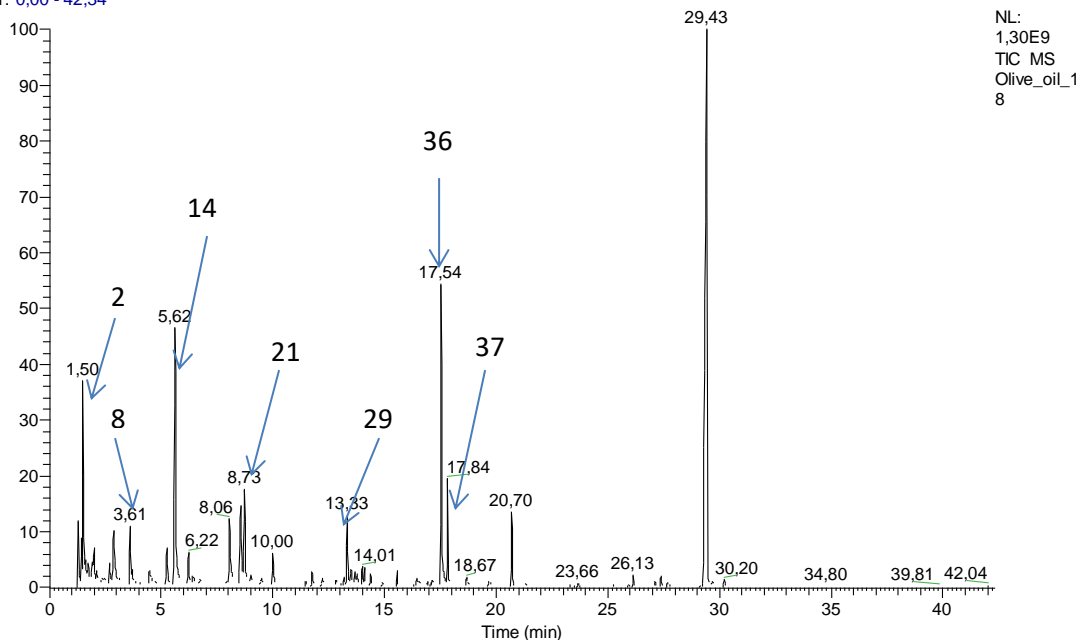
Εικόνα Β.2.1: Αέριο χρωματογράφημα του δείγματος ελαιολάδου από την περιοχή της Μεσσηνίας.

RT: 0,00 - 42,34



Εικόνα Β.2.2: Αέριο χρωματογράφημα του δείγματος ελαιολάδου από την περιοχή του Ηρακλείου

RT: 0,00 - 42,34



Εικόνα Β.2.3: Αέριο χρωματογράφημα του δείγματος ελαιολάδου από την περιοχή της Λακωνίας.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πτητικές αλδεΐδες, αλκοόλες, κετόνες και εστέρες αλκοολών με πέντε και έξι άτομα άνθρακα (C₅ - C₆), σχηματίζονται μέσω του βιοσυνθετικού μονοπατιού της λιποξυγενάσης (Διάγραμμα 25), και καταλαμβάνουν το 60 – 80 % του ολικού κλάσματος των πτητικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου (Salas, Harwood & Martínez-Force, 2013). Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από το επίπεδο και την ενεργότητα καθενός ενζύμου που λαμβάνει μέρος

στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης (lipoxygenase, LOX). Συγκεκριμένα, κατά την ενζυμική αποικοδόμηση του 13-μονοϋδρόξυπεροξειδίου του λινολενικού οξέος, σχηματίζονται αλδεΐδες, αλκοόλες και κετόνες με πέντε άτομα άνθρακα (C₅) και διμερή του πεντενίου (Raffo et al., 2015) τα οποία συνήθως έχουν χαμηλή συγκέντρωση στα παρθένα ελαιόλαδα και δεν συνεισφέρουν στο άρωμα τους.

Σύμφωνα με τον Angerosa και τους συνεργάτες του οι ενώσεις με 5 άτομα άνθρακα στο μόριό τους συνεισφέρουν στο άρωμα της καλής ποιότητας ελαιολάδου καθώς και στην πικρή του γεύση. Συνοπτικά το μονοπάτι της λιποξυγενάσης περιλαμβάνει μια σειρά από ένζυμα που οξειδώνουν (λιποξυγενάση) και διασπούν (υδροϋπεροξειδίου λυάσης) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα για να δώσουν αλδεΐδες (Kiritsakis, 1998). Αυτά στη συνέχεια ανάγονται σε αλκοόλες (αλκοολική αφυδρογονάση) και εστεροποιούνται (αλκοολική ακυλοτρανσφεράση). Οι ενώσεις με 5 άτομα άνθρακα στο μόριό τους που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα ελαιολάδου σε αυτή τη μελέτη είναι η 1-πεντεν-3-όλη, η 1-πεντανόλη, η 2-πεντεν-1-όλη, η 2-πεντανάλη, η πεντανάλη. Τα δείγματα ελαιολάδου από την περιοχή του Ηρακλείου είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό σε 1-πεντεν-3-όλη (4,49%) , σε 2-πεντανάλη (0,56%), σε 2-πεντεν-1-όλη (1,58%). Η πεντανάλη εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό (5,67%) στα δείγματα από την περιοχή της Λακωνίας. Τα δείγματα του ελαιολάδου από την περιοχή της Μεσσηνίας περιείχαν όλες τις παραπάνω ενώσεις σε μικρότερο ποσοστό (Angerosa et al., 2004) (Kalua et al, 2007).

Οι ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους έχουν άρωμα που προσομοιάζει αυτό των φρεσκοκομμένων φύλλων διαφόρων δέντρων, των ανώριμων φρούτων ή λαχανικών και του φρεσκοκομμένου πράσινου χόρτου. Αυτές προκύπτουν από την αποικοδόμηση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος που καταλύεται στο μονοπάτι της λιποξυγενάσης. Οι ενώσεις με έξι άτομα άνθρακα στο μόριό τους που βρέθηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι η 2-εξενάλη, η 2-εξεν-1-όλη, η 1-εξανόλη, η 2-εξανόνη και η 2,4-εξαδιενάλη. Η 2-εξενάλη, η αλδεΐδη που εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό σε όλα τα δείγματα σχετίζεται με το στάδιο ωριμότητας του ελαιολάδου. Επίσης θεωρείται ένας καλός δείκτης για την γεωγραφική διαφοροποίηση του ελαιολάδου. Τα δείγματα ελαιολάδου από την Μεσσηνία είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό 2-εξενάλης (34,87%), ακολουθεί το Ηράκλειο (32,25%), ενώ το μικρότερο ποσοστό βρέθηκε στην περιοχή της Λακωνίας (11,49%). Στα δείγματα από την

περιοχή της Λακωνίας βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό η 2-εξανόνη (0,03%), η 2-εξεν-1-όλη (4,65%), η 1-εξανόλη (5,09%) και η 2,4 εξαδιενάλη (0,60%).

Στα δείγματα του ελαιολάδου βρέθηκαν επίσης και άλλες καρβονυλικές ενώσεις όπως η επτανάλη, η οκτανάλη και η εννεαάλη που επιδρούν δυσμενώς στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου π.χ. δυσάρεστη οσμή. Η εννεαάλη είχε το μεγαλύτερο ποσοστό στα δείγματα του Ηρακλείου (5,48%) και της Λακωνίας (4,40%), ενώ τα ποσοστά της επτανάλης και της οκτανάλης ήταν χαμηλά σε όλα τα δείγματα ελαιολάδου. Μία ακόμη ένωση που συνεισφέρει στο άρωμα του ελαιολάδου είναι η 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη της οποίας το μεγαλύτερο ποσοστό υπολογίστηκε στα δείγματα από την περιοχή της Λακωνίας (0,68%). Η ένωση αυτή συνεισφέρει στο πράσινο και φρουτώδες άρωμα του ελαιολάδου.

Οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν έντονα τον σχηματισμό των πτητικών συστατικών, ενώ ορισμένες πτητικές ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλοι δείκτες της βοτανικής ή/και της γεωγραφικής προέλευσης των ελαιόλαδων. Όσον αφορά τον συσχετισμό των πτητικών ενώσεων με το άρωμα των παρθένων ελαιόλαδων, είναι γνωστό ότι οι πτητικές ενώσεις έχουν διαφορετική οσμητική ενεργότητα (Reiners & Grosch, 1998), και οι πτητικές ενώσεις που υπάρχουν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν είναι πάντα αυτές που συνεισφέρουν στο άρωμα του ελαίου (Erickson & Covey, 1980; Ben Temime et al., 2006). Έρευνες έδειξαν ότι το χαρακτηριστικό άρωμα του ελαιόλαδου συνδέεται με τις πτητικές ενώσεις C6 που παράγονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι LOX κατά τη σύνθλιψη των ελαιόκαρπων και τη μάλαξη της ελαιόζυμης (Olias et al., 1993; Cecchi & Alfei, 2013). Παράλληλα, ένας μεγάλος αριθμός πτητικών ενώσεων μπορεί να σχηματιστεί κατά τη διάρκεια της αυτοξειδωσης των ακόρεστων λιπιδίων που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσάρεστης οσμής. Συνεπώς, η παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων πτητικών ενώσεων μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τις ποιοτικές διαφορές στα ελαιόλαδα.

Σύμφωνα με τον Angerosa και τους συνεργάτες του, η σύσταση των πτητικών ουσιών στα ελαιόλαδα επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες που αφορούν αγρονομικές, εδαφοκλιματικές και τεχνολογικές απόψεις, όπως: η ποικιλία, η

γεωγραφική περιοχή, ο βαθμός ωριμότητας του ελαιοκάρπου, ο τρόπος άρδευσης του ελαιόδεντρου, οι συνθήκες παραλαβής και ο χρόνος αποθήκευσης του ελαίου, ενώ σύμφωνα με τον Tura και τους συνεργάτες του η ποικιλία είναι ο μοναδικός παράγοντας για τον προσδιορισμό της ποιότητας του αρώματος του ελαιόλαδου.

Οι διαφορετικές ποικιλίες ελαιόδεντρων δεν καλλιεργούνται πάντοτε στο ίδιο υψόμετρο, αλλά οι ζώνες των ελαιώνων κατανέμονται σε ένα ευρύ φάσμα υψομέτρων, όπου οι κλιματολογικές συνθήκες μπορεί να είναι τελείως διαφορετικές. Όλα αυτά έχουν αντίκτυπο στα χημική σύνθεση και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των ελαιόλαδων. Τα μονοποικιλιακά ελαιόλαδα, που παράγονται από ελιές που καλλιεργούνται σε μεγαλύτερα υψόμετρα, είναι γενικά γλυκύτερα και έχουν εντονότερο βοτανώδες άρωμα, σε σύγκριση με εκείνα που παράγονται από ελιές που καλλιεργούνται σε χαμηλότερα υψόμετρα. Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες στα υψηλότερα υψόμετρα, μπορούν να επηρεάσουν τα ένζυμα από μονοπάτι LOX, αφού η εξανάλη (πράσινη γλυκιά αίσθηση) προέρχεται από αυξημένα επίπεδα λινελαϊκού οξέος και η (E)-2-εξενάλη (γεύση πράσινης οσμής και στυπτικότητας) από χαμηλότερα επίπεδα α-λινολενικού οξέος (Aparicio & Luna, 2002; Gomes da Silva et al., 2012).

Έρευνες από την βιβλιογραφία υποστηρίζουν την επίδραση που έχει η αλληλεπίδραση της ποικιλίας – περιβάλλοντος στα χαρακτηριστικά των παρθένων ελαιόλαδων, εκ των οποίων από τα πιο σημαντικά είναι το πτητικό προφίλ τους. Όταν μελετήθηκαν οι πτητικές ενώσεις από τα ελαιόλαδα Chétoui (ποικιλία που καλλιεργείται στην Τυνησία), αναφέρθηκαν σημαντικές διαφορές στις πτητικές ενώσεις όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες ήταν διαφορετικές (Temime et al., 2006). Σε μελέτη που διεξήχθη από τον Dabbou και τους συνεργάτες του (2010) σχετικά με την ποιότητα και τη χημική σύνθεση του παρθένου ελαιόλαδου για την ποικιλία Sigoise που καλλιεργείται σε δύο διαφορετικές τοποθεσίες στην Τυνησία, σε μια μέτριας υγρασίας ζώνη (Béjaoua, Tunis) και μια ξερική ζώνη (Boughrara, Sfax) παρατηρήθηκαν τα εξής: τα ελαιόλαδα που παρήχθησαν από ελιές που καλλιεργήθηκαν σε μεγαλύτερο υψόμετρο χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερες περιεκτικότητες σε (E)-2-εξενάλη και εξενάλη, ενώ τα έλαια από το χαμηλότερο υψόμετρο χαρακτηρίστηκαν από την υψηλότερη περιεκτικότητα σε Z-2-εξανόλη και 1-εξανόλη. Επίσης το άθροισμα των προϊόντων C6 από LOX, βρέθηκε υψηλότερο σε έλαια από την Béjaoua περιοχή από ότι σε αυτά στην Boughrara. Μεταξύ των

προϊόντων οξειδωσης LOX, η ποσότητα εξενόλη ήταν υψηλότερη στα έλαια Βέζαουα, ενώ η περιεκτικότητα σε Z-2-εξανόλη ήταν σημαντικά χαμηλότερη.

Άλλη έρευνα ανέδειξε ότι η περιεκτικότητα σε ολικά πτητικά συστατικά αυξήθηκε σημαντικά με τον βαθμό ωρίμανσης των ελιών στα κρητικά ελαιόλαδα σε αντίθεση με τα ελαιόλαδα της Τυνησίας, όπου η ολική περιεκτικότητα σε πτητικές ενώσεις, παρέμεινε η ίδια. Η άρδευση οδήγησε σε αυξημένη περιεκτικότητα σε ολικά πτητικά μόνο στα ελαιόλαδα όπου προέρχονταν από μεσαίου βαθμού ωρίμανσης ελαιόκαρπους, σε αντίθεση με την σημαντική μείωση των συνολικών πτητικών σε ελαιόλαδα που προήλθαν από υπερώριμους καρπούς (Kandyliis et al., 2011). Έχει επίσης αποδειχτεί ότι οι μεγάλοι χρόνοι μάλαξης συνδέονται με σημαντική αύξηση του συνόλου των πτητικών ενώσεων (Kalua et al., 2007). Γενικότερα, οι πτητικές ενώσεις είναι είτε λιπόφιλες είτε υδρόφιλες. Η διαδικασία μάλαξης κατά τη διάρκεια εξαγωγής του ελαιόλαδου προκαλεί αύξηση των λιπόφιλων συστατικών (αλδεΐδες, εστέρες) και μείωση των υδρόφιλων συστατικών (αλκοόλες κ.λπ.) λόγω διαλυτοποίησης τους (Kiritsakis, 1998).

Η ομάδα των υδρογονανθράκων μελετήθηκε από διαφορετικούς συγγραφείς ως πιθανός δείκτης διάκρισης του παρθένου ελαιόλαδου από διαφορετικές ποικιλίες ή γεωγραφικές περιοχές (Bortolomeazzi et al., 2001; Guinda & Albi, 1996; Aparicio & Luna, 2002).

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, οι τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές που εξαρτώνται τόσο από την ποικιλία της ελιάς όσο και από την γεωγραφική προέλευση (Bortolomeazzi et al., 2001; Pouliarekou et al., 2011; Vichi et al., 2003b; Zunin et al. 2005). Συγκεκριμένα το α-φαρνεσένιο αναφέρθηκε ότι είναι ο πιο αντιπροσωπευτικός τερπενοειδής υδρογονάνθρακας σε ελαιόλαδα από διαφορετική γεωγραφική περιοχή (Cerretani et al., 2008a; Temime et al., 2006). Άλλοι ερευνητές ανέδειξαν σε έλαια διαφορετικών ποικιλιών, μεγάλες διαφορές κυρίως στην περιεκτικότητα α-κοπαένιο, α-φαρνεσένιο και υδρογονανθράκων με > 20 άτομα άνθρακα (Guinda et al., 1996). Επιπλέον, οι πεδοκλιματικές συνθήκες φάνηκε να επηρεάζουν την συγκέντρωση του α-κοπαένιο (Aparicio & Luna, 2002; Vichi et al., 2003). Οι γενετικοί παράγοντες επηρεάζουν έντονα τον σχηματισμό πτητικών ενώσεων, ενώ οι τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες

θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες της γεωγραφικής προέλευσης και γενοτύπου των ελαιολάδων. (Cecchi & Alfei, 2013).

Β.2.3 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΣΥΝΔΙΑΣΜΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GC-MS) ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ

Στην αρχή της στατιστικής επεξεργασίας πραγματοποιήθηκε Πολυπαραμετρική Ανάλυση Διακύμανσης (MANOVA) προκειμένου να καθοριστούν τα πτητικά συστατικά που είναι σημαντικά για τη γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου από τις τρεις διαφορετικές περιοχές (Λακωνία, Ηράκλειο, Μεσσηνία). Τα πτητικά συστατικά ορίστηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές ενώ η περιοχή ως ανεξάρτητη μεταβλητή.

Η ανάλυση είναι σημαντική όπως φανερώνουν οι δείκτες Pillai's Trace= 1.940 και Wilk's Lambda = 0.000 γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει σημαντική πολυπαραμετρική επίδραση των πτητικών συστατικών στην περιοχή προέλευσης των ελαιολάδων. Δεκαέξι πτητικά συστατικά βρέθηκαν να είναι σημαντικά για την γεωγραφική διαφοροποίηση των ελαιολάδων.

Πίνακας Β.2.2 Πτητικά συστατικά που βρέθηκαν να είναι σημαντικά για την γεωγραφική διαφοροποίηση των ελαιολάδων.

Variables	F	Sig.
2-βουτενάλη	11,859	,000
1-πεντεν-3-όλη	8,181	,001
Πεντανάλη	6,483	,005
2-εξανάλη	12,969	,000
1-εξανόλη	7,071	,003
Αιθανοϊκός -3- μέθυλο- βουτυλεστέρας	8,477	,001
2-επτανόνη	4,234	,024
2-εππενάλη	4,179	,025
Εξανοϊκό οξύ	3,712	,036
Οξικός εθυλεστέρας	5,842	,007
2- αιθενυλο-1,1-διμεθυλο-3-μεθυλενοκυκλοεξάνιο	11,415	,000
Νέο-άλλο- οκιμένιο	28,060	,000
2-εννεανάλη	4,542	,019
α-κοπαένιο	4,740	,016
Δεκαπεντάνιο	9,615	,001
Δεκαεξάνιο	16,152	,000

Στη συνέχεια της ανάλυσης, τα 16 πτητικά συστατικά χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να διαχωρίσουν την προέλευση των ελαιολάδων στις τρεις διαφορετικές περιοχές. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η Διαχωριστική Ανάλυση (Canonical Discriminant Analysis, CDA). Για τον υπολογισμό των συντελεστών-φορτίσεων στις διαχωριστικές συναρτήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Fisher, ενώ ο υπολογισμός των πιθανοτήτων σωστής κατάταξης έγινε με βάση το μέγεθος των ομάδων, εφόσον ο αριθμός των δειγμάτων από κάθε περιοχή δεν ήταν ο ίδιος. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της αντικατάστασης και της ενδοεπικύρωσης, για τον υπολογισμό των ποσοστών ορθής κατάταξης.

Πίνακας Β.2.3 Κανονικά χαρακτηριστικά διάκρισης σύμφωνα με το επί τοις ποσοστό που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή των συστατικών των ελαιολάδων

Συνάρτηση	Τιμή Eigen	Ποσοστό Διακύμανσης (%)	Αθροιστικό Ποσοστό (%)	Κανονική Συσχέτιση	Wilks' Lambda	χ^2	Βαθμοί Ελευθερίας	P value
1	10.810	72.6	72.6	0.957	0.017	92.077	32	0.000
2	4.070	27.4	100.0	0.896	0.197	36.525	15	0.001

Όπως φαίνεται από τον πίνακα Β.2.3 οι διαχωριστικές συναρτήσεις που υπολογίστηκαν μέσω της κανονικής διαχωριστικής ανάλυσης είναι δύο, όσες δηλαδή οι περιοχές από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα, μείον μία. Οι τιμές Eigen δείχνουν ότι η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση έχει την υψηλότερη κανονική συσχέτιση (0,957) και εξηγεί το 72.6% της ολικής διακύμανσης, έχει δηλαδή τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό. Το πόσο στατιστικώς σημαντική είναι αυτή η διαχωριστική συνάρτηση υπολογίζεται με τη χρήση του λ του Wilks' όπου είναι 0,017 και δείχνει την πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα του μοντέλου. Η τιμή σημαντικότητας (P value) η οποία είναι <0,05 και η τιμή χ^2 δείχνουν ότι υπάρχει υψηλή σημαντική διαφορά μεταξύ των κέντρων των ομάδων.

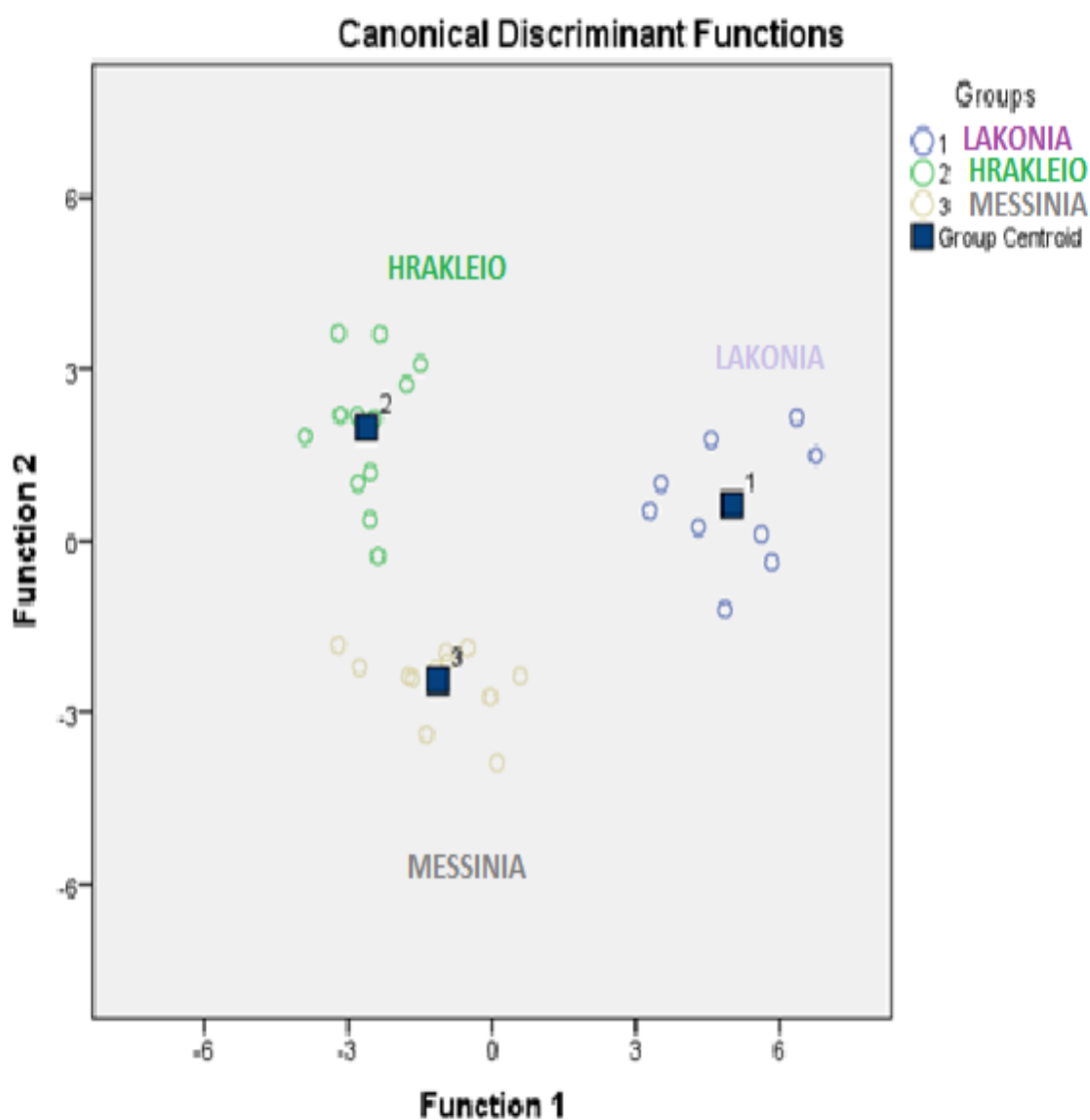
Πίνακας Β.2.4 Κανονικοποιημένοι συντελεστές και δομικός πίνακας μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν στην διαχωριστική ανάλυση

Μεταβλητές (Συστατικά)	Κανονικοποιημένοι συντελεστές		Δομικός Πίνακας	
	Συνάρτηση 1	Συνάρτηση 2	Συνάρτηση 1	Συνάρτηση 2
2-βουτενάλη	,604	-,674	,407	,137
1-πεντέν-3-όλη	-,513	,534	,290	,203
Πεντανάλη	,032	-,816	-,269	-,143
2-εξανάλη	-,085	-,525	,268	-,061
1-εξανόλη	,088	,483	,212	,138
Αιθανικός-3-μέθυλο- βουτυλεστέρας	,044	,664	,208	,036
2-επτανόνη	,296	,249	,185	,072
2-επτενάλη	1,483	-1,638	,180	-,143
Εξανοϊκό οξύ	-,344	,673	,158	,049
Οξικός εξυλεστέρας	1,658	-1,587	,151	,007
2-αιθενυλο-1,1- διμεθυλο-3- μεθυλενοκυκλοεξάνιο	-,095	,579	-,044	,390
Νέο – άλλο- οκιμένιο	-,601	1,366	-,120	,386
2-εννεαάλη	-,807	,481	-,148	,275
α-κοπαένιο	-,977	,625	,053	,265
Δεκαπεντάνιο	,346	-,061	,042	,254
Δεκαεξάνιο	1,390	,002	-,127	,177

Σύμφωνα με τους κανονικοποιημένους συντελεστές η πρώτη συνάρτηση σχετίζεται με τα συστατικά 2-επτανάλη, 1-πεντέν-3-όλη, α-κοπαένιο, 2-εννεαάλη, δεκαεξάνιο και νέο- άλλο-οκιμένιο τα οποία έχουν και τη μεγαλύτερη συνεισφορά. Τα συστατικά αυτά όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό είτε δεν ανιχνεύονται στα ελαιόλαδα και των τριών περιοχών, είτε ανιχνεύονται αλλά με σημαντικές διαφορές στην ποσότητά τους και έτσι δημιουργούν το διαχωρισμό. Όσον αφορά τη δεύτερη συνάρτηση τα συστατικά που έχουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο διαχωρισμό είναι το οξικός εξυλεστέρας, η 2-επτανάλη, το νέο-άλλο-οκιμένιο και η πεντανάλη.

Ο δομικός πίνακας δείχνει πόσο σχετίζεται η κάθε μεταβλητή του μοντέλου με τις δυο διαχωριστικές συναρτήσεις. Η πρώτη διαχωριστική συνάρτηση σχετίζεται κυρίως με τα συστατικά 2-βουτενάλη και 1-πεντέν-3-όλη ενώ η δεύτερη με τα συστατικά νέο- άλλο-οκιμένιο και 2-αιθενυλο-1,1-διμεθυλο-3-μεθυλενοκυκλοεξάνιο.

Στο σχήμα Β.2.4 φαίνεται ο διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων, δηλαδή μεταξύ των περιοχών από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα, ο οποίος βασίστηκε στις διαχωριστικές συναρτήσεις 1 και 2. Στον πίνακα Β.2.5 φαίνονται τα αποτελέσματα της κατάταξης που πραγματοποιήθηκε κατά την κανονική διαχωριστική ανάλυση καθώς και της διασταυρούμενης επικύρωσης.



Σχήμα Β.2.4 Γραφική παράσταση των διαχωριστικών συναρτήσεων 1 και 2 των 33 χρωματογραφημάτων GC-MS των ελαιολάδων σύμφωνα με το επί τοις εκατό ποσοστό που αντιστοιχεί στο εμβαδό κάθε κορυφής των συστατικών.

Πίνακας Β.2.5 Αποτελέσματα κατάταξης της διαχωριστικής ανάλυσης και της διασταυρούμενης επικύρωσης

Classification Results^{a,c}

Area			Predicted Group Membership			Total
			LAKONIA	HRAKLEIO	MESSINIA	
Original	Count	LAK	9	0	0	9
		HRA	0	12	0	12
		MES	0	0	12	12
	%	LAK	100,0	,0	,0	100,0
		HRA	,0	100,0	,0	100,0
		MES	,0	,0	100,0	100,0
Cross-validated ^b	Count	LAK	7	1	1	9
		HRA	1	8	3	12
		MES	0	1	11	12
	%	LAK	77,8	11,1	11,1	100,0
		HRA	8,3	66,7	25,0	100,0
		MES	,0	8,3	91,7	100,0

a. 100,0% of original grouped cases correctly classified.

b. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.

c. 78,8% of cross-validated grouped cases correctly classified.

Τα αποτελέσματα της κατάταξης που προέκυψαν από την διαχωριστική ανάλυση έδειξαν ότι τα δείγματα του ελαιολάδου κατατάσσονται στις περιοχές από όπου προέρχονται σε ποσοστό 100,0%. Από τα αποτελέσματα της διασταυρούμενης επικύρωσης, διαπιστώθηκε ότι το 78,8% των δειγμάτων μπορούν να καταταχθούν σωστά στις γεωγραφικές περιοχές.

B.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση και ταυτοποίηση των δειγμάτων ελαιολάδου από διαφορετικές περιοχές προέλευσης, παρατηρήθηκε ότι τα πτητικά συστατικά τους παρουσίασαν διαφορές στη σύστασή τους. Αυτό φαίνεται ίσως και από την επιτυχία της γεωγραφικής διαφοροποίησής τους με την εφαρμογή της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρία μαζών σε συνδυασμό με τη χημειομετρία.

Σύμφωνα με τον Angerosa και τους συνεργάτες του, η σύσταση των πτητικών ουσιών στα ελαιόλαδα επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες που αφορούν αγρονομικές, εδαφοκλιματικές και τεχνολογικές απόψεις, όπως: η ποικιλία, η γεωγραφική περιοχή, ο βαθμός ωριμότητας του ελαιοκάρπου, ο τρόπος άρδευσης του ελαιόδεντρου, οι συνθήκες παραλαβής και ο χρόνος αποθήκευσης του ελαίου.

Η υψηλότερη συγκέντρωση των πτητικών συστατικών παρατηρείται κατά την περίοδο που ο ελαιοκάρπος αλλάζει χρώμα από πρασινοκίτρινο σε μελανοϊώδες και συμπίπτει με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελαιόλαδο. Καθώς προχωρεί η ωρίμανση παρατηρείται μείωση των πτητικών συστατικών. Το κλίμα όπως και το έδαφος επηρεάζουν επίσης την ποιότητα του ελαιολάδου. Γενικά σε περιοχές με μεγάλη ηλιοφάνεια τα αρωματικά συστατικά είναι περισσότερα και η ποιότητα καλύτερη. Σε εδάφη σκληρά και ασβεστολιθικά τα ελαιόδεντρα δίνουν ελαιόλαδο πλουσιότερο σε αρωματικά συστατικά απ' ό,τι σε υγρά αργιλώδη εδάφη. Η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών στο ελαιόλαδο εξαρτάται και από τις τεχνολογικές παραμέτρους της παραλαβής του στο ελαιουργείο, ιδιαίτερα από το βαθμό διάρρηξης των φυτικών ιστών και τη θερμοκρασία που αναπτύσσεται στη διάρκεια της άλεσης, τη διάρκεια και τη θερμοκρασία της μάλαξης και το είδος του ελαιουργικού συγκροτήματος που χρησιμοποιείται. Γενικά, οι χαμηλές θερμοκρασίες (μέχρι 25° C) και οι μέσοι χρόνοι μάλαξης (35-45 min) ευνοούν το σχηματισμό των πτητικών συστατικών που είναι υπεύθυνα για τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Όλα τα παραπάνω μπορούν να εξηγήσουν τις

διαφορές που παρατηρήθηκαν στη σύσταση των πτητικών συστατικών των δειγμάτων ελαιολάδου στην παρούσα μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη, η εκχύλιση των πτητικών συστατικών των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της SPME μεθόδου. Στη συνέχεια η ίνα που είχε απορροφήσει τα πτητικά συστατικά εισήχθη στο σύστημα GC-MS και πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των πτητικών συστατικών. Ταυτοποιήθηκαν 46 πτητικά συστατικά και έπειτα έγινε επεξεργασία των δεδομένων των αέριων χρωματογραφημάτων, δηλαδή υπολογίστηκε το επί τοις εκατό ποσοστό που αντιστοιχεί στο εμβαδόν κάθε κορυφής των συστατικών σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο :

$$\%RPA = \frac{\text{εμβαδόν της ένωσης } \alpha}{\text{συνολικό εμβαδόν όλων των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν}} \times 100$$

Στη συνέχεια, τα δεδομένα που προέκυψαν εισήχθησαν στο SPSS 23.0 version και πραγματοποιήθηκε η πολυπαραμετρική ανάλυση διακύμανσης (MANOVA) ώστε να καθοριστούν τα συστατικά που είναι σημαντικά για την γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Δεκα έξι συστατικά βρέθηκαν να είναι σημαντικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την κανονική διαχωριστική ανάλυση. Τα αποτελέσματα της κατάταξης που προέκυψαν από την διαχωριστική ανάλυση έδειξαν ότι τα δείγματα του ελαιολάδου κατατάσσονται στις περιοχές από όπου προέρχονται σε ποσοστό 100,0%. Από τα αποτελέσματα της διασταυρούμενης επικύρωσης, διαπιστώθηκε ότι το 78,8% των δειγμάτων μπορούν να καταταχθούν σωστά στις γεωγραφικές περιοχές.

Καταλήγοντας, με την παρούσα μελέτη αποδεικνύεται η δυνατότητα της εύκολης και επιτυχούς γεωγραφικής διαφοροποίησης ελαιολάδων με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS) σε συνδυασμό με την χημειομετρία.

B.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

B.4.1 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C. P., Carmona, M., ... Polissiou, M. G. (2009). Geographical differentiation of saffron by GC–MS/FID and chemometrics. *European Food Research and Technology*, 229(6), 899–905.
2. Angerosa F., (2002) Influence of volatile compounds in virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 639-660.
3. Angerosa F., Roberta Mostallino R., Basti C., Vito R., 2001 Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils, *Food Chemistry*, 72, 19-28.
4. Angerosa F., Basti C., Vito R., 1999 Virgin Olive Oil Volatile Compounds from Lipoxygenase Pathway and Characterization of Some Italian Cultivars, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47, 836-839.
5. Angerosa F., 2000 Sensory quality of olive oils in “Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties”, edited by John Harwood & Ramon Arapicio, Springer.
6. Aparicio R., Morales M. T., 1998 Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46 , 1116-1122
7. Antoun, N., Tsimidou, M. (1997) Gourmet olive oils: stability and consumer acceptability studies. *Food Research International*. 30: 131-136.

8. Baccouri, O.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Lercker, G.; Zarrouk, M.; Miled, D.D.B. (2008). Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry*, 111, 322-328.
9. Benicasa, C. ; De Nino, A. ; Lombardo, N. ; Perri, E. ; Sindona, G. & Tagarelli, A. (2003) Assay of Aroma Active Components of Virgin Olive Oils from Southern Italian Regions by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 733- 741.
10. Boskou D, Blekas G & Tsimidou M., 2006 Olive oil Composition in Olive oil, *Chemistry and Technology Second Edition*, Editor Boskou Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, Greece, AOCS PRESS Champaign Illinois, p:57, 59-63.
11. Campestre, C., Angelini, G., Gasbarri, C., Angerosa, F., (2017) The compounds responsible for the Sensory Profile in Monovarietal Virgin Olive Oils. *Molecules* 22(11):1833
12. De La Lastra C. Alarcon., Barranco M.D., Herrerias J.M. 2001 Mediterranean Diet and Health: Biological Importance of Olive Oil, *Current Pharmaceutical Design*, 7, 933-950.
13. Feng, T., Sun, M., Song, S., Zhuang, H., & Yao, L. (2019). Gas chromatography for food quality evaluation. *Evaluation Technologies for Food Quality*, 219–265
14. Flamini G., Cioni P., Morelli I., 2003 Volatiles from Leaves, Fruits, and Virgin Olive Oil from *Olea Europaea* Cv. *Olivastra Seggianese* from Italy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1382-1386.
15. Gomes da Silva, Marco D.R., Costa Freitas, Ana M., Cabrita, Maria J.B., Garcia, Raquel., 2008 *Olive Oil Composition: Volatile Compounds*, Universidade de Évora, Évora, Portugal
16. Gomez-Rico A., Desamparados S.M., La Greca M., Fregapante G., 2006 Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil with Regard to Fruit Ripening and Irrigation Management, *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 54, 7130-7136.

17. Herrera, M.D, Perez-Guerrero, C., Marhuenda, E., Ruiz-Gutierrez, V. (2001) Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition* 86: 349-357.
18. Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G., et al., Olive oil volatile compounds, flavor development and quality: A critical review. *Food Chem.* 2007, 100, 273– 286.
19. Kapellakis E., Tsagarakis A., Crowther J., 2007 Olive oil history, production and by product management. *Reviews in Environmental Science and Bio Technology* –26.
20. Karabagias I. K., Badeka A. V., Kontakos S., Karabournioti S., Kontominas M. G., Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chem.* 2014, 165, 181– 190.
21. Kataoka H., Lord L., & Pawliszyn J. 2000 Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.
22. Kiritsakis, A. K. (1998). Flavor components of olive oil-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673–681.
23. Kosma I., Badeka A., Kornilia V., Kontakos S., & Kontominas M., (2015). Differentiation of Greek extra virgin olive oils according to cultivar based on volatile compound analysis and fatty acid composition. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118, 849-861.
24. Kosma, I., Vatavali, K., Kontakos, S., Kontominas, M., Kiritsakis, A., & Badeka, A. (2017). Geographical Differentiation of Greek Extra Virgin Olive Oil from Late-Harvested Koroneiki Cultivar Fruits. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(11), 1373–1384
25. Montedoro G., Beruccioli M., Anichini F., 1978 Aroma analysis of virgin olive oils by headspace (volatiles) and extraction (polyphenols) techniques, in *Flavor of Food and Beverages*, Charalambus G., Inglett G., Eds: Academic Press, New York.
26. Morales, M. T., & Tsimidou, M. (2000). The Role of Volatile Compounds and Polyphenols in Olive Oil Sensory Quality. *Handbook of Olive Oil*, 393–458.

27. Olias J.M., Gutierrez F., Gutierrez R., 1980 Volatiles components in the aroma of virgin olive oil. Identification and sensorial analysis of chromatographic eluents, *Grasa Aceites*, 29, 211-218.
28. Pawliszyn J. (1997) *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH, New York, Chapter 1-5.
29. Pawliszyn, J. (2012). *Theory of Solid-Phase Microextraction*. *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 13–59.
30. Pillonel, J. L., Bosset O & Tabacchi R. 2002 Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile, a review. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35, 1-14.
31. Poowadol T., Chadin K., Kanet W., Natchanun L., Thumnoon N., (2018) Identification of Volatile Compounds and Selection of Discriminant Markers for Elephant Dung Coffee Using Static Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Chemometrics., *Molecules*, 2018, 23,1910; doi 10.3390
32. Romero I, García-González DL, Aparicio-Ruiz R, Morales MT, 2014 Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects, *Talanta*. 2015 Mar;134:394-401.
33. Tura, D., Prenzler, P. D., Bedgood, D. R., Jr., Antolovich, M., Robards, K., Varietal and processing effects on the volatile profile of Australian olive oils. *Food Chem*. 2004, 84, 341– 349.
34. Servili, M.; Esposito, S.; Lodolini, E.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Montedoro, G.; Serravalle, M. & Gucciservili, R.. (2007) Irrigation Effects on Quality, Phenolic Composition, and Selected Volatiles of Virgin Olive Oils Cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6609-6618.
35. Servili, M., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Selvaggini, R., Sordini, B., Montedoro, G. (2011) Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olive-vegetation water concentrate produced by membrane treatment. *Food Chemistry* 124: 1308-1315.

36. SPSS, v.23.0, IBM, Armonk, NY 2014.
37. Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293.
38. Stefanoudaki, E.; Williams, M. & Harwood, J. (2010) Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 906–914.
39. Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., Koutsaftakis, A., Classification of virgin olive oils of two major Cretan cultivars based on their fatty acid composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999, 76, 623– 629.
40. Vas G., & Vekey K. 2004. Solid – Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool prior To Mass Spectrometric Analysis, *Journal Of Mass Spectroscopy* , 39, 233-254.
41. Vichi S, Castellote AI, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, López-Tamames E. 2003 Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection, *J Chromatogr A*, Jan 3;983(1-2):19-33.
42. Youssef, O., Guido F., Manel I., Youssef N B., et al., Volatile Compounds and Compositional Quality of Virgin Olive Oil from Queslatti variety: Influence of geographical origin. *Food Chem* 2011., 124, 1770-1776.

B.4.2 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κυριτσάκης, Α. (2007). Ελαιόλαδο συμβατικό και βιολογικό, Βρώσιμη ελιά – πάστα ελιάς, 4η Έκδοση, Θεσσαλονίκη: Αγροτικές Συνεταιριστικές Εκδόσεις.
2. Αλυγιζάκης, Ε. (1982). Επεξεργασία και κονσερβοποίηση επιτραπέζιας ελιάς, Αθήνα: Εκδόσεις Ν. Μαυρομάτης και ΣΙΑ.
3. Αρβανίτης, Χ. (2005). Το ελαιόλαδο θα μπορούσε να κάνει την Ελλάδα κέντρο του κόσμου.

4. Γερεουδάκη, Α. (2006). Το κρητικό ελαιόλαδο, Βήματα στην ανάπτυξη, Τριμηνιαίο Περιοδικό του Επιμελητηρίου Ηρακλείου, Αύγουστος, Τεύχος 45, σελ.19, Ηράκλειο
5. Κωνσταντίνος Ποντίκης, " Ελαιοκομία" , εκδόσεις Α. Σταμούλης, Πειραιάς 1992.
6. Μιχελάκης Ν. (1998). Τα μικρά μυστικά του ελαιολάδου, Το Βήμα, 11 Ιανουαρίου, Αριθμός Φύλλου 12463, Αθήνα,
7. Παπαγεωργίου, Γ. (1999). Ελαιόλαδα Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) και γεωγραφικής ένδειξης (ΠΓΕ), Γεωργία – Κτηνοτροφία, Μηνιαίο Περιοδικό Γεωτεχνικής Ενημέρωσης, Σεπτέμβριος, Τεύχος 7, σελ. 12, Αθήνα
8. Ταραντίλης 2017 Σημειώσεις Αέρια Χρωματογραφία

B.4.3 ΔΙΑΔΥΚΤΙΟ

<https://myoliveplant.gr/elainvas/poikilies-elias/>

<https://el.wikipedia.org/wiki/>

<https://el.wikipedia.org/wiki/>

<https://agrotikistegi.gr/>