

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μεταβολή του προφίλ των πτητικών ουσιών κατά τη συσκευασία της πράσινης επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με τη χρήση SPME-GC/MS και ηλεκτρονικής μύτης ALPHA M.O.S.

Αλεξάνδρα Ι. Νάνου

Επιβλέπων καθηγητής:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2021

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μεταβολή του προφίλ των πτητικών ουσιών κατά τη συσκευασία της πράσινης επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με τη χρήση SPME-GC/MS και ηλεκτρονικής μύτης ALPHA M.O.S.

“Elucidation of the volatilome of Spanish-style green olives packaged in multilaminated pouches under modified atmosphere using SPME-GC/MS and the ALPHA M.O.S. electronic nose”

Αλεξάνδρα Ι. Νάνου

Εξεταστική επιτροπή:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Παππάς Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Μεταβολή του προφίλ των πτητικών ουσιών κατά τη συσκευασία της πράσινης επιτραπέζιας ελιάς Ισπανικού τύπου σε εύκαμπτους πολυστρωματικούς περιέκτες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με τη χρήση SPME-GC/MS και ηλεκτρονικής μύτης ALPHA M.O.S.

*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιτραπέζια ελιά αποτελεί για την Ελλάδα αλλά και γενικά την ευρύτερη Μεσογειακή περιοχή, μια παραδοσιακή καλλιέργεια με μεγάλη οικονομική και κοινωνική σημασία. Ανάλογα την μέθοδο επεξεργασίας που υφίστανται προκειμένου να καταστούν εδώδιμες, προκύπτουν αρκετοί εμπορικοί τύποι επιτραπέζιων ελιών, ωστόσο, ο σημαντικότερος παγκοσμίως είναι οι πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου. Η επιτραπέζια ελιά ως προϊόν ζύμωσης χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλία πτητικών ουσιών οι οποίες είναι κυρίως προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού και συμβάλλουν σε μικρές συγκεντρώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και ιδιαίτερα στο άρωμα. του. Επομένως, το άρωμα είναι άμεσα συνδεδεμένο με την ποιοτική και ποσοτική σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών τα οποία καθορίζουν τόσο την ποιότητα του τελικού προϊόντος όσο και τη διάρκεια ζωής του, παίζοντας κατ' επέκταση, σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του από τον καταναλωτή. Στην παρούσα μελέτη, καταγράφηκε η μεταβολή του πτητικού αποτυπώματος των δύο ποικιλιών πράσινης ελιάς, «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική», η επεξεργασία των οποίων έχει πραγματοποιηθεί με την Ισπανική μέθοδο, ενώ ταυτόχρονα διερευνήθηκε η πιθανότητα διαχωρισμού των διαφορετικών ποικιλιών και συσκευασιών βάσει του πτητικού κλάσματος των δειγμάτων.

Για την παραλαβή των πτητικών συστατικών από τα δείγματα ελιάς χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης (static headspace), ενώ για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε η αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (GC-MS). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S. Μετά από προεπεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την αέρια χρωματογραφία, ογδόντα οκτώ (88) ενώσεις ταυτοποιήθηκαν που συμπεριλάμβαναν αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, τερπένια αλλά κυρίως αλκοόλες και εστέρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων αυτών με διάφορες μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 5.0. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA) επιτεύχθηκε σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων βάσει της ποικιλίας τους. Επιπλέον, όταν αναλύθηκαν τα δεδομένα από την κάθε ποικιλία

ξεχωριστά με την χρήση της επιβλεπόμενης μεθόδου κατηγοριοποίησης OPLS-DA, επετεύχθει ικανοποιητικός διαχωρισμός και μεταξύ των δύο πλαστικών συσκευασίας. Ανιχνεύθηκαν 15 σημαντικοί μεταβολίτες (VIPscore>1), που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις όπως οργανικά οξέα, αλκοόλες, εστέρες, και τερπένια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και ύστερα από την διακριτική παραγοντική ανάλυση (DFA) που πραγματοποιήθηκε στα δεδομένα που λήφθηκαν από την ηλεκτρονική μύτη, με τη διαφορά ότι ο διαχωρισμός με βάση τη συσκευασία δεν ήταν εφικτός σε αυτή την περίπτωση. Επομένως, η σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ποικιλία της ελιάς, ενώ επίσης το μέσο συσκευασίας φαίνεται να επιδρά στην παραγωγή πτητικών ουσιών από τις ελιές, ωστόσο σίγουρα απαιτείται διερεύνηση. Συνεπώς, το συγκεκριμένο πεδίο έρευνας εύλογα καθίσταται ένα αντικείμενο ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος με προοπτικές για περαιτέρω μελέτη.

Επιστημονική περιοχή: Χημική Ανάλυση Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου, ποικιλία Κονσερβολιά, ποικιλία Χαλκιδικής, πτητικό προφίλ, μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME), αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών (SPME/GC-MS), ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S., πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, Metaboanalyst

Elucidation of the volatilome of Spanish-style green olives packaged in multilaminated pouches under modified atmosphere using SPME-GC/MS and the ALPHA M.O.S. electronic nose

*Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Food Chemistry and Analysis*

ABSTRACT

Table olives are for Greece and the wider Mediterranean region, a traditional crop product of great economic and social importance. There are several commercial types of table olives, depending on the processing method used to make them edible, with Spanish style green table olives being the most famous worldwide. Table olives as a fermentation product are characterized by a wide variety of volatile substances which are mainly products of microbial metabolism. Those volatiles contribute in the organoleptic characteristics of the final product and especially its aroma. Therefore, the aroma is directly related to the qualitative and quantitative composition of the fraction of volatile components which determine both the quality of the final product and its shelf life, thus playing an important role in its acceptance by the consumer. In the present study, the elucidation of the volatile profiles of Spanish style green olives of cv. Conservolea and Halkidiki, during storage for a period of 12 months, was observed. Furthermore, the possibility of discrimination of the two varieties according to their volatilomes is reviewed. Finally, the effect of the different plastic packaging media on the volatiles production is tested.

Solid phase micro-extraction (SPME) technique was used for the extraction of volatile components from the olive samples that were further identified and quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). In addition, an analysis was performed with the electronic nose Alpha M.O.S. After pre-processing the data from GCMS there were eighty-eight (88) compounds identified in both olive cultivars, including several aldehydes, ketones, acids, terpenes, but mainly esters and alcohols. The data were then statistically processed by various multivariate analysis methods using the MetaboAnalyst 5.0 web platform. According to the results of Principal Component Analysis (PCA) a clear separation of samples based on their variety was achieved. Furthermore, when the data from each variety were analyzed separately using Orthogonal-Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (O-PLS-DA), the separation between the two plastic packaging media was also successful. There were 15 important volatile compounds (VIP score > 1) detected, which belong to various classes such as organic acids, alcohols, esters, and terpenes. Similar results were obtained, regarding the varieties separation, after the Discriminant Factor Analysis (DFA) that was performed to the e-nose data. However, the results weren't the same as regards to their packaging

media, since no discrimination was achieved in that case. Therefore, it is observed that the two varieties can be separated based on their volatile profiles and also there is a clear distinction between the two packaging plastics, but only using the GC/MS analysis and not the e-nose although further investigation is required. In conclusion, this field of research reasonably becomes an object of great scientific interest, with many prospects of further study.

Scientific area: Food Chemical Analysis

Keywords: Spanish-style green table olives, Conservolea variety, Halkidiki variety, volatilome, solid phase micro-extraction (SPME), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), Alpha M.O.S. electronic nose, multivariate statistical analysis, Metaboanalyst

Στην οικογένειά μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων και στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κύριου Μαλλούχου Αθανάσιου, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και τις χρήσιμες υποδείξεις καθώς επίσης και για την βοήθεια του στην κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του συστήματος αεριοχρωματογράφου-φασματομέτρου μάζας και την υπομονή που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω και το καθηγητή κύριο Ευστάθιο Πανάγου για τη καθοριστική συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας με τις επιστημονικές του παρατηρήσεις, οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της εργασίας, αλλά και την εμπιστοσύνη του σε εμένα με την υπόδειξη ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά το προσωπικό των εργαστηρίων Μικροβιολογίας αλλά και Χημείας τροφίμων για την χορήγηση τόσο των δειγμάτων (ελιές), όσο και του υλικού εξοπλισμού, κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστίες οφείλω και σε όλους τους καθηγητές, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς φοιτητές και επιστημονικούς συνεργάτες, για την άψογη συνεργασία και το πολύ ζεστό και φιλικό κλίμα που υπήρχε σε όλη την περίοδο της εργασίας στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα την οικογένεια μου και όλα τα φιλικά μου πρόσωπα για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση που μου έχουν προσφέρει απλόχερα, καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων, αλλά και για την στήριξη τους κατά την εκπόνηση της πτυχιακής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1. ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ.....	11
1.1. Ιστορική Αναδρομή.....	11
1.2. Σημερινά δεδομένα.....	11
1.3. Νομοθεσία	12
1.4. Βοτανολογικά χαρακτηριστικά	13
1.5. Χημική σύσταση του καρπού.....	14
1.6. Κυριότερες Ελληνικές ποικιλίες.....	16
Κονσερβολιά	16
Καλαμών	17
Χαλκιδικής	17
2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ.....	17
2.1. Κυριότεροι εμπορικοί τύποι.....	17
2.1.1. Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου.....	18
2.1.2. Φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου	19
2.1.3. Καλιφόρνιας	19
2.2. Μικροβιολογία Ελαιόκαρπου.....	20
2.2.1. Νωπός.....	20
2.2.2. Μικροβιολογία Ζύμωσης	20
2.3. Ζύμωση.....	21
3. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΛΛΟΥΝ ΣΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....	22
3.1. Το άρωμα στα τρόφιμα.....	22
3.2. Μεταβολισμός μικροχλωρίδας και συνεισφορά στο άρωμα	23
3.3. Πτητικά συστατικά των επιτραπέζιων ελιών.....	25
3.4. Παραγωγή των κυριότερων πτητικών ενώσεων.....	26
4. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ.....	28
4.1. Παραλαβή πτητικών	28
4.1.1. Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid phase microextraction, SPME)	29
4.2. Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (GC – MS)	31
4.3. Ηλεκτρονική μύτη (e-nose).....	34
5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	36
5.1. Χημειομετρία.....	36

5.1.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA).....	37
5.1.2. Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares regression-Discriminant Analysis, PLS- DA) και OPLS-DA	37
5.1.3. Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant Factor Analysis, DFA).....	38
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	39
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
1. Δείγματα – Πειραματικός σχεδιασμός	40
2. Όργανα – Υλικά	41
2.1. Υλικά και σκεύη.....	41
2.2. Συσκευές – Όργανα.....	41
2.4. Τριχοειδής στήλη.....	42
3. Μέθοδοι – Πειραματική πορεία	43
3.1. Προετοιμασία δειγμάτων.....	43
3.2. Απομόνωση και προσδιορισμός πτητικών συστατικών	43
3.2.1. Διαδικασία εκχύλισης των πτητικών συστατικών των δειγμάτων με SPME....	43
3.2.2. Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS).....	43
3.2.3. Στατιστική επεξεργασία	44
3.3. Ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S. (E-nose).....	44
3.3.1. Λήψη των πτητικών από headspace	44
3.3.2. Ανάλυση με e-nose	44
3.3.3. Πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (Multivariate statistical analysis).....	45
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
1. Αποτελέσματα ανάλυσης GC/MS	46
1.1. Προ - επεξεργασία δεδομένων	46
1.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	47
1.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση	51
1.3.1. Ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική.....	51
1.3.2. Πράσινες ελιές της ποικιλίας Κονσερβολιά	56
1.3.2. Πράσινες ελιές της ποικιλίας Χαλκιδική.....	59
2. Αποτελέσματα ανάλυσης με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S.....	63
2.1. Απόκριση της ηλεκτρονικής μύτης Alpha M.O.S στα πτητικά.....	63
3.2. Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant factor analysis, DFA).....	67
E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	77

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

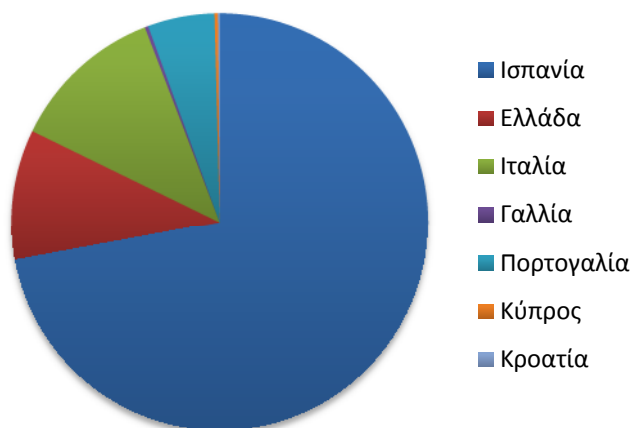
1.1. Ιστορική Αναδρομή

Η καλλιέργεια της ελιάς χρονολογείται από τον 16^ο αιώνα π.Χ. και συμβάδιζε πάντα με την επέκταση και την εξέλιξη των μεσογειακών πολιτισμών. Από τον 6^ο π.Χ. αιώνα, η ελιά διαδίδεται σε όλες τις μεσογειακές χώρες και φτάνει στην Τρίπολη, την Τυνησία και στο νησί της Σικελίας από το οποίο εξαπλώνεται στη νότια Ιταλία (IOOC 2019). Σύμφωνα με την αρχαία Ελληνική μυθολογία, η ελιά ήταν το δώρο που έκανε η θεά Αθηνά στους κατοίκους της Αθήνας, οι οποίοι προκειμένου να εκφράσουν την ευγνωμοσύνη τους, ονόμασαν την πόλη τους προς τιμήν της. Εκείνη στην συνέχεια τους έμαθε να την καλλιεργούν (Loussert & Brousse R., 1980). Πολύ χαρακτηριστική είναι η φράση του Γάλλου πολιτικού και συγγραφέα Duhamel, «η Μεσόγειος τελειώνει εκεί όπου η ελιά δεν ευδοκιμεί», το οποίο μπορεί να αντικατασταθεί με τη φράση «εκεί όπου ο ήλιος το επιτρέπει, η ελιά ριζώνει και μεγαλώνει» (IOOC 2019).

1.2. Σημερινά δεδομένα

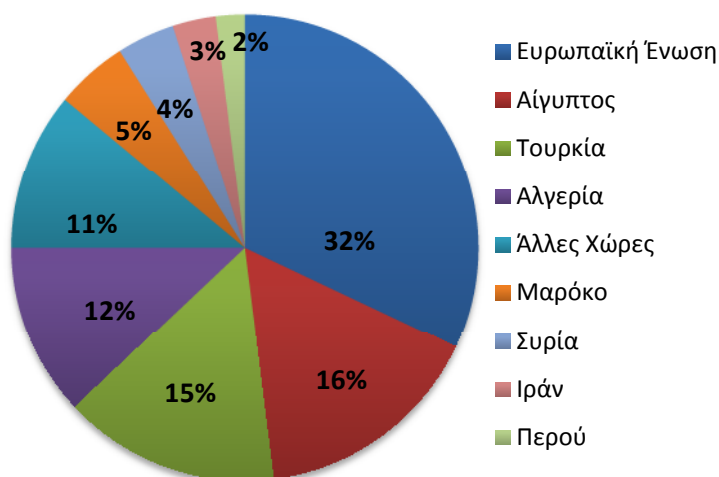
Στις μέρες μας, η παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς συνεχίζει να εξαπλώνεται γύρω από τη Μεσόγειο και να αποτελεί το πιο σημαντικό οικονομικά ζυμούμενο προϊόν στην Ελλάδα και στις άλλες μεσογειακές χώρες, αποτελώντας μαζί και με το ελαιόλαδο σημαντικό μέρος της μεσογειακής διατροφής (Panagou et al. 2008). Πλέον καλλιεργείται ακόμη και σε πολύ απομακρυσμένα, από το φυσικό χώρο προέλευσης της, μέρη, όπως στη Νότια Αφρική, την Αυστραλία, την Ιαπωνία, την Χιλή και την Κίνα, Ωστόσο το 98% των ελαιόδεντρων βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου (Panagou & Tassou, 2006). Η παραγωγή επιτραπέζιων ελιών παγκοσμίως ανέρχεται ετησίως σε περίπου 2 με 3 εκατομμύρια τόνους. Το 35% περίπου από την ποσότητα αυτή παράγεται σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και ειδικότερα στην Ισπανία, την Ελλάδα, την Ιταλία, την Πορτογαλία, την Αίγυπτο και την Τουρκία (IOOC 2019). Η Ελλάδα καλύπτει 765.000 στρέμματα καλλιεργούμενης έκτασης με ελιές και παράγει 405.600 τόνους λάδι, δηλαδή το 19,7% της παραγωγής στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ επίσης και 104.300 τόνους επιτραπέζιας ελιάς που αντιστοιχεί στο 16,0% της συνολικής παραγωγής της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΙΚΗ ΕΝΩΣΗ 2018-2019 (σε χιλ. τόννους)



Εικόνα 1. Γράφημα που απεικονίζει την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε χιλιάδες τόνους (δεδομένα από ΙΟΟC, 2019)

ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΩΝ ΕΛΙΩΝ 2018-2019



Εικόνα 2. Γράφημα που απεικονίζει την παγκόσμια παραγωγή επιτραπέζιων ελιών σε χιλιάδες τόνους (δεδομένα από ΙΟΟC, 2019)

1.3. Νομοθεσία

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (ΙΟΟC 2019), ως επιτραπέζια ελιά ορίζεται ο υγιής καρπός καθορισμένων ποικιλιών του καλλιεργούμενου ελαιόδεντρου (*Olea europaea sativa*), που συγκομίζεται σε στάδιο κατάλληλης ωριμότητας και ποιότητας, ώστε μετά από κατάλληλη επεξεργασία να δώσει ένα

καλά συντηρούμενο βρώσιμο προϊόν. Στην επεξεργασία αυτή μπορεί να προστεθούν διάφορα προϊόντα ή αρωματικές ύλες (αρτύματα) καλής ποιότητας. Κάθε μέθοδος επεξεργασίας στοχεύει κυρίως στην αποδόμηση του φαινολικού γλυκοζίτη ελευρωπαΐνη, που προσδίδει πικρή γεύση στους καρπούς με αποτέλεσμα να καθιστά αδύνατη την άμεση κατανάλωση τους.

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2003), η επιτραπέζια ελιά ανήκει στην κατηγορία τροφίμων φυτικής προέλευσης, που διατηρούνται με αλάτι, ξύδι, λάδι ή οινόπνευμα. Ειδικότερα είναι «οι ημιώριμοι ή ώριμοι καρποί της ελιάς, οι διατιθέμενοι στην κατανάλωση κατόπιν ειδικής επεξεργασίας και που έγιναν διατηρήσιμοι είτε με αλάτισμα είτε με τοποθέτηση σε άλμη ή σε ξύδι ή σε ελαιόλαδο» (ΚΤΠ, Κεφάλαιο XIII, άρθρο 123, παρ. 9).

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, Stan 66-1981), οι ελιές είναι το προϊόν το οποίο:

1. Προετοιμάζεται από καρπούς των ποικιλιών της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea*), έχοντας φτάσει στον κατάλληλο βαθμό ωριμότητας για την επεξεργασία που έχουν επιλεγεί, για την παραγωγή ελιών των οποίων ο όγκος, το σχήμα, η αναλογία σάρκας - πυρήνα, η λεπτή σάρκα, η γεύση, η σταθερότητα και η ευκολία αποκόλλησης από τον πυρήνα, τους καθιστούν ειδικά κατάλληλους για επεξεργασία.

2. Επεξεργάζεται έτσι ώστε να αφαιρεθεί η πικράδα και συντηρείται με φυσική ζύμωση και/ή με θερμική διεργασία και/ή άλλα μέσα, έτσι ώστε να αποτραπεί η αλλοίωση και να διασφαλισθεί η σταθερότητα του προϊόντος σε κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, με ή δίχως την προσθήκη συντηρητικών.

3. Συσκευάζεται με ή χωρίς κατάλληλο υγρό μέσο συσκευασίας

Για λόγους διασφάλισης της αναγνώρισης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που έχουν ορισμένα προϊόντα, όπως οι επιτραπέζιες ελιές κάποιων περιοχών, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα δημιούργησε το 1992 συστήματα για την κατοχύρωση των ιδιαίτερων αυτών χαρακτηριστικών, όπως η ονομασία ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) και ΠΓΕ (Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη) (Minagric.gr).

1.4. Βοτανολογικά χαρακτηριστικά

Η ελιά ανήκει στο γένος *Olea* sp. της οικογένειας Oleaceae και η βοτανική ονομασία της είναι *Olea europaea*. Ένα από τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Olea* sp. είναι η μακροζωία τους, που μπορεί να ξεπεράσει και τα 100 χρόνια, χωρίς μάλιστα να σταματήσει ή να μειωθεί η παραγωγικότητα αυτών των δένδρων. Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 35 είδη αειθαλών θάμνων και δέντρων (Sciencekew.org, Μπαλατσούρας Γ., 1995). Η ελιά είναι ένα δέντρο αειθαλές και αιωνόβιο χάρη στην ανθεκτικότητά και την ικανότητά του να βλαστάνει από οφθαλμούς στο κάτω μέρος του κορμού του. Ανήκει στα παλαιότερα γνωστά

καλλιεργούμενα δέντρα στον κόσμο (Liphschitz et al. 1991). Συναντάται σε περιοχές ξηρές και ημίξηρες και επιβιώνει και σε ιδιαίτερα δυσπρόσιτες περιοχές καθώς και σε άγονα εδάφη. Επίσης ευδοκιμεί ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, όπου οι βροχοπτώσεις είναι συχνές από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη. Έχει ακόμη, την ικανότητα να βλαστάνει ξανά μετά από τραυματισμό ή καταστροφές του υπέργειου τμήματός της (Κυριτσάκης Α., 1993).

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, όμοια ανατομικά με τις κοινές δρύπες των πυρηνόκαρπων όπως είναι το ροδάκινο, το κεράσι και το δαμάσκηνο. Το σχήμα του καρπού είναι σφαιρικό ή ελλειψοειδές, μήκους 2-3 cm και εγκάρσιας διαμέτρου 1-2cm. Το βάρος του είναι συνήθως 3 με 10g (Πανάγου Ε., 2002).

1.5. Χημική σύσταση του καρπού

Το κύριο μέρος του καρπού της ελιάς είναι η σάρκα (μεσοκάρπιο) που καταλαμβάνει το 70 – 90 % του βάρους του καρπού. Η χημική σύσταση του μεσοκαρπίου χαρακτηρίζεται κυρίως από: υγρασία, λιπαρές ουσίες, υδατάνθρακες, φαινολικές ενώσεις, πρωτεΐνες, πηκτίνες, οργανικά οξέα, βιταμίνες, χρωστικές, ανόργανα συστατικά και ιχνοστοιχεία (Μπαλατσούρας Γ., 1995; Πανάγου Ε., 2002).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται αναλυτικά η μέση σύσταση του μεσοκαρπίου. Η ποικιλία, ο βαθμός ωρίμανσης καθώς επίσης και η διαφορά στις τεχνικές καλλιέργειας, είναι πιθανό να επηρεάσουν και να διαφοροποιήσουν την αναλογία των συστατικών αυτών στην σάρκα της ελιάς (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997).

Πίνακας 1. Σύσταση του μεσοκαρπίου και αναλογίες των βασικότερων συστατικών

Συστατικό	Αναλογία στο μεσοκάρπιο
Υγρασία	60-75%
Λιπαρές ουσίες	10-25%
Ανάγοντα σάκχαρα	3-6%
Μη ανάγοντα σάκχαρα	<0.3%
Ίνες	1-4%
Πρωτεΐνη	1-2%
Οργανικά οξέα	0.5-1.0%
Φαινολικές Ουσίες	2-3%
Πηκτίνες	<0.6%
Λοιπές ενώσεις	3-7%

Υγρασία της σάρκας

Το κυριότερο συστατικό της ελιάς είναι το νερό το οποίο περιέχεται στον ελαιόκαρπο σε ποσοστό 60 – 75 % (w/w). Εξαιρέση αποτελούν οι ξηράλατες ελιές, στις οποίες η υγρασία κυμαίνεται από 28 – 35 % (w/w). Το περιεχόμενο νερό είναι

υπεύθυνο για τη μη αφυδάτωσή του καρπού επάνω στο δέντρο. Όσο χαμηλότερο είναι το ποσοστό της υγρασίας του μεσοκαρπίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η θρεπτική και ενεργειακή αξία της ελιάς (Kailis S. & Harris D., 2007). Κατά την επεξεργασία των ελιών, ο καρπός χάνει υγρασία η οποία αντισταθμίζεται μερικώς από το αλάτι που εισέρχεται στη σάρκα (Μπαλατσούρας Γ., 1995).

Λιπαρές ουσίες

Ο νωπός καρπός έχει περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες από 20 μέχρι 25% (w/w). Οι λιπαρές ουσίες, ως μη πολικές, δεν εκχυλίζονται ούτε κατά την εκπίκνιση του καρπού με άλκαλι ούτε κατά την απευθείας ζύμωση σε άλμη. Οι περισσότερες λιπαρές ουσίες είναι τριγλυκερίδια, υπάρχουν όμως διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το κυριότερο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό οξύ ενώ ακολουθούν το παλμιτικό, στεατικό, λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. Η σχετική αναλογία του παλμιτικού, του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος μειώνεται στην πορεία της ωρίμανσης, ενώ αυτή του στεατικού και κυρίως του ελαϊκού οξέος, αυξάνεται στη διάρκεια αυτής της περιόδου. Το χαμηλό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων στον καρπό, κάνει την ελιά ένα προϊόν υψηλής βιολογικής και διατροφικής αξίας για τον άνθρωπο (Πανάγου Ε., 2002).

Σάκχαρα

Τα κυριότερα σάκχαρα που περιέχονται στο μεσοκάρπιο είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν το 90 – 95 % (w/w) των σακχάρων, και σε μικρότερο ποσοστό ακολουθούν η σακχαρόζη και η μαννιτόλη (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997). Τα σάκχαρα αποτελούν τα ζυμάσιμα συστατικά του μεσοκαρπίου για τους μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Πανάγου Ε., 2002).

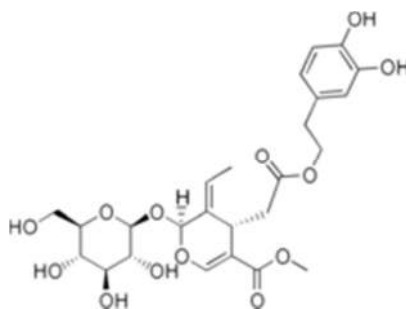
Πρωτεΐνες

Ο ελαιόκαρπος έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (1-3%), γι' αυτό και δεν μπορεί να θεωρηθεί πηγή πρωτεΐνης για τον άνθρωπο. Ωστόσο τα αμινοξέα που περιέχει είναι απαραίτητα για τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία για να πραγματοποιήσουν τη γαλακτική ζύμωση χρειάζονται εκτός από σάκχαρα, και αμινοξέα που εκχυλίζονται από τη σάρκα της ελιάς προς την άλμη καθιστώντας την ένα σύνθετο θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Πανάγου Ε., 2002).

Φαινολικές ουσίες

Το μεσοκάρπιο είναι πλούσιο σε φαινολικές ουσίες με την ελευρωπαΐνη να είναι η κυρίαρχη και να περιέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φύλλα του ελαιόδεντρου. Άλλες φαινολικές ουσίες που έχουν ανιχνευτεί στον καρπό της ελιάς είναι η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και ο γλυκοζίτης της τυροσόλης. Η ελευρωπαΐνη είναι ένας φαινολικός γλυκοζίτης υπεύθυνος για την πικρή γεύση του καρπού που τον καθιστά μη εδώδιμο χωρίς προηγούμενη επεξεργασία (Πανάγου Ε.,

2002). Για τον λόγο αυτό, όλες οι μέθοδοι επεξεργασίας του ελαιοκάρπου έχουν σαν βασικό στόχο την μερική ή ολική απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης από τη σάρκα της ελιάς, ανάλογα με τον παρασκευαζόμενο εμπορικό τύπο, καθώς επίσης τη συντήρηση του προϊόντος και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Μπαλατσούρας Γ., 1995). Από χημική άποψη, η ελευρωπαΐνη είναι ένας διπλός εστέρας της γλυκόζης και αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης, ένα μόριο υδροξυτυροσόλης και ένα μόριο ακόρεστου οξέος εμπειρικού τύπου $C_{10}H_{16}O_3$, το ελενολικό οξύ (Πανάγου Ε., 2002).



Εικόνα 3. Δομή του μορίου της ελευρωπαΐνης (Özkaya & Ozkaya 2011)

Οργανικά οξέα

Μικρές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων ανιχνεύονται στη σάρκα της ελιάς. Κάποια από αυτά είναι το μηλικό, το οξαλικό και το κιτρικό. Ορισμένα από αυτά (κιτρικό, μηλικό) μπορούν να μεταβολιστούν από τα γαλακτικά βακτήρια, ιδιαίτερα όταν έχουν εξαντληθεί τα ζυμώσιμα συστατικά, αυξάνοντας έτσι την ολική οξύτητα της άλμης (Drinan, Robin, and Cogan 1976).

1.6. Κυριότερες Ελληνικές ποικιλίες

Οι κυριότερες ελληνικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών είναι τρεις: Κονσερβολιά, Καλαμάτας Καλαμών και Χαλκιδικής (Πανάγου Ε., 2002). Διάφορες άλλες ελληνικές ποικιλίες παράγονται επίσης, όπως η Κορωνέικη, Ηγουμενίτσας, Αλεξανδρούπολης, Μεγαρίτικη, Μυτιλήνης, Θρούμπα κ.α.

Κονσερβολιά



Στην Ελλάδα η Κονσερβολιά αποτελεί την κυριότερη ποικιλία και αναλογεί στο 80-85 % της παραγωγής επιτραπέζιας ελιάς. Καλλιεργείται κυρίως στην Κεντρική Ελλάδα και πιο συγκεκριμένα στις περιοχές, Άρτας, Φωκίδας, Φθιώτιδας, Μαγνησίας, Εύβοιας, Αιτωλοακαρνανίας και της Λάρισας. Από μορφολογικής απόψεως μοιάζει με την ισπανική ποικιλία *Manzanilla*. Η Κονσερβολιά είναι ποικιλία μεσόκαρπη και παραγωγική, και αποδίδει από 15 έως 100 kg ελαιοκάρπου ανά δέντρο. Το βάρος του καρπού κυμαίνεται από 5 έως 8 g. Έχει μήκος 20-30 mm και

πάχος 20-25 mm με σχήμα σφαιρικό έως ωσειδές. Η ποικιλία αυτή έχει αναλογία βάρους σάρκας προς βάρος πυρήνα που κυμαίνεται από 6:1 έως 10:1 (Μπαλατσούρας Γ., 1995). Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου, αλλά και για την παραγωγή φυσικών μαύρων ελιών σε άλμη.

Καλαμών

Η ποικιλία Καλαμών παρουσιάζει περιορισμένη διάδοση και οι πιο σημαντικοί νομοί παραγωγής της είναι οι: Λακωνίας, Μεσσηνίας, Αργολίδας, Ηλείας, Κορινθίας, Φθιώτιδας και Αιτωλοακαρνανίας. Είναι μεσόκαρπη ποικιλία και ο καρπός της έχει βάρος 3 έως 6 g. Έχει σχήμα κυλινδροκωνικό και έχει την ιδιαιτερότητα το κουκούτσι να απομακρύνεται από τη σάρκα εξαιρετικά εύκολα. Ο λόγος σάρκας/ πυρήνα είναι ανάλογος με αυτόν της Κονσερβολιάς.



Χρησιμοποιείται για την παραγωγή φυσικών μαύρων ελιών σε άλμη. Όταν έχει φτάσει στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας αποκτά βαθύ μαύρο χρώμα, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για αυτό τον εμπορικό τύπο. Η συγκομιδή του καρπού γίνεται στο στάδιο πλήρους ωριμότητας κατά την περίοδο Νοεμβρίου – Δεκεμβρίου (Πανάγου Ε., 2002).

Χαλκιδικής

Η ποικιλία Χαλκιδικής είναι η τρίτη πιο σημαντική ποικιλία στην χώρα μας και αναλογεί στο 3% της ελληνικής παραγωγής. Καλλιεργείται κυρίως στις περιοχές



Χαλκιδικής, Καβάλας και Σερρών. Από μορφολογικής απόψεως μοιάζει με την Ισπανική ποικιλία Gordal η οποία είναι ο κύριος ανταγωνιστής της. Η σχέση σάρκας/πυρήνα είναι 10:1, κάτι που την καθιστά αρκετά ελκυστική για επιτραπέζια χρήση. Το μέσο βάρος του καρπού είναι 6-10 g. Το χρώμα της δεν είναι ποτέ μαύρο στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας, γι' αυτό χρησιμοποιείται αποκλειστικά και μόνο για τη παραγωγή πράσινων ελιών Ισπανικού τύπου (ΔΟΕΠΕΛ 2019).

2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ

2.1. Κυριότεροι εμπορικοί τύποι

Οι παραδοσιακές και σύγχρονες μέθοδοι επεξεργασίας αποσκοπούν κυρίως στην μερική ή ολική απομάκρυνση της ελευρωπαίνης η οποία προσδίδει πικρή γεύση στον καρπό (εκπίκρυνση). Με τον τρόπο αυτό καθίσταται εδώδιμος και αποδεκτός

από το καταναλωτικό κοινό (Garrido-Fernández & Fernández-Díez, 1997; Μπαλατσούρας Γ., 1995).

Το χρώμα και ο τρόπος συντήρησης του τελικού προϊόντος καθορίζουν το είδος του εμπορικού τύπου των επιτραπέζιων ελιών:

- Χρώμα: Το χρώμα μπορεί να είναι πράσινο, φυσικό μαύρο με ερυθρές και ξανθές διαβαθμίσεις και τεχνητό μαύρο, το οποίο προκύπτει μέσω επεξεργασίας οξειδωσης των καρπών σε αλκαλικό περιβάλλον.
- Συντήρηση: Το τελικό προϊόν μπορεί να συντηρηθεί με οξέα (γαλακτικό ή οξικό), με αλάτι (ξηρό ή με τη μορφή πυκνής άλμης) και με αναερόβωση (απουσία αέρα στον χώρο ζύμωσης ή συσκευασίας). Σε όλους τους εμπορικούς τύπους οι ελιές συντηρούνται με συνδυασμό και των τριών αυτών παραγόντων, ωστόσο ένας από αυτούς θα κυριαρχεί έναντι των άλλων δύο, των οποίων ο ρόλος θα είναι κυρίως βοηθητικός (Μπαλατσούρας Γ., 1995).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αρκετοί εμπορικοί τύποι επιτραπέζιων ελιών προκύπτουν. Επιπλέον, διαφορές στον τρόπο συσκευασίας και την μορφή εμπορίας του προϊόντος (ολόκληρες, εκπυρηνωμένες, γεμιστές, τεμαχισμένες ελιές κτλ.) οδηγούν στη δημιουργία δεκάδων ακόμη εμπορικών τύπων. Ωστόσο σύμφωνα με τον Ενοποιημένο Κανονισμό Ποιότητας για τις επιτραπέζιες ελιές, οι κυρίαρχοι εμπορικοί τύποι είναι:

- Επεξεργασμένες πράσινες επιτραπέζιες ελιές σε άλμη (Ισπανικού τύπου)
- Μη επεξεργασμένες φυσικές μαύρες ελιές (Ελληνικού τύπου)
- Μαύρες (ώριμες) ελιές σε άλμη (τύπου Καλιφόρνιας)

2.1.1. Πράσινες ελιές Ισπανικού τύπου

Αποτελούν τον σπουδαιότερο εμπορικό τύπο επιτραπέζιας ελιάς που παράγεται παραδοσιακά στην Ισπανία και αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής. Προέρχονται από πράσινους καρπούς, οι οποίοι έχουν αποκτήσει το κανονικό τους μέγεθος, είναι συνεκτικοί και υγιείς. Ο καρπός συγκομίζεται την περίοδο Σεπτεμβρίου-Οκτωβρίου, κατά βάση με τα χέρια και όχι με ραβδισμό έτσι ώστε να μην υπάρξει τυχόν τραυματισμός του. Ακολουθεί μεταφορά στο εργοστάσιο όπου λαμβάνει χώρα η εκκρίση με εμβάπτιση σε αραιό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) περιεκτικότητας 1,8-2,7 % w/v (Πανάγου Ε., 2002). Η συγκέντρωση του NaOH καθορίζεται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από το βαθμό ωριμότητας του καρπού και την ποικιλία της ελιάς. Το άλκαλι υδρολύει την ελευρωπαΐνη σε υδροξυτυροσόλη και γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος. Η επεξεργασία με το άλκαλι είναι πολύ βασικό στάδιο της μεταποίησης των πράσινων ελιών, διότι εκτός από το ξεπύρισμα των καρπών, βοηθά και στο μαλάκωμα της σάρκας που οδηγεί στην εκχύλιση ορισμένων θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για τη δράση των γαλακτικών βακτηρίων (Chammem et al. 2005). Ο παραπάνω χειρισμός διαρκεί μέχρι το NaOH να διαποτίσει τα 2/3 της σάρκας. Στην συνέχεια πραγματοποιείται

έκπλυση με νερό προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αλκάλειου (τρεις αλλαγές νερού). Τέλος, ο καρπός μεταφέρεται σε μεγάλες πολυεστερικές δεξαμενές, όπου προστίθεται άλμη περιεκτικότητας 6 - 10 % και υφίσταται γαλακτική ζύμωση από τη μικροχλωρίδα που υπάρχει στους καρπούς (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997). Προκειμένου να είναι επιτυχής η ζύμωση, μπορεί να πραγματοποιηθεί οξίνιση της άλμης με οργανικά οξέα, εμβολιασμός με καθαρή καλλιέργεια γαλακτοβακίλλων, προσθήκη σακχάρων ή χρήση άλμης από προηγούμενη ζύμωση (Panagou and Katsaboxakis 2006). Μετά την ζύμωση, η οποία διαρκεί περίπου 3-4 εβδομάδες, η τιμή του pH είναι μεταξύ 3,8 - 4,4 και η οξύτητα 0,6 -0,8% (Πανάγου Ε., 2002). Οι ελιές παραμένουν στις δεξαμενές μέχρι την συσκευασία και την διοχέτευσή τους στην αγορά.

2.1.2. Φυσικές μαύρες ελιές Ελληνικού τύπου

Αυτές παράγονται κυρίως στην Ελλάδα και είναι ο κυρίαρχος εμπορικός τύπος. Λόγω αυτού, οι φυσικές μαύρες ελιές σε άλμη είναι διεθνώς γνωστές με την επωνυμία “Greek style naturally black olives” (Garrido-Fernández & Fernández-Díez, 1997; Πανάγου Ε., 2002). Στον συγκεκριμένο εμπορικό τύπο, ο καρπός συγκομίζεται στο στάδιο πλήρους ωριμότητας ή λίγο πριν από αυτό (μέσα Οκτωβρίου – τέλη Δεκεμβρίου), όταν τα $\frac{3}{4}$ του μεσοκαρπίου έχουν αποκτήσει μαύρο χρώμα (Panagou et al. 2008). Μετά τη συγκομιδή, γίνεται ποιοτική διαλογή και ταξινόμηση κατά μέγεθος. Στην συνέχεια, ο καρπός εμβαπίζεται σε άλμη περιεκτικότητας 8 – 10% NaCl όπου υφίσταται ζύμωση χάρη στη μικτή χλωρίδα αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων. Οι αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν κατά την ζύμωση, εμποδίζουν την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων στην επιφάνεια των δεξαμενών. Η άλμη δημιουργεί ένα εκλεκτικό περιβάλλον που ευνοεί τελικά την ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων και ζυμών. Τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος καθορίζονται από το ποια από τις παραπάνω δυο κατηγορίες μικροοργανισμών που συνυπάρχουν, θα επικρατήσει. Η διαθεσιμότητα των ζυμώσιμων υποστρωμάτων, το pH, η περιεκτικότητα σε αλάτι, ο έλεγχος της θερμοκρασίας και οι αναερόβιες συνθήκες, είναι οι πιο βασικοί παράγοντες που είναι δυνατόν να επηρεάσουν την διαδικασία. Επομένως, προκειμένου το τελικό προϊόν να είναι σταθερό και καλής ποιότητας, πρέπει οι παραπάνω παράμετροι να ελέγχονται. Ύστερα από διάστημα 6-9 μηνών, η διαδικασία ολοκληρώνεται και οι ελιές παραμένουν στις δεξαμενές. Στην συνέχεια γίνεται ποιοτική διαλογή και ταξινόμηση κατά μέγεθος. Στο τέλος οι ελιές εκτίθενται στον ατμοσφαιρικό αέρα για 24 ώρες έτσι ώστε να βελτιωθεί το χρώμα τους (Πανάγου Ε., 2002).

2.1.3. Καλιφόρνιας

Οι ελιές αυτού του τύπου μαυρίζουν τεχνητά με οξείδωση σε αλκαλικές συνθήκες και ονομάζονται μαύρες ώριμες ελιές. Οι νωπές πράσινες ελιές επεξεργάζονται αμέσως μετά τη συγκομιδή ή μετά την αποθήκευση σε άλμη ή σε ειδικό όξινο διάλυμα. Ο νωπός καρπός επεξεργάζεται με αραιό διάλυμα καυστικού

νατρίου με σκοπό την εκπίκρυνση του καρπού και την βελτίωση της διαπερατότητας της επιδερμίδας. Για τη μεταβολή του χρώματος της ελιάς από πράσινο σε μαύρο, οι ελιές τοποθετούνται σε νερό στο οποίο διοχετεύεται ρεύμα αέρα. Οι μαύρες πλέον ελιές σταθεροποιούνται με προσθήκη γλυκονικού σιδήρου (0,1%) ή γαλακτικού σιδήρου για 1-12 ώρες ανάλογα την ποικιλία. Ακολουθεί πλύσιμο με νερό, και τοποθέτηση σε άλμη 3% για 1-3 ημέρες προκειμένου να εξισορροπηθεί το αλάτι στο μεσοκάρπιο της ελιάς. Ύστερα οι ελιές υφίστανται παστερίωση για να αποφευχθεί η μικροβιολογική αλλοίωση. Τέλος συσκευάζονται σε γυάλινους ή μεταλλικούς περιέκτες με άλμη και αποστειρώνονται. Τα χαρακτηριστικά αυτού του τύπου ελιών είναι πολύ διαφορετικά όσον αφορά στο άρωμα, τη γεύση και την υφή σε σχέση με τις φυσικές μαύρες ελιές ελληνικού τύπου. Αυτές οι ελιές έχουν χαρακτηριστική αλμυρή γεύση και οσμή που θυμίζει χόμα. Επιπλέον παρουσιάζουν συχνά, μεταλλική και σαπωνώδη γεύση ή και τάγγισμα (Πανάγου Ε., 2002).

2.2. Μικροβιολογία Ελαιόκαρπου

2.2.1. Νωπός

Η αυτόχθονη μικροχλωρίδα του νωπού ελαιόκαρπου είναι υπεύθυνη για την αυθόρμητη ζύμωση όταν οι ελιές τοποθετούνται στην άλμη. Κυρίως αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. Enterobacteriaceae) ανιχνεύονται στον νωπό καρπό, τα οποία αποτελούν την κυρίαρχη ενδογενή μικροχλωρίδα του. Ακόμη, ορισμένα θετικά κατά Gram βακτήρια όπως *Clostridium butyricum* αλλά και *Bacillus* spp., ανιχνεύονται (Heperkan 2013). Ζύμες, μύκητες και οξυγαλακτικά βακτήρια εμφανίζονται σε μικρότερο ποσοστό (Faid, Akhartouf, and Asehgaou 1994). Ανάλογα την ποικιλία, η αυτόχθονη μικροχλωρίδα του καρπού διαφέρει, εξαρτάται όμως και από τον τόπο καλλιέργειας, την ωριμότητα του καρπού, τις καλλιεργητικές τεχνικές, την εποχή του χρόνου, το μικροκλίμα της περιοχής, τη χρήση ή όχι φυτοφαρμάκων, ενώ ακόμη και τη διαδικασία της μεταποίησης (Kailis S. & Harris D., 2007).

2.2.2. Μικροβιολογία Ζύμωσης

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας μεταβάλλεται κατά την ζύμωση. Στο αρχικό στάδιο της παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών που ανήκουν στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα του ελαιοκάρπου και κυρίως της οικογενείας Enterobacteriaceae. Όμως κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί της οικογένειας αυτής μειώνονται σταδιακά ώσπου στο τέλος της επεξεργασίας δεν ανιχνεύονται πια. Τα οξυγαλακτικά, αποτελούν τα πιο σημαντικά βακτήρια κατά την επεξεργασία της ελιάς και μετατρέπουν τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ και άλλα οργανικά οξέα (Heperkan 2013). Στις ζυμούμενες ελιές έχουν ανιχνευτεί οξυγαλακτικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. και *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. Οι ζύμες παίζουν επίσης καθοριστικό ρόλο στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών. Τα πιο συχνά γένη ζυμών που συναντάμε είναι *Candida* spp., *Pichia* spp., *Saccharomyces* spp. (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997). Σε μικρότερο βαθμό εμφανίζονται οι μύκητες στις ελιές και η ανάπτυξή τους είναι υπεύθυνη για

την υποβάθμιση της υφής του ιστού της ελιάς, τη γεύση και την οσμή μούχλας και την ανάπτυξη μυκοτοξινών (Heperkan et al. 2006). Οι πιο σημαντικοί μύκητες ανήκουν στα γένη *Aerobasidium* spp., *Geotrichum* spp. και *Penicillium* spp. (Κερκέζου Σ., 2017).

2.3. Ζύμωση

Πολλά φυτικά προϊόντα υποβάλλονται σε διαδικασίες ζύμωσης από μικροοργανισμούς. Ο κύριος σκοπός των ζυμώσεων στα τρόφιμα είναι να αυξηθεί η διάρκεια ζωής τους (συντήρηση) και η μικροβιολογική ασφάλειά τους. Ωστόσο, αρκετά τρόφιμα μπορεί να επεξεργάζονται κατ' αυτόν τον τρόπο, για να αποκτήσουν συγκεκριμένη γεύση, άρωμα και υφή, γνωρίσματα τα οποία κάνουν το προϊόν πιο ελκυστικό στους καταναλωτές (Caplice and Fitzgerald 1999). Η ζύμωση είναι μια διαδικασία κατά την οποία παράγονται οξέα, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και άλλοι μεταβολίτες, από οργανικές ενώσεις, όπως τα σάκχαρα οι οποίες υφίστανται βιοχημικές μεταβολές από τη δράση μικροοργανισμών ή ενζύμων (Μπλούκας Ι., 2004).

Η ζύμωση στις επιτραπέζιες ελιές έχει ως στόχο την συντήρηση τους ενώ ταυτόχρονα την ενίσχυση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του τελικού προϊόντος (Panagou & Tassou, 2006). Η διαδικασία της ζύμωσης της ελιάς πραγματοποιείται μέσα σε άλμη. Μέσα σε αυτήν τα σάκχαρα εκχυλίζονται από το μεσοκάρπιο στην άλμη ως υδατοδιαλυτές ουσίες, και δημιουργούν ένα κατάλληλο υπόστρωμα στο οποίο θα αναπτυχθεί η ενδογενής μικροχλωρίδα (κυρίως οξυγαλακτικά βακτήρια και ζύμες) προκαλώντας έτσι την εκκίνηση της ζύμωσης. Τα σάκχαρα του καρπού μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς κατά την ζύμωση, παράγοντας κυρίως γαλακτικό οξύ.

Τα στάδια της ζύμωσης

Το πρώτο στάδιο της ζύμωσης διαρκεί 7-14 ημέρες και αρχίζει τη στιγμή που οι ελιές τοποθετούνται στην άλμη. Στην αρχή της ζύμωσης παρατηρείται ανάπτυξη των βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί επικρατούν στις 2-3 πρώτες μέρες της ζύμωσης, ενώ ο πληθυσμός τους μειώνεται σταδιακά μέχρι που εξαφανίζονται μετά από 12-15 ημέρες (Heperkan 2013). Αυτό οφείλεται στη σταδιακή μείωση της τιμής του pH αφενός λόγω της εκχύλισης των ενδογενών οργανικών οξέων του καρπού στην άλμη και αφετέρου λόγω της δράσης των οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία μεταβολίζουν τα ζυμώσιμα συστατικά του καρπού και παράγουν γαλακτικό οξύ. Η μείωση της τιμής του pH ευνοεί επίσης και την ανάπτυξη των ζυμών, ο πληθυσμός των οποίων αυξάνεται σταδιακά και αποτελούν μαζί με τα οξυγαλακτικά βακτήρια τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς της ζύμωσης. Σε αυτό το πρώτο στάδιο, αποκαθίσταται σταδιακά το ισοζύγιο κατανομής των ζυμώσιμων συστατικών και των προϊόντων της ζύμωσης μεταξύ σάρκας και άλμης. Η διάρκεια του δεν θα πρέπει να ξεπεράσει τις είκοσι μέρες και η τιμή του pH της άλμης θα πρέπει να ελέγχεται σε καθημερινή βάση

διαφορετικά υπάρχει σοβαρός κίνδυνος εκτροπής της ζύμωσης (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997).

Το δεύτερο στάδιο διαρκεί 2-3 εβδομάδες. Στο στάδιο αυτό, επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία μεταβολίζουν τα σάκχαρα παράγοντας γαλακτικό οξύ μέσω της γαλακτικής ζύμωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση του pH και την ταυτόχρονη αύξηση της ογκομετρούμενης οξύτητας στην άλμη.

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο, η οξυγαλακτική ζύμωση συνεχίζεται μέχρις ότου εξαντληθούν τα ζυμώσιμα συστατικά στην άλμη, και το pH και η ογκομετρούμενη οξύτητα φτάσουν στα επιθυμητά επίπεδα.

3. ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΛΛΟΥΝ ΣΤΟ ΑΡΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

3.1. Το άρωμα στα τρόφιμα

Τα τρόφιμα, όταν καταναλώνονται, προκαλούν αλληλεπίδραση των ερεθισμάτων της γεύσης, της οσμής και της υφής τα οποία παρέχουν μια συνολική εκτίμηση ή ένα αίσθημα το οποίο ορίζεται καλύτερα από την αγγλική λέξη *flavour*. Στα ελληνικά αποδίδεται ως ευφραντική ικανότητα ή γευσιάρωμα ή γευστικο-οσφραντικό αίσθημα. Η ευφραντική ικανότητα ενός τροφίμου είναι αποτέλεσμα τόσο ενώσεων υπεύθυνων για την γεύση όσο και ενώσεων υπεύθυνων για την οσμή.

Οι ουσίες που συμβάλλουν στην οσμή (άρωμα) είναι πτητικές ενώσεις οι οποίες γίνονται αντιληπτές από τους υποδοχείς οσμής του οσφρητικού οργάνου, δηλαδή του οσφρητικού ιστού της ρινικής κοιλότητας. Πρόκειται για χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, οι οποίες εξατμίζονται εύκολα σε θερμοκρασία δωματίου. Στα τρόφιμα βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες (περίπου 10-15 mg/kg). Όλες οι γνωστές πτητικές ενώσεις ταξινομούνται με βάση το τρόφιμο και την τάξη των ενώσεων και δημοσιεύονται σε μια συλλογή πινάκων που ανανεώνεται συνεχώς. Στην έκδοση του 1997 υπάρχουν 8000 ενώσεις σε περισσότερα από 300 τρόφιμα (Belitz H.D. et al., 2004).

Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός από το σύνολο των πτητικών ενώσεων που υπάρχουν, επιδρά εν τέλει στο άρωμα του προϊόντος. Συνεισφέρουν μόνο τα πτητικά συστατικά τα οποία βρίσκονται σε συγκεντρώσεις πάνω από το όριο αναγνώρισης της οσμής. Ως όριο αναγνώρισης οσμής χαρακτηρίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία πρέπει να περιέχεται σε ένα τρόφιμο ένα πτητικό συστατικό προκειμένου να γίνει αντιληπτό οργανοληπτικά (Belitz H.D. et al., 2004). Άμεση είναι η σύνδεση του αρώματος με την ποσοτική και ποιοτική σύνθεση των πτητικών συστατικών, ενώ επίσης αποτελεί ένα καλό δείκτη ποιότητας και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του προϊόντος από τον καταναλωτή (Belitz H.D. et al., 2004; Sabatini & Marsilio, 2008). Το άρωμα στα τρόφιμα είναι μία σύνθεση πτητικών συστατικών χαρακτηριστική για το εκάστοτε προϊόν. Σε αυτό συνεισφέρουν κυρίως πτητικές ενώσεις όπως, αλκοόλες, εστέρες, υδρογονάνθρακες, καρβονυλικές ενώσεις, καρβοξυλικά οξέα, πυρανόνες, φουρανόνες, θειούχες ενώσεις, λακτόνες, πυρρολινικά

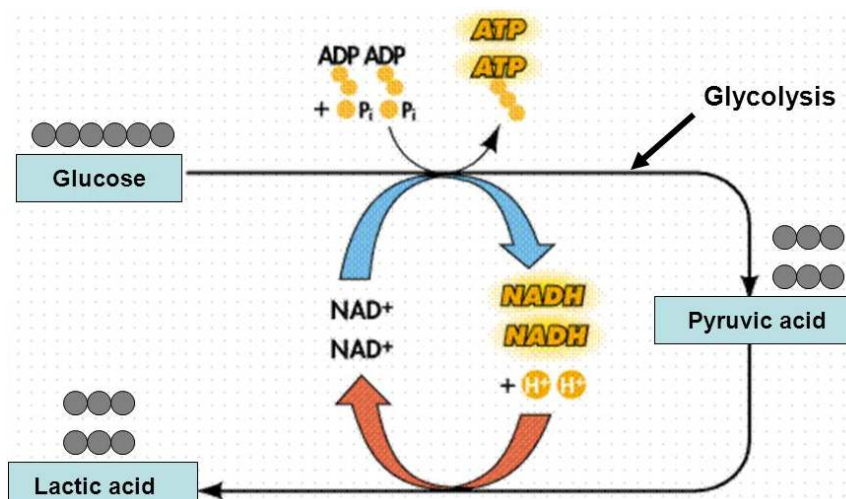
και πυριδινικά παράγωγα, φαινόλες και φαινολικά παράγωγα και τερπένια (Belitz H.D. et al., 2004). Τα πτητικά συστατικά μπορούν να σχηματιστούν σε κάθε στάδιο παραγωγής από όλα τα συστατικά του τροφίμου. Μπορούν να βρίσκονται στις πρώτες ύλες, ή ακόμη και να είναι προϊόντα αντιδράσεων που πραγματοποιούνται κατά την επεξεργασία ή την αποθήκευση του τροφίμου (Plutowska and Wardencki 2007).

Σχετικά με την ελιά, τα πτητικά συστατικά σχηματίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια του κλιμακτηριακού σταδίου (climacteric stage) της ωρίμανσης και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρά κατά την ανάπτυξη του καρπού (Kalua et al. 2007; Sabatini and Marsilio 2008).

3.2. Μεταβολισμός μικροχλωρίδας και συνεισφορά στο άρωμα

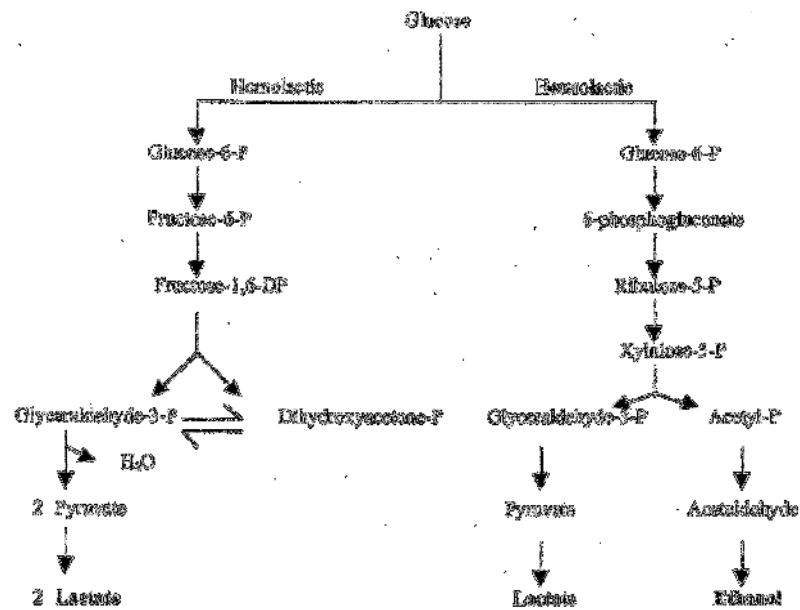
Ο σχηματισμός πτητικών αρωματικών συστατικών στις επιτραπέζιες ελιές είναι μια δυναμική διαδικασία η οποία πραγματοποιείται κυρίως κατά τη ζύμωση της ελιάς από τα ενδογενή οξυγαλακτικά βακτήρια και τις ζύμες, μαζί με μια ποικιλία μολυσματικών μικροοργανισμών, που μέσα από διάφορα βιοχημικά μονοπάτια παράγουν πτητικές ενώσεις από συστατικά του καρπού (Sabatini and Marsilio 2008). Αποτελούν επομένως, ένα αρκετά πολύπλοκο οικοσύστημα στο οποίο, τα ενεργά ενζυμικά συστήματα στα συστατικά του τροφίμου αλληλεπιδρούν με τις μεταβολικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών ζύμωσης (McFeeters, 2004).

Αρχικά, τα γαλακτικά βακτήρια επηρεάζουν άμεσα το άρωμα των ζυμούμενων καρπών, καθώς συμβάλλουν στην δημιουργία οργανοληπτικών χαρακτηριστικών με ποικίλους τρόπους. Κατά τον μεταβολισμό τους, η σημαντικότερη αλλαγή που προκαλούν είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος και η ακολουθούμενη μείωση του pH που προκαλείται μέσω της γαλακτικής ζύμωσης.



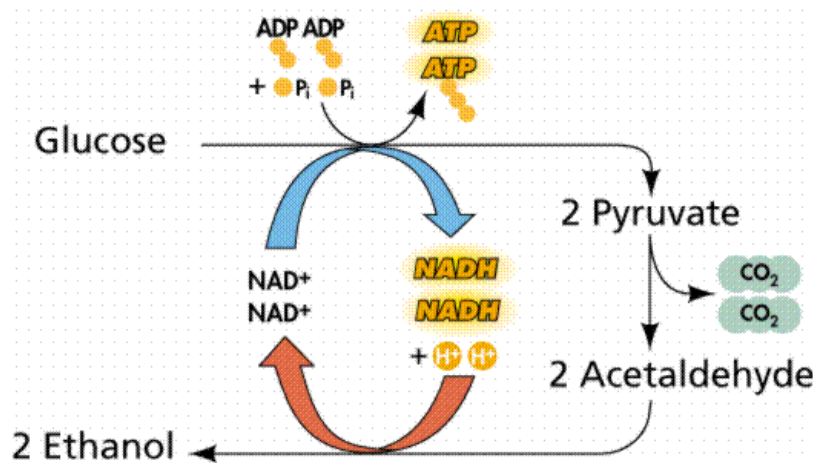
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση γαλακτικής ζύμωσης (Purves, W. K. et al. 1994)

Όπως προαναφέρθηκε, κατά την διαδικασία της ζύμωσης τα γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν τα σάκχαρα μέσω της γαλακτικής ζύμωσης. Όσον αφορά την μεταβολική τους αυτή δραστηριότητα, υπάρχουν δυο μηχανισμοί. Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ από τις εξόζες, μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), ενώ τα ετεροζυμωτικά παράγουν, εκτός από γαλακτικό οξύ, σημαντικές ποσότητες αιθανόλης, οξικού οξέος και διοξείδιο του άνθρακα, μέσω της οδού του φωσφογλυκονικού/φωσφοκετολάσης (6-PG/PK) (Belitz H.D. et al., 2004; Μπαλατσούρας Γ., 1995). Το χαμηλό pH, ο περιορισμός των θρεπτικών υποστρωμάτων ή και η συγκέντρωση του αλατιού μπορεί να σχετίζονται με την εναλλαγή μεταξύ ομοζυμωτικού και ετεροζυμωτικού μεταβολισμού (Bobillo and Marshall 1991).



Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση ομοζυμωτικού και ετεροζυμωτικού μηχανισμού γαλακτικής ζύμωσης (OnlineBiologyNotes.com)

Οι ζύμες επίσης σχετίζονται με την παραγωγή πτητικών ενώσεων που μπορεί να συμβάλλουν στο άρωμα της ελιάς. Μεταβολίζουν τα σάκχαρα μέσω της αλκοολικής ζύμωσης και παράγουν αιθανόλη και κάποια παραπροϊόντα όπως αλκοόλες, ακεταλδεΐδη (από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος) και εστέρες (π.χ. οξικός αιθυλεστέρας από την εστεροποίηση της αιθανόλης με το ακετυλο-CoA).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση αλκοολικής ζύμωσης (Purves, W. K. et al. 1994)

Ωστόσο οι ζύμες, σχετίζονται και με κάποιες μικροβιακές αλλοιώσεις (αεριοθυλάκωση, έντονη παραγωγή CO₂, θόλωμα της άλμης από τον μεγάλο αριθμό των ζυμών) με αποτέλεσμα να συμμετέχουν στο σχηματισμό ανεπιθύμητων οσμών ή γεύσεων (Argoyo-López et al. 2008).

Τα γαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες συνυπάρχουν κατά την διαδικασία της ζύμωσης στις ελιές. Είναι όμως δυνατόν ένας από τους δύο μικροβιακούς πληθυσμούς να επικρατήσει έναντι του άλλου, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στην γεύση και το άρωμα του τελικού προϊόντος (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997; Panagou et al. 2008). Διαφορετική είναι η επίδραση ορισμένων παραγόντων όπως η πτώση του pH, η συγκέντρωση NaCl ή και οι αναερόβιες συνθήκες, στην ανάπτυξη των διαφόρων συστατικών της μικροχλωρίδας. Υψηλή περιεκτικότητα NaCl κατά τη ζύμωση, ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997; Tassou, Panagou, and Katsaboxakis 2002). Ενώ, χαμηλότερα επίπεδα αλατιού ευνοούν την επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των ζυμών (Panagou et al. 2008).

Άλλοι μικροοργανισμοί που περιλαμβάνονται στην φυσική μικροχλωρίδα της ελιάς μπορεί δρουν ανταγωνιστικά σε σχέση με τα γαλακτικά βακτήρια και τις ζύμες και επίσης να παράγουν διάφορες πτητικές ενώσεις οι οποίες σχετίζονται με την αλλοίωση των επιτραπέζιων ελιών και επηρεάζουν το άρωμα του τελικού προϊόντος. Τα γένη *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Enterobacter* και *Escherichia* μπορεί να παράγουν προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ, βουτανόλη, οξικό οξύ ακετόνη κ.α. (McFeeters, 2004).

3.3. Πτητικά συστατικά των επιτραπέζιων ελιών

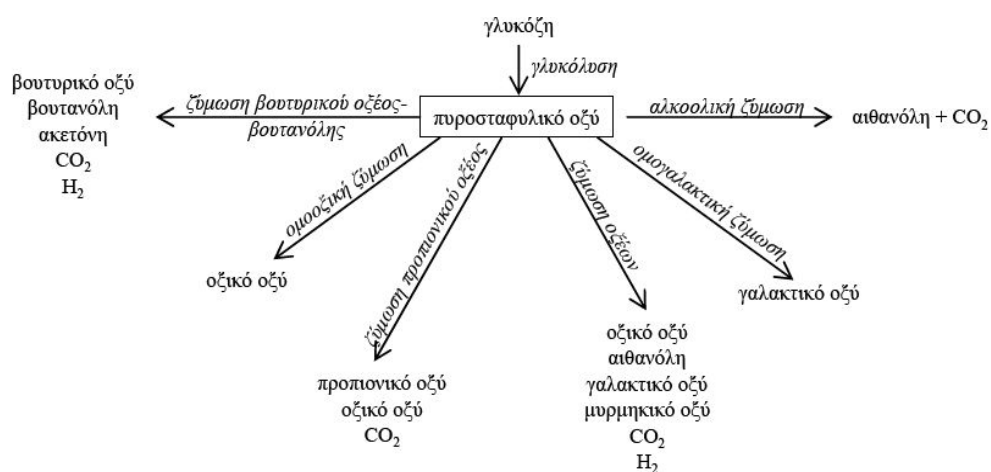
Οι καλής ποιότητας επιτραπέζιες ελιές χαρακτηρίζονται από ένα ευχάριστο φρουτώδες άρωμα. Το άρωμα αυτό προέρχεται από την ισορροπία ενός συνδυασμού πτητικών ενώσεων όπως, αλκοόλες, κετόνες, εστέρες, αλδεΐδες, οξέα κ.α. Η σύσταση

του αρώματος και των πτητικών στις ελιές, είναι άμεσα συνδεδεμένη με μια ποικιλία παραγόντων όπως οι γενετικοί παράγοντες, ο βαθμός ωρίμανσης των πρώτων υλών καθώς και οι συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης του προϊόντος (Garrido-Fernández and Fernández-Díez 1997). Οι διαφορές στη σύσταση του πτητικού προφίλ δίνουν την δυνατότητα σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών ποικιλιών και μεθόδων επεξεργασίας. Επίσης μπορούν να εντοπιστούν τυχόν ανεπιθύμητες οσμές που παράγονται κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Sabatini and Marsilio 2008; Sabatini, Perri, and Marsilio 2009).

Περιορισμένες είναι οι διαθέσιμες πληροφορίες στην βιβλιογραφία, σχετικά με το πτητικό προφίλ στις επιτραπέζιες ελιές. Ωστόσο, έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών ορισμένων ποικιλιών.

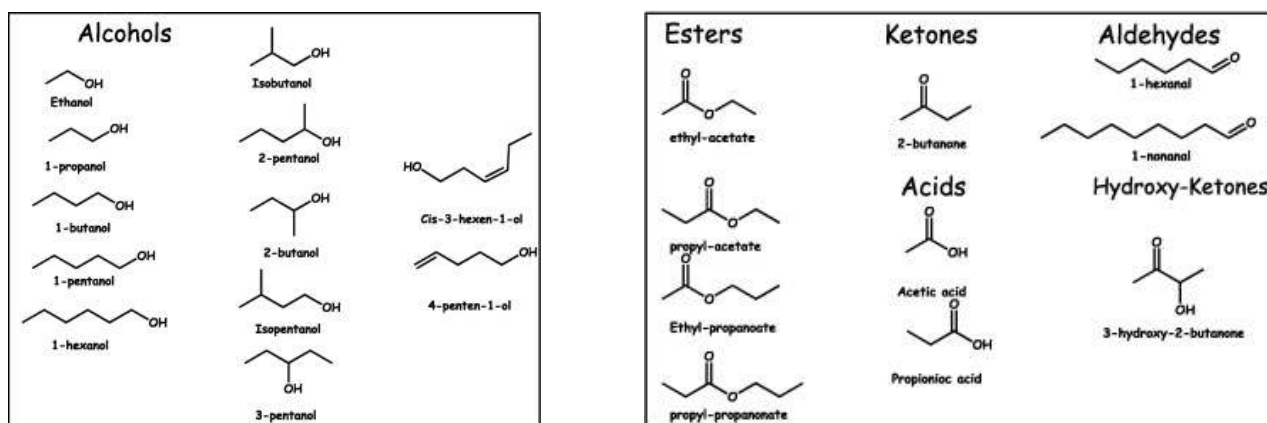
3.4. Παραγωγή των κυριότερων πτητικών ενώσεων

Η ζύμωση στις επιτραπέζιες ελιές περιλαμβάνει την αποδόμηση σύνθετων οργανικών ουσιών σε απλούστερες. Τα σάκχαρα μέσω της γλυκόλυσης μεταβολίζονται προς πυροσταφυλικό οξύ. Από αυτό στην συνέχεια, ανάλογα το είδος της ζύμωσης, προκύπτουν πολλοί μεταβολίτες οι οποίοι μπορεί να είναι πτητικά μονοκαρβοξυλικά οξέα (μυρμηγκικό οξύ, οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ), γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, βουτανόλη, ακετόνη κ.α.



Εικόνα 7. Πτητικά προϊόντα ζύμωσης σακχάρων

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται οι πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν σε επιτραπέζιες ελιές σε σχετική έρευνα που έγινε (Sabatini and Marsilio 2008).



Εικόνα 8. Πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν σε επιτραπέζιες ελιές σε έρευνα των Sabatini & Marsilio, 2008

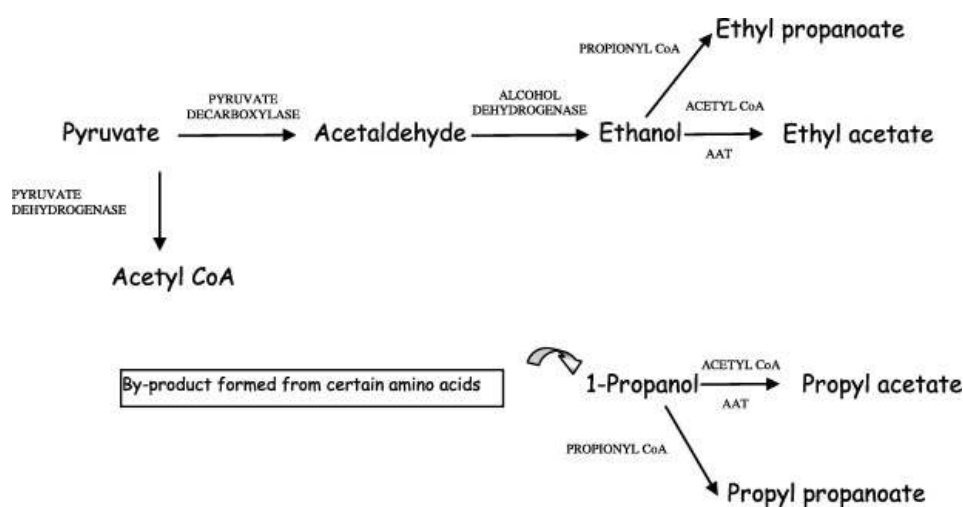
Πιο συγκεκριμένα, σε αρκετές επιστημονικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, σχετικά με τα πτητικά συστατικά στις επιτραπέζιες ελιές (ανεξαρτήτως της μεθόδου επεξεργασίας, [τόσο Ισπανικού τύπου, όσο και Ελληνικού τύπου]), η ακεταλδεΐδη, η αιθανόλη, η μεθανόλη, η 2-βουτανόλη, το μεθυλοσουλφίδιο, η προπανόλη, η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το ισοβουτυρικό οξύ ήταν από τις πιο σημαντικές πτητικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν. Οι περισσότερες από αυτές τις έρευνες, εστίαζαν γύρω από τις προαναφερθείσες ενώσεις (Montaño et al., 2003; Panagou and Tassou, 2006, Panagou et al., 2008, 2011; Sabatini et al., 2009; Sabatini & Marsilio, 2008; Tassou et al., 2002).

Αρκετά βακτήρια, μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού παράγουν **μεθανόλη**. Στις επιτραπέζιες ελιές, η παρουσία της μεθανόλης μπορεί να αποτελεί προϊόν της δράσης των πηκτινολυτικών ενζύμων τα οποία διαχωρίζουν την μεθυλομάδα από την πηκτίνη που βρίσκεται στα κύτταρα των καρπών (Panagou and Tassou, 2006). Η βιοσύνθεση ανώτερων αλκοολών θεωρείται ότι σχετίζεται με την διαδικασία απαμίνωσης των αμινοξέων (Sabatini and Marsilio 2008). Η **αιθανόλη** είναι ένα από τα προϊόντα του μεταβολισμού των ετεροζυμωτικών βακτηρίων, ενώ επίσης αποτελεί κύριο προϊόν του μεταβολισμού των ζυμών μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Η προπανόλη και η 2-βουτανόλη πιθανόν να αποτελούν παραπροϊόντα σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια ζύμωσης.

Η **ακεταλδεΐδη** είναι από τις σημαντικότερες καρβονυλικές ενώσεις που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των επιτραπέζιων ελιών. Αποτελεί κυρίως, προϊόν του μεταβολισμού των ζυμών που πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της αλκοολικής ζύμωσης, όπου το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη, με την βοήθεια του ενζύμου αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος. Μπορεί επίσης να προκύψει και από την μερική οξείδωση της αιθανόλης. Η ακεταλδεΐδη, μαζί με την αιθανόλη παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ζύμωση, αφού η ακεταλδεΐδη και σε μικρότερο βαθμό η αιθανόλη θεωρείται ότι διαμορφώνουν το δευτερεύον άρωμα των ζυμούμενων ελιών (Panagou and Tassou, 2006). Η ακεταλδεΐδη και γενικά οι αλδεΐδες που μπορεί να σχηματίζονται, είναι δυνατόν να μετατραπούν στην συνέχεια, σε πτητικές αλκοόλες με την βοήθεια της

αλκοολικής αφυδρογονάσης ως καταλύτη (ADH, alcohol dehydrogenase) (Conde, Delrot, and Gerós 2008).

Οι πτητικοί **εστέρες**, αποτελούν βασικά συστατικά του αρώματος των καρπών, σε διαφορετικό ωστόσο βαθμό ανάλογα τον καρπό. Αρκετές φορές θεωρούνται το συστατικό που είναι κυρίως υπεύθυνο για την χαρακτηριστική και ευχάριστη γεύση και οσμή που εκτιμούν οι καταναλωτές στο τελικό προϊόν. Η αιθανόλη και η προπανόλη, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των οξικών και προπανοϊκών εστέρων, αντιστοίχως, οι οποίοι συντίθενται κατά την εστεροποίηση των πτητικών αλκοολών με μόρια ακετυλο-CoA και προπιόνυλο-CoA αντίστοιχα, σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο AAT (alcohol-acyl-transferase) (Sabatini & Marsilio 2008). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ένα προτεινόμενο πιθανό μονοπάτι βιοσύνθεσης εστέρων στις επιτραπέζιες ελιές.



Εικόνα 9. Πιθανό μονοπάτι βιοσύνθεσης εστέρων στις επιτραπέζιες ελιές (Sabatini & Marsilio 2008)

Συγκεκριμένα, ο οξικός αιθυλεστέρας, ως έμμεσο προϊόν του μεταβολισμού των ζυμών, σχηματίζεται στο αρχικό στάδιο της ζύμωσης και αυξάνει σταδιακά κατά την επεξεργασία (Panagou, E. et al. 2006). Όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα ζυμούμενα τρόφιμα, συμβάλλει θετικά στο άρωμά τους, ωστόσο η συγκέντρωση του δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 200 mg/L, διότι υπάρχει πιθανότητα να προσδώσει μια δυσάρεστη οσμή στο τελικό προϊόν.

4. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

4.1. Παραλαβή πτητικών

Η κλασική μεθοδολογία ανάλυσης του πτητικού προφίλ ενός τροφίμου περιλαμβάνει αρχικά, την απομόνωση των πτητικών ουσιών από το δείγμα και στην συνέχεια ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των επιμέρους συστατικών του πτητικού κλάσματος. Κοινά προβλήματα, σε όλες τις διαφορετικές τεχνικές παραλαβής των πτητικών ενώσεων από ένα τρόφιμο είναι η πιθανή καταστροφή των πτητικών συστατικών, καθώς και ο σχηματισμός ανεπιθύμητων παρεμποδιζουσών ουσιών κατά την διαδικασία

απομόνωσής τους. Επομένως, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής θα πρέπει να περιορίζει τις τυχόν παρεμποδίσεις, καθώς επίσης και να είναι όσο πιο ήπια γίνεται, προκειμένου να αποφευχθούν οξειδώσεις, υποβάθμιση του προϊόντος ή άλλες πιθανές χημικές ή βιοχημικές αλλαγές στο αρχικό δείγμα. Θα πρέπει ακόμη, να λαμβάνεται υπόψιν ότι, τα πτητικά συστατικά ενός τροφίμου είναι πολλά και διαφέρουν ως προς τη χημική δομή, το μοριακό βάρος και την συγκέντρωσή τους στο εξεταζόμενο δείγμα (Morales & Tsimidou 2000; Sides et al. 2000).

Ορισμένες τεχνικές παραλαβής πτητικών συστατικών από δείγματα τροφίμων είναι:

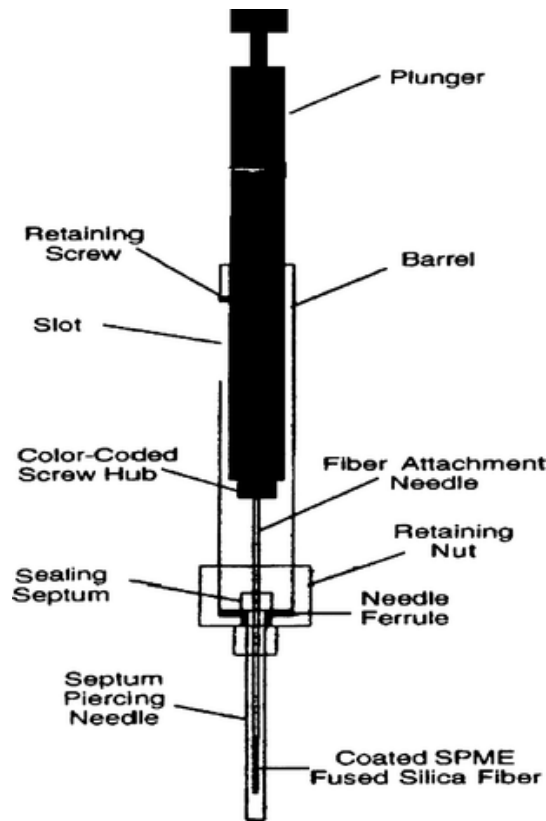
- Απ' ευθείας έγχυση του δείγματος (*Direct injection*)
- Κατανομή στην υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση (*Static Headspace, SHS*)
- Εκχύλιση με διαλύτη (*Solvent Extraction*)
- Απόσταξη με υδρατμούς ή σε συνθήκες ελαττωμένης πίεση (*Distillation*)
- Εκχύλιση με ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση (*Supercritical Fluid Extraction, SFE*),
- Εκχύλιση μετά από συγκράτηση σε στερεή φάση (*Solid Phase Extraction, SPE*)
- Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (*Solid Phase Microextraction, SPME*)
- Θερμική εκρόφηση μετά από συγκράτηση με προσρόφηση σε στερεή φάση (*Dynamic Headspace DHS*)

Ωστόσο, η επιλογή της μεθόδου που εφαρμόζεται κάθε φορά εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης για τις ανάγκες της οποίας είναι απαραίτητη η παραλαβή των πτητικών συστατικών από τα δείγματα του προς εξέταση τροφίμου (Morales and Tsimidou 2000; Sides, Robards, and Helliwell 2000).

4.1.1. Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (*Solid phase microextraction, SPME*)

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Pawliszyn και Arthur και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5–50ng/L(ppb) για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Πρόκειται για μια γρήγορη, εύκολα αυτοματοποιούμενη και οικονομική διαχωριστική τεχνική (Pawliszyn J., 1997).

Η συσκευή SPME ομοιάζει με σύριγγα και αποτελείται από μια διάταξη η οποία συγκρατεί την ίνα, και έναν αγωγό μέσα στον οποίο αυτή προστατεύεται. Η ίνα είναι τοποθετημένη στο εσωτερικό της βελόνας της σύριγγας και με την βοήθεια ενός ελατηρίου, μπορεί να εξέρχεται από τον αγωγό. Η ίνα είναι κατασκευασμένη από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) και επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό (Vas and Vékey 2004).

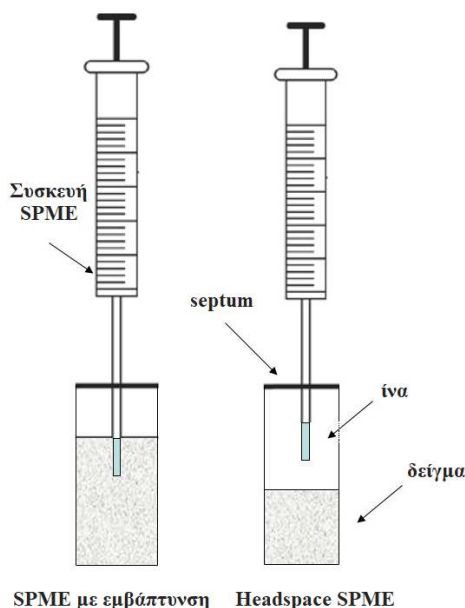


Εικόνα 10. Διάταξη συσκευής – ίνας SPME (Aulakh et al. 2005)

Πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η προσρόφηση των πτητικών συστατικών στην ίνα SPME και στο δεύτερο στάδιο, τα πτητικά συστατικά που έχουν προσροφηθεί πάνω στην ίνα, εκροφόνται από αυτήν. Πιο αναλυτικά, το δείγμα είναι τοποθετημένο σε ένα φιαλίδιο το οποίο θερμοστατείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για ορισμένο χρονικό διάστημα. Η βελόνα της σύριγγας σε πρώτη φάση, εισάγεται μέσω ενός ελαστικού παρεμβύσματος (septum) στο φιαλίδιο. Με την βοήθεια του εμβόλου στην συνέχεια, η ίνα εξέρχεται από την βελόνα και είναι σε θέση να προσροφήσει τα πτητικά συστατικά του δείγματος. Σε δεύτερη φάση η ίνα επανέρχεται στην βελόνα όπου και προστατεύεται και η σύριγγα απομακρύνεται από το φιαλίδιο. Ακολουθεί εισαγωγή της βελόνας στην διάταξη έγχυσης δείγματος του αέριου χρωματογράφου. Σε τελική φάση, τα προσροφόμενα στην στατική φάση της ίνας, πτητικά συστατικά εκροφόνται από αυτήν με θερμική εκρόφηση και μεταφέρονται με την βοήθεια του φέροντος αερίου στην τριχοειδή στήλη του αέριου χρωματογράφου για διαχωρισμό, ταυτοποίηση και μέτρηση. Τέλος η βελόνα εξάγεται από τον εισαγωγέα δείγματος.

Η προσρόφηση των πτητικών πάνω στην ίνα μπορεί να γίνει με δύο τρόπους οι οποίοι διαφέρουν στην θέση τοποθέτησης της ίνας στο δείγμα. Στην μια περίπτωση η ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα (υδατικό διάλυμα) γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τα πτητικά συστατικά του να προσροφούνται στο πολυμερικό υλικό. Στην άλλη περίπτωση, είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών

από το δείγμα στην υπερκείμενη αέρια φάση (headspace) του φιαλιδίου, μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί το προς ανάλυση δείγμα (Pawliszyn J., 1997; Pillonel et al., 2002). Η headspace εκδοχή της SPME (HS-SPME) επιλέγεται στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι μία πτητική ή ημιπτητική ουσία. Με την εφαρμογή της μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός του επιθυμητού συστατικού, όταν στο ίδιο υπόστρωμα συνυπάρχουν μη πτητικές παρεμποδίσσεις, ενώ ταυτόχρονα ελαχιστοποιείται η προσρόφηση ουσιών που μπορούν να αλλοιώσουν ή να καταστρέψουν την ίνα.



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση προσρόφησης πτητικών συστατικών στην ίνα SPME με εμφύπτυνση (αριστερά) και από το εσωτερικό διάκενο χώρο (headspace) (δεξιά) (Θεοδορίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, 2015)

Η χρήση μικρής ποσότητας δείγματος, το χαμηλό κόστος, ο ελάχιστος χρόνος που απαιτείται για την προσρόφηση των πτητικών, η απουσία διαλύτη και η υψηλή ευαισθησία είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής και είναι ιδανική για χρήση σε συνδυασμό με την τεχνική GC-MS.

4.2. Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (GC – MS)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό χημικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού των πτητικών συστατικών ενός δείγματος. Σε αυτή, η κινητή φάση είναι ένα αδρανές αέριο, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι υγρή ή στερεή. Όταν αναλύονται δείγματα τροφίμων, η στατική φάση είναι συνήθως ένα μη πτητικό υγρό που είναι καθηλωμένο σε στερεό φορέα που αποτελεί το υλικό πλήρωσης της στήλης ή στα εσωτερικά τοιχώματα της. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου είναι, οι εξεταζόμενες ουσίες να είναι πτητικές ή να

μετατρέπονται με κατάλληλο τρόπο σε πτητικά παράγωγα. Ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στις διαφορές που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητές τους, όπως το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία, το μέγεθος των μορίων κ.α. Οι διαφορές αυτές διαφοροποιούν τη σχετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς την στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι η κινητή φάση διερχόμενη μέσα από την στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μίγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (Χατζηιωάννου Θ., 2010).

Οι βασικές μονάδες ενός συστήματος αερίου χρωματογράφου είναι:

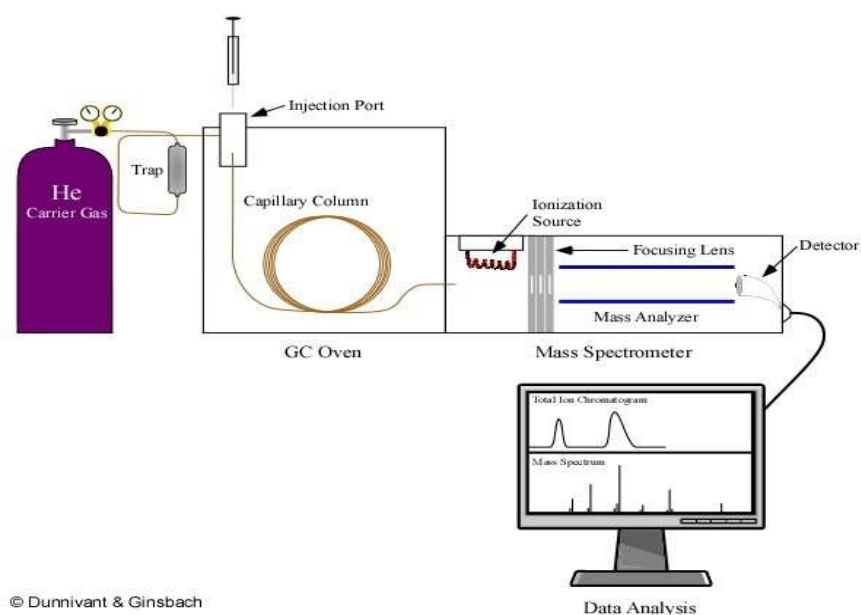
1. η οβίδα φέροντος αερίου (κινητή φάση), ο ρυθμιστής πίεσης και το μανόμετρο
2. το σύστημα εισαγωγής δείγματος
3. ένας θερμοστατούμενος κλίβανος ο οποίος περιλαμβάνει την χρωματογραφική στήλη
4. ο ανιχνευτής και ο ενισχυτής σήματος
5. ο καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι χημικώς αδρανές έναντι του υλικού κατασκευής του αεριοχρωματογράφου, του πληρωτικού υλικού της στήλης και των προς διαχωρισμό ουσιών. Χρησιμοποιούνται κυρίως ήλιο He, άζωτο N₂ και αργό Ar. Η επιλογή του γίνεται κυρίως με βάση τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Ο ρυθμιστής ρυθμίζει την πίεση από 100-200 atm που επικρατούν στη φιάλη σε 1-3 atm που επικρατούν στην είσοδο της στήλης. Το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής που φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum) το οποίο δρα σαν βαλβίδα που επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, όχι όμως την έξοδο αυτού και του φέροντος αερίου. Ο εισαγωγέας μπορεί να βρίσκεται σε λειτουργία μη διαμοιρασμού - splitless (όλο το δείγμα που εισάγεται με την ένεση εισέρχεται στη στήλη διαχωρισμού) ή διαμοιρασμού - split (μέρος του δείγματος εισέρχεται στη στήλη διαχωρισμού, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται στο περιβάλλον από την βαλβίδα split). Στη λειτουργία split, το ποσοστό διαχωρισμού του δείγματος περιγράφεται με τον όρο λόγος διαμοιρασμού (split ratio), που είναι ο λόγος της ροής του φέροντος αερίου προς τη ροή του αερίου από την έξοδο split. Η στήλη είναι μέσα στον θερμοστατούμενο κλίβανο, όπου η θερμοκρασία της μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης με συγκεκριμένο πρόγραμμα.

Το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κορυφή της χρωματογραφικής στήλης. Τα διαχωριζόμενα συστατικά, εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και με την βοήθεια του φέροντος αερίου διέρχονται από τον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής συνδέεται με καταγραφικό, όπου οι πληροφορίες που λαμβάνονται καταγράφονται σε μορφή φάσματος. Ο χρόνος ο οποίος μεσολαβεί από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η ουσία φτάνει στον ανιχνευτή (εμφανιστεί δηλαδή η κορυφή στο χρωματογράφημα) ονομάζεται **χρόνος**

κατακράτησης και συμβολίζεται με t_R . Η ερμηνεία του φάσματος στηρίζεται στην σύγκριση του χρόνου κατακράτησης της άγνωστης ουσίας με τον αντίστοιχο συγκεκριμένης πρότυπης ουσίας. Ωστόσο, από μόνος του ο χρόνος κατακράτησης δεν μπορεί να ταυτοποιήσει ένα συστατικό. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής, το Φασματόμετρο Μαζών (Skoog A. et al., 2005; Feng et al., 2019).

Ο συνδυασμός της αέριας χρωματογραφίας με την φασματομετρία μαζών αποτελεί μια πολύ αποτελεσματική αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση δειγμάτων τροφίμων και χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία, υψηλή εξειδίκευση και ταχύτητα.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των βασικών μονάδων ενός συστήματος αέριου χρωματογράφου (Wu et al. 2012)

Τα συστατικά του δείγματος που έχουν διαχωριστεί, βγαίνουν από τον αέριο χρωματογράφο, εισέρχονται όντας σε αέρια κατάσταση στο φασματόμετρο μαζών. Στο θάλαμο ιονισμού του φασματόμετρου μαζών, τα μόρια των συστατικών του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα με μικρότερη μάζα. Συχνά ο ιοντισμός αυτός, γίνεται με βομβαρδισμό των αέριων μορίων της ένωσης με **δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Ionization EI)** μεγάλης κινητικής ενέργειας συνήθως 70eV. Κατά την πορεία τους τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με μερικά από τα μόρια της ένωσης οπότε αυτά διασπώνται και παράγονται θετικά μοριακά ιόντα με μικρότερη μάζα. Όλα τα παραγόμενα ιόντα έχουν τυχαίες κατευθύνσεις, το ισχυρό όμως ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί σύγκλιση των ιόντων σε μια λεπτή ταινιωτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με τον λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα που θα προκύψει από την ένταση του

μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/z αποτελεί το φάσμα μαζών (Feng et al., 2019; Χατζηιωάννου Θ., 2010)

4.3. Ηλεκτρονική μύτη (e-nose)

Από πρακτικής άποψης, στις καθημερινές εφαρμογές είναι αρκετά χρονοβόρο και επίπονο να χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία για τον προσδιορισμό ενός σύνθετου δείγματος πτητικών ενώσεων. Μια αρκετά ενδιαφέρουσα εναλλακτική είναι η χρήση ενός αυτοματοποιημένου συστήματος όπως η ηλεκτρονική μύτη, το οποίο όχι μόνο μιμείται την ανθρώπινη όσφρηση αλλά είναι επίσης ικανό να ταυτοποιεί και να ταξινομεί τις πτητικές ενώσεις (Srivastava, Mishra, and Mishra 2019).

Η πρώτη καταγεγραμμένη επιστημονική προσπάθεια για χρήση ηλεκτρονικών αισθητήρων πραγματοποιήθηκε από τους Persaud και Dodd το 1982. Αυτοί έφτιαξαν μία συσκευή η οποία αποτελούνταν από μία σειρά τριών αισθητήρων αερίου που χρησιμοποιούνταν για τη διάκριση είκοσι διαφορετικών ουσιών (Persaud and Dodd 1982).

Η εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης η οποία συχνά αναφέρεται και ως τεχνητή όσφρηση έχει τεράστια αναδυόμενη σημασία τα τελευταία χρόνια. Πρόκειται για ένα σύγχρονο αναλυτικό εργαλείο το οποίο μιμείται το οσφραντικό σύστημα της ανθρώπινης μύτης (Smolander 2003). Το όργανο αποτελείται από μια συστοιχία αισθητήρων, μια μονάδα συλλογής σήματος και ένα λογισμικό ανάλυσης δεδομένων, το οποίο αναλύει το σήμα με στατιστικές μεθόδους αναγνώρισης προτύπων, όπως Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant Factorial Analysis, DFA) και Ανάλυση Συστάδων (Cluster Analysis), καθώς επίσης και Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks), Μηχανές Υποστήριξης Διανυσμάτων (Support Vector Machines), Τυχαία Δάση (Random Forest) (Guerrero et al., 2006; Peris & Escuder-Gilabert, 2009; Tian et al., 2013). Το δείγμα θερμοστατείται σε ειδικό σφραγισμένο φιαλίδιο για ορισμένο χρονικό διάστημα ώστε τα πτητικά συστατικά του να διαχυθούν στο διάκενο χώρο (headspace). Τα πτητικά λαμβάνονται από την υπερκείμενη αέρια φάση με ειδική σύριγγα και εισάγονται στην ηλεκτρονική μύτη. Η ανταπόκριση των αισθητήρων στις πτητικές ενώσεις ενός δείγματος μεταφράζεται ως αλλαγή στις ηλεκτρικές τους ιδιότητες, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα σήμα από κάθε αισθητήρα. Το συνδυασμένο μοτίβο αυτών των αλλαγών-σημάτων από όλους τους αισθητήρες σχηματίζει ένα πτητικό «δακτυλικό αποτύπωμα» για το δείγμα. Η ηλεκτρονική μύτη απαιτεί «εκπαίδευση» με πρότυπα δείγματα για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Creed 2010). Διαφορετικές πτητικές ενώσεις προκαλούν διαφορετικές αποκρίσεις στους αισθητήρες και συνεπώς διαφορετικά μοτίβα. Ο υπολογιστής αξιολογεί το μοτίβο σήματος και μπορεί να συγκρίνει τα αρώματα διαφορετικών δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αναγνώριση μοτίβου (Srivastava, Mishra, and Mishra 2019). Τα αποτελέσματα είναι ποιοτικά, παρά ποσοτικά. Οι μεμονωμένες ενώσεις δεν διαχωρίζονται/ταυτοποιούνται με την ηλεκτρονική μύτη, αλλά τα δείγματα μπορούν να ταξινομηθούν σε αποδεκτά ή μη αποδεκτά σύμφωνα με το

δακτυλικό αποτύπωμα των πτητικών ενώσεων και τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με μια μέθοδο αναφοράς (π.χ. οργανοληπτική αξιολόγηση ή μικροβιολογική ανάλυση). Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με τη συσχέτιση μεταξύ των αποκρίσεων του αισθητήρα και της ποιότητας του δείγματος, το σύστημα μπορεί να ρυθμιστεί για να ταξινομήσει δείγματα άγνωστης ποιότητας (Smolander 2003). Τα δεδομένα από την ανάλυση με ηλεκτρονική μύτη βρέθηκαν επίσης να συσχετίζονται καλά με κλασικές αναλυτικές τεχνικές (GC-MS) (Creed 2010).

Οι αισθητήρες κατασκευάζονται από οξειδία μετάλλων ή οργανικά πολυμερή, αν και πιο πρόσφατα, έχουν χρησιμοποιηθεί ακουστικά κύματα επιφανείας και πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι. Μπορούν να ανταποκριθούν σε πτητικές ενώσεις με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 30 έως 300. Μόρια όπως αλκοόλες, κετόνες, λιπαρά οξέα και εστέρες δίνουν ισχυρή απόκριση, ενώ πλήρως οξειδωμένα μόρια, όπως CO₂, NO₂ και H₂O έχουν χαμηλότερη απόκριση. Η διάταξη των αισθητήρων μπορεί επίσης να αναγνωρίσει μόρια που περιέχουν ομάδες θείου και αμίνης. Προβλήματα ενδέχεται να υπάρξουν όταν αναλύονται δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, καθώς πολλοί από τους αισθητήρες ανταποκρίνονται έντονα στο νερό, εμποδίζοντας να παρατηρηθούν τυχόν διαφορές ανάμεσα στα δείγματα (Creed 2010; Srivastava, Mishra, and Mishra 2019)

Η εφαρμογή της ηλεκτρονικής μύτης στην ανάλυση τροφίμων είναι αρκετά διαδεδομένη, καθώς έχει αποδειχθεί ότι ανιχνεύει πτητικά συστατικά των τροφίμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ποιότητάς τους (Creed 2010; Zhong 2019). Πιο συγκεκριμένα, τα τρόφιμα συχνά αποτελούν ιδανικό μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών. Η σύνθεση των πτητικών ενώσεων που εντοπίζονται σε ένα τρόφιμο μπορεί να αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα και τον τύπο των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε αυτό και μπορεί επίσης να σχετίζεται με την ποιότητά του. Έτσι, η ηλεκτρονική μύτη φαίνεται να είναι ένα χρήσιμο μέσο για την ανίχνευση τέτοιων αλλαγών (Zhong 2019) Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανάλυση του αρώματος φρούτων όπως, πεπόνια (Benady et al. 1995), αχλάδια (Oshita et al. 2000), ροδάκινα (Molto et al. 1999), νεκταρίνια (Natale et al. 2001), μάνγκο (Li et al. 2009) και εσπεριδοειδή (Pallottino et al. 2012). Οι περισσότερες έρευνες επικεντρώθηκαν στην ταξινόμηση των ποικιλιών ή στην αξιολόγηση των αλλαγών στο αρωματικό προφίλ κατά την ωρίμανση, καθώς το άρωμα είναι ένας σημαντικός δείκτης ωριμότητας που σχετίζεται με την αποδοχή του προϊόντος από τους καταναλωτές (Nicolai et al. 2009). Αρκετές έρευνες έχουν γίνει επίσης για την ανάλυση των πτητικών με την μέθοδο αυτή σε λάδι (Hai and Wang 2006), γάλα (Labreche et al. 2005), σιτάρι (Evans et al. 2000) και ρύζι (Srivastava, Mishra, and Mishra 2019).

Σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης (headspace GC), η ηλεκτρονική μύτη είναι πολύ πιο ασφαλής, οικονομικά αποδοτική, γρήγορη, μη καταστρεπτική και θα μπορούσε να αυτοματοποιηθεί εύκολα (Peris and Escuder-Gilabert 2009). Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν την ηλεκτρονική μύτη

ιδανική για χρήση στον έλεγχο ρουτίνας των τροφίμων (Srivastava, Mishra, and Mishra 2019).



Εικόνα 13. Σύστημα ηλεκτρονικής μύτης Alpha M.O.S. (Alpha MOS - HVDLifesciences.com)

5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

5.1. Χημειομετρία

Η χημειομετρία είναι ένας αναπτυσσόμενος επιστημονικός κλάδος με την βοήθεια του οποίου γίνεται εφικτό να αντλήσουμε πληροφορίες από τα δεδομένα διαφόρων χημικών συστημάτων. Η ανάλυση και η ερμηνεία μεταβολικών δεδομένων για περισσότερα από πενήντα δείγματα, με δεκάδες χαρακτηριστικά (κορυφές, μεταβολίτες, συγκεντρώσεις) είναι αρκετά περίπλοκη. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η μείωση του αριθμού των μεταβλητών. Για τον λόγο αυτό, προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια τέτοια ανάλυση δεδομένων, χρησιμοποιούνται στατιστικές μέθοδοι και τεχνικές που χρησιμοποιούν ταυτόχρονα ανάλυση μιας ή περισσότερων εξαρτημένων μεταβλητών έναντι δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών. Αυτές οι μέθοδοι επεξεργασίας πολυδιάστατων δεδομένων είναι γνωστές ως πολυμεταβλητές στατιστικές αναλύσεις και επιτρέπουν τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό

αγνώστων δειγμάτων αλλά και την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα (Putnik et al. 2019).

Δύο είναι οι κατηγορίες των στατιστικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην χημειομετρία: οι επιβλεπόμενες (supervised) και οι μη επιβλεπόμενες (unsupervised). Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμεύουν στην ανάλυση της συνολικής δομής ενός συνόλου δεδομένων, ομαδοποιώντας τα ανάλογα με τα κοινά τους χαρακτηριστικά. Οι επιβλεπόμενες τεχνικές, χρησιμεύουν για τον ακριβή προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης ομάδας μεταβολιτών-ενώσεων. Συσχετίζουν γνωστές δομές δεδομένων με πρότυπα και κανόνες προκειμένου να γίνει εφικτή η πρόβλεψη νέων δεδομένων (Cao et al. 2019; Srivastava et al. 2019).

5.1.1. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)

Πρόκειται για μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, με την PCA δίνεται η δυνατότητα οπτικοποίησης των δεδομένων από τον πολυδιάστατο στο τρισδιάστατο χώρο. Σκοπός είναι να γίνουν τα αποτελέσματα πιο κατανοητά δημιουργώντας νέες μεταβλητές, μη συσχετιζόμενες, τις λεγόμενες κύριες συνιστώσες (PC). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιούνται γραμμικοί συνδυασμοί των μεταβολιτών που εντοπίστηκαν και ταυτόχρονα γίνεται μεγιστοποίηση της διακύμανσης του δείγματος. Στοχεύει στο να εξηγήσει με τον καλύτερο τρόπο την διακύμανση των αρχικών δεδομένων (X), χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η κατηγορία στην οποία ανήκουν (Y) (Bijlsma et al. 2006). Η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει τη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Η δεύτερη συνιστώσα εξηγεί με τη σειρά της τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση, αυτή δηλαδή που δεν μπορεί να εξηγήσει η πρώτη συνιστώσα, και η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τις υπόλοιπες συνιστώσες (Dudzic et al. 2017).

5.1.2. Διακριτική Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares regression-Discriminant Analysis, PLS-DA) και OPLS-DA

Η PLS-DA είναι μια επιβλεπόμενη μέθοδος ομαδοποίησης των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, χρησιμοποιούνται προηγούμενες γνώσεις-δεδομένα σχετικά με τις κατηγορίες (Y) κατά την ταξινόμηση. Στη συνέχεια προβάλλει τις μεταβλητές (X) σε ένα χώρο λίγων διαστάσεων που μεγιστοποιεί τον διαχωρισμό μεταξύ των διαφόρων ομάδων δεδομένων στις πρώτες διαστάσεις. Αυτές οι επονομαζόμενες λανθάνουσες μεταβλητές κατατάσσονται με βάση το πόσο καλά εξηγούν τη διακύμανση του Y. Χρησιμεύει στις περιπτώσεις όπου ο όγκος των ανεξάρτητων μεταβλητών που πρέπει να αναλυθούν είναι αρκετά μεγάλος (Dudzic et al. 2017; Srivastava et al. 2019). Το OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares), όπως το PLS-DA, είναι ένα επίσης ισχυρό εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη μείωση των διαστάσεων και την αναγνώριση χαρακτηριστικών που οδηγούν στο διαχωρισμό των δεδομένων σε ομάδες. Είναι και αυτή μια επιβλεπόμενη μέθοδος μοντελοποίησης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντί για το PLS-DA λόγω των καλύτερων δυνατοτήτων που έχει στη διάκριση μεταξύ παραλλαγών σε ένα σύνολο δεδομένων που είτε σχετίζονται είτε όχι με την πρόβλεψη ομάδων. Υπό αυτήν την

έννοια, με τη χρήση του OPLS-DA τείνουν να προκύπτουν μοντέλα που είναι λιγότερο περίπλοκα και πιο διορατικά από αυτά του PLS-DA. Ωστόσο, τόσο το OPLS-DA όσο και το PLS-DA είναι εξίσου επιρρεπή στη δημιουργία μοντέλων που υπερβαίνουν τα δεδομένα, επομένως απαιτούν διασταυρούμενη επικύρωση για να διασφαλιστεί η αξιοπιστία του μοντέλου (Worley & Powers 2013, 2016).

5.1.3. Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant Factor Analysis, DFA)

Η Διακριτική παραγοντική ανάλυση (DFA) είναι μια ακόμη επιβλεπόμενη μέθοδος, η οποία, όπως και η PLS-DA, διερευνά την πιθανότητα ταξινόμησής αγνώστων δειγμάτων σε μια συγκεκριμένη ομάδα. Ως αποτέλεσμα, παρουσιάζει πόσο καλά διαφέρουν οι ομάδες μεταξύ τους (Srivastava et al. 2019).

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το άρωμα της επιτραπέζιας ελιάς παίζει σπουδαίο ρόλο στην ποιότητα και την αποδοχή της από τους καταναλωτές. Ως προϊόν ζύμωσης, οι ελιές χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλία πτητικών ουσιών οι οποίες συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, οι διαθέσιμες από τη βιβλιογραφία πληροφορίες για τα πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν στο άρωμα της βρώσιμης ελιάς Ισπανικού τύπου είναι περιορισμένες. Συνεπώς, η καταγραφή του πτητικού προφίλ, σε ελιές Ισπανικού τύπου ζύμωσης, είναι εύλογα ένα αρκετά ενδιαφέρον επιστημονικό αντικείμενο έρευνας. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη, καταγράφηκε η μεταβολή του πτητικού αποτυπώματος δύο ποικιλιών πράσινης ελιάς Ισπανικού τύπου, «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική», κατά την διάρκεια της αποθήκευσής τους για διάστημα 12 μηνών σε πλαστικές συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Η εξέταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών, πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της τεχνικής SPME-GCMS αλλά και με την χρήση της ηλεκτρονικής μύτης Alpha M.O.S. Ταυτόχρονα, έγινε έλεγχος για την πιθανότητα διαφοροποίησης των δύο ποικιλιών ανάλογα με το πτητικό προφίλ τους. Τέλος, εξερευνήθηκε η επίδραση της χρήσης διαφορετικών πλαστικών μέσων συσκευασίας στην παραγωγή των πτητικών συστατικών.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Δείγματα – Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα επιτραπέζιας πράσινης ελιάς δύο διαφορετικών ποικιλιών, «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική». Η επεξεργασία τους είχε πραγματοποιηθεί με την Ισπανική μέθοδο και είχαν εκπυρηνωθεί. Επιπλέον, μετά το πέρας της ζύμωσής τους, οι ελιές συσκευάστηκαν σε δυο διαφορετικούς τύπους πλαστικής συσκευασίας με διαφορετικά πολυστρωματικά φιλμ, στα οποία εγχύθηκε αέριο μίγμα για την δημιουργία της επιθυμητής τροποποιημένης ατμόσφαιρας συντήρησης, η οποία ήταν 70% άζωτο (N₂) και 30% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂). Τα δείγματα συντηρούνταν σε θερμοκρασία δωματίου για δώδεκα μήνες. Κατά την διάρκεια της συντήρησης ελήφθησαν δείγματα σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Για κάθε ποικιλία και συσκευασία, το πείραμα της συντήρησης επαναλήφθηκε δύο φορές. Επομένως, συλλέχθηκαν συνολικά 24 δείγματα ανά ζεύγος ποικιλία - συσκευασία καθώς και το σημείο 0 που αντιστοιχούσε στην ημερομηνία συσκευασίας.

Πίνακας 2. Σημεία δειγματοληψίας ελιάς από τις διαφορετικές ποικιλίες και συσκευασίες κατά την διάρκεια της συντήρησης των 12 μηνών

Ποικιλία- Συσκευασία/Μήνες συντήρησης	Κονσερβολιά		Χαλκιδική	
	Συσκευασία 1	Συσκευασία 2	Συσκευασία 1	Συσκευασία 2
Σημείο 0	0	0	0	0
Σημείο 1	1	1	1	1
Σημείο 2	2	2	2	2
Σημείο 3	3	3	3	3
Σημείο 4	4	4	4	4
Σημείο 5	5	5	5	5
Σημείο 6	6	6	6	6
Σημείο 7	7	7	7	7
Σημείο 8	8	8	8	8
Σημείο 9	9	9	9	9
Σημείο 10	10	10	10	10
Σημείο 11	12	12	12	12

Τα δείγματα επιτραπέζιας ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη χορηγήθηκαν από το εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων στο οποίο πραγματοποιήθηκε και η συντήρησή τους. Επίσης εκεί έγιναν οι μικροβιολογικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών, καθώς και η ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S.

2. Όργανα - Υλικά

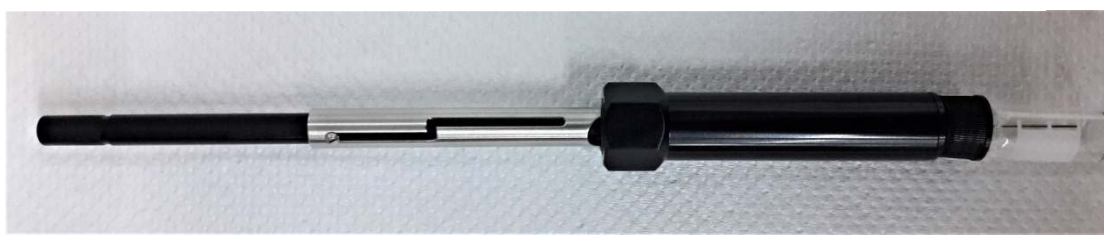
2.1. Υλικά και σκεύη

Τα διαλύματα, οι ουσίες και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική πορεία ήταν τα εξής:

- Υγρό άζωτο
- Υδατικό διάλυμα 1,4-διοξανίου συγκέντρωσης 1000 mg/mL ως εσωτερικό πρότυπο σε κάθε χρωματογραφική ανάλυση
- Γυάλινα φιαλίδια όγκου 20 mL με βιδωτά πώματα που φέρουν PTFE/Silicone παρέμβυσμα,
- SPME ίνα (Carboxen/DVB/PDMS, 50/30 μm , *Agilent Technologies*)
- Συσκευή SPME, Fiber assembly holder, (*Agilent Technologies*)
- Σύριγγα εκρόφησης e-nose
- Θερμόμετρο



Εικόνα 14. Γυάλινα φιαλίδια όγκου 20 mL με πώματα που εφαρμόζονται με ειδικό πιεστήριο (αριστερά), με βιδωτό πώμα φέρουν παρέμβυσμα από PTFE/Silicone (δεξιά)



Εικόνα 15. Ίνα SPME (*Agilent Technologies*)

2.2. Συσκευές - Όργανα

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν τα εξής:

- Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός με ακρίβεια ζύγισης τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

- Ηλεκτρική θερμαντική εστία
- Αέριος χρωματογράφος-Φασματοόμετρο Μαζών GCMS QP2010 Ultra (Shimadzu)
- Συσκευή ηλεκτρονική μύτης (E-nose), Alpha Soft Fox 2.0, (Alpha M.O.S, France)



Εικόνα 16. Αέριος χρωματογράφος-Φασματοόμετρο Μαζών GC-MS (Shimadzu)

2.4. Τριχοειδής στήλη

Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο ήταν DB-WAX με πολική στατική φάση (cross-linked/surface bonded 100% polyethylene glycol PEG), μήκους 30 m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25 mm και πάχος υμενίου στατικής φάσης 0,25 μm (Agilent Technologies).

3. Μέθοδοι – Πειραματική πορεία

3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Όλα τα δείγματα διατηρούνταν στην κατάψυξη μέχρι την στιγμή της προετοιμασίας τους. Η συσκευασία κάθε δείγματος περιλάμβανε ελιές χωρίς κουκούτσι που ζύγιζαν περίπου 5-10 g. Όλη η ποσότητα των ελιών από κάθε συσκευασία αλέστηκε με σκοπό να μετατραπεί σε σκόνης ελιάς. Η διαδικασία αυτή είχε ως εξής: Αρχικά όλη η ποσότητα των ελιών της εκάστοτε συσκευασίας μεταφερόταν σε ειδικό δοχείο γεμάτο με υγρό άζωτο, προκειμένου οι ελιές να παγώσουν και να είναι ευκολότερη η άλεση τους. Στην συνέχεια οι παγωμένες ελιές μεταφέρονταν σε συσκευή άλεσης και μετατρέπονταν σε σκόνη. Τα δείγματα ελιών σε σκόνη αποθηκεύονταν στην κατάψυξη μέχρι την στιγμή της περαιτέρω ανάλυσής τους.

3.2. Απομόνωση και προσδιορισμός πτητικών συστατικών

3.2.1. Διαδικασία εκχύλισης των πτητικών συστατικών των δειγμάτων με SPME

Για την απομόνωση των πτητικών συστατικών από τα δείγματα ελιάς σε σκόνη, με την χρήση SPME χρησιμοποιήθηκε ένα SPME (Agilent Technologies). Αρχικά ζυγίζονται 0,5 g από το εκάστοτε δείγμα, σε φιαλίδιο των 20 ml με βιδωτό πώμα που φέρει PTFE/Silicone παρέμβυσμα. Στη συνέχεια προστίθενται 1 ml εσωτερικού προτύπου 1,4-διοξάνιο με την βοήθεια αυτόματης πιπέτας. Μετά, το δείγμα θερμαίνεται στο θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 40°C για 15 λεπτά για εξισορρόπηση των φάσεων. Ύστερα από το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η ένα SPME εισάγεται στο φιαλίδιο με το δείγμα για 30 επιπλέον λεπτά για την πραγματοποίηση της εκχύλισης των πτητικών συστατικών. Όταν η ένα έχει προσροφήσει τα πτητικά συστατικά απομακρύνεται από το φιαλίδιο και εισάγεται στο σύστημα GC-MS για ανάλυση.

3.2.2. Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μαζών (GC-MS)

Ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra. Τα πτητικά συστατικά εκφροφήθηκαν στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου σε λειτουργία μη διαμοιρασμού (splitless) για 5 min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα διατηρήθηκε στους 240°C. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε Ήλιο με σταθερή γραμμική ταχύτητα (36 cm/s). Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη DB-WAX (30 m X 0,25 mm, d.f. 0,25 μm). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 3. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των πτητικών συστατικών των επιτραπέζιων ελιών

	Ρυθμός ανόδου (°C /min)	Τελική Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Παραμονής (min)
0	-	40.0	5.00
1	5.00	180.0	0.00
2	30.00	240.0	5.00

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων και του συστήματος σύζευξης (interface) ήταν 230 και 240ο C αντίστοιχα. Ο τρόπος λειτουργίας του φασματόμετρου μαζών ήταν ιοντισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron ionization EI), με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος σάρωσης μαζών 40-300 m/z. Το λογισμικό καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το GCMS Solution Version 4.30 (Shimadzu). Η αποσυνέλιξη των φασμάτων και η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό AMDIS (ver. 2.72, NIST) συγκρίνοντας τους δείκτες κατακράτησης και δεδομένα φασματομετρίας μαζών από τις βιβλιοθήκες NIST14 και FFNSC2 (Shimadzu). Για τη σύγκριση των ποσοτήτων των ουσιών χρησιμοποιήθηκε ο λόγος των εμβαδών των κορυφών.

3.2.3. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση, πραγματοποιήθηκε στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 5.0 και περιγράφεται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο (Chong et al., 2018; Xia & Wishart, 2016; Xia et al., 2015).

3.3. Ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S. (E-nose)

3.3.1. Λήψη των πτητικών από headspace

Αρχικά ζυγίζονται 0,5 g από το εκάστοτε δείγμα επιτραπέζιας ελιάς, σε φιαλίδιο των 20 mL με πώμα που φέρει PTFE/Silicone septa. Στη συνέχεια, το φιαλίδιο με το δείγμα θερμοστατείται σε θερμοκρασία 60 °C για 30 λεπτά, προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων και τα πτητικά συστατικά να κατανεμηθούν στον αέριο χώρο πάνω από το δείγμα (headspace). Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, με τη βοήθεια κατάλληλης σύριγγας παραλαμβάνονται 0,5 mL από τον αέριο χώρο του φιαλιδίου, τα οποία εισάγονται απευθείας στην συσκευή ηλεκτρονικής μύτης για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση.

3.3.2. Ανάλυση με e-nose

Το σύστημα ηλεκτρονικής μύτης που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από μια συστοιχία αισθητήρων, τον εισαγωγέα δείγματος και ένα λογισμικό ανάλυσης δεδομένων. Η συστοιχία των αισθητήρων αποτελείται από 18 μεταλλικούς

αισθητήρες οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως τύπου L (LY2/LG, LY2/G, LY2/AA, LY2/GH, LY2/gCTI, LY2/gCT), τύπου P (P10/1, P10/2, P40/1, P30/1, P30/2, P40/2, PA2) και τύπου T (T30/1, T70/2, T40/2, T40/1, TA/2). Κάθε αισθητήρας είναι ευαίσθητος στην προσρόφηση διαφορετικών πτητικών συστατικών. Οι αισθητήρες αυτοί μεταφράζουν τα δεδομένα σε μορφή R_i , το οποίο είναι η αναλογία της αντίστασης G (όταν οι αισθητήρες έχουν προσροφήσει πτητικά συστατικά από το δείγμα) προς την αντίσταση G_0 (όταν οι αισθητήρες έρχονται σε επαφή με τον αέρα [zero gas]).

Τα προσροφημένα πτητικά συστατικά εισάγονται με την σύριγγα μέσα στον εισαγωγέα της ηλεκτρονικής μύτης. Η ροή του φέροντος αερίου (αέρας), ρυθμίστηκε σε 150 mL/λεπτό, ενώ ο όγκος εγχύσεως του δείγματος σε 500 μ L/s. Ο χρόνος ανάλυσης (acquisition time) ρυθμίστηκε σε 120 s, ακολουθούμενη από μια περίοδο ανάκτησης (1080s) έτσι ώστε οι αισθητήρες να επιστρέψουν στην γραμμή της βάσης ξανά (base line). Το λογισμικό διαβάζει την αντίσταση των αισθητήρων κάθε 1 s (acquisition period). Η απόκριση των αισθητήρων υπολογίστηκε ως αλλαγή στην αντίσταση ($\Delta R / R_0$). Το λογισμικό Alpha Soft V14 χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση και ανάλυση των δεδομένων.

3.3.3. Πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση (Multivariate statistical analysis)

Η ανάλυση και η ερμηνεία δεδομένων για περισσότερα από πενήντα δείγματα με αρκετές σειρές αισθητήρων είναι αρκετά περίπλοκη. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητη η μείωση του αριθμού των μεταβλητών. Η μείωση της διάστασης των δεδομένων (dimensionality reduction) καθιστά δυνατή την επεξεργασία και παρουσίαση των αποκρίσεων των 18 αισθητήρων σε δύο ή τρεις διαστάσεις για ένα μεγάλο σύνολο δειγμάτων. Αυτή η μέθοδος επεξεργασίας πολυδιάστατων δεδομένων είναι όπως προαναφέρθηκε, γνωστή ως πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση και επιτρέπει τον προσδιορισμό σημαντικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό αγνώστων δειγμάτων, την πρόβλεψη της έντασης των αισθητήρων, αλλά και την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα άγνωστο δείγμα. Μια από τις πιο γνωστές στατιστικές τεχνικές, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη για την επεξεργασία των δεδομένων ύστερα από την ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη, είναι η Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant factor analysis, DFA).

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αποτελέσματα ανάλυσης GC/MS

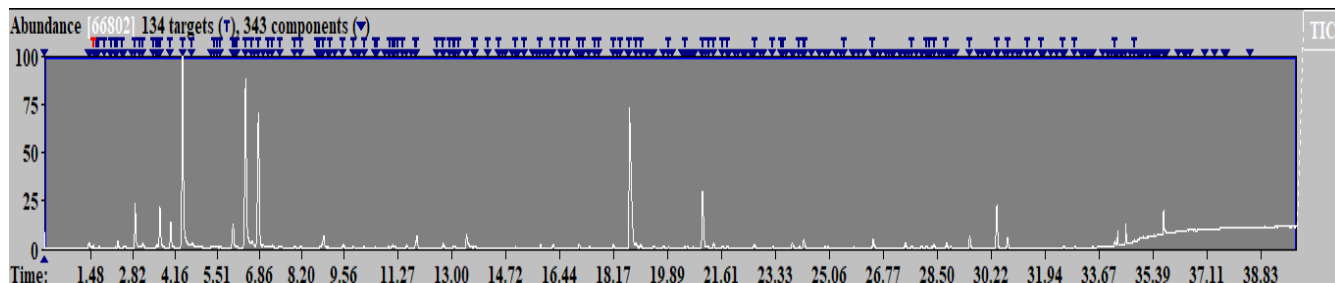
1.1. Προ - επεξεργασία δεδομένων

Τα λογισμικά GCMS Solution (ver. 4.30; Shimadzu), AMDIS (ver. 2.72; NIST), IDAlign και NIST MS Search (ver. 2.2; NIST) χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία επεξεργασίας και ταυτοποίησης των πτητικών συστατικών. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση με GC/MS, επεξεργάστηκαν με την χρήση του προγράμματος AMDIS. Αρχικά, απαιτείται η μετατροπή των αρχείων του λογισμικού Shimadzu στα αντίστοιχα (*XML) που το πρόγραμμα AMDIS μπορεί να διαχειριστεί. Ακολουθεί η επεξεργασία τους, που περιλαμβάνει την αποσυνέλιξη των φασμάτων (deconvolution). Η αποσυνέλιξη πραγματοποιείται ώστε να διαχωριστούν ουσίες οι οποίες συνεκλούνται. Οι κορυφές των χρωματογραφημάτων ταυτοποιήθηκαν με την χρήση των δεικτών κατακράτησης RI (βασισμένη σε ομόλογη σειρά n-αλκανίων C8-C24), σε συνδυασμό με τον βαθμό ομοιότητας των φασμάτων μάζας πρότυπων ενώσεων και των αντίστοιχων από βιβλιοθήκες δεδομένων φασματομετρίας μαζών NIST14 (NIST, USA). Από την ανωτέρω διαδικασία ανιχνεύθηκαν οι πτητικές ενώσεις, οι οποίες ταξινομήθηκαν βάσει του RI και προέκυψε πίνακας δεδομένων με τα εμβαδά της κάθε ουσίας σε κάθε δείγμα.

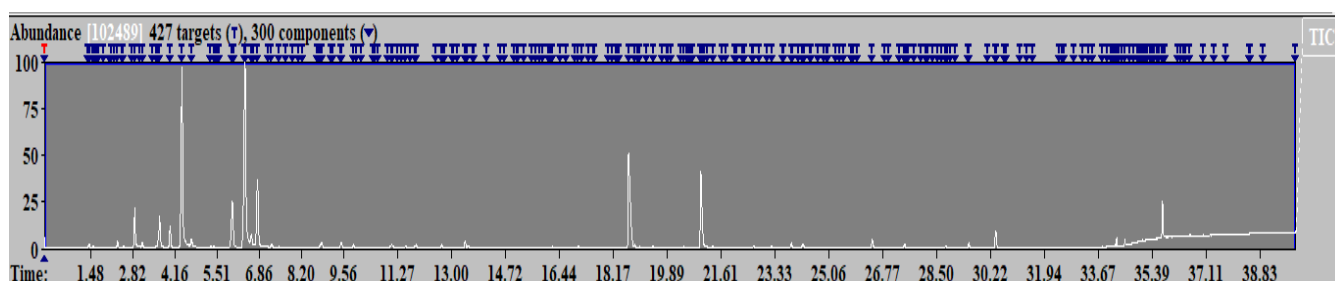
Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IDAlign προκειμένου να πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση (normalization) για την διόρθωση του σήματος ώστε να εξαλειφθούν τυχόν σφάλματα. Το εμβαδόν των κορυφών των ενώσεων διαιρέθηκε με το εμβαδόν του εσωτερικού προτύπου (1,4 - διοξάνιο) και στην συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με την συγκέντρωση αυτού (1000mg/ml), και το αποτέλεσμα διαιρέθηκε με την αντίστοιχη μάζα δείγματος. Έτσι, προέκυψε ένας πίνακας πτητικών συστατικών για κάθε μία από τις δύο ποικιλίες και συσκευασίες ελιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

1.2. Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Ένα τυπικό ολικό ιοντικό χρωματογράφημα του πτητικού προφίλ για κάθε ποικιλία παρουσιάζεται στο Γράφημα 1.



(α)



(β)

Γράφημα 1. Τυπικό ολικό ιοντικό χρωματογράφημα του πτητικού προφίλ που λήφθηκε από την ανάλυση με SPME-GCMS για τις ποικιλίες (α) Κονσερβολιά και (β) Χαλκιδική

Ογδόντα οκτώ (88) ενώσεις ταυτοποιήθηκαν, οι οποίες περιελάμβαναν εστέρες, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, καθώς και τερπένια, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Garrido Fernández et al., 2017; Sabatini & Marsilio, 2008; Sánchez Gómez et al., 2016). Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 4) με τις ταυτοποιημένες ουσίες και τις αντίστοιχες τιμές των δεικτών κατακράτησής τους (RI).

Πίνακας 4. Κατάλογος των ταυτοποιημένων ουσιών, ταξινομημένων κατά ομάδα και οι αντίστοιχες τιμές των δεικτών κατακράτησής τους (RI).

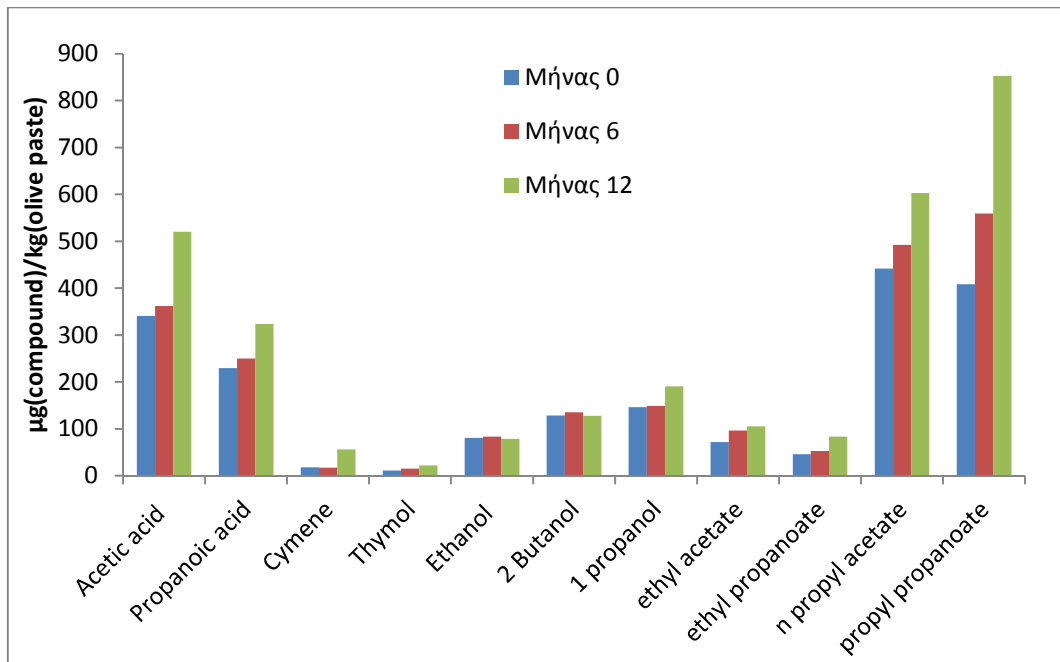
Ομάδα	Πτητική ένωση	RI	Ομάδα	Πτητική ένωση	RI
ΑΛΚΑΝΙΑ	Hexane	586	ΚΕΤΟΝΕΣ	Acetone	808.7
	Octane	791.5		2-Butanone	896.7
ΑΙΘΕΡΕΣ	Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-	1591.4		5-Hepten-2-one, 6-methyl-	1334.4
	Carvacrol methyl ether	1601	ΑΛΛΕΪΔΕΣ	Acetaldehyde	693.7
ΤΕΡΠΕΝΙΑ	β-Pinene	1092		2-Propenal	833.6

	b-Myrcene	1159.6	ΟΞΕΑ	Octanal	1285
	α -Terpinene	1170.3		2-Heptenal, (Z)-	1319
	D-Limonene	1189.3		2-Decenal, (E)-	1642.9
	β -Phellandrene	1197.3		Acetic acid	1445.2
	Eucalyptol	1200.9		Propanoic acid	1534.4
	γ -Terpinene	1238.8		Propanoic acid, 2-methyl-	1567.6
	Cymene	1262.9		Butanoic acid	1627.2
	Copaene	1487.2		Butanoic acid, 3-methyl-	1669.5
	Camphor	1510.6		Hexanoic acid	1843.1
	Linalool	1550		Octanoic acid	2063
	α -Terpineol	1700		Nonanoic acid	2173.2
	endo-Borneol	1702		Acetic acid, methyl ester	818.7
	Thymol	2186.5		Ethyl Acetate	880.1
	Carvacrol	2209		Methyl propionate	903.1
	ΑΛΚΟΟΛΕΣ	Ethanol		930	ΕΣΤΕΡΕΣ
2-Butanol, (R)-		1028.8	n-Propyl acetate	966.2	
1-Propanol		1041.8	sec-Butyl acetate	981.2	
1-Propanol, 2-methyl-		1095.1	Isobutyl acetate	1010.9	
1-Butanol		1148	Propanoic acid, propyl ester	1042	
1-Butanol, 3-methyl-		1210.3	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	1065.2	
1-Pentanol		1253.6	Acetic acid, butyl ester	1068.9	
2-Heptanol		1324.3	Propanoic acid, 2-methylpropyl ester	1077.5	
1-Hexanol		1356.6	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	1120.5	
3-Hexen-1-ol, (Z)-		1386.6	Propanoic acid, butyl ester	1139.4	
1-Octen-3-ol		1453.2	3-Methylbutanoic acid, propyl ester	1153.7	
1-Heptanol		1458.9	1-Butanol, 3-methyl-, propanoate	1187.4	
2-Ethyl-1-hexanol		1493.5	Ethyl hexanoate	1233	
2,3-Butanediol		1543.9	Acetic acid, hexyl ester	1271.3	
1-Octanol		1561.4	3-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-	1314.6	
Terpinen-4-ol		1603.4	Propanoic acid, hexyl ester	1339	
1-Nonanol		1663.8	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	1342.3	
Phenol, 2-methoxy-		1854.8	3-Hexen-1-ol, propanoate, (Z)-	1383	
Benzyl alcohol		1874.3	Isopropyl lactate	1427	
Phenylethyl Alcohol		1910.8	Octanoic acid, ethyl ester	1434.8	

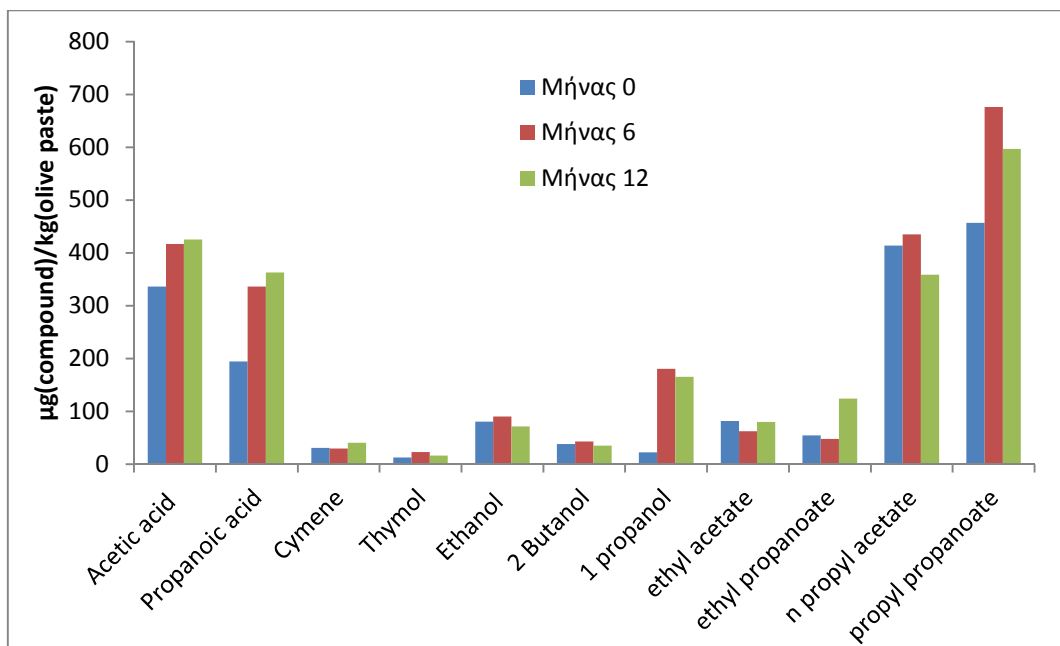
	p-Methylguaiacol	1953.2		Decanoic acid, ethyl ester	1640
	Phenol	2002.3		Benzyl acetate	1725
	Phenol, 4-methyl-	2080.3		2-Phenethyl acetate	1811
	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-	2172.8		Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	1883.3
	Phenol, 4-ethyl-	2179.4		Diallyl disulphide	1475.3

Με μια πρώτη ματιά στα τυπικά χρωματογραφήματα των δύο ποικιλιών, φαίνεται πως η πτητική τους σύνθεση, από ποιοτικής απόψεως, είναι σχεδόν ίδια. Υψηλές συγκεντρώσεις οξέων, εστέρων και αλκοολών παρατηρήθηκαν σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να εντοπίζονται υψηλά επίπεδα Οξικού οξέος, Προπανοϊκού οξέος, Οξικού προπυλίου και Προπανοϊκού προπυλίου (Acetic acid, Propanoic acid, n-Propyl acetate, Propyl propanoate) και στις δύο ποικιλίες. Επιπλέον, όλα τα δείγματα φαίνεται να παρουσίασαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις κετονών και αλδευδών.

Στο παράρτημα Π-1, δίνεται πίνακας με τις προαναφερθείσες πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στις ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις αυτών σε $\mu\text{g}_{(\text{ουσίας})}/\text{kg}_{(\text{πάστας ελιάς})} \pm \text{SD}$ ενδεικτικά για τους 0, 6 και 12 μήνες συντήρησης. Η μεταβολή των συγκεντρώσεων ορισμένων βασικών πτητικών ενώσεων (αυτές που φάνηκε να παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες) ως προς το χρόνο αποθήκευσης και πιο συγκεκριμένα για τους 0, 6 και 12 μήνες, παρουσιάζεται στο Γράφημα 2. Μία τάση ήπιας αύξησης φαίνεται να παρουσιάζεται στις συγκεντρώσεις του προπανοϊκού οξέος (Propanoic acid), του προπανοϊκού αιθυλεστέρα, του οξικού αιθυλεστέρα (Ethyl Propanoate, n-propyl acetate), του οξικού οξέος (Acetic acid), του κυμενίου και της θυμόλης (Cymene, Thymol), και στις δύο ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς. Η αιθανόλη, η 2-βουτανόλη και η 1-προπανόλη (Ethanol, 2-Butanol, 1-Propanol) φαίνεται να παρουσιάζουν μια τάση αύξησης έως τον έκτο μήνα ακολουθούμενη από μία τάση μείωσης σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Στην ποικιλία Χαλκιδική, φαίνεται να σημειώθηκε σημαντική τάση αύξησης με την πάροδο του χρόνου, του οξικού προπυλεστέρα και του προπανοϊκού προπυλεστέρα (n-Propyl acetate, Propyl propanoate), ενώ στην ποικιλία Κονσερβολιά, αυτές οι ενώσεις φαίνεται να παρουσίασαν μια σημαντική μείωτική τάση κατά τους τελευταίους έξι μήνες αποθήκευσης.



(α)



(β)

Γράφημα 2. Μεταβολή των συγκεντρώσεων ορισμένων βασικών πτητικών ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν και στις δύο ποικιλίες, ως προς το χρόνο αποθήκευσης για τους 0, 6 και 12 μήνες, στην ποικιλία (α) Κοσερβολιά και (β) Χαλκιδική.

Κατά τη ζύμωση, οι ελιές μεταβολίζουν το πυροσταφυλικό οξύ σε άλλες ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, στην ομοζυμωτική γαλακτική ζύμωση, το γαλακτικό οξύ είναι το κύριο τελικό προϊόν, ενώ η ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση παράγει κυρίως οργανικά οξέα και αλκοόλες. Η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα προέρχονται επίσης από την αλκοολική

ζύμωση. Με βάση τις πτητικές ενώσεις που εντοπίστηκαν σε αυτή τη μελέτη, προτείνεται ότι όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλκοολική και ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση, που εξηγεί την υψηλή περιεκτικότητα σε οξικό οξύ και αιθανόλη. Βακτήρια όπως το *Acetobacter* spp. και οι ζύμες, που απαντώνται συνήθως σε μήτρες τροφίμων, παράγουν επίσης οξικό οξύ. Το προπανοϊκό οξύ παράγεται επίσης από βακτήρια όπως το *Propionibacterium* spp. μέσω του μεταβολισμού τους. Η παρουσία των προαναφερθέντων βακτηρίων μπορεί επίσης να επιβεβαιωθεί από τις υψηλές ποσότητες προπανοϊκών και οξικών εστέρων (McFeeters 2004; Panagou et al. 2011). Το πτητικό προφίλ των ποικιλιών επιτραπέζιας ελιάς που προέκυψε από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνεί και με ήδη υπάρχουσες δημοσιεύσεις που έχουν να κάνουν με την παραγωγή πτητικών ενώσεων σε διαφορετικές ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών (Montaño et al. 2003; Panagou et al., 2006; Sabatini & Marsilio 2008; Sabatini et al., 2009; Tassou et al., 2002).

1.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

Τα προ-επεξεργασμένα δεδομένα μεταφορτώθηκαν στην ηλεκτρονική πλατφόρμα MetaboAnalyst 5.0 και πριν την στατιστική ανάλυση, οι κανονικοποιημένες τιμές των μεταβολιτών μετασχηματίστηκαν (mean-centered). Τα δείγματα χωρίστηκαν σε κατηγορίες, ανάλογα με την ποικιλία και την συσκευασία.

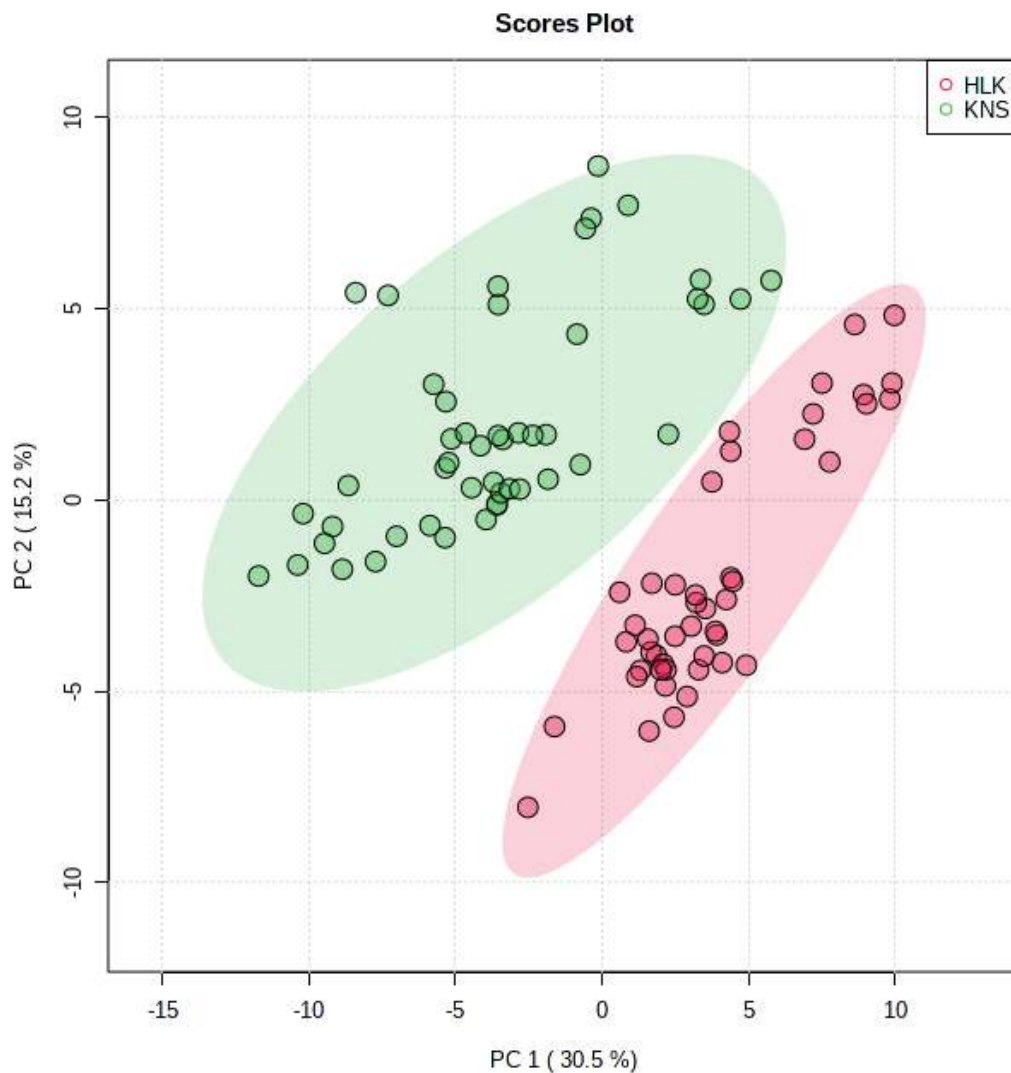
1.3.1. Ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική

Τα δείγματα ελιάς που αναλύθηκαν, χωρίστηκαν ανάλογα με την ποικιλία τους και έτσι προέκυψαν οι 2 κλάσεις του Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Κλάσεις δειγμάτων ελιάς των δύο ποικιλιών

Κλάσεις	Ποικιλία
KNS	Ποικιλία Κονσερβολιά
HLK	Ποικιλία Χαλκιδική

Τα δεδομένα των πτητικών που ανιχνεύθηκαν, υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Γράφημα 3. Οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από την ανάλυση στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξηγούν την διακύμανση των αρχικών δεδομένων κατά 45,9%. Από το παρακάτω γράφημα, είναι εμφανές πως οι δύο κλάσεις έχουν σχηματίσει δύο συμπαγείς διακριτές ομάδες οι οποίες απέχουν η μια από την άλλη. Πιο συγκεκριμένα η κλάση KNS που αντιστοιχεί στην ποικιλία Κονσερβολιά (πράσινη περιοχή) φαίνεται να ξεχωρίζει από την κλάση HLK που αντιστοιχεί στα δείγματα της ποικιλίας Χαλκιδική (κόκκινη περιοχή).

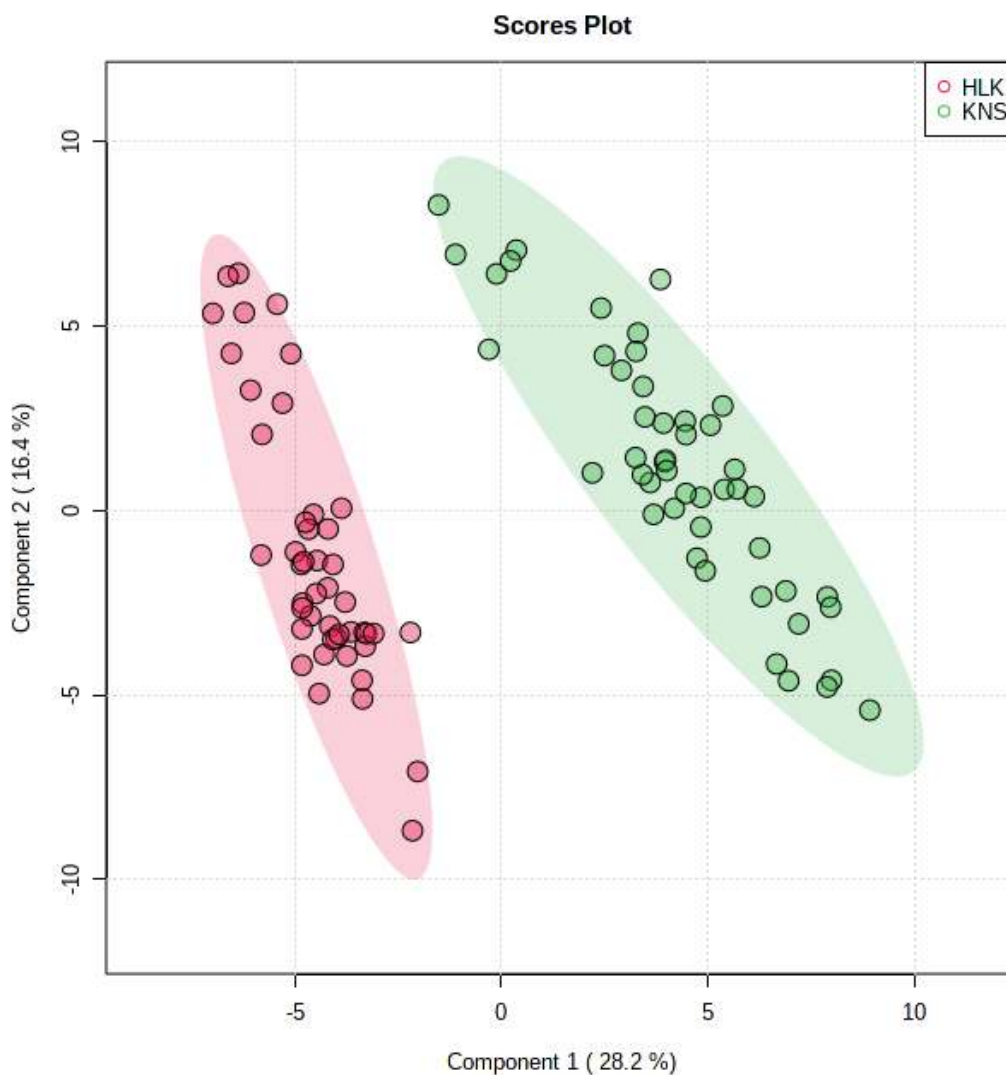


Γράφημα 3. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς των δύο ποικιλιών. Οι κλάσεις (KNS, HLK) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες από την συγκεκριμένη ανάλυση επεξηγούν το 62,7% της μεταβλητότητας, ενώ η συνιστώσα PC1 δίνει την καλύτερη ομαδοποίηση και αντιπροσωπεύει το 30,5% της μεταβλητότητας. Η απόσταση μεταξύ των δύο κλάσεων είναι ένας τρόπος αξιολόγησης της ομοιότητας μεταξύ των διαφορετικών ομάδων δειγμάτων. Επομένως η ανάλυση PCA έδειξε ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων της ελιάς ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί με βάση την ποικιλία.

Παρόμοια και ακόμα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η ανάλυση όταν τα ίδια δεδομένα υποβλήθηκαν σε διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS-DA (Partial Least Squares - Discriminant Analysis). Όπως και στο PCA γράφημα, στο Γράφημα 4 παρατηρείται πως η κλάση των δειγμάτων που αντιστοιχεί στα δείγματα της ποικιλίας Κονσερβολιά (κλάση KNS/πράσινη περιοχή) διαχωρίζεται από εκείνη

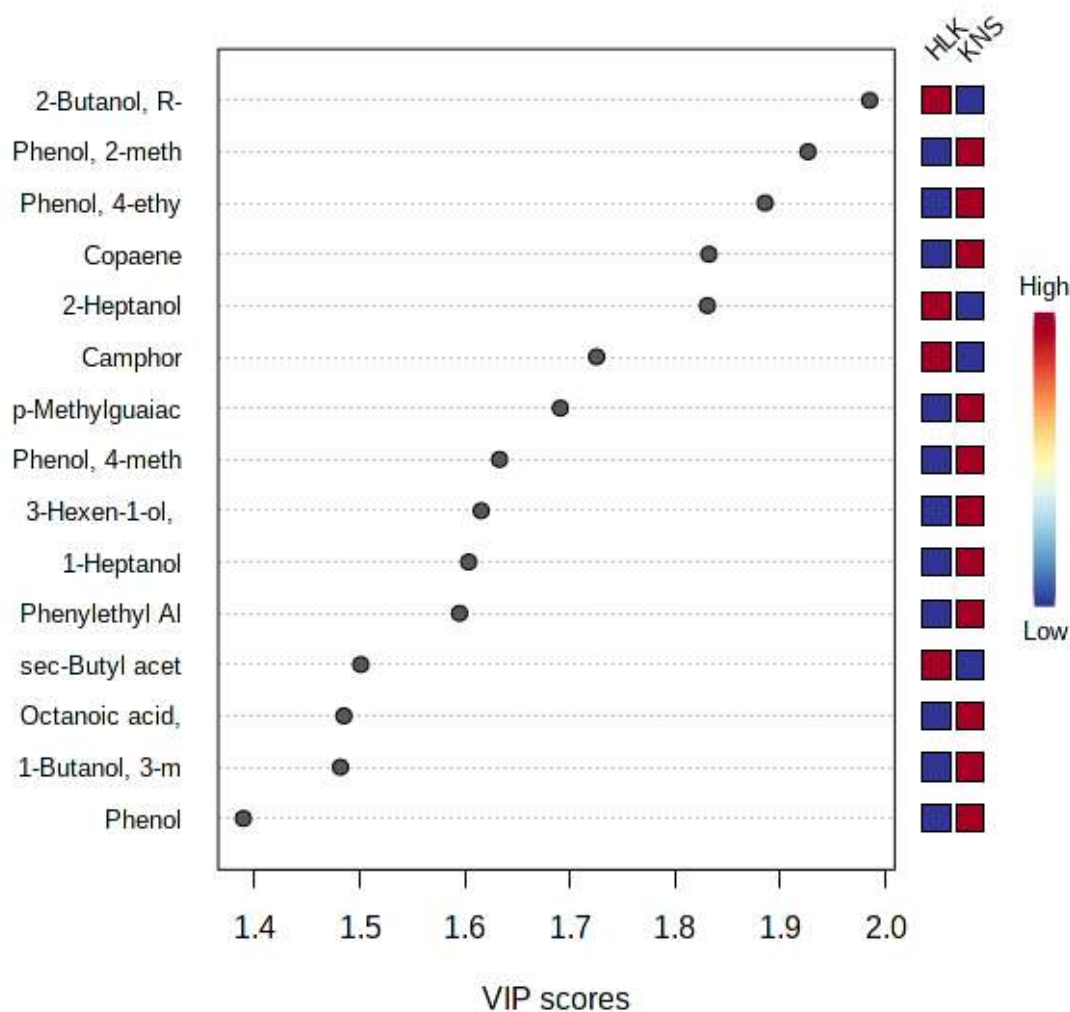
που αντιστοιχεί στα δείγματα της ποικιλίας Χαλκιδική (κλάση HLK/κόκκινη περιοχή), και η διαφοροποίηση είναι ακόμα πιο ικανοποιητική καθώς φαίνεται πως τα σύνολα των δειγμάτων των δύο ποικιλιών απέχουν ακόμα περισσότερο μεταξύ τους, γεγονός που επιβεβαιώνει και πάλι πως οι δύο ποικιλίες είναι εφικτό να διαχωριστούν.



Γράφημα 4. Γράφημα PLS-DA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς των δύο ποικιλιών. Οι κλάσεις (KNS, HLK) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 5.

Στο Γράφημα 5 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι 15 πιο σημαντικές πτητικές ενώσεις, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores (Variable Importance for Prediction), αυτές δηλαδή που συνεισφέρουν σημαντικά στο μοντέλο PLS-DA και άρα στην τυχόν διαφοροποίηση των δύο ποικιλιών ελιάς. Όπως φαίνεται στο γράφημα, ο διαχωρισμός των δύο κλάσεων και κατ' επέκταση των δυο ποικιλιών οφείλεται σε διαφορές στις ποσότητες κυρίως αλκοολών, όπως 2-Βουτανόλη, R-, 2-Επτανόλη, 4-Μεθυλ-φαινόλη, 1-Επτανόλη, Φαινυλαιθυλαλκοόλη, Φαινόλη, κ.α. (2-Butanol, R-; 2-Heptanol; Phenol, 4-methyl; 1-Heptanol; Phenylethyl alcohol; Phenol),

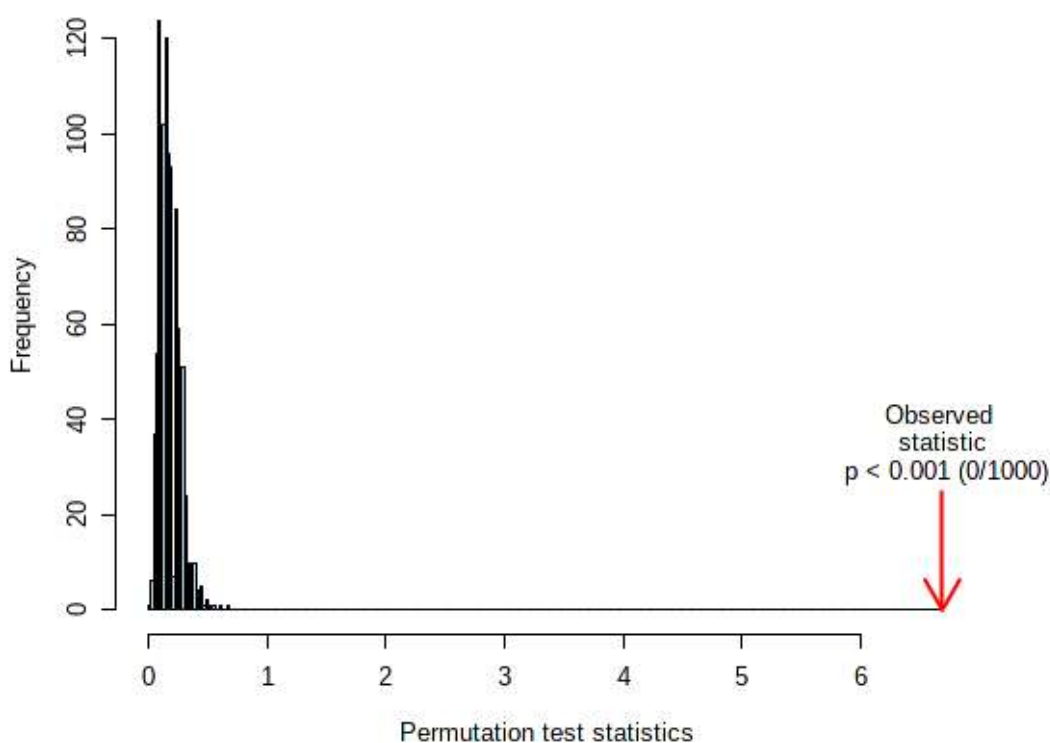
εστέρων όπως ο Οξικός βουτυλεστέρας και ο Αιθυλεστέρας του οκτανοϊκού οξέος (sec-Butyl acetate, Octanoic acid-ethyl ester) αλλά και τερπενίων όπως η Καμφορά και το Κοπαένιο (Camphor, Copaene). Όπως παρατηρείται στη δεξιά στήλη του γραφήματος 5, ορισμένες από αυτές τις ενώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερες ενδιάμεσες τιμές ποσότητας στις κλάσεις που αντιστοιχούν στην ποικιλία Χαλκιδική, ενώ άλλες στις κλάσεις της ποικιλίας Κονσερβολιά.



Γράφημα 5. Οι 15 σημαντικότερες πτητικές ενώσεις των δειγμάτων ελιάς των δύο ποικιλιών που συνεισφέρουν στο μοντέλο PLS-DA. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την ενδιάμεση τιμή της ποσότητας κάθε ουσίας στην αντίστοιχη κλάση που περιγράφεται στον Πίνακα 5.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταστοιχείωσης (permutation test) του μοντέλου. Προκειμένου να γίνει αυτό, χρησιμοποιούνται τα ίδια δεδομένα αλλά τα δείγματα τοποθετούνται σε τυχαίους επανασηματισμούς και αναπτύσσεται ένα νέο μοντέλο του οποίου η επίδοση αξιολογείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές (>1000) και συγκρίνεται η επίδοση του αρχικού μοντέλου με τα τυχαία μοντέλα που αναπτύχθηκαν, ενώ ταυτόχρονα ελέγχεται αν η διαφορά τους είναι στατιστικώς σημαντική (Bijlsma et al. 2006). Η επίδοση των μοντέλων γίνεται με

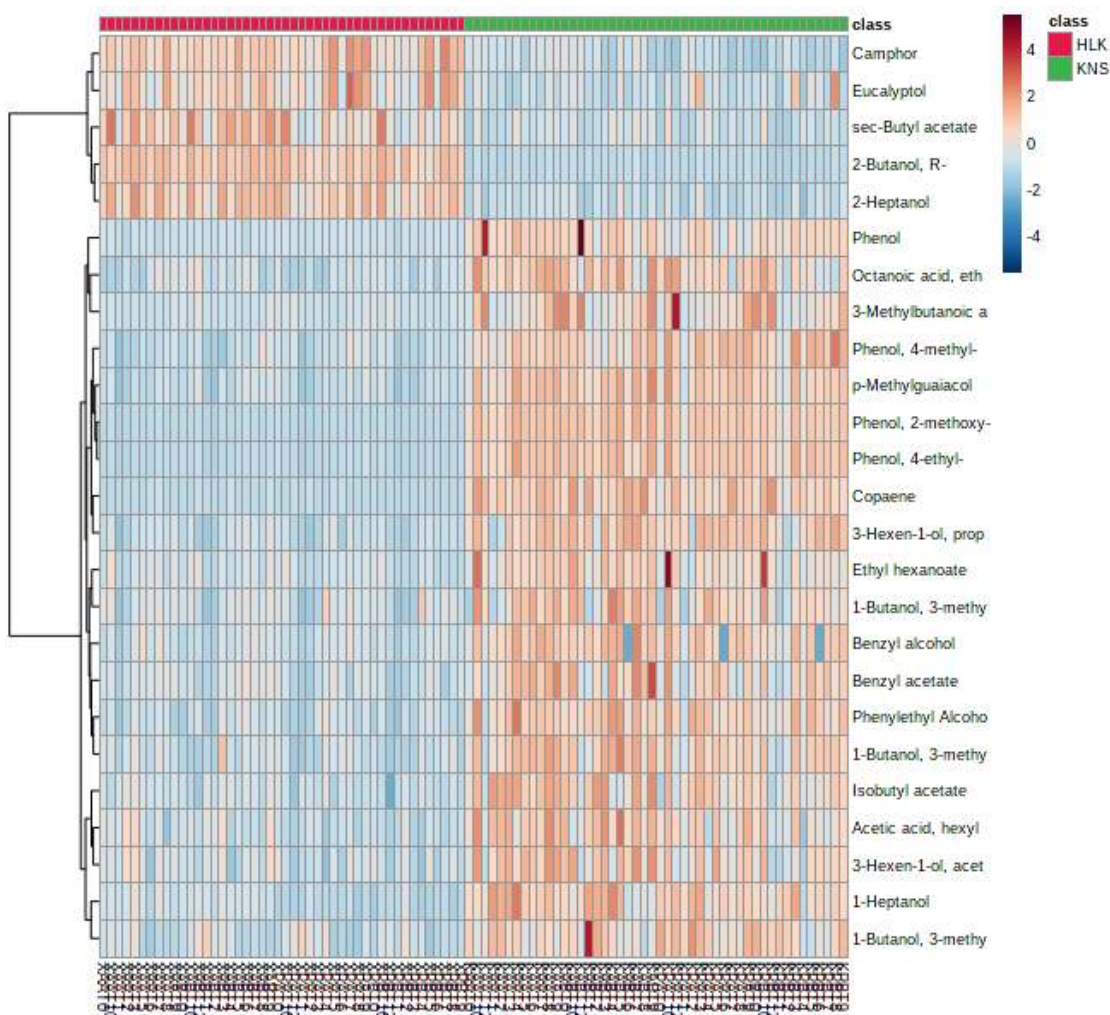
χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within) του καθενός από αυτά. Στο παρακάτω διάγραμμα (Γράφημα 6), παριστάνονται γραφικά οι λόγοι αυτοί, σε ένα ιστόγραμμα, το οποίο ονομάζεται «κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων». Όσο πιο μακριά προς τα δεξιά βρίσκεται ο λόγος B/W του «πραγματικού» μοντέλου, από τους αντίστοιχους λόγους των μοντέλων που αναπτύχθηκαν, τόσο πιο σημαντική θεωρείται η διάκριση και άρα οι διαφορές των κλάσεων του πραγματικού μοντέλου είναι στατιστικώς σημαντικές.



Γράφημα 6. Κατανομή τυχαίων ταξινομήσεων του μοντέλου PLS-DA. Η επίδοση των μοντέλων έγινε με χρήση του λόγου B/W (sum of squares between/sum of squares within).

Στο Γράφημα 7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA) υπό την μορφή θερμικού χάρτη (Heatmap). Τα «Heatmaps» διευκολύνουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων λόγω των μοτίβων που ακολουθούν οι πτητικές ουσίες μεταξύ των δειγμάτων. Τα έγχρωμα κελιά του χάρτη αντιστοιχούν στην σχετική αφθονία κάθε ουσίας. Πιο συγκεκριμένα, το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε χαμηλή σχετική αφθονία, ενώ όσο το χρώμα μεταβάλλεται προς το κόκκινο η σχετική αφθονία της εκάστοτε ουσίας αυξάνεται. Είναι επομένως πιο εύκολο να διακρίνουμε πώς μεταβάλλονται οι προαναφερθείσες σημαντικότερες πτητικές ενώσεις (όπως προέκυψαν βάσει των VIP Scores) κατά μήκος των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων. Οι πρώτες πέντε ενώσεις (Καμφορά, Ευκαλυπτόλη, οξικός βουτυλεστέρας, 2-Βουτανόλη, 2-Επτανόλη) δείχνουν να έχουν υψηλή σχετική αφθονία στα δείγματα της ποικιλίας Χαλκιδική ενώ

αντίθετα χαμηλή σχετική αφθονία στα δείγματα της ποικιλίας Κονσερβολιά. Σχεδόν όλες οι υπόλοιπες ενώσεις που απεικονίζονται στον παρακάτω θερμικό χάρτη, δείχνουν να αφθονούν στις ελιές τις ποικιλίας Κονσερβολιά και να έχουν σχετικά χαμηλή αφθονία στις ελιές της ποικιλίας Χαλκιδική.



Γράφημα 7. Θερμικός χάρτης (Heatmap, HCA) των αποτελεσμάτων που απεικονίζει την ομαδοποίηση των σημαντικότερων πτητικών ουσιών (βάσει των VIP Scores) μεταξύ των διαφορετικών κλάσεων δειγμάτων (οι κλάσεις περιγράφονται στον Πίνακα 5).

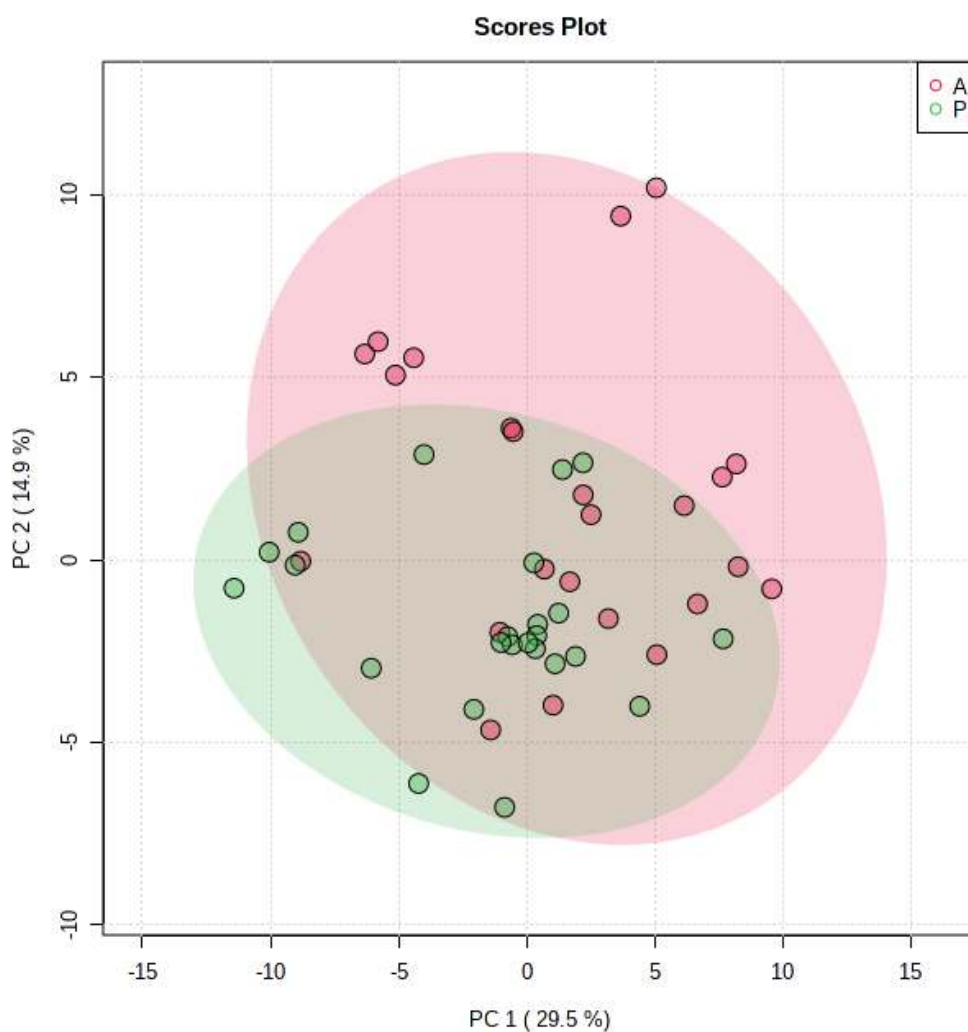
1.3.2. Πράσινες ελιές της ποικιλίας Κονσερβολιά

Τα δείγματα ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά χωρίστηκαν ανάλογα με την συσκευασία στην οποία συντηρούνταν. Έτσι προέκυψαν οι 2 κλάσεις του Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Κλάσεις ποικιλίας Κονσερβολιά συγκριτικά με το μέσο συσκευασίας

Κλάσεις	Τύπος πλαστικού συσκευασίας
A	Συσκευασία 1
P	Συσκευασία 2

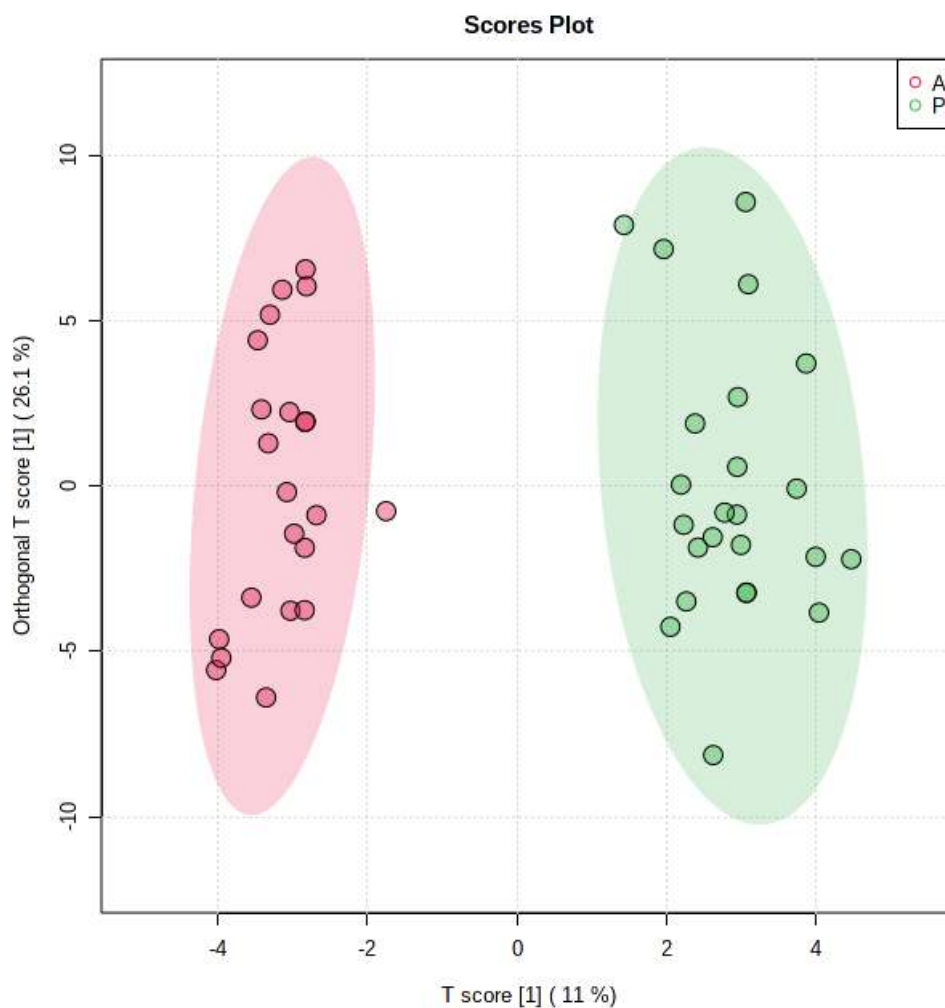
Τα δεδομένα των μεταβολιτών υποβλήθηκαν σε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Γράφημα 8. Οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν (PC1 και PC2) εξηγούν την διακύμανση των αρχικών δεδομένων σε ποσοστό 44,4%. Με βάση το παρακάτω διάγραμμα, είναι εμφανές πως δεν επιτυγχάνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πλαστικών συσκευασίας των δειγμάτων της ποικιλίας Κονσερβολιά, καθώς οι δύο ομάδες συσκευασιών (κλάση Α/ροζ περιοχή και κλάση Ρ/πράσινη περιοχή) σχεδόν αλληλεπικαλύπτονται, στο γράφημα PCA. Οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες από την συγκεκριμένη ανάλυση επεξηγούν το 61,3% της μεταβλητότητας.



Γράφημα 8. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά. Οι κλάσεις(A, P) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 6.

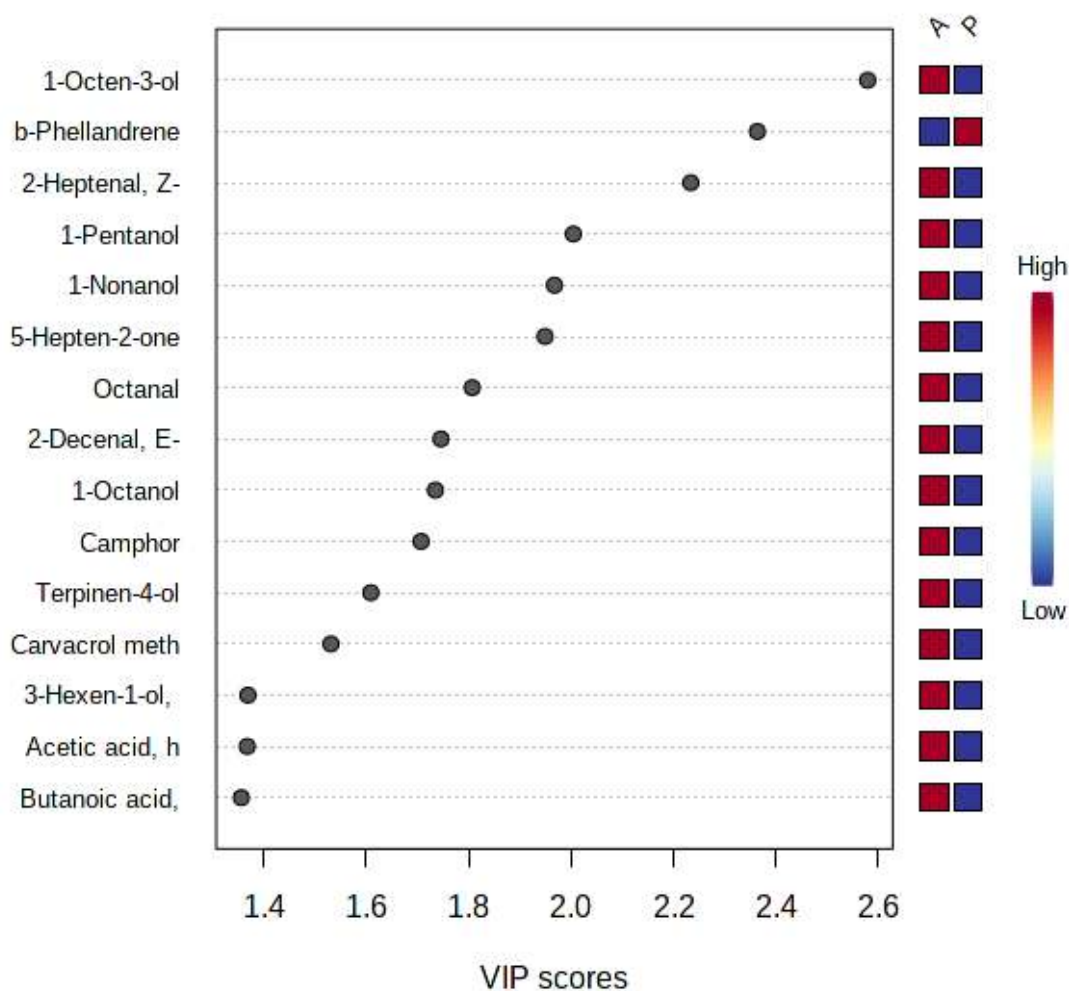
Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλύτερα όταν τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με ortho-PLS-DA. Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 9, οι δυο διαφορετικές συσκευασίες έχουν σχηματίσει δύο συμπαγείς διακριτές ομάδες οι οποίες απέχουν αρκετά η μια από την άλλη. Επομένως γίνεται αντιληπτό πως ο διαχωρισμός των δύο

διαφορετικών πλαστικών συσκευασίας ήταν αρκετά ικανοποιητικός με την βοήθεια της επιβλεπόμενης μεθόδου OPLS-DA.



Γράφημα 9. Γράφημα OPLS-DA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς των δύο διαφορετικών συσκευασιών της ποικιλίας Κονσερβολιά. Οι κλάσεις περιγράφονται στον Πίνακα 6.

Στο Γράφημα 10 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι 15 πιο σημαντικές πτητικές ουσίες, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores. Όπως φαίνεται, ο διαχωρισμός των δύο συσκευασιών οφείλεται σε διαφορές στις ποσότητες αλκοολών, όπως 1-Οκτεν-3-όλη, 1-Πεντανόλη, 1-Νονανόλη, 1-Οκτανόλη (1-Octen-3-ol; 1-Pentanol; 1-Nonanol; 1-Octanol) κ.α., αλδεϋδών όπως η 2-Επτανάλη, Ζ, η Οκτανάλη και η 2-Δεκανάλη, Ε (2-Heptenal, Ζ; Octanal; 2-Decenal, Ε), οξέων όπως το 3-Μεθυλ-βουτανικό οξύ (Butanoic acid, 3-methyl), ορισμένων εστέρων όπως ο Εξυλεστέρας του οξικού οξέος (Acetic acid, hexyl ester; 3-Hexen-1-ol, acetate), αλλά και τερπενίων όπως η Καμφορά (Camphor). Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις φαίνεται να εντοπίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στην Συσκευασία 1 (Κλάση Α).



Γράφημα 10. Οι 15 σημαντικότερες πτητικές ουσίες των δειγμάτων ελιάς της ποικιλίας Κονσερβολιά που συνεισφέρουν στο μοντέλο o-PLS-DA. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της ποσότητας κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 6.

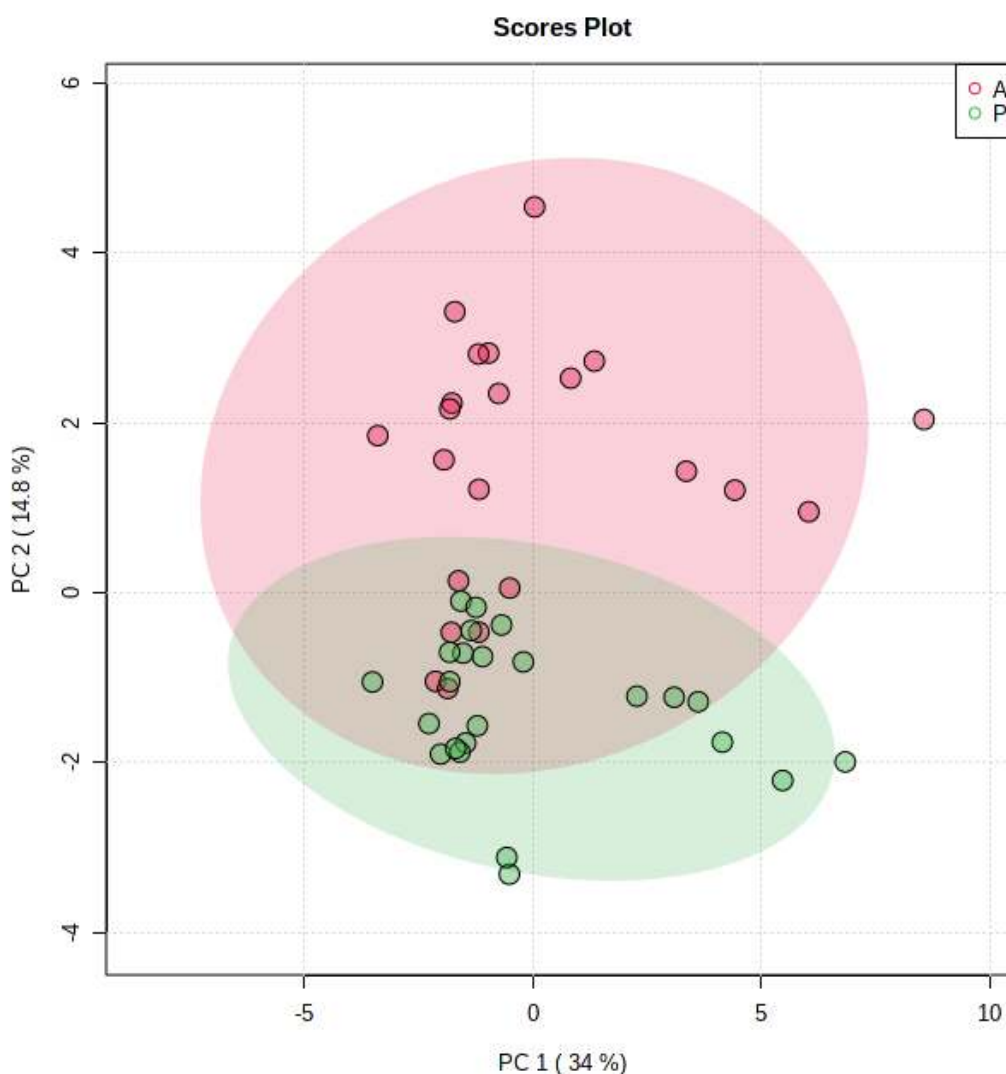
1.3.2. Πράσινες ελιές της ποικιλίας Χαλκιδική

Τα δείγματα της ποικιλίας Χαλκιδική χωρίστηκαν επίσης, ανάλογα με την συσκευασία στην οποία συντηρούνταν. Έτσι προέκυψαν πάλι 2 κλάσεις οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Κλάσεις ποικιλίας Χαλκιδική συγκριτικά με το μέσο συσκευασίας

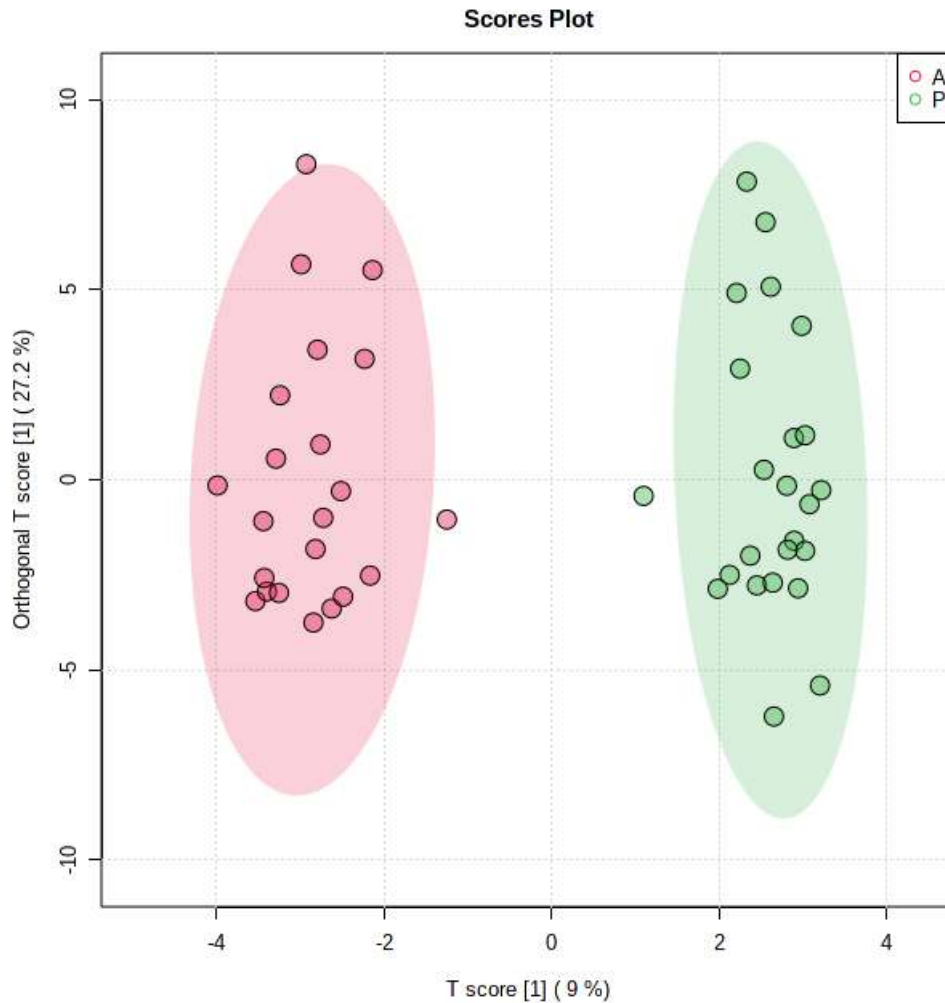
Κλάσεις	Τύπος πλαστικού συσκευασίας
A	Συσκευασία 1
P	Συσκευασία 2

Ακολούθησε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) και προέκυψε το Γράφημα 11. Και στην περίπτωση της ποικιλίας Χαλκιδική είναι εμφανές ότι με την μέθοδο PCA δεν επιτυγχάνεται ξεκάθαρος διαχωρισμός με βάση το υλικό συσκευασίας, καθώς οι δύο κλάσεις που αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά πλαστικά (κλάση Α/ροζ περιοχή και κλάση Ρ/πράσινη περιοχή) οριακά αλληλεπικαλύπτονται, στο γράφημα PCA. Οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες από την συγκεκριμένη ανάλυση επεξηγούν το 63,6% της μεταβλητότητας.



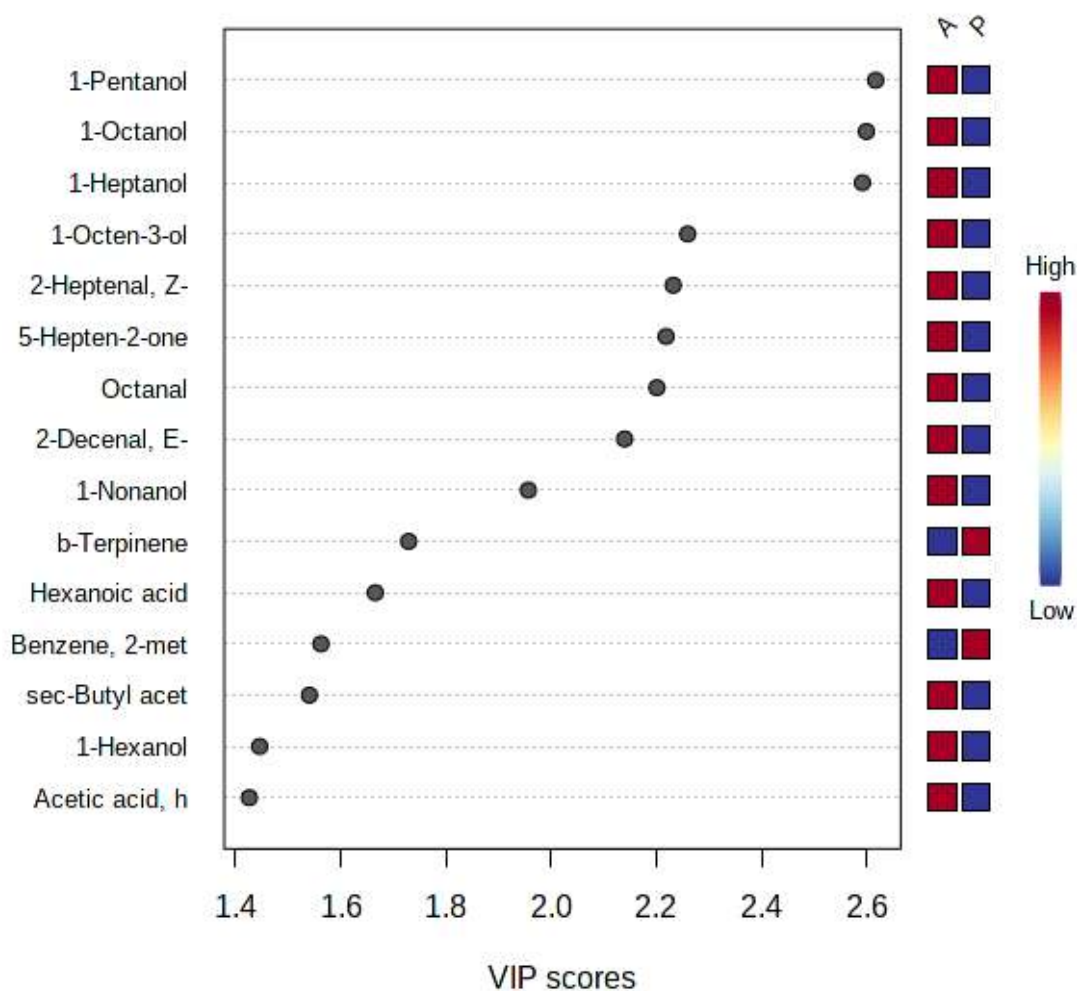
Γράφημα 11. Γράφημα των κύριων συνιστωσών PCA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς της ποικιλίας Χαλκιδική. Οι κλάσεις(A, P) των δειγμάτων περιγράφονται στον Πίνακα 7.

Ύστερα και από την ανάλυση ortho-PLS-DA, προέκυψαν καλύτερα αποτελέσματα. Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 12, οι δυο κλάσεις που αντιπροσωπεύουν τις δυο διαφορετικές συσκευασίες της ποικιλίας Χαλκιδική απέχουν αρκετά μεταξύ τους, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο διαχωρισμός με βάση το πλαστικό συσκευασίας και στην ποικιλία Χαλκιδικής ήταν ικανοποιητικός με την χρήση του o-PLS-DA.



Γράφημα 12. Γράφημα o-PLS-DA (scoresplot) για τα δείγματα ελιάς των δύο διαφορετικών συσκευασιών της ποικιλίας Χαλκιδική. Οι κλάσεις περιγράφονται στον Πίνακα 7.

Στο Γράφημα 13 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι 15 πιο σημαντικές πτητικές ενώσεις, όπως προέκυψαν μετά τον υπολογισμό των VIP Scores. Και στην ποικιλία Χαλκιδική, ο διαχωρισμός των δύο συσκευασιών οφείλεται σε διαφορές στις ποσότητες κυρίως αλκοολών, όπως 1-Οκτεν-3-όλη, 1-Πεντανόλη, 1-Οκτανόλη, 1-Επτανόλη, 1-Νονανόλη (1-Octen-3-ol; 1-Pentanol; 1-Octanol; 1-Heptanol; 1-Nonanol;) κ.α., κάποιων αλδευδών όπως 2-Επτανάλη, Ζ, Οκτανάλη, 2-Δεκανάλη, Ε (2-Heptenal, Z; Octanal; 2-Decenal, E), οξέων όπως Εξανοϊκό οξύ (Hexanoic acid), αλλά και ορισμένων εστέρων όπως ο Οξικός βουτυλεστέρας και ο Εξυλεστέρας του οξικού οξέος (sec-Butyl acetate; Acetic acid, hexyl ester). Όπως και στην ποικιλία Κονσερβολιά, οι πιο πολλές από αυτές τις ενώσεις φαίνεται να εντοπίζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στην Συσκευασία 1 (Κλάση Α).



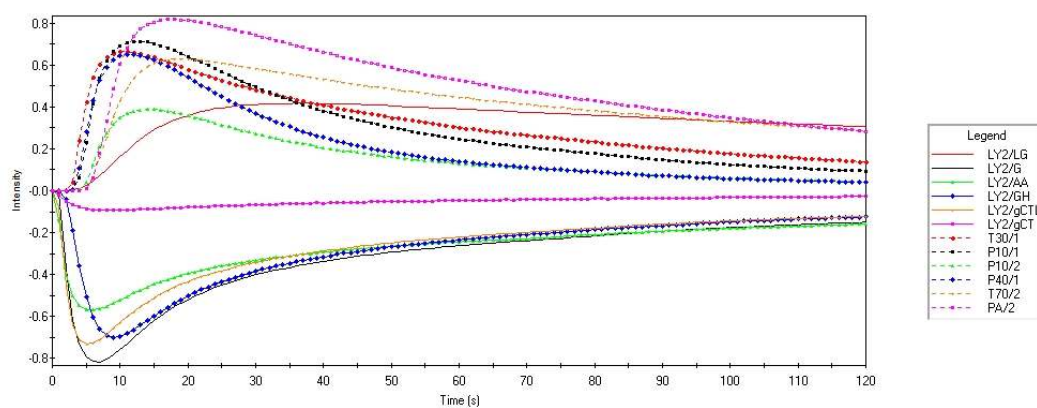
Γράφημα 13. Οι 15 σημαντικότερες πτητικές ενώσεις των δειγμάτων ελιάς της ποικιλίας Χαλκιδική που συνεισφέρουν στο μοντέλο o-PLS-DA. Τα έγχρωμα κελιά στην δεξιά στήλη δείχνουν την διάμεση τιμή της ποσότητας κάθε μεταβολίτη στην αντίστοιχη κατηγορία που περιγράφεται στον Πίνακα 7.

Παρατηρείται πως οι περισσότερες από τις ενώσεις στις οποίες οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο συσκευασιών είναι κοινές και στις δύο ποικιλίες ελιάς που αναλύθηκαν. Επιπλέον, οι διαφορές στις ποσότητές τους είναι παρόμοιες, δηλαδή οι ουσίες που εμφανίζουν μεγαλύτερη διάμεση τιμή στην Συσκευασία 1 στην ποικιλία Κονσερβολιά, φαίνεται να εμφανίζουν το ίδιο μεγάλη διάμεση τιμή αντίστοιχα στη Συσκευασία 1 και στην ποικιλία Χαλκιδική. Το γεγονός αυτό ισχυροποιεί το συμπέρασμα ότι οι συγκεκριμένες πτητικές ουσίες είναι κατά βάση υπεύθυνες για τον διαχωρισμό των δυο συσκευασιών.

2. Αποτελέσματα ανάλυσης με την ηλεκτρονική μύτη Alpha M.O.S.

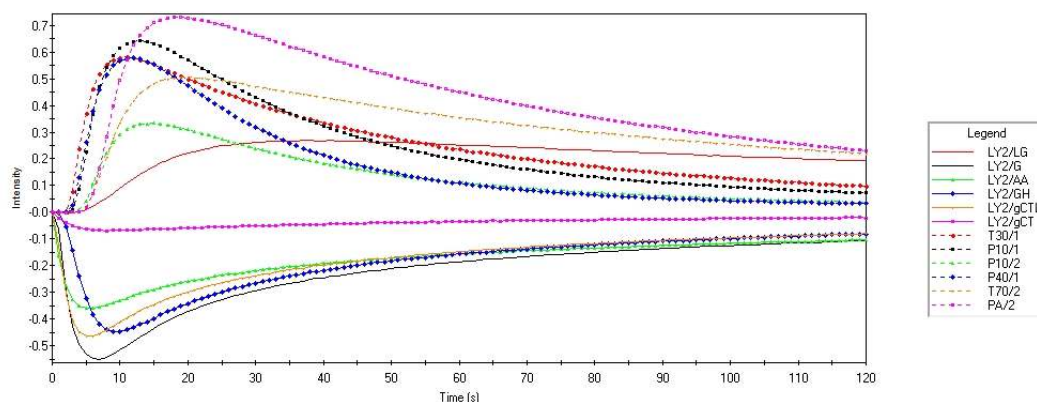
2.1. Απόκριση της ηλεκτρονικής μύτης Alpha M.O.S στα πτητικά

Η παραγωγή των πτητικών ουσιών στα δείγματα πράσινης ελιάς των δυο ποικιλιών, «Κονσερβολιάς» και «Χαλκιδικής», καταγράφηκαν στο λογισμικό της ηλεκτρονικής μύτης. Τα γραφήματα χρόνου έναντι έντασης της απόκρισης των 12 μεταλλικών αισθητήρων στα δείγματα Κονσερβολιάς και Χαλκιδικής, φαίνονται στο Γράφημα 14.



LY2/LG_LY2/LG/T26403070140706 (Time [s]: 0.00 Intensity: 0.0000)

(α)



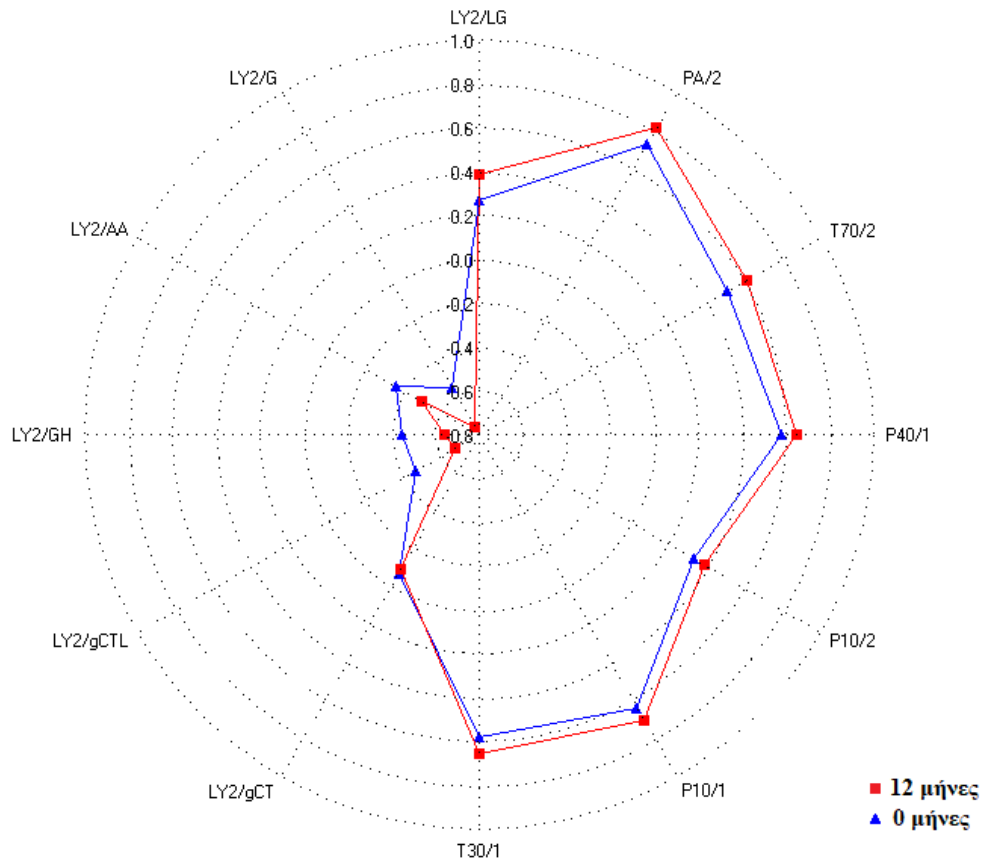
LY2/LG_LY2/LG/T26403070140706 (Time [s]: 0.00 Intensity: 0.0000)

(β)

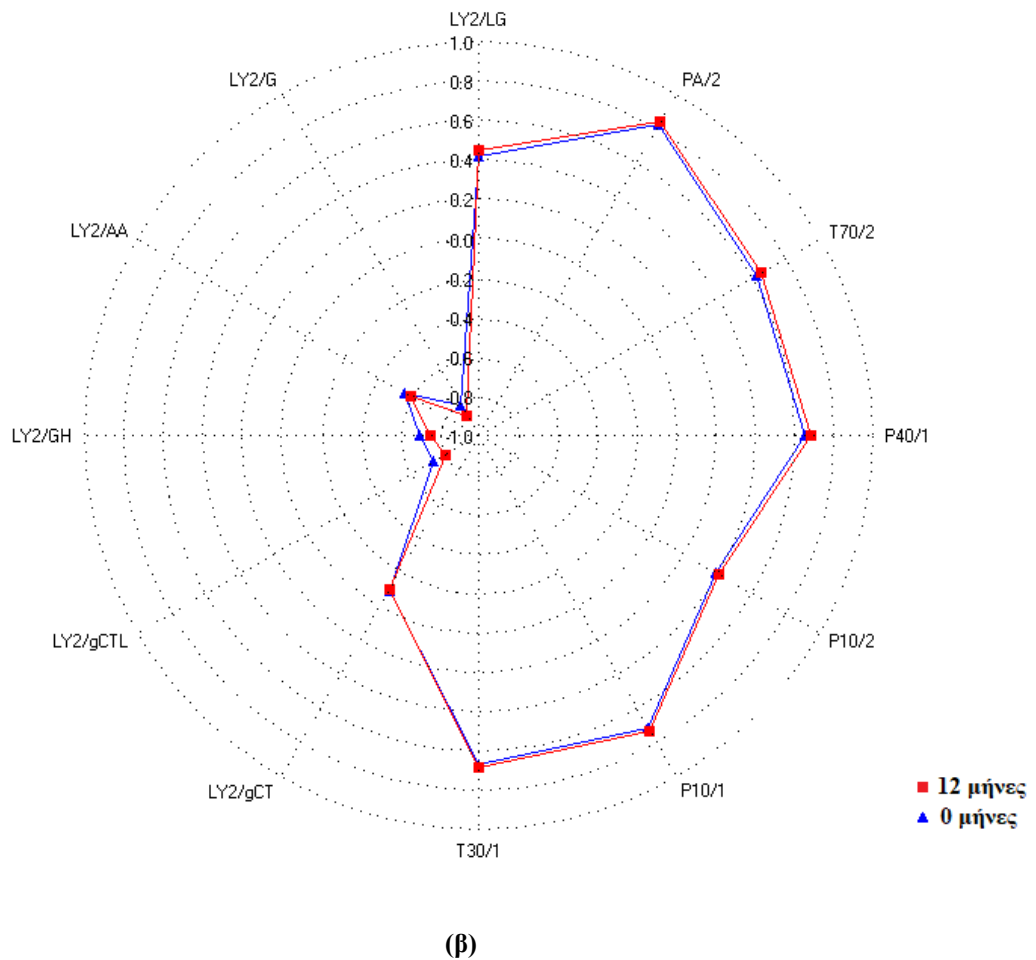
Γράφημα 14. Γραφήματα χρόνου έναντι έντασης της απόκρισης των 12 μεταλλικών αισθητήρων στα δείγματα ελιάς των ποικιλιών (α) Κονσερβολιά και (β) Χαλκιδική.

Η αντίσταση των αισθητήρων PA/2, P10/1, T30/1, P40/1, LY2/LG και T70/2 ήταν εμφανώς μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υπόλοιπους 7 αισθητήρες. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω γραφήματα, οι αποκρίσεις των αισθητήρων ήταν παρόμοιες για τις δύο ποικιλίες επιτραπέζιας ελιάς, γεγονός που υποδεικνύει ότι το πτητικό προφίλ των δύο ποικιλιών ήταν παρόμοιο. Το Γράφημα 15 δείχνει την απόκριση των αισθητήρων σε μορφή αραχνοειδούς διαγράμματος για τις δύο ποικιλίες στην έναρξη (0 μήνες) και στο τέλος (12 μήνες) της αποθήκευσης. Η

περιοχή κάτω από το διάγραμμα ραντάρ για τους αισθητήρες PA/2, P10/1, T30/1, P40/1, LY2/LG και T70/2 φαίνεται να αυξήθηκε ελαφρώς με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης από 0 έως 12 μήνες.

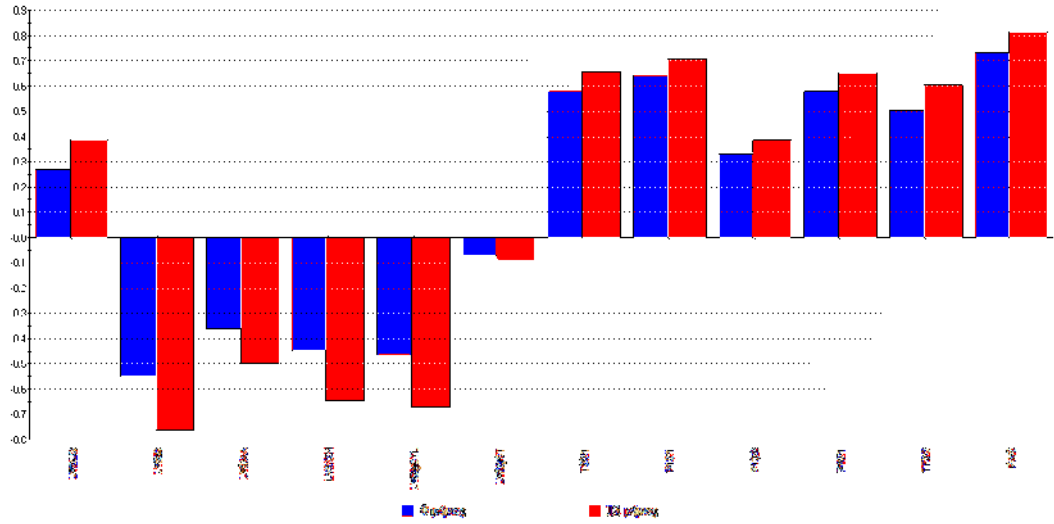


(α)

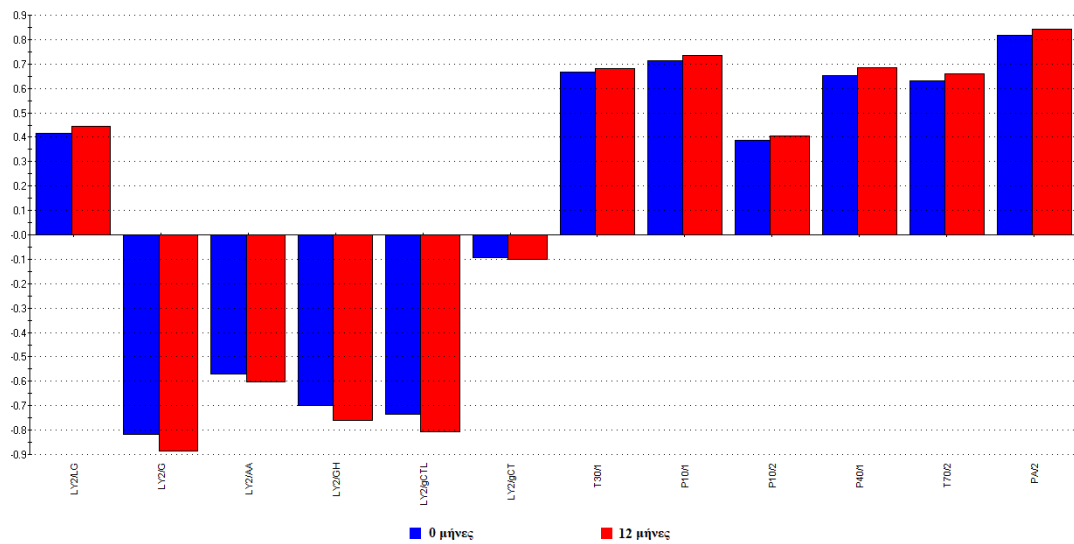


Γράφημα 15. Απόκριση των αισθητήρων σε μορφή ραντάρ στους 0 και στους 12 μήνες αποθήκευσης για την ποικιλία **(α)** «Κονσερβολιά» και **(β)** «Χαλκιδική».

Στο Γράφημα 16 φαίνεται πιο ξεκάθαρα η διαφορά μεταξύ 0 και 12 μηνών αποθήκευσης, στην απόκριση των προαναφερθέντων αισθητήρων. Επιπλέον παρατηρείται ότι η διαφορά αυτή, με την πάροδο των μηνών αποθήκευσης είναι αρκετά πιο αισθητή και ευκρινής στις ελιές της ποικιλίας «Κονσερβολιά» απ’ ότι σε αυτές της ποικιλίας «Χαλκιδική».



(α)



(β)

Γράφημα 16. Απόκριση των αισθητήρων σε μορφή ραβδογράμματος στην αρχή (0 μήνες) και στο τέλος (12 μήνες) της αποθήκευσης για την ποικιλία (α) «Κονσερβολιά» και (β) «Χαλκιδική».

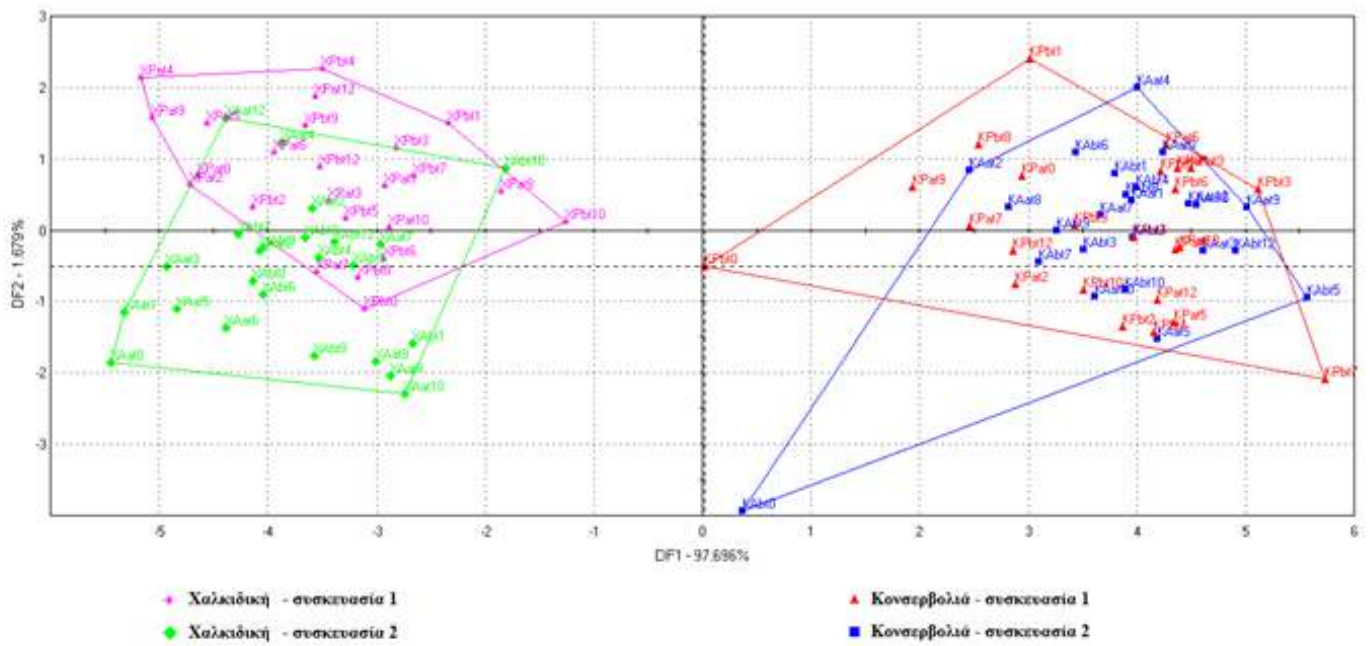
Και στις δύο ποικιλίες, οι αισθητήρες LY2/G, LY2/AA, LY2/GH, LY2/gCTL και LY2/gCT έδωσαν αρνητική απόκριση στα γραφήματα της αντίστασης, που δείχνει ότι οι αισθητήρες δεν έπαιξαν σημαντικό ρόλο στον χαρακτηρισμό των δειγμάτων ελιάς που αναλύθηκαν.

3.2. Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (Discriminant factor analysis, DFA)

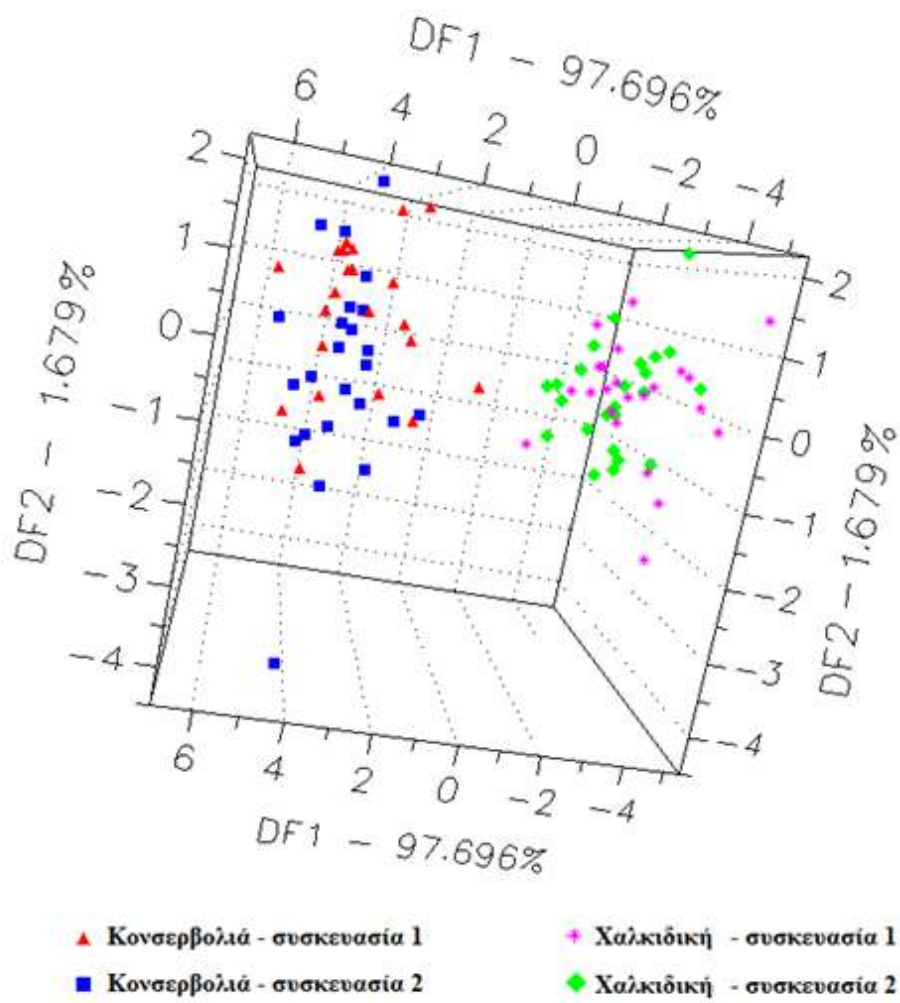
Η ανάλυση και η ερμηνεία των αποκρίσεων των αισθητήρων της ηλεκτρονικής μύτης βασίστηκε σε πολυμεταβλητές μεθόδους ανάλυσης και ειδικότερα στη Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση, με σκοπό το διαχωρισμό των δειγμάτων της επιτραπέζιας ελιάς των δύο ποικιλιών σε προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας, οι οποίες είναι γνωστές εκ των προτέρων (a priori), δηλαδή προϋποθέτει γνώση της δομής των δεδομένων. Οι κανόνες ταξινόμησης βασίζονται σε γραμμικούς συνδυασμούς των παρατηρούμενων μεταβλητών, οι οποίοι ονομάζονται διακριτικές συναρτήσεις (Discriminant Functions, DF). Η γραφική παράσταση της διακριτικής ανάλυσης (DFA) των δειγμάτων ελιάς των ποικιλιών «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική» φαίνεται στο Γράφημα 17. Το γράφημα DFA έδειξε ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων της ελιάς ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί με βάση την ποικιλία και όχι με βάση τη συσκευασία. Η πρώτη διακριτική συνάρτηση (DF1) μπόρεσε να εξηγήσει το 97,69% της παραλλακτικότητας των δεδομένων και η διακριτική συνάρτηση (DF2) το 1,68%. Το Γράφημα 18 παρουσιάζει την διακριτική ανάλυση παραγόντων σε μορφή 3D γραφήματος για τις δύο ποικιλίες και δύο συσκευασίες ελιάς. Η απόσταση μεταξύ των ομάδων και στις δύο παραπάνω μορφές διαγράμματος, είναι ένας τρόπος αξιολόγησης της ομοιότητας μεταξύ δύο ομάδων δειγμάτων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, από την διακριτική παραγοντική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, παρατηρείται ότι οι δύο ποικιλίες μπορούν να διαχωριστούν με βάση το πτητικό τους προφίλ καθώς οι ομάδες «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική» φαίνεται να απέχουν αρκετά μεταξύ τους και στα δύο είδη γραφημάτων. Ωστόσο δεν διακρίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των δύο πλαστικών συσκευασίας, καθώς και στις δύο περιπτώσεις ποικιλιών, οι δύο ομάδες συσκευασιών σχεδόν αλληλεπικαλύπτονται, τόσο στο γράφημα DFA με δύο και τρεις διακριτικές συναρτήσεις. Αυτό άμεσα οδηγεί στο συμπέρασμα πως το μέσο συσκευασίας δεν επιδρά σημαντικά στην παραγωγή των πτητικών από τις ελιές.

Validation Score = 94



Γράφημα 17. Διακριτική παραγοντική ανάλυση (DFA) των δειγμάτων ελιάς των ποικιλιών «Κονσερβολιά» και «Χαλκιδική».



Γράφημα 18. Διακριτική ανάλυση παραγόντων σε μορφή 3D γραφήματος για τις δύο ποικιλίες και δύο συσκευασίες ελιάς.

E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του πτητικού κλάσματος των δειγμάτων ελιάς με χρήση αέριας χρωματογραφίας SPME-GC/MS, αλλά και της ηλεκτρονικής μύτης Alpha M.O.S. Ογδόντα οκτώ (88) πτητικές ενώσεις ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα οι οποίες συμπεριλάμβαναν αρκετά οξέα, τερπένια, αλδεΐδες, κετόνες, αιθέρες αλλά κυρίως αλκοόλες και εστέρες. Η υψηλή περιεκτικότητα σε οξικό οξύ και αιθανόλη υποδηλώνει πως όλα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αλκοολική και ετεροζυμωτική γαλακτική ζύμωση. Επιπλέον, η παρουσία βακτηρίων όπως *Acetobacter* spp., *Propionibacterium* spp. αλλά και ζυμών, μπορεί να επιβεβαιωθεί από τις υψηλές ποσότητες προπανοϊκών και οξικών εστέρων, καθώς και οξικών και προπανοϊκών οξέων, ενώσεων οι οποίες συχνά προκύπτουν ως προϊόντα του μεταβολισμού τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης στα δεδομένα του GC/MS που ακολούθησε, προέκυψε ομαδοποίηση των δειγμάτων σε κλάσεις, οι οποίες αντιπροσώπευαν τις διαφορετικές ποικιλίες των δειγμάτων ελιάς. Ανιχνεύθηκαν 15 σημαντικές πτητικές ενώσεις, ανάμεσα στις οποίες περιλαμβάνονταν αλκοόλες, οργανικά οξέα, εστέρες, και τερπένια. Παρατηρήθηκε πως η διαφοροποίηση με βάση την ποικιλία ήταν εφικτή. Επιπλέον, όταν αναλύθηκαν τα δεδομένα από την κάθε ποικιλία ξεχωριστά με την χρήση της επιβλεπόμενης μεθόδου κατηγοριοποίησης OPLS-DA, ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο πλαστικών συσκευασίας ήταν ικανοποιητικός. Επίσης, από την Διακριτική Παραγοντική Ανάλυση (DFA) που πραγματοποιήθηκε στα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση με την ηλεκτρονική μύτη, παρατηρήθηκε πως ότι οι δύο ποικιλίες διαχωρίζονται με βάση το πτητικό τους προφίλ, ενώ με βάση το μέσο συσκευασίας δεν επιτεύχθηκε σημαντικός διαχωρισμός.

Επομένως, η σύσταση του κλάσματος των πτητικών συστατικών είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ποικιλία της ελιάς. Όσον αφορά δε το μέσο συσκευασίας, φαίνεται επίσης να επιδρά στην παραγωγή πτητικών ουσιών από τις ελιές. Ο διαχωρισμός ως προς την ποικιλία ήταν εφικτός και επιβεβαιώθηκε και με τις δύο αναλυτικές τεχνικές (GCMS, e-nose), όμως η διαφοροποίηση σε σχέση με το πλαστικό συσκευασίας δεν φάνηκε να γίνεται αισθητή στην περίπτωση της ανάλυσης με την ηλεκτρονική μύτη. Αυτό άμεσα αποδεικνύει πως οι διάφορες πτητικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, εμπεριέχουν κυρίως πληροφορίες σχετικά με την ποικιλία της ελιάς, και σε δεύτερο χρόνο δεδομένα που σχετίζονται με την συσκευασία των δειγμάτων. Οι παραπάνω δύο αναλυτικές τεχνικές, σε συνδυασμό με τις διάφορες στατιστικές μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης, καθίστανται άμεσα εξαιρετικά χρήσιμα εργαλεία για την διαφοροποίηση των ποικιλιών ελιάς με βάση το πτητικό τους προφίλ, αλλά και για την πιθανή ανίχνευση μεταβολών που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της συντήρησης, κάτι που σίγουρα απαιτεί επιπλέον πειράματα.

Η σύσταση του πτητικού κλάσματος στις ελιές, πέρα από την ποικιλία, είναι άμεσα συνδεδεμένη με το χαρακτηριστικό άρωμα και την ποιότητα του τελικού

προϊόντος παίζοντας κατ' επέκταση σημαντικό ρόλο στην αποδοχή του από τον καταναλωτή. Συνεπώς, το συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο, εύλογα καθίσταται ένα αντικείμενο ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος με σπουδαίες προοπτικές για περαιτέρω μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, τον πιθανό συνδυασμό του με μικροβιολογικές αναλύσεις και οργανοληπτικά δεδομένα με σκοπό την εύρεση ουσιών που θα μπορούσαν πιθανώς να αποτελέσουν βιοδείκτες για την πορεία της συντήρησης και τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Ωστόσο σίγουρα κάτι τέτοιο, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση και στατιστική επεξεργασία για να αποδειχθεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A., Skoog D., West D. M., Holler J.F., and Crouch S. R. 2005. *Θεμελιώδεις Αρχές Αναλυτικής Χημείας*.
- Arroyo-López, Francisco, Amparo Querol, Joaquin Bautista-Gallego, and Antonio Garrido Fernández. 2008. “Role of Yeast in Table Olive Production.” *International journal of food microbiology* 128: 189–96.
- Aulakh, J S, A K Malik, Varinder Kaur, and Philippe Schmitt-Kopplin. 2005. “A Review on Solid Phase Micro Extraction—High Performance Liquid Chromatography (SPME-HPLC) Analysis of Pesticides.” *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 35(1): 71–85.
<https://doi.org/10.1080/10408340590947952>.
- Benady, M, James Simon, D Charles, and G Miles. 1995. “Fruit Ripeness Determination by Electronic Sensing of Aromatic Volatiles.” *Transactions of the ASAE* 38: 251–57.
- Bijlsma, Sabina et al. 2006. “Large-Scale Human Metabolomics Studies: A Strategy for Data (Pre-) Processing and Validation.” *Analytical chemistry* 78: 567–74.
- Bobillo, Mercedes, and Valerie Marshall. 1991. “Effect of Salt and Culture on Lactate and Acetate Production by *Lactobacillus Plantarum*.” *Food Microbiology* 8: 153–60.
- Cao, Mengsi et al. 2019. “An Untargeted and Pseudotargeted Metabolomic Combination Approach to Identify Differential Markers to Distinguish Live from Dead Pork Meat by Liquid Chromatography–mass Spectrometry.” *Journal of Chromatography A* 1610: 460553.
- Caplice, Elizabeth, and Gerald Fitzgerald. 1999. “Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation.” *International journal of food microbiology* 50: 131–49.
- Chammem, Nadia et al. 2005. “Combined Effect of Alkali Pretreatment and Sodium Chloride Addition on the Olive Fermentation Process.” *Bioresource technology* 96: 1311–16.
- Codex Alimentarius
- Conde, Carlos, Serge Delrot, and Hernâni Gerós. 2008. “Physiological, Biochemical and Molecular Changes Occurring during Olive Development and Ripening.” *Journal of plant physiology* 165: 1545–62.
- Creed, Philip. 2010. “Chemical Deterioration and Physical Instability in Ready-to-Eat Meals and Catered Foods.” In *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*, , 608–62.
- Drinan, D, S Robin, and Timothy Cogan. 1976. “Citric Acid Metabolism in Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria.” *Applied and environmental microbiology* 31: 481–86.
- Dudzik, Danuta, Cecilia Barbas Bernardos, Antonia Garcia, and Coral Barbas. 2017. “Quality Assurance Procedures for Mass Spectrometry Untargeted Metabolomics. A Review.” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

- Evans, Phillip et al. 2000. "Evaluation of a Radial Base Function Neural Network for the Determination of Wheat Quality from Electronic Nose Data." *Sensors and Actuators B-chemical - SENSOR ACTUATOR B-CHEM* 69: 348–58.
- Faid, Mohamed, Rachida Akhartouf, and Abdeslam Asehrou. 1994. "Microorganisms Associated with Post-Harvest Green Olives Deteriorations in Morocco." *Grasas y Aceites* 45.
- Feng, Tao et al. 2019. "Gas Chromatography for Food Quality Evaluation." In , 219–65.
- Garrido-Fernández, A., and M. J. Fernández-Díez. 1997. *Table Olives Production and Processing*. 1st Editio. London Chapman & Hall.
- Garrido Fernández, Antonio et al. 2017. "Volatile Profiles of Green Spanish-Style Table Olives: Application of Compositional Data Analysis for the Segregation of Their Cultivars and Production Areas." *Talanta* 169.
- Guerrero, Armando et al. 2006. "Strategies for Qualitative and Quantitative Analyses with Mass Spectrometry-Based Electronic Noses." *Trends in Analytical Chemistry - TrAC* 25: 257–66.
- H.D., Belitz, Grosch W., and Schieberie P. 2004. *Food Chemistry*. Springer.
- Hai, Zheng, and Jun Wang. 2006. "Detection of Adulteration in Camellia Seed Oil and Sesame Oil Using an Electronic Nose." *European Journal of Lipid Science and Technology* 108: 116–24.
- Hepkeran, Zeynep et al. 2006. "Mycobiota, Mycotoxigenic Fungi, and Citrinin Production in Black Olives." *Advances in experimental medicine and biology* 571: 203–10.
- . 2013. "Microbiota of Table Olive Fermentation and Criteria of Selection for Their Use as Starters." *Frontiers in microbiology* 4: 143.
- IOOC. 2019. "https://www.internationaloliveoil.org/." <https://www.internationaloliveoil.org/>.
- J., Pawliszyn. 1997. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*.
- Kalua, Curtis et al. 2007. "Olive Oil Volatile Compounds, Flavour Development and Quality: A Critical Review." *Food Chemistry* 100: 273–86.
- Labreche, Saïd, Sandrine Bazzo, S Cadé, and Eric Chanie. 2005. "Shelf Life Determination by Electronic Nose: Application to Milk." *Sensors and Actuators B: Chemical* 106: 199–206.
- Li, Zhenfeng, Ning Wang, Vijaya Raghavan, and Clément Vigneault. 2009. "Ripeness and Rot Evaluation of 'Tommy Atkins' Mango Fruit through Volatiles Detection." *Journal of Food Engineering - J FOOD ENG* 91: 319–24.
- Lipshitz, Nili, Ram Gophna, Moshe Hartman, and Gideon Biger. 1991. "The Beginning of Olive (*Olea Europaea*) Cultivation in the Old World: A Reassessment." *Journal of Archaeological Science* 18: 441–53.
- M., Niaounakis, and Halvadakis P. 2006. *Olive Processing Waste Management - Literature Review and Patent Survey*. 2nd ed. Pergamon.
- MCFEETERS, R. 2004. "Fermentation Microorganisms and Flavor Changes in Fermented Foods." *Journal of Food Science* 69: FMS35–37.

- Minagric.gr. “[Http://Www.Minagric.Gr/Index.Php/El/](http://www.minagric.gr/index.php/el/).”
<http://www.minagric.gr/index.php/el/>.
- Molto, Enrique et al. 1999. “An Aroma Sensor for Assessing Peach Quality.” *Journal of Agricultural Engineering Research - J AGR ENG RES* 72: 311–16.
- Montaño, A et al. 2003. “Chemical Profile of Industrially Fermented Green Olives of Different Varieties.” *Food Chemistry* 82: 297–302.
- Morales, Maria, and Maria Tsimidou. 2000. “The Role of Volatile Compounds and Polyphenols in Olive Oil Sensory Quality.” in *Handbook of Olive Oil* (eds J. Harwood and R. Aparicio): 393–438.
- Natale, Corrado et al. 2001. “Electronic Nose Based Investigation of the Sensorial Properties of Peaches and Nectarines.” *Sensors and Actuators B: Chemical* 77: 561–66.
- Nicolaï, Bart et al. 2009. “Non-Destructive Evaluation. Detection of External and Internal Attributes Frequently Associated with Quality and Damage.” *Postharvest Handling*: 421–41.
- OnlineBiologyNotes.com. “No Title.” <https://www.onlinebiologynotes.com/different-fermentation-pathway-bacteria/>.
- Oshita, S et al. 2000. “Discrimination of Odors Emanating from ‘La France’ Pear by Semi-Conducting Polymer Sensors.” *Computers and Electronics in Agriculture* 26: 209–16.
- Özkaya, Fügen, and Mucahit Ozkaya. 2011. “Oleuropein Using as an Additive for Feed and Products Used for Humans.” *Journal of Food Processing & Technology* 02.
- Pallottino, Federico et al. 2012. “Electronic Nose Application for Determination of *Penicillium Digitatum* in Valencia Oranges.” *Journal of the science of food and agriculture* 92: 2008–12.
- Panagou, Efstathios, O Hondrodinou, Athanasios Mallouchos, and George-John Nychas. 2011. “A Study on the Implications of NaCl Reduction in the Fermentation Profile of Conservolea Natural Black Olives.” *Food microbiology* 28: 1301–7.
- Panagou, Efstathios, and Constantinos Katsaboukakis. 2006. “Effect of Different Brining Treatments on the Fermentation of Cv. Conservolea Green Olives Processed by the Spanish-Method.” *Food microbiology* 23: 199–204.
- Panagou, Efstathios, Ulrich Schillinger, Charles Franz, and George-John Nychas. 2008. “Microbiological and Biochemical Profile of Cv. Conservolea Naturally Black Olives during Controlled Fermentation with Selected Strains of Lactic Acid Bacteria.” *Food microbiology* 25: 348–58.
- Panagou, Efstathios, Chrysoula Tassou, and Panagiotis Skandamis. 2006. “Physicochemical, Microbiological, and Organoleptic Profiles of Greek Table Olives from Retail Outlets.” *Journal of food protection* 69: 1732–38.
- Peris, Miguel, and Laura Escuder-Gilabert. 2009. “A 21st Century Technique for Food Control: Electronic Noses.” *Analytica chimica acta* 638: 1–15.
- Persaud, Krishna, and George Dodd. 1982. “Analysis of Discrimination Mechanisms in the Mammalian Olfactory System Using a Model Nose.” *Nature* 299(5881): 352–55. <https://doi.org/10.1038/299352a0>.

- Pillonel, L, J Bosset, and Raffaele Tabacchi. 2002. "Rapid Preconcentration and Enrichment Techniques for the Analysis of Food Volatile. A Review." *Lwt - Food Science and Technology* 35: 1–14.
- Plutowska, Beata, and Waldemar Wardencki. 2007. "Aromagrams – Aromatic Profiles in Appreciation of Food Quality." *Food Chemistry* 101: 845–72.
- Purves, W. K.; Orians, G. H.; Heller, H. C .Raig. 1994. *Life: The Science of Biology*. 4th ed. Sinauer Associates Inc.
- Putnik, Predrag et al. 2019. "Trends in Chemometrics and Meat Products." *IOP Conference Series Earth and Environmental Science* 333: 12016.
- R., Loussert, and Brousse G. 1980. *L' Olivier*.
- S., Kailis, and Harris D. 2007. *Producing Table Olives*.
- Sabatini, Nadia, and Vincenzo Marsilio. 2008. "Volatile Compounds in Table Olives (Olea Europaea L., Nocellara Del Belice Cultivar)." *Food Chemistry* 107: 1522–28.
- Sabatini, Nadia, Enzo Perri, and Vincenzo Marsilio. 2009. "An Investigation on Molecular Partition of Aroma Compounds in Fruit Matrix and Brine Medium of Fermented Table Olives." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10: 621–26.
- Sánchez Gómez, Antonio et al. 2016. "Retention of Color and Volatile Compounds of Spanish-Style Green Table Olives Pasteurized and Stored in Plastic Containers under Conditions of Constant Temperature." *LWT - Food Science and Technology* 75.
- Science, Kew. "Https://Www.Kew.Org/Science." <https://www.kew.org/science>.
- Sides, Alasdair, Kevin Robards, and Stuart Helliwell. 2000. "Development in Extraction Techniques and Their Application to Analysis of Volatiles in Foods." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19: 322–29.
- Smolander, M. 2003. "The Use of Freshness Indicators in Packaging." In *Novel Food Packaging Techniques*, , 127–43.
- Srivastava, Shubhangi, Gayatri Mishra, and Hari N Mishra. 2019. "Probabilistic Artificial Neural Network and E-Nose Based Classification of Rhyzopertha Dominica Infestation in Stored Rice Grains." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 186.
- Tassou, Chrysoula, E Z Panagou, and K Z Katsaboxakis. 2002. "Microbiological and Physicochemical Changes of Naturally Black Olives Fermented at Different Temperatures and NaCl." *Food Microbiology* 19: 605–15.
- Tian, Xiaojing, Jun Wang, and Shaoqing Cui. 2013. "Analysis of Pork Adulteration in Minced Mutton Using Electronic Nose of Metal Oxide Sensors." *Journal of Food Engineering* 119: 744–49.
- Vas, Gyorgy, and Károly Vékey. 2004. "Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis." *Journal of mass spectrometry : JMS* 39: 233–54.
- Worley, Bradley, and Robert Powers. 2013. "Multivariate Analysis in Metabolomics." *Current Metabolomics* 1(1): 92–107.
- . 2016. "PCA as a Practical Indicator of OPLS-DA Model Reliability."

Current Metabolomics 4(2): 97–103.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27547730>.

Wu, Shubin, Gaojin Lyu, and Rui Lou. 2012. “Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis.”

Zhong, Yaoguang. 2019. “Electronic Nose for Food Sensory Evaluation.” In , 7–22.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Α., Κυριτσάκης. 1993. *Το Ελαιόλαδο : Χημική Σύνθεση, Τεχνολογία, Ποιοτικός Έλεγχος*. 3η Έκδοση. ed. Θεσσαλονίκη : Αγροτικές Συνεταιριστικές Εκδόσεις.
- Γ., Μπαλατσούρας. 1995. *Η Επιτραπέζια Ελιά*.
- ΔΟΕΠΕΛ. 2019. “Εθνική Διαεπαγγελματική Οργάνωση Επιτραπέζιας Ελιάς.”
<https://doepel.gr/>.
- Ε., Πανάγου. 2002. “Ζύμωση, Συντήρηση Και Οικολογία Της Επιτραπέζιας Ελιάς.” Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Θ., Χατζηϊωάννου Π., and Κουμπάρης Α. Μ. 2010. *Ενόργανη Ανάλυση*.
- Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β. 2015. “Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων.” In *Βιοαναλυτική Χημεία*, Εκδόσεις Κάλλιπος, 6.1-6.18. <http://hdl.handle.net/11419/3672>.
- Ι., Μπλούκας. 2004. *Επεξεργασία Και Συντήρηση Τροφίμων*. Σταμούλη Α.Ε.
- Σ., Κερκέζου. 2017. “Μελέτη Της Ζύμωσης Της Φυσικής Μαύρης Ελιάς Ποικιλίας Καλαμών Με Τη Χρήση Επιλεγμένων Στελεχών Ζυμών Ως Καλλιέργειες Εκκίνησης.” Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π-1. Οργανικές πτητικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με την τεχνική αέριας χρωματογραφίας/φασματομετρίας μαζών (GC/MS) στις ποικιλίες Κονσερβολιά και Χαλκιδική και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις αυτών εκφρασμένες σε μg (ουσίες)/ kg (πάστας ελιάς) \pm SD στους 0, 6 και 12 μήνες συντήρησης

Πτητική ένωση	Χρόνος συντήρησης 0 Μήνες		Χρόνος συντήρησης 6 Μήνες		Χρόνος συντήρησης 12 Μήνες	
	Χαλκιδική	Κονσερβολιά	Χαλκιδική	Κονσερβολιά	Χαλκιδική	Κονσερβολιά
1 Hexane	0.94±0.05	1.07±0.35	0.77±0.11	1.20±0.02	0.10±0.03	4.86±0.89
2 Octane	0.40±0.12	0.30±0.10	0.11±0.10	0.24±0.05	1.30±1.07	1.21±0.20
3 Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1- (1-methylethyl)	0.31±0.05	0.36±0.10	0.38±0.06	0.33±0.05	0.99±0.73	0.53±0.07
4 Carvacrol methyl ether	0.86±0.01	0.79±0.18	0.54±0.08	0.78±0.09	2.37±1.26	1.20±0.24
5 Acetone	0.58±0.02	0.68±0.06	1.12±0.07	1.17±0.15	1.37±1.18	0.51±0.03
6 2-Butanone	1.02±0.06	0.68±0.48	1.41±0.28	0.75±0.23	3.04±0.37	0.43±0.35
7 5-Hepten-2-one, -6methyl	1.92±0.21	1.05±0.09	7.18±1.03	4.53±2.01	2.42±2.08	1.90±0.14
8 Acetaldehyde	0.25±0.02	0.16±0.01	0.26±0.05	0.11±0.00	0.16±0.01	0.13±0.00
9 2-Propenal	0.23±0.04	0.26±0.01	0.28±0.03	0.24±0.19	0.39±0.13	0.26±0.01
10 Octanal	0.14±0.03	0.08±0.04	2.35±0.09	0.55±0.47	1.93±1.37	1.52±0.53
11 2-Heptenal, (Z)-	0.31±0.35	0.54±0.43	1.07±0.15	1.34±0.69	2.86±3.97	3.64±0.48
12 2-Decenal, (E)-	0.09±0.02	0.10±0.02	0.93±0.09	0.13±0.11	0.93±1.18	0.64±0.21
13 Acetic acid	340.75±45.14	336.65±100.26	361.81±0.73	416.92±30.36	520.37±223.29	425.8±34.07
14 Propanoic acid	229.45±8.49	194.26±147.56	249.85±13.84	336.15±3.35	323.63±106.97	362.89±38.23
15 Propanoic acid, 2-methyl-	1.28±0.02	1.49±0.01	1.28±0.05	1.77±0.00	1.50±0.53	1.40±0.07
16 Butanoic acid	2.96±0.35	2.60±1.22	2.95±0.17	3.85±0.07	4.47±1.86	3.31±0.34
17 Butanoic acid, 3-methyl-	10.63±0.79	10.40±0.33	9.59±0.67	10.77±1.05	13.26±5.84	7.98±1.75
18 Hexanoic acid	1.56±0.15	1.62±1.31	1.84±0.25	2.20±0.45	4.25±2.70	2.43±0.02
19 Octanoic acid	1.26±0.25	1.94±0.57	1.12±0.20	1.31±0.36	5.94±3.43	4.79±1.25
20 Nonanoic acid	0.05±0.02	1.42±1.60	0.02±0.01	0.11±0.00	15.20±5.71	11.31±0.55
21 β-Pinene	0.38±0.50	0.67±0.04	0.02±0.01	0.25±0.20	1.08±0.21	1.19±0.17
22 b-Myrcene	0.40±0.47	0.61±0.12	0.46±0.02	0.38±0.21	0.37±0.06	1.19±0.17
23 α-Terpinene	0.76±0.14	1.08±0.38	0.50±0.08	0.45±0.48	2.30±1.41	1.43±0.36
24 D-Limonene	3.78±0.97	2.56±0.41	3.58±0.29	2.64±1.84	11.52±4.16	2.81±0.50
25 β-Phellandrene	0.25±0.10	0.06±0.02	0.18±0.17	0.07±0.04	0.78±0.03	0.10±0.04
26 Eucalyptol	4.65±0.57	3.41±0.81	4.07±0.57	3.04±0.57	7.54±2.27	3.87±0.23
27 γ-Terpinene	6.40±0.71	8.87±3.47	5.95±0.02	9.30±3.19	25.76±16.80	16.11±2.60
28 Cymene	17.89±0.21	31.16±12.53	17.00±0.62	29.51±3.86	56.46±26.24	40.79±2.53
29 Copaene	0.06±0.03	2.51±0.35	0.25±0.18	3.82±1.27	0.96±0.70	2.81±1.50
30 Camphor	0.94±0.08	0.57±0.15	0.96±0.11	0.50±0.15	1.77±0.85	0.58±0.10
31 Linalool	4.64±0.43	6.07±1.58	5.93±0.78	6.14±1.18	8.47±2.63	6.76±0.75
32 α-Terpineol	1.08±0.11	1.41±0.37	1.20±0.21	1.31±0.32	2.34±1.28	1.43±0.23
33 endo-Borneol	1.37±0.15	1.51±0.25	1.68±0.28	1.58±0.49	2.36±0.89	1.68±0.05
34 Thymol	11.21±0.79	12.50±2.51	15.36±2.35	23.28±2.84	22.03±8.74	16.24±2.48
35 Carvacrol	8.48±0.47	18.69±5.99	10.84±2.29	0.11±0.00	20.34±7.93	0.13±0.00
36 Ethanol	81.06±0.55	80.70±42.99	83.64±7.99	90.18±6.33	78.40±1.83	71.51±9.85
37 2-Butanol, (R)-	128.41±9.72	38.08±10.04	135.23±10.24	43.18±3.19	127.84±3.67	35.34±2.31
38 1-Propanol	146.25±11.23	22.12±31.17	148.97±50.46	180.54±4.16	190.38±48.08	165.33±31.16

39	1-Propanol, 2-methyl-	0.80±0.28	0.94±0.06	0.67±0.12	0.73±0.88	0.06±0.02	0.69±0.22
40	1-Butanol	5.15±0.19	2.36±2.47	4.38±0.23	3.45±0.38	7.25±0.75	2.74±0.18
41	1-Butanol, 3-methyl-	7.46±0.36	12.00±0.34	6.02±0.74	9.33±0.96	11.47±1.41	9.37±1.66
42	1-Pentanol	0.39±0.02	0.35±0.03	0.50±0.09	0.34±0.01	1.18±0.57	0.50±0.01
43	2-Heptanol	0.89±0.11	0.55±0.08	0.97±0.16	0.55±0.04	1.46±0.75	0.43±0.03
44	1-Hexanol	2.49±0.12	4.11±0.60	2.47±0.51	3.09±0.30	5.47±2.51	4.00±0.14
45	3-Hexen-1-ol, (Z)-	3.11±0.26	4.43±1.15	3.04±0.42	3.40±0.01	6.71±3.99	3.20±0.24
46	1-Octen-3-ol	3.88±0.14	4.99±1.26	5.16±1.15	5.30±1.51	7.71±2.29	6.76±0.76
47	1-Heptanol	1.37±0.11	2.16±0.06	1.17±0.27	1.70±0.66	2.38±1.20	2.06±0.22
48	2-Ethyl-1-hexanol	1.04±0.47	1.08±0.30	0.77±0.15	1.52±1.38	3.41±2.99	0.86±0.12
49	2,3-Butanediol	0.73±0.23	0.63±0.46	0.79±0.32	0.88±0.12	0.06±0.02	0.13±0.00
50	1-Octanol	2.36±0.16	2.78±0.12	3.15±0.40	3.01±0.47	4.23±2.45	2.72±0.44
51	Terpinen-4-ol	2.71±0.14	3.85±0.53	3.06±0.68	3.73±0.93	6.36±3.75	4.05±0.33
52	1-Nonanol	1.39±0.13	1.55±0.30	1.71±0.36	2.05±0.14	2.27±1.12	1.42±0.13
53	Phenol, 2-methoxy-	1.47±0.02	6.23±1.65	1.74±0.30	6.32±0.72	2.71±1.36	6.99±0.86
54	Benzyl alcohol	3.36±0.23	6.35±1.26	4.61±0.75	4.08±5.62	5.89±2.91	5.63±0.89
55	Phenylethyl Alcohol	11.19±1.56	17.69±0.97	14.25±1.98	19.00±2.99	22.02±10.47	14.93±3.38
56	p-Methylguaiacol	45.33±1.15	70.07±14.45	48.61±10.17	76.17±12.38	89.73±42.63	70.24±6.16
57	Phenol	0.19±0.03	0.71±0.14	0.10±0.11	0.78±0.11	0.36±0.23	2.66±0.41
58	Phenol, 4-methyl-	0.93±0.04	2.28±1.04	0.92±0.10	2.41±0.54	1.83±0.77	2.68±0.34
59	Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-	0.49±0.24	0.39±0.18	0.53±0.14	0.41±0.11	0.54±0.24	0.22±0.03
60	Phenol, 4-ethyl-	0.82±0.03	3.10±0.77	0.80±0.13	3.26±0.63	1.88±1.22	2.97±0.46
61	Acetic acid, methyl ester	11.90±1.92	10.92±7.38	17.29±2.13	9.43±0.46	23.84±10.62	14.60±4.75
62	Ethyl Acetate	71.69±12.19	81.64±54.50	96.28±10.78	62.24±3.27	105.56±32.73	80.24±18.31
63	Methyl propionate	7.96±0.87	8.84±5.50	10.54±0.73	9.01±0.02	17.05±3.75	25.91±5.15
64	Propanoic acid, ethyl ester	46.02±7.73	54.27±34.50	52.66±7.17	47.87±1.55	83.75±29.57	123.93±20.76
65	n-Propyl acetate	441.53±1.91	414.14±204.43	491.97±59.46	435.24±16.34	603.02±266.02	358.60±50.28
66	sec-Butyl acetate	13.58±2.42	5.42±2.55	18.99±1.67	6.80±0.10	21.68±5.71	4.90±0.14
67	Isobutyl acetate	1.17±0.18	1.88±0.41	1.19±0.12	1.70±0.07	1.03±0.57	1.03±0.03
68	Propanoic acid, propyl ester	408.04±32.80	456.80±317.43	559.23±17.59	676.76±106.6	852.60±622.51	597.17±15.57
69	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	0.95±0.21	1.15±0.39	0.32±0.01	0.72±0.09	1.62±0.43	1.26±0.08
70	Acetic acid, butyl ester	8.57±0.30	4.84±3.46	7.10±0.49	7.88±0.62	9.54±2.64	4.07±0.03
71	Propanoic acid, 2-methylpropyl ester	0.93±0.29	1.60±1.50	1.71±0.07	2.55±0.13	0.70±0.35	2.76±0.07
72	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	10.08±2.77	17.31±2.99	10.20±1.76	21.29±1.50	11.02±5.64	9.48±0.69
73	Propanoic acid, butyl ester	9.85±2.37	8.65±9.58	10.24±0.65	10.43±1.13	0.06±0.02	9.49±0.01
74	3-Methylbutanoic acid, propyl ester	0.29±0.11	1.95±2.35	0.02±0.01	1.18±0.21	1.44±0.84	3.55±0.08
75	1-Butanol, 3-methyl-, propanoate	5.88±1.92	6.30±5.36	6.48±0.09	12.46±2.11	5.30±2.15	11.19±1.90
76	Ethyl hexanoate	0.15±0.01	0.73±0.47	0.38±0.05	0.83±0.03	1.12±0.73	0.98±0.14
77	Acetic acid, hexyl ester	0.99±0.21	1.68±0.39	0.74±0.04	1.60±0.13	1.30±0.75	1.11±0.10
78	3-Hexen-1-ol, acetate, (Z)-	1.00±0.11	1.49±0.39	0.79±0.39	1.65±0.08	1.13±0.51	0.86±0.03
79	Propanoic acid, hexyl ester	0.34±0.02	0.52±0.42	0.35±0.11	0.67±0.44	0.84±0.59	1.03±0.13
80	Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	0.38±0.13	1.94±2.37	0.53±0.14	0.59±0.02	0.29±0.26	0.13±0.00
81	3-Hexen-1-ol, propanoate, (Z)-	0.48±0.07	1.43±0.30	0.74±0.07	1.60±0.43	0.68±0.66	1.28±0.02
82	Isopropyl lactate	1.67±0.07	2.69±1.92	5.33±0.56	3.27±0.09	3.14±2.21	0.28±0.04
83	Octanoic acid, ethyl ester	0.26±0.19	0.78±0.29	0.38±0.06	0.82±0.06	0.96±0.46	0.60±0.37
84	Decanoic acid, ethyl ester	0.05±0.02	0.08±0.09	0.02±0.01	0.06±0.06	0.06±0.02	0.13±0.00

85	Benzyl acetate	0.97±0.05	1.50±0.59	1.31±0.30	2.05±0.40	1.08±0.56	0.99±0.06
86	2-Phenethyl acetate	2.90±0.27	4.26±1.15	6.71±0.64	8.94±1.70	3.96±2.48	2.80±0.27
87	Propanoic acid, 2-phenylethyl ester	1.11±0.12	1.22±0.74	1.81±0.39	1.94±0.07	1.79±1.37	1.90±0.25
88	Diallyl disulphide	3.36±0.30	3.76±1.29	4.09±0.57	1.90±2.53	10.73±4.59	0.13±0.00

¹ Κάθε τιμή του πίνακα είναι η μέση τιμή των δύο επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν, εκφρασμένη σε $\mu\text{g}_{(\text{ουσίας})}/\text{kg}_{(\text{πάστας ελιάς})} \pm \text{SD}$.