

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Γεωγραφική διαφοροποίηση ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους

Δάφνη-Βασιλική Ν. Θεοδωρίκου

<u>Επιβλέπων καθηγητής:</u> Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ

> AOHNA 2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Γεωγραφική διαφοροποίηση ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους

Geographical differentiation of Amfissis cultivar olive oil based on chromatographic and spectroscopic techniques combined with chemometrics

Δάφνη-Βασιλική Ν. Θεοδωρίκου

<u>Εξεταστική Επιτροπή:</u> Πέτρος Ταραντίλης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων) Χρήστος Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ Γεωγραφική διαφοροποίηση ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης με τη χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών σε συνδυασμό με χημειομετρικές μεθόδους

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου Εργαστήριο Γενικής Χημείας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρθένο ελαιόλαδο είναι το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον καρπό της ελιάς (Olea europaea L.) αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές επεξεργασίες. Βασικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής και ιδιαίτερα δημοφιλές λόγω των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών και των θετικών του επιδράσεων στην υγεία, αποτελεί βασικό εξαγώγιμο προϊόν της χώρας μας. Η Ελλάδα, κατέχοντας την τρίτη θέση στην παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την πρώτη στην παραγωγή εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, πρέπει να διασφαλίσει την τυποποίηση του προϊόντος της με βάση την ποικιλία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γεωγραφικής προέλευσης ώστε να εξασφαλίσει τις πιστοποιήσεις Π.Ο.Π και Π.Γ.Ε. της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα μελέτη, γίνεται προσπάθεια γεωγραφικής διαφοροποίησης 38 δειγμάτων παρθένου ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης από τις περιοχές της Φωκίδας και της Μαγνησίας.

Τα βασικά στάδια της μελέτης περιλαμβάνουν ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID), ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (SPME-GC-MS), ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, μελέτη των φαινολικών συστατικών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τετραπολική φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή χρόνου πτήσης (HPLC-ESI-QTOF-MS), λήψη των φασμάτων FTIR, στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και προσπάθεια γεωγραφικής διαφοροποίησης των δειγμάτων ελαιολάδου με χρήση χημειομετρικών μεθόδων.

Το προφίλ των λιπαρών οξέων και από τις δύο περιοχές χαρακτηρίστηκε από υψηλά επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Το πτητικό κλάσμα ήταν πλούσιο σε αλδεΰδες και ειδικότερα στην (E)-2-εξενάλη, όπου παρατηρήθηκε και σημαντική διαφορά στην συγκέντρωσή της ανάμεσα στις δύο περιοχές. Το φαινολικό κλάσμα περιείχε τις σημαντικότερες ενώσεις που συναντώνται στο ελαιόλαδο, όχι όμως την κυρίαρχη ουσία του καρπού της ελιάς, την ελευρωπαΐνη. Οι συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ μεταξύ λιπαρών οξέων και πτητικών ενώσεων έδειξαν παρόμοια χαρακτηριστικά αλλά και διαφορές μεταξύ των δειγμάτων κάθε περιοχής. Τα δείγματα ελαιολάδου παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην σύστασή τους και η γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) με βάση τη σύσταση σε λιπαρά οξέα, πτητικές ενώσεις και τα φάσματα FTIR των δειγμάτων ελαιολάδου. Παρατηρήθηκε ικανοποιητική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων ελαιολάδου των δυο περιοχών με βάση τα λιπαρά οξέα και τα φάσματα FTIR, και οριακή διαφοροποίηση με βάση τις πτητικές ενώσεις. Η προσπάθεια να αυξηθεί η διαφοροποίηση συνδυάζοντας μεταβλητές και συμπεριλαμβάνοντας το ποσοστό των ολικών φαινολικών δεν είχε αποτέλεσμα και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα ολικά φαινολικά δεν επηρεάζονται από την γεωγραφική προέλευση.

Επιστημονική περιοχή διατριβής: Χημεία Τροφίμων

Λέξεις-κλειδιά: παρθένο ελαιόλαδο, ποικιλία Αμφίσσης, γεωγραφική διαφοροποίηση, λιπαρά οξέα, πτητικές ενώσεις, φαινολικά συστατικά, φάσμα ATR-FTIR Geographical differentiation of Amfissis cultivar olive oil based on chromatographic and spectroscopic techniques combined with chemometrics

MSc Food Science & Technology Department of Food Science & Human Nutrition Laboratory of General Chemistry

ABSTRACT

Virgin olive oil (VOO) is obtained from the fresh fruits of the olive tree (*Olea europaea L.*) through physical or mechanical techniques. VOO has grown in popularity amongst consumers due both to its pleasant qualities and its health benefits. Greece, holds 3rd place among olive oil producing countries and 1st place among extra virgin olive oil producing countries in Europe. It is imperative for Greece to characterize and standardize its olive oil based on cultivar and particular geographical origin characteristics in an effort to establish a PDO or PGI olive oil status. The aim of this study is to make a comparative evaluation of 38 samples of Amfissis cultivar from two geographical regions (Phocis and Magnesia), to identify the VOOs by their region, thereby rendering it possible to establish the regional authenticity of VOO in Greece.

Identification and quantification of fatty acids was performed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), identification and quantification of volatile compounds by solid phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), quantification of total phenolic components by the Folin-Ciocalteu method, study of phenolic components by high pressure liquid chromatography in combination with high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). Also, FTIR spectra were obtained.

The fatty acid (FA) profile from both regions was characterized by high levels of monounsaturated FAs. The volatile fraction (VCs) was rich in aldehydes and notable differences were observed in the (*E*)-2-hexenal content of samples. The phenolic franction contained the most important compounds found in olive oil, but not the predominant compound of olive fruit, oleuropein. Spearman's ρ correlation coefficients among FAs and VCs indicated similar traits and differences between the VOOs of each geographical region.

The VOOs were geographically distinguished utilizing Principal Component Analysis (PCA) based on the composition of fatty acids and volatile compounds and the FTIR spectra of olive oil samples.

Strong differentiation was observed between the olive oil samples of the two regions based on fatty acids and FTIR spectra, and moderate differentiation was observed between the olive oil samples of the two regions based on volatile compounds. Combination of variables with total phenolic content was performed in order to increase the differentiation, but the result were unacceptable, and led to the conclusion that total phenolic content is not affected by geographical origin.

Dissertation scientific area: Food Chemistry

Keywords: virgin olive oil, Amfissis cultivar, geographical differentiation, fatty acids, volatile compounds, phenolic components, ATR-FTIR spectra

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Πέτρο Ταραντίλη, καθηγητή του ΓΠΑ και επιβλέποντα καθηγητή μου για την ανάθεση του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την επιστημονική καθοδήγηση και υποστήριζή του, και την Παναγιώτα-Κυριακή Ρεβέλου, μεταδιδακτορικό ερευνήτρια του ΓΠΑ, για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές και την υπομονή της σε όλα τα στάδια εκπόνησης του πειράματος αλλά και συγγραφής της μελέτης μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για το καλό κλίμα συνεργασίας και την άμεση βοήθειά τους όταν τη χρειαζόμουν. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα εργαστήρια ΕΡΓΑΝΑΛ για την παροχή των αποτελεσμάτων ανάλυσης των λιπαρών οξέων των δειγμάτων ελαιολάδου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
Α.1. Εισαγωγή1
Α.1.1. Ιστορική αναδρομή1
Α.1.2. Βοτανικά Χαρακτηριστικά
Α.1.3. Ποικιλίες ελιάς
Α.2. Ελαιόλαδο
Α.2.1. Ορισμός
Α.2.2. Κατηγορίες ελαιολάδου
Α.2.3. Στάδια παραγωγής ελαιολάδου
Α.2.4. Οφέλη ελαιολάδου στην υγεία
Α.2.5. Στατιστικά στοιχεία9
Α.3. Ποιότητα ελαιολάδου10
Α.3.1. Κριτήρια ποιότητας10
Α.3.2. Απαιτήσεις της αγοράς10
Α.3.3. Αυθεντικότητα ελαιολάδου11
Α.4. Χημική σύσταση ελαιολάδου
Α.4.1. Λιπαρά οξέα
Α.4.1.1. Αέρια χρωματογραφία με ανίχνευση ιονισμού φλόγας (GC-FID)14
Α.4.2. Πτητικά συστατικά15
Α.4.2.1. Μονοπάτι λιποξυγενάσης17
Α.4.2.2. Δευτερεύοντα μονοπάτια βιοσύνθεσης πτητικών ενώσεων
A.4.2.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME)19
Α.4.3. Φαινολικά συστατικά
A.4.3.1. Μέθοδος Folin-Ciocalteu24
A.4.3.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τετραπολική φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή χρόνου πτήσης (HPLC-ESI-QTOF-MS)

Α.4.4. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)2
Α.5. Χημειομετρία
Α.6. Σκοπός της εργασίας2
Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
Β.1. Υλικά και μέθοδοι
Β.1.1. Δείγματα ελαιολάδου29
B.1.2. Πειραματική πορεία για την ταυτοποίηση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών με SPME-GC-MS
B.1.2.1. Διαδικασία εκχύλισης των πτητικών συστατικών από το ελαιόλαδο με τη τεχνική SPME
B.1.2.2. Ανάλυση πτητικού κλάσματος με GC/MS
B.1.3. Πειραματική πορεία ποσοτικού προσδιορισμού ολικών φαινολικών συστατικών με τι μέθοδο Folin-Ciocalteu
B.1.4. Πειραματική πορεία για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών με HPLC-ESI QTOF/MS
. Β.1.4.1. Παραλαβή φαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο
B.1.4.2. Ανάλυση φαινολικού κλάσματος με HPLC-ESI-QTOF/MS
B.1.5. Πειραματική πορεία για την καταγραφή των φασμάτων ATR-FTIR
Β.1.6. Στατιστική επεξεργασία4
Β.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση
Β.2.1. Ανάλυση λιπαρών οξέων
Β.2.2. Ανάλυση πτητικών ενώσεων
B.2.3. Ανάλυση ολικών πολικών φαινολικών ενώσεων
Β.2.4. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων50
B.2.5. Ανάλυση φασμάτων FTIR60
Β.3. Στατιστική Ανάλυση
B.3.1. Συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ6.
B.3.2. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (P.C.A.)

B.3.2.1. Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των λιπαρών οξέων			
Β.3.2.2. Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των πτητικών ενώσεων			
B.3.2.3. Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει συνδυασμών των παραμέτρων που			
μελετήθηκαν			
B.3.2.4. Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των φασμάτων ATR-FTIR75			
Β.4. Συμπέρασμα			
Γ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ			
Γ.1. Ελληνική Βιβλιογραφία			
Γ.2. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία			
Γ.3. Διαδικτυακές Αναφορές			
Δ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ93			
Δ.1. Χρωματογραφήματα πτητικών ενώσεων			
Δ.1.1 Φωκίδα93			
Δ.1.2 Μαγνησία			
Δ.2. Φάσματα FTIR			
Δ.2.1 Φωκίδα112			
Δ.2.2 Μαγνησία			

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 8: Μονοπάτι της λιποξυγενάσης (LOX) (Genovese et al., 2021)
Εικόνα 9: Αρωματικές πτητικές ενώσεις (Morales et al., 1997)
<i>Εικόνα 10</i> : Μέρη μιας ίνας SPME (Μπακέας, 2008)20
Εικόνα 11: Διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου (Κασιμάτη, 2020)21
Εικόνα 12: Δευτερογενής μεταβολισμός φυτών (Γιαννακοπούλου, 2010)
Εικόνα 13: Δομές κύριων φαινολικών του ελαιολάδου (Tuck et al., 2002)
Εικόνα 14: Χάρτης της Ελλάδας με σημειωμένες τις περιοχές προέλευσης των δειγμάτων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης (Φωκίδα και Μαγνησία)
Εικόνα 15: Προσρόφηση πτητικών συστατικών
Εικόνα 16: TRACE GC Ultra- DSQ II MS
Εικόνα 17: Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος
Εικόνα 18: Καλλιεργητικό τρυβλίο μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu
Εικόνα 19: Καλλιεργητικό τριβλίο μετά την επώαση των 2 ωρών
<i>Εικόνα 20:</i> Φασματοφωτόμετρο UV/Vis
Εικόνα 21: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος
Εικόνα 22: Συμπύκνωση μεθανολικού εκχυλίσματος
Εικόνα 23: Αποτέλεσμα συμπύκνωσης/ Υδρόφιλο φίλτρο διήθησης
<i>Εικόνα 24:</i> Agrilent 6530 Q-TOF LC/MS
<i>Εικόνα 25:</i> FT-IR IROS-05 (Ostec)
Εικόνα 26: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης λιπαρών οξέων ελαιολάδου ποικιλίας
Αμφίσσης με GC-FID
Εικόνα 27: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης πτητικών ενώσεων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας με SPME-GC-MS
Εικόνα 28: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης πτητικών ενώσεων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας με SPME-GC-MS

Εικόνα 29: Χρωματογράφημα ανάλυσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας με HPLC-ESI-QTOF/MS60
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα ανάλυσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας με HPLC-ESI-QTOF/MS
Εικόνα 31: Φάσματα ATR-FTIR δειγμάτων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας και της Μαγνησίας
Εικόνα 32: Αξιολόγηση του φάσματος FTIR (Vlachos et al., 2006)
Εικόνα 33: Color map με τις συσχετίσης μεταξύ των λιπαρών οξέων και των πτητικών ενώσεων των
παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας
Εικόνα 34: Color map με τις συσχετίσης μεταξύ των λιπαρών οξέων και των πτητικών ενώσεων των
παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας
Εικόνα 35: Scores plot λιπαρών οξέων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
Εικόνα 36: Loadings plots λιπαρών οξέων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
<i>Εικόνα 37:</i> Scree plot λιπαρών οξέων
Εικόνα 38: Partial contribution λιπαρών οξέων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
Εικόνα 39: Scores plot πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
Εικόνα 40: Loadings plots πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
<i>Εικόνα 41:</i> Scree plot πτητικών ενώσεων
Εικόνα 42: Partial contribution πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
Εικόνα 43: Scores plot φασμάτων ATR-FTIR (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
Εικόνα 44: Loadings plots φασμάτων ATR-FTIR (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)
<i>Εικόνα 45:</i> Scree plot φασμάτων ATR-FTIR
Εικόνα 46: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-179
<i>Εικονα 4/:</i> Αεριοχρωματογραφημα των πτητικών συστατικών του δειγματός ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-180

 Εικόνα 49: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-219 94 Εικόνα 50: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-223	Εικόνα 48:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-181
 Εικόνα 50: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-223	Εικόνα 49:	94 Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-219
Εικόνα 51: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩK-2019-224	Εικόνα 50:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-223 95
 Εικόνα 52: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-225	Εικόνα 51:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-224
Εικόνα 53: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-226 	Εικόνα 52:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-225 96
Εικόνα 54: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-227 	Εικόνα 53:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-226
Εικόνα 55: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-228 	Εικόνα 54:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-227
Εικόνα 56: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-229	Εικόνα 55:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-228
Εικόνα 57: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-230 	Εικόνα 56:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-229 98
Εικόνα 58: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΦΩΚ-2019-231 99 Εικόνα 59: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2018-146 	Εικόνα 57:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-230
Εικόνα 59: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2018-146 	Εικόνα 58:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-231 99
Εικόνα 60: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2018-147 100 Εικόνα 61: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-120 	Εικόνα 59:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΜΑΓ-2018-146
Εικόνα 61: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-120	Εικόνα 60:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2018-147
	Εικόνα 61:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΜΑΓ-2019-120
Εικόνα 62: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-MAΓ-2019-121	Εικόνα 62:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-121 101

Εικόνα 	63:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019-134 101
Εικόνα	64:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019-137
Εικόνα	65:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-MAΓ-2019-138 102
Εικόνα 	66:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019-139
Εικόνα	67:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ- ΜΑΓ -2019-140
Εικόνα	68:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ- ΜΑΓ -2019-141 104
Εικόνα	69:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-142 104
Εικόνα	70:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΓ- ΜΑΓ -2019-143
Εικόνα	71:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019-144
Εικόνα	72:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΜΑΓ-2019-145
Εικόνα	73:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΜΑΓ-2019-136
Εικόνα	74:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ- ΜΑΓ -2019-203
Εικόνα	75:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-242
Εικόνα	76:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF-ΜΑΓ-2019-243
Εικόνα	77:	Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-244 108

Εικόνα 78: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019-245
Εικόνα 79: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-246
Εικόνα 80: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF- MAΓ -2019- 247
Εικόνα 81: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-248
Εικόνα 82: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜF- ΜΑΓ -2019-250
Εικόνα 83: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ- ΜΑΓ -2019-251
Εικόνα 84: Φάσμα ATR-FTIR του δείνματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-179
Εικόνα 85: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-180
Εικόνα 86: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-181
Εικόνα 87: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-219
Εικόνα 88: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-223
Εικόνα 89: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-224
<i>Εικόνα 90:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-225
<i>Εικόνα 91:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-226
<i>Εικόνα 92:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-227
<i>Εικόνα 93:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-228
<i>Εικόνα 94:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-229
<i>Εικόνα 95:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-230
<i>Εικόνα 96:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩK-2019-231
Εικόνα 97: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2018-146
Εικόνα 98: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2018-147
<i>Εικόνα 99:</i> Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-120
Εικόνα 100: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-121
Εικόνα 101: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-134
Εικόνα 102: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-137
Εικόνα 103: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-138

Εικόνα 104: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-139	
Εικόνα 105: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-140	
Εικόνα 106: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-141	
Εικόνα 107: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-142	
Εικόνα 108: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-143	
Εικόνα 109: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-144	
Εικόνα 110: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-145	
Εικόνα 111: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-136	
Εικόνα 112: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-203	
Εικόνα 113: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-242	
Εικόνα 114: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-243	
Εικόνα 115: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-244	
Εικόνα 116: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-245	
Εικόνα 117: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-246	
Εικόνα 118: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-247	
Εικόνα 119: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-248	
Εικόνα 120: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος ΑΜΓ-ΜΑΓ-2019-250	
Εικόνα 121: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-251	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α.1. Εισαγωγή

Α.1.1. Ιστορική αναδρομή

Η καταγωγή της ελιάς και του καρπού της χάνεται στα βάθη των αιώνων, σίγουρα όμως πατρίδα της είναι τα παράλια της Μεσογείου. (Δούκας και Δαλιγκάρου, 2008) Η ιστορία της αρχίζει πριν ακόμα ανακαλυφθεί η γραφή. Πολλοί ερευνητές θεωρούν σαν πιθανό τόπο προέλευσής της τις περιοχές της Συρίας και της Μικράς Ασίας, των οποίων οι βουνοπλαγιές είναι κατάφυτες από αγριελιές, ενώ άλλοι πιστεύουν ότι προέρχεται από την Αφρική (Αβησσυνία, Αίγυπτος). Στις περιοχές αυτές καλλιεργήθηκε συστηματικά από τους Σημιτικούς λαούς και διαδόθηκε από τους Φοίνικες στην Κύπρο και στα βόρεια παράλια της Αφρικής (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία). (Γκαβίδου και Ζωγράφου, 2008) Από αυτούς, και λόγω των στενών εμπορικών σχέσεων που είχαν αναπτύξει με τους κατοίκους της Κρήτης, η ελιά ταξίδεψε στο νότιο τμήμα του νησιού και τα πρώτα άγρια ελαιόδεντρα έκαναν την εμφάνισή τους. Με κοιτίδα την Ελλάδα, η ελιά εξαπλώθηκε στην συνέχεια και σε άλλες χώρες της Μεσογείου, όπως στην Ιταλία και τη Νότια Γαλλία. Οι Ρωμαίοι τη διέδωσαν στην Ιβηρική χερσόνησο, ενώ οι Ισπανοί με τη σειρά τους γύρω στον 16 αιώνα μ.Χ. εισήγαγαν το ελαιόδεντρο στην Νότια Αμερική, το Μεξικό και τις Η.Π.Α. Στην Αυστραλία η ελιά καλλιεργήθηκε από τους Άγγλους τον 19 αιώνα. (Δούκας κ.ά., 2008)



Εικόνα 1: Εξάπλωση της ελιάς στη λεκάνη της Μεσογείου (Γιαννακοπούλου, 2010)

Ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τρόπο διάδοσής της, είναι γεγονός ότι η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε σε μεγάλη έκταση στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο (*Olea europea*) και ειδικότερα στη λεκάνη της Μεσογείου. Οι κάτοικοι των Μεσογειακών χωρών, αναγνωρίζοντας την πολυτιμότητα των προϊόντων της δεν αρκέστηκαν στην τυχαία ανεύρεση ελαιοκάρπου, αλλά αναζήτησαν τρόπους για συστηματικές καλλιέργειες εξημερώνοντας το αυτοφυές δέντρο. Η διαδικασία αυτή υπήρξε επίπονη και μακροχρόνια και όπως όλα δείχνουν η περιοχή από την οποία ξεκίνησε ήταν η Κρήτη. (Πασχαλοπούλου, 2008) Πληθώρα γραπτών μαρτυριών (πινακίδες Γραμμικής Β' στην Κνωσό και την Πύλο) και αρχαιολογικών ευρημάτων (υλικοτεχνικός εξοπλισμός, αποθηκευτικά αγγεία, σκεύη καθημερινής χρήσης, εικαστικές απεικονίσεις) από την Μινωική περίοδο μαρτυρούν ότι η καλλιέργεια της ελιάς και η εκμετάλλευση των προϊόντων της κατείχε πρωταγωνιστική θέση στην καθημερινή ζωή και την οικονομία του τόπου. Στην εμπορία του κρητικού λαδιού οφείλεται κυρίως η μεγάλη οικονομική ανθηρότητα των Μινωικών ανακτόρων. Το παραγόμενο ελαιόλαδο αποθηκευόταν σε αμφορείς και εξαγόταν στα νησιά του Αιγαίου και την κεντρική Ελλάδα σε εργαστήρια και ιερά ή προσφέρονταν ως αμοιβή ή δώρο για πρακτικούς (φωτισμός, φαρμακευτική χρήση, διατροφή, καλλωπισμός) και λατρευτικούς σκοπούς. (Δούκας κ.ά., 2008, Παρθενίου, 2006)

Σε όλη την διάρκεια της διαδρομής της, η ελιά σηματοδοτεί την πορεία των πολιτισμών προς ένα ανώτερο στάδιο. Στις παραστάσεις που σώθηκαν από τα μυκηναϊκά χρόνια η ελιά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως ιερό δέντρο δίπλα σε βωμούς με το ιδεόγραμμα του ελαιοδέντρου να συναντάται τόσο στις πινακίδες της Γραμμικής Α' όσο και της Β'. (Πασχαλοπούλου, 2008) Στην αρχαϊκή εποχή ελαιοκομικό και οικονομικό κέντρο του ελληνικού κόσμου ήταν η Αθήνα, με το ελαιόδεντρο να γίνεται όλο και πιο σημαντικό. Είναι γνωστός ο μύθος της θεάς Αθηνάς που δώρισε στους πολίτες των Αθηνών ένα δέντρο ελιάς ως πηγή πλούτου και ευημερίας για να κερδίσει τον Ποσειδώνα και να εκλεγεί από τους κατοίκους προστάτιδα της πόλης, που πήρε και το όνομά της. Στην Αθήνα των κλασικών χρόνων επιβλήθηκαν ειδικά μέτρα προστασίας των ελαιοδέντρων από τον Σόλωνα και η ελιά λατρευόταν ως ιερό δέντρο, σύμβολο ειρήνης, ζωής, σοφίας και ευημερίας. (Δούκας κ.ά, 2008) Ο Ιπποκράτης έκανε χρήση του ελαιολάδου για την θεραπεία των ασθενών του, κυρίως ω αντιπυρετικό και νευρολογικό φάρμακο. Από το πρώτο πρεσάρισμα του καρπού προμηθεύονταν το λάδι για την διατροφή τους, από το δεύτερο έφτιαχναν αλοιφές και το τρίτο το χρησιμοποιούσαν για τον φωτισμό. (Πασχαλοπούλου, 2008)

Στα ρωμαϊκά χρόνια το εμπόριο του λαδιού γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη και τα ρωμαϊκά πλοία μετέφεραν μεγάλες ποσότητες σε περιοχές που δεν καλλιεργούνταν η ελιά. Κατά την διάρκεια των βυζαντινών χρόνων η αυτοκρατορία, λόγω του μεγέθους της, συμπεριλάμβανε σχεδόν τις μισές από τις παραγωγικές περιοχές ελαιολάδου και το προϊόν εξαγόταν σε όλο τον κόσμο, με μεγάλο μέρος από την συνολική παραγωγή να προέρχεται από τους ελαιώνες των Χριστιανικών μοναστηριών. Η ανάγκη για φως παράλληλα με τις υπόλοιπες χρήσεις του δημιουργούσε όλο και μεγαλύτερες ανάγκες, τόσο που η Αυτοκρατορία βρισκόταν διαρκώς ελλειμματική σε ελαιόλαδο και συχνά οι αρχές απαγόρευαν την εξαγωγή του. Μετά την παρακμή της βυζαντινής αυτοκρατορίας το εμπόριο πήραν στα χέρια τους οι Ενετοί, λαμβάνοντας μέτρα προστασίας των ελαιοδέντρων και η ελαιοκαλλιέργεια γνώρισε πρωτοφανή άνθηση, με το μέτρο της δεκαπενταετούς φορολογικής απαλλαγής σε όποιον ασχολούνταν συστηματικά με την ελιά, να ξεχωρίζει. Στην εποχή της Τουρκοκρατίας το εμπόριο του λαδιού έγινε η αφορμή για να αναπτυχθούν ισχυρές τοπικές οικονομίες, με ιδιαίτερο σταθμό την συνθήκη του Κιουτσούκ-Καϊναρτζή το 1770, με την οποία οι θαλάσσιοι δρόμοι από το Αιγαίο προς την Δυτική Ευρώπη απελευθερώθηκαν και το λάδι ταξίδευε ανενόχλητο. Κατά τον 18 αιώνα οι εξαγωγείς λαδιού εφοδίαζαν τις ευρωπαϊκές αγορές και κυρίως την Μασσαλία με την πρώτη ύλη της σαπωνοποιίας. Κατά την επανάσταση του 1821 όμως, καταστράφηκαν από τους Τούρκους χιλιάδες ελαιόδεντρα σε όλη την επαναστατημένη Ελλάδα.

Αμέσως μετά την σύσταση του νέου ελληνικού κράτους (1830), λήφθηκαν μέτρα ενίσχυσης της ελαιοκαλλιέργειας. Ωστόσο οι αρχαϊκοί τρόποι καλλιέργειας και συλλογής του καρπού και η καθυστέρηση της εισαγωγής των μηχανών στην παραγωγή δεν βοήθησαν στην περαιτέρω ανάπτυξή της. Η τεχνολογική εξέλιξη που επιτεύχθηκε τελικά το 1870, βελτίωσε την ποιότητα του καρπού, μείωσε τον χρόνο επεξεργασίας και αύξησε την απόδοση. Βέβαια, η ανάπτυξη της βιομηχανίας των σπορέλαιων, το πετρέλαιο και η ανάπτυξη της παραγωγής συνθετικών προϊόντων εκτόπισαν το ελαιόλαδο από τις περισσότερες χρήσεις του. Η σύγχρονη επιστημονική έρευνα και οι αυξανόμενες ανάγκες καλύτερης ποιότητας ζωής επανέφεραν την δυναμική της κατανάλωσης του ελαιολάδου και εισήγαγαν την αξιοποίηση των αποβλήτων των ελαιοτριβείων για την παραγωγή λιπασμάτων και ενέργειας. Αναμφίβολα, από την αρχαία Ελλάδα έως και σήμερα, η ελιά αποτελεί το σημαντικότερο δέντρο του τόπου και συνδέεται άμεσα με την κουλτούρα και την διατροφή της χώρας. Φτάνοντας στον 21 αιώνα, η Ελλάδα είναι η τρίτη σε παραγωγή λαδιού χώρα στον κόσμο και πρώτη σε κατά κεφαλήν κατανάλωση, ενώ η ελαιοκαλλιέργεια απασχολεί το 40% του αγροτικού πληθυσμού της χώρας. (Γκαβίδου κ.ά, 2008, Πασχαλοπούλου, 2008, Παρθενίου, 2006)

Α.1.2. Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η καλλιεργούμενη ελιά (Olea europeae sativa) είναι γένος καρποφόρων δέντρων της οικογένειας των Ελαιοειδών (Oleaceae). Στο είδος europeae ανήκει το σύνολο των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Είναι δέντρο αειθαλές, τα άνθη της εμφανίζονται προς το τέλος Μαΐου, ενώ ο καρπός ωριμάζει και συλλέγεται κατά τα τέλη του φθινοπώρου και αρχές του χειμώνα. Οι εδαφικές απαιτήσεις της δεν είναι μεγάλες και αναπτύσσεται ακόμα και σε μη γόνιμα έως πετρώδη εδάφη. (Καραγιαννοπούλου, 2019) Ο χρόνος ζωής της κυμαίνεται από μερικές δεκάδες έως εκατοντάδες έτη και ευδοκιμεί σε κλίματα εύκρατα χωρίς ακρότητες θερμοκρασίας και υγρασίας, κυρίως ξηροθερμικά. Γι' αυτό το λόγο είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Τουρκία, Αλγερία). (Πασχαλοπούλου, 2008)



Εικόνα 2: Ελαιόδεντρο κατά την περίοδο της συγκομδής.

Α.1.3. Ποικιλίες ελιάς

Το ελαιόδεντρο είναι αιωνόβιο και έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται πολύ εύκολα. Συνεπώς, οι ποικιλίες που συναντώνται είναι πολλές και δημιουργήθηκαν από φυσικές συνθήκες με την πάροδο του χρόνου. Χωρίζονται σε 3 ομάδες ανάλογα με τον τρόπο χρήσης του καρπού, τις ποικιλίες για ελαιοποίηση, τις ποικιλίες των επιτραπέζιων ελιών και τις μικτές ποικιλίες. (Δούκας κ.ά., 2008) Στη χώρα μας υπολογίζεται ότι υπάρχουν πάνω από 45 ποικιλίες ελιάς. Η πιο δημοφιλής ελαιοπαραγωγική ποικιλία στην Ελλάδα είναι η Κορωνέϊκη. Καλλιεργείται κυρίως στην Πελοπόννησο και την Κρήτη, είναι μικρόκαρπη, πολύ παραγωγική, ανθεκτική στις ξηροθερμικές συνθήκες της Ελλάδας ενώ ο καρπός της έχει περιεκτικότητα σε λάδι 18-22% και παράγει λάδι υψηλής ποιότητας. (Λιόντου, 2020) Οι ποικιλίες Καλαμών και Αμφίσσης είναι οι κυριότερες ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών. Η πρώτη, είναι ποικιλία με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (Π.Ο.Π), καλλιεργείται κυρίως στη Μεσσηνία και τη Λακωνία, είναι μεγαλόκαρπη, ευδοκιμεί σε περιοχές με μεγάλη υγρασία και παράγει μαύρες ελιές εκλεκτής ποιότητας. Η δεύτερη, γνωστή και ως Κονσερβολιά/Βολιώτικη/Μαυροελιά, καλλιεργείται κυρίως στην Στερεά Ελλάδα (Αγρίνιο, Άμφισσα), στο Βόλο και την Εύβοια, είναι μεγαλόκαρπη, δίνει εκλεκτής ποιότητας μάυρες και πράσινες ελιές και δευτερευόντως καλής ποιότητας ελαιόλαδο. (Γκαβίδου κ.ά, 2008, Μητσόπουλος, 2012) Η κυριότερη μικτή ποικιλία είναι η Μεγαρείτικη, καλλιεργείται κυρίως στην Αττική, την Βοιωτία, την Εύβοια και την Πελπόννησο, είναι μεσόκαρπη, με περιεκτικότητα σε λάδι 20-29%, ανθεκτική στην ξηρασία και παράγει λάδι μέτριας έως καλής ποιότητας και διάφορους τύπους μέτριας ποιότητας επιτραπέζιων ελιών, κυρίως σπαστών. (Καραγιαννοπούλου, 2019)



Εικόνα 3: Ποικιλίες ελιάς στην Ελλάδα (MyOlivePlant)

Α.2. Ελαιόλαδο

Α.2.1. Ορισμός

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarious, παρθένο ελαιόλαδο είναι το ελαιόλαδο που λαμβάνεται αποκλειστικά από τον καρπό της ελιάς (*Olea europaea L.*), αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές επεξεργασίες με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρησης και της διήθησης. (Codex Alimentarius, 1981)

Α.2.2. Κατηγορίες ελαιολάδου

Σύμφωνα με τον Codex Alimentarious και την Ευρωπαϊκή Ένωση, τα ελαιόλαδα ταξινομούνται ως εξής:

<u>Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο</u>: Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 0,8%. Οργανοληπτικά, είναι αυτό με την καλύτερη ποιότητα, δεν έχει ελαττώματα και είναι φρουτώδες.

<u>Παρθένο ελαιόλαδο</u>: Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 2%, είναι επίσης φρουτώδες αλλά με ελαφριά μειονεκτήματα.

<u>Ραφιναρισμένο (εξευγενισμένο) ελαιόλαδο</u>: Το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται έπειτα από εξευγενισμό μειονεκτικών ελαιολάδων και του οποίου η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 0,3%, ενώ παράλληλα δεν έχουν προκληθεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Έχει ελάχιστο ή καθόλου άρωμα, γεύση και χρώμα ελιάς.

Ελαιόλαδο: Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα του οποίου η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 1%.

<u>Ελαιόλαδο lampante (μειονεκτικό)</u>: Είναι το χαμηλότερης ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο. Η οξύτητά του ξεπερνάει το 2%, έχει ουσιαστικά ελαττώματα (κακή γεύση και άρωμα) και δεν προορίζεται για κατανάλωση.

<u>Ακατέργαστο πυρηνέλαιο</u>: Λαμβάνεται από τον πυρήνα της ελιάς κατόπιν χημικής επεξεργασίας και δεν προορίζεται για κατανάλωση

<u>Πυρηνέλαιο</u>: Αποτελείται από εξευγενισμένα πυρηνέλαια και παρθένα ελαιόλαδα, του οποίου η οξύτητα δεν υπερβαίνει το 1% (Codex Alimentarius, 1981, ΕΦΕΤ, 2015)

Α.2.3. Στάδια παραγωγής ελαιολάδου

Η διαδικασία εξαγωγής του ελαιολαδου είναι κρίσιμης σημασίας για την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι μέθοδοι εξαγωγής ευθύνονται για αρκετές διαφορές που παρατηρούνται στην ποιότητα, καθώς, ανάλογα με την επεξεργασία, από την ίδια πρώτη ύλη προκύπτουν διαφορετικά τελικά προϊόντα. (Vaz-Freire et al., 2008) Τα στάδια που ακολουθούνται μετά την παραλαβή του καρπού για την παραγωγή του ελαιολάδου είναι τα εξής:

- Αποφύλλωση: Φύλλα και κλαδιά που συλλέγονται με τον ελαιόκαρπο πρέπει να απομακρυνθούν. Το βάρος τους δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1%. Τα φύλλα αυξάνουν την χαρακτηριστική μυρωδιά και γεύση ''πρασίνου'', ειδικά εάν κατά το σπάσιμο χρησιμοποιούνται μεταλλικοί σπαστήρες.
- 2. Πλύσιμο: Απομάκρυνση των ξένων υλών που περιέχονται στον καρπό. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι πόσιμο σύμφωνα με τις οδηγίες της Ε.Ε. και την εθνική νομοθεσία. Η αφαίρεση των φύλλων και το πλύσιμο της ελιάς είναι σημαντικά στάδια για την μηχανική ασφάλεια του

ελαιοκομικού εξοπλισμού, που λειτουργεί με μεγάλη ταχύτητα, αλλά και την οργανοληπτική ποιότητα του ελαιολάδου.

- 3. Μεταφορά: Ενδείκνυται η χρήση μεταφορικής ταινίας που δεν τραυματίζει τον καρπό.
- 4. Θραύση-Σπάσιμο: Επηρεάζει την ποιότητα (οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και θρεπτικές ιδιότητες) και την ποσότητα του ελαιολάδου. Γίνεται με μεταλλικούς συνήθως σπαστήρες, σε σύντομο χρονικό διάστημα ώστε να περιορίζεται η επαφή του καρπού με τον αέρα και να μην ευνοείται η οξειδωτική αλλοίωση του ελαιολάδου. Τα ελαιόλαδα που προέρχονται από μεταλλικούς σπαστήρες έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, με πιο πικρή και πικάντικη γεύση.
- 5. Μάλαξη: Ο χρόνος μάλαξης εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση του λαδιού. Δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 30 λεπτά, καθώς μειώνεται η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες που οξειδώνονται κατά την επαφή του ελαιολάδου με τον αέρα. Κατά τα πρώτα βήματα της εξαγωγής λαδιού (θραύση και μάλαξη) διεξάγονται σημαντικές αλλαγές στη χημική σύσταση του προϊόντος, λόγω της ενεργοποίησης των ενζύμων του καρπού, που προκαλείται από την διάσπαση των κυτταρικών ιστών.
- 6. Διαχωρισμός: Υπάρχουν 3 μέθοδοι διαχωρισμού του ελαιολάδου από την ελαιόπαστα, με πίεση, με φυγοκέντριση και με διήθηση. Συνήθως ο διαχωρισμός γίνεται με φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες, που βασίζονται στη διαφορά πυκνότητας μεταξυ των συστατικών της πάστας (ελαιόλαδο, νερό και αδιάλυτα στερεά). Μεγάλη προσοχή δίνεται στην θερμοκρασία του χρησιμοποιούμενου νερού, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά τους 30°C, γιατί αλλοιώνονται τα οργανοληπτικά συστατικά του ελαιολάδου και οξειδώνεται πιο γρήγορα.
- 7. Τελικός διαχωρισμός-καθαρισμός ελαιολάδου: Ο καθαρισμός και η διαύγαση του ελαιολάδου που παραλαμβάνεται γίνεται με ειδικούς κατακόρυφους μηχανικούς διαχωριστήρες που απομακρύνουν από το λάδι τις ξένες ύλες και τα υπολείμματα απόνερων σε ένα αρκετά υψηλό βαθμό (*Εικόνα 4*). Στη συνέχεια το ελαιόλαδο αποθηκεύεται σε ανοξείδωτες δεξαμενές ή δοχεία που βρίσκονται σε κατάλληλα στεγασμένους χώρους, προστατευμένο από την επίδραση του φωτός, του οξυγόνου και των υψηλών θερμοκρασιών. (Μανωλόπουλος, 2018, Angerosa et. Al., 1998, Louadj & Giuffre, 2010)



Εικόνα 4: Τελικός διαχωρισμός ελαιολάδου

Α.2.4. Οφέλη ελαιολάδου στην υγεία

Το ελαιόλαδο είναι το πολυτιμότερο στοιχείο και η κύρια πηγή λίπους της Μεσογειακής δίαιτας. Η υψηλή θρεπτική αξία του ελαιολάδου προκύπτει κυρίως από την υψηλή περιεκτικότητά του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (ελαϊκό οξύ), την ισορροπημένη αναλογία του σε κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα και την παρουσία σημαντικών ποσοτήτων φυσικών αντιοξειδωτικών. (Genovese et al., 2021, Zarrouk et al., 2007) Το ελαιόλαδο συμβάλλει:

- Στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η κατανάλωσή του μειώνει τις συγκεντρώσεις της ολικής χοληστερόλης και της ''κακής'' LDL χοληστερόλης, που αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στεφανιαίας καρδιοπάθειας, ενώ ανεβάζει τα επίπεδα της ''καλής'' HDL χοληστερόλης.
- Στην επιβράδυνση του γήρατος, αφού περιέχει μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και βιταμίνη Ε.
- Στην απορρόφηση των βιταμινών από τον οργανισμό λόγω της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες.
- Στην πρόληψη της σκλήρυνσης των αρτηριών και της αθηροσκλήρυνσης.
- Στη διευκόλυνση της λειτουργίας του συκωτιού και στην αποτροπή πέτρας στην χολή.
- Στη διαιτητική αγωγή του διαβήτη.
- Στη προστασία από τον καρκίνο λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε αντιοξειδωτικές ουσίες. (Παπαδάκης κ.ά., Peršuric and Damijanic, 2021)

Α.2.5. Στατιστικά στοιχεία

Παγκοσμίως, παράγονται κατά μέσο όρο 3 εκατομμύρια τόνοι ελαιολάδου κάθε χρόνο. Από αυτά, περίπου τα 2 εκατομμύρια παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η οποία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός, καταναλωτής και εξαγωγέας ελαιολάδου. Η Ισπανία καταλαμβάνει το 66% της παραγωγής εντός της Ένωσης, ακολουθεί η Ιταλία με 15% και η Ελλάδα με 13%, η οποία έχει την μεγαλύτερη κατά κεφαλήν κατανάλωση με περίπου 12kg ανά άτομο ετησίως. Περίπου 570.000 τόνοι ελαιολάδου εξάγονται κάθε χρόνο από την Ε.Ε. Κυριότεροι προορισμοί είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες, η Βραζιλία και η Ιαπωνία. Όλο και μεγαλύτερο μερίδιο στην εξαγωγή ελαιολάδου διεκδικεί τα τελευταία γρόνια η Τυνησία, μια από τις μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγούς χώρες παγκοσμίως, καθώς αυξάνεται και βελτιώνεται η τυποποίηση και υπάρχει σταθερή πολιτική υποστήριξης του προϊόντος από την Ευρωπαϊκή Ένωση. (European Commision) Στην Ελλάδα, οι ελαιώνες καλύπτουν το 60% του καλλιεργούμενου εδάφους, παράγοντας κατά μέσο όρο 300.000 τόνους ετησίως. Οι ποικιλίες που παράγουν ελαιόλαδο κυριαρχούν, και το 70% της παραγωγής είναι εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο. Το 1/3 της παραγωγής εξάγεται ετησίως, καθιστώντας την Ελλάδα πρώτη παγκοσμίως στις εξαγωγές εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Εκτός από την οικονομική της διάσταση, η ελαιοκαλλιέργεια έχει για την χώρα μας τεράστια κοινωνική και περιβαλλοντική σημασία αφού συμβάλλει καθοριστικά στην βιωσιμότητα μειονεκτικών περιοχών και στη διατήρηση της ελληνικής φύσης. (Καραγιαννοπούλου, 2019, IOC, 2012)



Εικόνα 5: Ετήσια παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρωπαϊκή Ένωση (European Commision)

Α.3. Ποιότητα ελαιολάδου

Α.3.1. Κριτήρια ποιότητας

Η ποιότητα του ελαιολάδου επηρεάζεται σημαντικά από πληθώρα παραγόντων όπως η ποικιλία της ελιάς, η καλλιεργητική διαδικασία, ο τρόπος συλλογής των ελαιοκάρπων, η έκθλιψή τους, αλλά και η φύλαξη του τελικού προϊόντος. Λόγω της ιδαίτερης οικονομικής και διατροφικής αξίας του ελαιολάδου είναι σημαντική η διασφάλιση της ποιότητας του με τη θέσπιση κριτηρίων που αφορούν στα οργανοληπτικά, χημικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. (Παπαδόπουλος, 1993)

<u>Οξύτητα</u>: Ως ελεύθερη οξύτητα ορίζεται ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και εκφράζεται σε γραμμάρια ελαϊκού οξέος ανά 100 γραμμάρια ελαιολάδου.

<u>Αριθμός υπεροξειδίων</u>: Τα υπεροξείδια είναι χημικές ενώσεις που δημιουργούνται από την επίδραση του οξυγόνου στο ελαιόλαδο. Ο αριθμός των υπεροξειδίων οφείλεται στα υδροϋπεροξείδια, τα οποία είναι προϊόντα του πρωτογενούς σταδίου οξείδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων. Η οξείδωση μπορεί να είναι ενζυματική ή χημική.

<u>Φασματοφωτομετρική εξέταση στο υπεριώδες</u>: Μετρούνται οι απορροφήσεις στα μήκη κύματος 232nm και 270nm, συμβατικά παριστώμενες με Κ. Ο συντελεστής απορρόφησης K₂₃₂ αφορά υδροϋπεροξείδια και συζυγή διένια που παράγονται σε διάφορα στάδια οξείδωσης, ενώ ο συντελεστής K₂₇₀ αφορά καρβονυλικές ομάδες ως προϊόντα οξείδωσης και συζυγή τριένια τα οποία παράγονται όταν το ελαιόλαδο υποβάλλεται σε βιομηχανική επεξεργασία.

<u>Οργανοληπτική αξιολόγηση</u>: Η ανίχνευση και περιγραφή των ποιοτικών και ποσοτικών χαρακτηριστικών του παρθένου ελαιολάδου χρησιμοποιώντας τις ανθρώπινες αισθήσεις και η ταξινόμηση αυτού σύμφωνα με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. (ΕΦΕΤ, 2015)

Α.3.2. Απαιτήσεις της αγοράς

Τα πρότυπα εμπορίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης εξασφαλίζουν ότι η αγορά προμηθεύεται γεωργικά προϊόντα τυποποιημένης και ικανοποιητικής ποιότητας ώστε να ικανοποιούνται οι προσδοκίες των καταναλωτών, να διευκολύνεται το εμπόριο και να εξασφαλίζονται ίσοι όροι ανταγωνισμού για τους παραγωγούς της Ε.Ε. Η νομοθεσία της για το ελαιόλαδο προσδιορίζει τις διάφορες κατηγορίες ελαιολάδων και πυρηνελαίων, καθώς και τις σχετικές μεθόδους ανάλυσης που πρέπει να χρησιμοποιούν οι αρχές ελέγχου των κρατών μελών, και προβλέπει κανόνες για την επισήμανση και τη συσκευασία. (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 1991, 2012, 2013) Εκτός όμως από τις νομικές απαιτήσεις που πρέπει να τηρούνται και τους ελέγχους που πραγματοποιούνται και αφορούν τον τομέα του ελαιολάδου, ένα ζήτημα που αφορά ιδιαίτερα την Ελλάδα είναι η ανάδειξη της ανώτερης ποιότητας του προϊόντος. Η

παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου συνεχώς αυξάνεται, και σε κάποιες περιπτώσεις γίνεται με πολύ χαμηλό κόστος λόγω φτηνών εργατικών χεριών (π.χ. Τουρκία, Μαρόκο, Τυνησία κ.λπ.). Σε άλλες περιπτώσεις, φτηνό λάδι παράγεται μέσω της μηχανοποίησης της συγκομιδής (Ισπανία). Αυτή η κατάσταση δημιουργεί έντονο ανταγωνισμό στην αγορά του ελαιολάδου. Το πλεονέκτημα του Έλληνα παραγωγού που πρέπει να προβάλλει και να αξιοποιήσει είναι η ανώτερη ποιότητα του προϊόντος του. (Κουμπούρης, Γ.) Έχοντας σαν δεδομένο την υψηλή ποιότητα του ελληνικού ελαιολάδου και το γεγονός ότι το συντριπτικό ποσοστό του συνολικού παραγόμενου προϊόντος χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, η Ελλάδα διατηρεί ένα πολύ μικρό μερίδιο της διεθνούς αγοράς. Από τους περίπου 120.000 τόνους που εξάγονται ετησίως (35% της ετήσιας παραγωγής), μόνο το 10% εξάγεται ως τυποποιημένο και συσκευασμένο προϊόν. Είναι λοιπόν επιτακτική η ανάγκη η Ελλάδα να χαρακτηρίσει και να τυποποιήσει το ελαιόλαδο της με βάση την ποικιλία του και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της γεωγραφικής του προέλευσης. (Kosma et al., 2017)

Α.3.3. Αυθεντικότητα ελαιολάδου

Η ποιότητα του ελαιολάδου δεν εξαρτάται μόνο από την ποικιλιακή του σύνθεση αλλά και από την γεωγραφική περιοχή προέλευσής του. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί μεγάλη παραλλακτικότητα στην αναλογία λιπαρών οξέων στο λάδι μιας δεδομένης ποικιλίας ανάλογα με την γεωγραφική της προέλευση. Το ίδιο ισχύει και για τα περισσότερα από τα συστατικά του ελαιολάδου. Τα χαρακτηριστικά του εδάφους (χημική και κοκκομετρική σύσταση, ιοντοανταλλακτική ικανότητα, συγκέντρωση οργανικής ουσίας και ανόργανων διαλυτών αλάτων, κ.λπ.) καθώς και οι κλιματολογικές συνθήκες (ομβροθερμικά πρότυπα) αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. (Παπαδάκης κ.ά.) Η συσχέτιση του ελληνικού προϊόντος με την ποιότητα, την ''παράδοση'' που χαρακτηρίζει πολλές περιοχές της Ελλάδας και την αυθεντικότητά του (την διαβεβαίωση δηλαδή ότι το προϊόν που αγοράζει ο καταναλωτής πληρεί την περιγραφή του) επιτυγχάνεται μέσω των ενδείξεων αναγνώρισης ποιότητας Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε. και Ε.Π.Ι.Π που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. Οι χαρακτηρισμοί αυτοί διασφαλίζουν ότι η ποιότητα του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητά του, δηλαδή την βοτανική και γεωγραφική του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητά του, δηλαδή την βοτανική και γεωγραφική του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητά του, δηλαδή την βοτανική και γεωγραφική του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητα του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητα του που διασφαλίζουν ότι η ποιότητα του προϊόντος είναι στενά συνδεδεμένη με την αυθεντικότητα του, δηλαδή την βοτανική και γεωγραφική του προϊδευση. (Karabagias et al., 2013)

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει κριτήρια για την πιστοποίηση της προέλευσης των τροφίμων, προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των προϊόντων και να αυξηθεί η αγοραστική τους αξία. Με τον κανονισμό 2081/92 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 1992), η Ε.Ε. υιοθέτησε ένα σύστημα για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και την προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων, ενώ με τον κανονισμό 2082/92 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 1992) όρισε τους κανόνες για την πιστοποίηση ορισμένων ειδικών χαρακτηριστικών τέτοιων προϊόντων και τροφίμων. (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης, Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη, Εγγυημένο Παραδοσιακό Ιδιότυπο Προϊόν). Το 2006, με στόχο την βελτίωση του συστήματος, οι παραπάνω κανονισμοί αντικαταστάθηκαν από τους 510/2006 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2006) και 1898/2006 αντίστοιχα, (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2006) χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το πεδίο εφαρμογής και η σκοπιμότητά τους. Με τον κανονισμό 1151/12 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2012) συγχωνεύτηκαν σε ένα ενιαίο νομοθετικό πλαίσιο οι ανωτέρω κανονισμοί. Τέλος, ο κανονισμός 182/2009 (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2009) στοχεύει στην θέσπιση των προδιαγραφών εμπορίας του ελαιολάδου (Kosma et al., 2017, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

Ελαιόλαδο Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) ονομάζεται το προϊόν το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή, σε εξαιρετικές περιπτώσεις, χώρα, του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που συμπεριλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και του οποίου όλα τα στάδια παραγωγής εκτελούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής. Ελαιόλαδο Προστατευόμενης Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.) ονομάζεται το προϊόν το οποίο κατάγεται από ένα συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα, του οποίου ένα συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό ή φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στην γεωγραφική του προέλευση και του οποίου ένα τουλάχιστον από τα στάδια της παραγωγής εκτελείται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής. Τέλος, ως Εγγυημένο Παραδοσιακό Ιδιότυπο Προϊόν (Ε.Π.Ι.Π.) νοείται ένα ιδιότυπο προϊόν ή τρόφιμο το οποίο παρασκευάζεται με τρόπο παραγωγής, μεταποίησης ή σύνθεσης που αντιστοιχεί στην παραδοσιακή πρακτική για το εν λόγω προϊόν ή τρόφιμο ή παράγεται από πρώτες ύλες ή συστατικά που είναι τα χρησιμοποιούμενα παραδοσιακά. Για να μπορεί να καταχωρηθεί μια ονομασία ως ονομασία εγγυημένου παραδοσιακού ιδιότυπου προϊόντος, πρέπει να χρησιμοποιείται κατά παράδοση για την περιγραφή του ιδιότυπου προϊόντος ή να προσδιορίζει τον παραδοσιακό χαρακτήρα ή τον ιδιότυπο χαρακτήρα του προϊόντος. (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων). Τα Π.Ο.Π., Π.Γ.Ε. και Ε.Π.Ι.Π. προϊόντα διαθέτουν σαφές πλεονέκτημα στην διαδικασία προώθησής τους, ειδικά στις απαιτητικές αγορές των δυτικών χωρών. (Σύνδεσμος, Ελληνικών Βιομηχανιών Τυποποιήσεως Ελαιολάδου)

Για την επιβολή των παραπάνω κανονισμών απαιτούνται αναλυτικά εργαλεία επαλήθευσης της φύσης των τροφίμων υψηλής αξίας, όπως το ελαιόλαδο, που να πιστοποιούν και να προστατεύουν την αυθεντικότητά τους εύκολα και με ακρίβεια. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της γεωγραφικής και βοτανικής προέλευσης περιλαμβάνουν υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (GC/MS), υγρή χρωματογραφία υψηλής ασματογραφία υψηλής απόδοσης (TRMS), φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FTIR), φασματοσκοπία φθορισμού, φασματοσκοπία εγγύς υπερύθρου (NIR) κ.λπ. (Karabagias et al., 2013)

Α.4. Χημική σύσταση ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο είναι η μόνη λιπαρή ουσία που έχει ως κύριο υλικό δομήσεώς της το ελαϊκό οξύ. Αποτελείται κατά 98% από τριγλυκερίδια (εστέρες της γλυκερόλης με τα ανώτερα λιπαρά οξέα), τα οποία, μαζί με τα μονο- και δι-γλυκερίδια, αποτελούν το κύριο σαπωνοποιήσιμο τμήμα του. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, στερόλες, αλειφατικές και τριτερπενικές αλκοόλες, υδρογονάνθρακες, πτητικές ενώσεις, χρωστικές και αντιοξειδωτικά, που αποτελούν το μη σαπωνοποιήσιμο μέρος. (Κυριτσάκης, 2018) Όλα αυτά τα συστατικά δίνουν μοναδικό χαρακτήρα στο ελαιόλαδο. (Muzammil et al., 2021) Η σύνθεση του ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή παραγωγής (έδαφος, κλιματολογικές συνθήκες), τις γεωργικές πρακτικές (άρδευση, λίπανση), τη καλλιέργεια (συγκομιδή, ωρίμανση), τη παραγωγή (αποθήκευση μετά τη συγκομιδή, παραγωγή λαδιού), καθώς και τις συνθήκες αποθήκευσης του τελικού προϊόντος (θερμοκρασία, φως). (Karabagia et al, 2013, Longobardi et al., 2012) Δεδομένου ότι αποτελεί προϊόν του οποίου η αξία συνδέεται στενά με τον τρόπο με τον οποίο παράγεται και επεξεργάζεται, είναι πολύ σημαντική η διατήρηση της εμπιστοσύνης των καταναλωτών και η διασφάλιση της αυθεντικής του σήμανσης. (Revelou et al., 2021)

Α.4.1. Λιπαρά οξέα

Το ελαιόλαδο περιέχει 72% μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, 14% πολυακόρεστα και 14% κορεσμένα. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό (18:1), το οποίο αποτελεί το 56-84% των συνολικών λιπαρών οξέων και είναι και ο λόγος που το ελαιόλαδο ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα φυτικά έλαια. Το δεύτερο σημαντικότερο ακόρεστο είναι το λινελαϊκό (18:2), το κύριο πολυακόρεστο οξύ της διατροφής. Άλλα ακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο ελαιόλαδο σε μικρές ποσότητες είναι το λινολενικό (18:3), το αραχιδονικό (20:4) και το παλμιτελαϊκό (16:1). Τέλος, σε ίχνη μπορεί να βρεθούν και κάποια ακόμη λιπαρά οξέα, όπως το μυριστικό (14:0) και το εικοσανοϊκό οξύ. Από τα κορεσμένα οξέα σε μεγαλύτερη αναλογία απαντά το παλμιτικό (16:0) και το στεατικό (18:0). Ανάλογα με τα ποσοστά ελαϊκού, λινελαϊκού και παλμιτικού, τα ελαιόλαδα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα λινελαϊκού και παλμιτικού και υψηλό επίπεδο ελαϊκού και παρθένα ελαιόλαδα της Βόρειας Μεσογείου (Ισπανικά, Ιταλικά, Ελληνικά και Τουρκικά). Η δεύτερη κατηγορία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα λινελαϊκού και παλμιτικού και χαμηλά επίπεδα ελαϊκού. Σε αυτή ανήκουν τα λάδια της Βορείου Αφρικής και ιδιαίτερα τα Τυνησιακά. (Diraman, et al., 2010)

Τα κύρια τριγλυκερίδια του ελαιολάδου είναι αυτά στα οποία απαντάται το ελαϊκό οξύ, καθώς αποτελούν το 70-80% του βάρους του ελαίου. Η παρουσία των μονο- και διγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο οφείλεται είτε σε ατελή βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων είτε σε αντιδράσεις υδρόλυσης. (Κυριτσάκης, 2018) Τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, με τη μορφή τριγλυκεριδίων, ποικίλουν κατά τη διάρκεια της περιόδου ωρίμανσης της ελιάς, ενώ εξαρτώνται από την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειας και κλίματος. Γενικά, είναι αποδεκτό ότι ελαιόλαδα που προέρχονται από περιοχές με ψυχρό κλίμα περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελαϊκού οξέος σε σχέση με αυτά που προέρχονται από θερμότερες περιοχές. Η καθυστέρηση στη συγκομιδή του ελαιοκάρπου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αναλογίας των ακόρεστων λιπαρών οξέων (ειδικά του λινελαϊκού) και μείωση της αναλογίας του παλμιτικού, γεγονός που καθιστά το ελαιόλαδο περισσότερο ευαίσθητο στην οξείδωση, καθώς όσο αυξάνεται η ακορεστότητα αυξάνεται και η ταχύτητα οξείδωσης.(Κυριτσάκης, 2018, Μανωλόπουλος, 2018). Τα όρια που έχει καθιερώσει ο Codex Alimentarius για τα κύρια λιπαρά οξέα του ελαιολάδου είναι: ελαϊκό 55-83%, παλμιτικό 7,5-20% και λινελαϊκό 3,5-21% (Εικόνα 6). (Codex Alimentarius, 1981) Η σύνθεση των λιπαρών οξέων και των τριγλυκεριδίων έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ταξινόμηση των ελαιολάδων με βάση την γεωγραφική και βοτανική τους προέλευση. (Karabagias, et al., 2013) Η πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανάλυση των λιπαρών οξέων είναι η αέρια χρωματογραφικ με ανίχνευση ιοντισμού φλόγας (GC-FID), αφού πρώτα πραγματοποιηθεί η μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME). (Zhang et al., 2015, Karabagias et al., 2013)

Fatty acid	Carbon number	Allowable range %
Palmitic	C16:0	7.5–20.0
Palmitoleic	C16:1	0.3-3.5
Stearic	C18:0	0.5-5.0
Oleic	C18:1	55.0-83.0
Linoleic	C18:2	3.5-21.0
Linolenic acid	C18:3	0.0-1.5
Arachidic	C20:0	<0.6
Gadoleic	C20:1	<0.4

Εικόνα 6: Επιτρεπόμενα όρια των βασικών λιπαρών οξέων του ελαιολάδου

A.4.1.1. Αέρια χρωματογραφία με ανίχνευση ιονισμού φλόγας (GC-FID)

Οι ανιχνευτές ιονισμού αλληλεπιδρούν με διαλυμένες ουσίες που εκλούονται από στήλες αέριας χρωματογραφίας (GC) και παράγουν ρεύμα που ποικίλλει ανάλογα με την συγκέντρωσή τους στο δείγμα. Η τεχνική είναι ευαίσθητη σε μόρια που ιονίζονται σε φλόγα υδρογόνου-αέρα, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων ενώσεων που περιέχουν άνθρακα (με σημαντικές εξαιρέσεις το μονοξείδιο και το διοξείδιο του άνθρακα). Μετά τον διαχωρισμό του δείγματος στη στήλη του GC, κάθε αναλυόμενη ουσία περνά μέσα από μια φλόγα υδρογόνου-αέρα η οποία ιονίζει τα άτομα άνθρακα. Καθώς τα ιόντα σχηματίζονται μέσα στον ανιχνευτή, ωθούνται από ένα ηλεκτρικό δυναμικό προς ένα ηλεκτρόδιο παράγοντας ρεύμα. Αυτό το ρεύμα μετατρέπεται σε τάση, φιλτράρεται και ενισχύεται όπως απαιτείται. (Hinshaw, 2015) Ένα αδρανές αέριο υποστήριξης χρησιμοποιείται συχνά για να διασφαλιστεί ότι παρέχεται πρόσθετη ροή αερίου στα ιόντα του δείγματος καθώς κινούνται μέσω του ανιχνευτή, κάτι που μπορεί να βελτιώσει τα αναλυτικά αποτελέσματα. Το αέριο υποστηριξης πρέπει να είναι αδρανές και να περιέχει ελάχιστες ακαθαρσίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ανάλυση του δείγματος. Συνήθως χρησιμοποιείται το ήλιο ή το άζωτο, που είναι η πιο οικονομική επιλογή. (Peak Scientific, 2019) Το μεγάλο πλεονέκτημα του GC-FID είναι η δυνατότητα διάκρισης ισομερών ενώσεων και ενώσεων με στενά συνδεδεμένες δομές. (Mohan et al., 2019)

Α.4.2. Πτητικά συστατικά

Η οργανοληπτική ποιότητα ενός τροφίμου αντιπροσωπεύει τον βαθμό που αυτό είναι αποδεκτό και επιθυμητό. Αυτή προσδιορίζεται κυρίως από ένα σύνολο χαρακτηριστικών που γίνονται αντιληπτά με τις αισθήσεις. Το άρωμα, το χρώμα και η γεύση είναι χαρακτηριστικά που είναι σημαντικά για τον καταναλωτή. (Λιόντου, 2020) Η ποιοτική υπεροχή του παρθένου ελαιολάδου, συνδέεται αναμφίβολα με τα συστατικά που του προσδίδουν την μοναδική γεύση και το άρωμα του και είναι τα χαρακτηριστικά με τα οποία κερδίζει την αποδοχή του πελάτη. (Muzammil et al., 2021) Η απουσία αισθητηριακών ελαιτωμάτων είναι απαραίτητη για να ονομαστεί το λάδι εξαιρετικά παρθένο, ενώ η παρουσία τους χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό λαδιών άλλων κατηγοριών. Τόσο για τα θετικά όσο και για τα αρνητικά χαρακτηριστικά της οσμής και της γεύσης του ελαιόλαδου υπεύθυνες είναι οι πτητικές ενώσεις. (Kalua et al, 2017) Είτε κύριες, είτε δευτερεύουσες, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τους δείκτες ποιότητας και αξίζει η μελέτη των μονοπατιών σχηματισμού και αποικοδόμησής τους, ακόμα και αν ορισμένες ανιχνεύονται σε συγκεντρώσεις που είναι κάτω από το κατώφλι της οσμής και δυρισμάνου είναι κάτω από το κατώφλι της οσμής και δεν συνεισφέρουν στο άρωμά του ελαιολάδου. (Gomez da Silva e al., 2012)

Οι πτητικές ενώσεις είναι ενώσεις που εξατμίζονται εύκολα σε θερμοκρασία δωματίου. Παράγονται σε σημαντικό βαθμό κατά το στάδιο ωρίμανσης των καρπών και όχι κατά την ανάπτυξή τους. (Kalua et al, 2017) Το άρωμα του ελαιολάδου αποδίδεται σε αλδεΰδες,αλκοόλες, εστέρες, υδρογονάνθρακες, κετόνες, παράγωγα του φουρανίου, οξέα κ.ά. (Gomez da Silva e al., 2012) Πάνω από 280 έχουν ταυτοποιηθεί, αλλά μόνο 67 έχει βρεθεί ότι μπορεί να περιέχονται στο ελαιόλαδο σε επίπεδα υψηλότερα από το κατώφλι της οσμής τους και να συνεισφέρουν στο άρωμά του. Η μεγάλη ποικιλία των πτητικών ενώσεων που βρίσκονται στο υψηλής ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο προκύπτει από τις βιογενείς οδούς του καρπού της ελιάς, δηλαδή των οδών της λιποξυγενάσης (LOX pathway) και τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων. Στο τελικό άρωμα βέβαια θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και ενώσεις, ιδιαίτερα αλδεΰδες, που προέρχονται από διεργασίες αυτοξείδωσης. Προϊόντα μεταβολισμού προερχόμενα από πιθανές ζυμώσεις, μετατροπή ορισμένων αμινοξέων, ενζυμικές δραστηριότητες ζυμών ή οξειδωτικές διεργασίες συνδέονται με τα αισθητηριακά ελαττώματα του παρθένου ελαιολάδου και οφείλονται στην παραλαβή του ελαιολάδου από υπερώριμους καρπούς, στην ανάπτυξη ζυμομυκήτων, μυκήτων και βακτηρίων στους καρπούς εξαιτίας δυσμενών συνθηκών στους χώρους συλλογής τους, ή στην οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων εξαιτίας της αποθήκευσης του ελαιολάδου σε χώρους με υψηλή θερμοκρασία. Η βιοσύνθεση των πτητικών ενώσεων που έχουν σημαντική συνεισφορά στο άρωμα του παρθένου ελαιόλαδου οφείλεται πρωτίστως στο βιοσύνθετικό μονοπάτι της λιποζυγενάσης και δευτερευόντως στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό ορισμένων αμινοξέων (*Εικόνα 7*). (Gomez da Silva e al., 2012, Χαλαστάρα, 2008)

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε πτητικά συστατικά επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η ποικιλία, η γεωγραφική περιοχή, η ωριμότητα του καρπού, η συγκομιδή, οι μέθοδοι επεξεργασίας και ο χρόνος αποθήκευσης. Ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές και διαδικασίες εκχύλισης έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να αξιολογηθεί το πτητικό προφίλ του ελαιολάδου. Το μεγάλο ζήτημα της ανάλυσης των αρωματικών συστατικών είναι η απώλεια ενώσεων κατά τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος. (Gomez da Silva e al., 2012) Η επιλογή της μεθόδου που εφαρμόζεται κάθε φορά εξαρτάται από τον αντικειμενικό σκοπό της μελέτης για τις ανάγκες της οποίας είναι απαραίτητη η παραλαβή των πτητικών συστατικών από τα δείγματα του προς εξέταση τροφίμου. (Λιόντου, 2020)



Εικόνα 7: Τα κύρια μονοπάτια που εμπλέκονται στον σχηματισμό του πτητικού προφίλ των ελαιολάδων υψηλής ποιότητας (Gomez da Silva e al., 2012)

Α.4.2.1. Μονοπάτι λιποξυγενάσης

Κατά την διάρκεια της σύνθλιψης και της μάλαξης επέρχονται σημαντικές αλλαγές στη χημική σύσταση, λόγω της διάσπασης των κυτταρικών ιστών και της ενεργοποίησης των ενζύμων του καρπού της ελιάς. Κατά συνέπεια, το μονοπάτι της λυποξυγενάσης ξεκινά από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων με τη μεσολάβηση της άκυλο υδρολάσης (AH), που οδηγεί σε απελευθέρωση των λιπαρών οξέων. Οι λιποξυγενάσες, μετά την απελευθέρωσή τους, γίνονται αμέσως ενεργές και μετατρέπουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινολενικό και λινελαϊκό στα αντίστοιχα 9- και 13υδροϋπεροξείδιά τους. Αυτά με τη σειρά τους, καταλύονται από υδροϋπεροξειδικές λυάσες (HPL) που οδηγούν στον σχηματισμό των C6 αλδεϋδών (Ζ)-3-εξενάλης και εξανάλης από το λινολενικό και το λινελαϊκό αντίστοιχα. Η ακόρεστη μορφή της (Ζ)-3-εξενάλης υφίσταται ταχεία ισομερίωση προς την πιο σταθερή (E)-2-εξενάλη. (Gomez da Silva e al., 2012) Με αναγωγή της εξανάλης, της (Z)-3-εξενάλης και της (E)-2-εξενάλης, καταλυόμενες από την αλκοολική αφυδρογονάση (ADH), σχηματίζονται εξανόλη, (Ζ)-3-εξενόλη και (Ε)-2-εξενόλη. Η εξανόλη και η (Ζ)-3-εξενόλη εστεροποιούνται με τη δράση της αλκοολικής ακετυλοτρανσφεράσης (AAT) προς οξικό εξυλεστέρα και οξικό (Z)-3-εξυλενεστέρα αντιστοίχως (Εικόνα 6). Οι ενώσεις αυτές δίνουν την χαρακτηριστική οσμή πράσινων φύλλων και την φρουτώδη οσμή του ελαιολάδου και αποτελούν τα κύρια συστατικά του. Κατά την ενζυμική αποικοδόμηση του 13-μονοϋπεροξειδίου του λινολενικού οξέος σχηματίζονται και C5 πτητικές ενώσεις

(αλδεΰδες, αλκοόλες, κετόνες) και διμερή του πεντανίου, που όμως δεν συνεισφέρουν στο άρωμα λόγω της χαμηλής συγκέντρωσής τους. Η μόνη που σχηματίζεται και συνεισφέρει ουσιαστικά στο άρωμα είναι η 1-πεντεν-3-όνη. (Χαλαστάρα, 2008)



Εικόνα 8: Μονοπάτι της λιποξυγενάσης (LOX) (Genovese et al., 2021)

Α.4.2.2. Δευτερεύοντα μονοπάτια βιοσύνθεσης πτητικών ενώσεων

Άλλα πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου είναι πτητικά προϊόντα της οξειδωτικής αποικοδόμησης των ακόρεστων λιπαρών οξέων (1-πεντεν-3-όλη, (Z)-2πεντενόλη). Κατά την βιοσύνθεση αμινοξέων όπως η βαλίνη, η ισολευκίνη και η λευκίνη σχηματίζονται ως παραπροϊόντα η 2-μεθυλο-προπανάλη, η 2-μεθυλο-βουτανόλη και η 3-μεθυλο-βουτανάλη αντίστοιχα. Από τις αλκανάλες αυτές σχηματίζονται με την καταλυτική δράση μιας δεϋδρογονάσης των αλκοολών οι αντίστοιχες αλκοόλες και από τις τελευταίες με τη δράση μιας ακυλοτρανσφεράσης οι αντίστοιχοι εστέρες. (Χαλαστάρα, 2008) Χαρακτηριστικές ενώσεις που συμβάλλουν στο άρωμα είναι και τα πτητικα μονοτερπένια και σεσκιτερπένια που βιοσυντίθονται από τις πρόδρομες ενώσεις πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο και πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος. Τα πιο χαρακτηριστικά είναι οι τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες β-οκιμένιο, α-κοπαένιο και (*E*,*E*)-α-φαρνεσένιο (Revelou et al., 2020)

volatile compound	sniffing	volatile compound	sniffing
hexane		2-methylbutan-1-ol	fìsh oil
methyl acetate		3-methylbutanol	
octene	solvent-like	3-methyl-2-butenyl acetate	putty-like, unpleasant
ethyl acetate	sweet, aromatic	dodecene	
butan-2-one	fragrant, pleasant	ethenylbenzene	
3-methylbutanal	sweet, fruity	pentan-1-ol	pungent
1,3-hexadien-5-yne		1,2,4-trimethylbenzene	
ethylfuran	sweet	hexyl acetate	sweet, fruity
etnyi propanoate	sweet, strawberry, apple	C ₈ Ketone	iruity, mushroom-iike
1 methylaenten 2 me	sweet	octan-2-one 2 (4 method 2 menterod)for en	ma al du
a-mediyipentan-2-one	sweet strouberry	(E) 2 penter 1 ol	maray
2 methylbut 2 en al	solvent like	2 herenul acetate	meen bonono fruitu
methylbenzene	due solvent-like	(7)-2-penter-1-ol	banana
2-methylbut-3-enol	gille, suivaite inte	6-methyl-5-henten-2-one	fruity
butyl acetate	green, pungent, sweet	nonan-2-one	fruity
hexanal	green, apple	hexan-1-ol	fruity, aromatic
2-methylbutyl propanoate	aromatic, ketone	4-methyl-1-penten-3-ol	,,
2-methyl-propan-1-ol	ethyl acetate-like	(<i>E</i>)-3-hexen-1-ol	
(E)-2-pentenal	green, apple	alcohol C6 branched	sweety
(Z)-2-pentenal	green, pleasant	tridecene	-
ethylbenzene	strong	(<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol	banana
(E)-3-hexenal	artichoke, green, flowers	2,4-hexadienal	
(Z)-3-hexenal	green leaves, grassy	(E)-2-hexen-1-ol	green, grassy
2-methylpent-4-enal	_	(2)-2-hexen-1-ol	green fruit
1-penten-3-ol	wet earth	2-octenal	fruity, soap
3-methylbutyl acetate	banana	acetic acid	pungent
neptan-2-one	ITURY	methyl nonanoate	fruity
aidenyde C6 branched	ITURY	methyl decanoate	Iresh
(と)-2-nexenal	bitter, almonds, green	propanoic acid	aromatic, pungent

Εικόνα 9: Αρωματικές πτητικές ενώσεις (Morales et al., 1997)

A.4.2.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME)

Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεής φάσης, που αναπτύχθηκε το 1990 από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του, είναι μια απλή, γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται επιλεκτική συγκέντρωση πτητικών συστατικών από υγρά και στερεά δείγματα χωρίς την χρήση τοξικών διαλυτών. Χρησιμοποιείται τόσο στην εξέταση περιβαλλοντικών δειγμάτων όσο και δειγμάτων τροφίμων. Όλα τα στάδια της κλασσικής εκχύλισης υγρού-υγρού έχουν ενσωματωθεί σε ένα στάδιο, με τη χρήση μιας συσκευής, που έχει ως αποτέλεσμα να απλοποιείται η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος. Είναι μια ιδανική τεχνική για χρήση σε συνδυασμό με την τεχνική GC-MS. (Λιόντου, 2020)

Στην SPME χρησιμοποιείται μια ίνα κατασκευασμένη από διοξείδιο του πυριτίου η οποία έχει καλυφθεί με ειδικό πολυμερικό υλικό (στατική φάση). Τα πτητικά συστατικά του δείγματος ή της υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης αλληλεπιδρούν με το πολυμερικό υλικό, με αποτέλεσμα την προσρόφησή τους στην ίνα. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής μειώνεται ο χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, τα έξοδα για την αγορά διαλυτών μιας τεχνικής εκχύλισης καθώς και η διαχείριση αποβλήτων. Βέβαια, μειώνεται παράλληλα και το όριο ανίχνευσης των πτητικών ενώσεων μετά τη θερμική εκρόφησή τους από την ίνα στη διάταξη έγχυσης του αεριοχρωματογράφου και το διαχωρισμό τους στην τριχοειδή στήλη του. (Χαλαστάρα, 2008) Η συσκευή SPME είναι πολύ απλή και έχει εμφάνιση ανάλογη με αυτή μιας τροποποιημένης σύριγγας που αποτελείται από διάταξη συγκράτησης της ίνας και αγωγό εντός του οποίου προστατεύεται η ίνα, η οποία με τη βοήθεια ειδικού ελατηρίου εξέρχεται από τον αγωγό (*Εικόνα* 10).



Εικόνα 10: Μέρη μιας ίνας SPME (Μπακέας, 2008)

Η τεχνική SPME εφαρμόζεται με δύο τρόπους οι οποίοι διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση στην οποία τοποθετείται η ίνα στο δείγμα. Στην πρώτη περίπτωση η ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα και απαιτείται η επαρκής ανάδευσή του ώστε να επιτευχθεί ταχύτερη αλληλεπίδραση των πτητικών συστατικών με το πολυμερικό υλικό. Στη δεύτερη περίπτωση, πρέπει να προηγηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών από το δείγμα στο εσωτερικό διάκενο του φυαλιδίου του δείγματος και να έχει αποκατασταθεί ισορροπία. Η πρακτική αυτή εφαρμόζεται όταν το δείγμα έχει πολύπλοκη σύσταση, επειδή τα συστατικά του μπορεί να προκαλέσουν φθορά στην ίνα. (Χαλαστάρα, 2008) Ο τρόπος ανάδευσης του δείγματος, η θερμοκρασία της δειγματοληψίας, η τιμή του pH του δείγματος, ο όγκος του δείγματος και οι συνθήκες προσρόφησης και εκρόφησης των πτητικών πρέπει να διατηρούνται σταθερές προκειμένου να εξασφαλιστεί η ακρίβεια των μετρήσεων. (Λιόντου, 2020)

Αφού επέλθει ο χρόνος προσρόφησης των συστατικών, η ίνα επανέρχεται με τη βοήθεια εμβόλου μέσα στην σύριγγα, απομακρύνεται από το φυαλίδιο και τοποθετείται στη διάταξη θερμής εισαγωγής τύπου split/splitless του αέριου χρωματογράφου. Στον εισαγωγέα του χρωματογράφου, η ίνα εκ νέου εξέρχεται με τη βοήθεια του εμβόλου ώστε τα προσροφημένα στη στατική φάση συστατικά να ελευθερωθούν με θερμική εκρόφηση στην τριχοειδή στήλη. Οι πτητικές ενώσεις συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο (συνήθως He), το οποίο οδηγείται στην στήλη μέσω της φιάλης υψηλής πίεσης, όπου
και διαχωρίζονται και εκλούονται διαδοχικά. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάκτηση των ενώσεων και η εκρόφησή τους, επιτυγχάνεται βαθμιαία με διαβάθμιση της θερμοκρασίας. Ο διαχωρισμός αυτός, επιτυγχάνεται με βάση την αλληλεπίδραση αυτών, με την στατική φάση της στήλης και την ταχύτητα του φέροντος αερίου. Τα πτητικά συστατικά οδηγούνται από την στήλη, στον ανιχνευτή, ο οποίος ενισχύει το σήμα και καταγράφεται σε κατάλληλο καταγραφικό ή ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η χρήση ενός φασματομέτρου μάζας, έναντι ενός απλού αέριου χρωματογράφου, έχει τη δυνατότητα λήψης του φάσματος μάζας κάθε συστατικού, με αποτέλεσμα να παρέχονται πολλές πληροφορίες για τη δομή του συστατικού και να γίνεται πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση. Το σήμα κάθε συστατικού απ' τον ανιχνευτή καταγράφεται σε κατάλληλο λογισμικό με τη μορφή κορυφής (Εικόνα 11). (Κασιμάτη, 2020)



Εικόνα 11: Διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου (Κασιμάτη, 2020)

Α.4.3. Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις, ή αλλιώς πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα ενώσεων με ένα ή περισσότερα υδροξύλια απ'ευθείας συνδεδεμένα σε έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους. Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των αμινοξέων των φυτών (*Εικόνα 12*). Υπάρχουν τουλάχιστον 36 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής στα παρθένα ελαιόλαδα. (Perez et al., 2014) Σε αυτές τις ενώσεις έχουν αποδοθεί πολλά από τα οφέλη της κατανάλωσης του παρθένου ελαιολάδου στην υγεία που περιλαμβάνουν προστασία της LDL από την οξείδωση, αντιμικροβιακές ιδιότητες, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, προστασία από διάφορες μορφές καρκίνου κ.α. (Chen et al., 2015) Η σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις καθορίζεται από τους φαινολικούς γλυκοζίτες που βρίσκονται στο καρπό της ελιάς και από τη δράση κάποιων υδρολυτικών ενζύμων (β-γλυκοξιδάση) πάνω σε αυτούς τους γλυκοζίτες.

οξείδωση των φαινολικών στα στάδια του σπασίματος και της μάλαξης του καρπού κατά τη διαδικασία της εξαγωγής του ελαιολάδου.



Εικόνα 12: Δευτερογενής μεταβολισμός φυτών (Γιαννακοπούλου, 2010)

Οι πιο σημαντικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στον καρπό της ελιάς είναι τα φαινολικά οξέα, οι φαινολικές αλκοόλες, τα φλαβονοειδή, τα σεκοϊριδοειδή και οι λιγνάνες. Στα φαινολικά οξέα ο αρωματικός δακτύλιος μπορεί να φέρει ως υποκαταστάτες είτε καρβοξυλικό οξύ (παράγωγα βενζοϊκού οξέος με σκελετό C₆-C₁ με κυριότερα το γαλλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και την υδροξυτυροσόλη), προπενικό οξύ (παράγωγα κινναμωμικού οξέος με σκελετό C₆-C₃, με κυριότερα το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ), είτε αλδεϋδομάδα. Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικά συστατικά με 15 άτομα άνθρακα στο σκελετό τους και έχουν δομή C₆-C₃-C₆. Είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτά και σε αυτά οφείλεται ο χρωματισμός των πετάλων, ενώ βοηθούν και στην άμυνα ενάντια σε προσβολές από έντομα και μικροοργανισμούς. Η χαμηλή τοξικότητά τους σε σχέση με άλλα φυτικά συστατικά επιτρέπει την πρόσληψη μέσω της τροφής ικανοποιητικών ποσοτήτων με απότέλεσμα την αύξηση της άμυνας του οργανισμού απέναντι σε αλλεργιογόνα και ιούς. Τα σεκοϊριδοειδή είναι γλυκοζυλιωμένες ενώσεις που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των τερπενίων. (Γιαννακοπούλου,2010)

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου είναι οι αλκοόλες 3.4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και η p-υδροξυφαινυλαιθανόλη (τυροσόλη), ενώ του πολτοποιημένου καρπού της ελιάς πριν ολοκληρωθεί η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου τα σεκοϊριδοειδή ελευρωπαΐνη και λιγκστροσίδης. (Vinha et al., 2005) Η υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA) και η τυροσόλη (p-HPEA), προέργονται από τους γλυκοζίτες της ελαιοευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου. Η διαφορά τυροσόληςυδροξυτυροσόλης είναι ότι η υδροξυτυροσόλη διαθέτει μια επιπλέον υδρόξυ ομάδα στη μέτα-θέση. Η ελευρωπαΐνη είναι ένας εστέρας που αποτελείται από υδροξυτυροσόλη και ελενολικό οξύ. Είναι η κύρια φαινολική ένωση στον καρπό της ελιάς, ενώ καθώς ο καρπός ωριμάζει η συγκέντρωση της ελευρωπαϊνης μειώνεται και το προϊόν της υδρόλυσής της, η υδροξυτυροσόλη, αυξάνεται. (Tuck et al., 2002) Στην ελευρωπαΐνη οφείλεται η πικρή γεύση του ελαιολάδου και το γαρακτηριστικό κάψιμο στον λαιμό (Papanikolaou et al., 2019) Επίσης, η διαλδεϋδική αποκαρβοξυλιωμένη μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με την υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA-EDA) ή με την τυροσόλη (p-HPEA-EDA), και η αλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με την υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA-EA) ή με την τυροσόλη (p-HPEA-EA), που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, παράγονται με ενζυμική και/ή χημική αποδόμηση των γλυκοζιτών των σεκοϊριδοειδών του καρπού της ελιάς. (Κώτσιου, 2015)

Οι φαινολικές ενώσεις, και ειδικότερα τα σεκοϊριδοειδή, είναι σημαντικοί παράγοντες στην εκτίμηση της ποιότητας του ελαιολάδου αφού, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνα για την σταθερότητά του στην αυτοξείδωση και την φωτοξείδωση, ενώ ταυτόχρονα συνεισφέρουν στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. (Vinha et al., 2005) Η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των φαινολών του ελαιολάδου επηρεάζεται από την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση, το χρόνο συγκομιδής και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης. (Bajoub et al., 2016)



Εικόνα 13: Δομές κύριων φαινολικών του ελαιολάδου (Tuck et al., 2002)

A.4.3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι η πιο σημαντική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνολικών πολικών φαινολικών συστατικών ενός δείγματος φυσικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Αναπτύχθηκε αρχικά στην Ιατρική σχολή του Harvard από τον Folin και τους συνεργάτες του το 1912 για την μελέτη του μεταβολισμού των πρωτεϊνών στον άνθρωπο και το 1927 τροποποιήθηκε από τους Folin και Ciocalteu και χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών. (Μητσόπουλος, 2012) Πρόκειται ουσιαστικά για μια φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (Folin-Ciocalteau reagent, FCR). Έτσι, εξασφαλίζεται η γραμμικότητα με βάση το νόμο Beer-Lambert και υπάρχει ένα μέτρο σύγκρισης των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μετρήσεων. (Μητσόπουλος, 2012)

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι απλή, ευαίσθητη και ακριβής και δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό. Το βασικό της μειονέκτημα έγκειται στο γεγονός ότι δεν προσδιορίζει μόνο το εκχυλιζόμενα φαινολικά συστατικά αλλά και ορισμένες πρωτεΐνες, σάκχαρα, το ασκορβικό οξύ, οργανικά οξέα κ.ά. Η ποσότητα των ολικών πολικών φαινολικών σε ένα δείγμα συνήθως εκφράζεται ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος ή κατεχίνης τα οποία χρησιμοποιούνται ως ποσοτικά πρότυπα. (Chen et al., 2015)

A.4.3.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με τετραπολική φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό και ανιχνευτή χρόνου πτήσης (HPLC-ESI-QTOF-MS)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια πολύ ισχυρή μέθοδος διαχωρισμού που χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ή περισσότερων συστατικών ταυτόχρονα σε ένα μίγμα. Έχει ποικίλες εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως στη φαρμακευτική βιομηχανία, στις περιβαλλοντικές επιστήμες και στη βιολογική και χημική έρευνα.

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι τεχνική ανίχνευσης με μέτρηση της αναλογίας μάζας/ιοντικό φορτίο. Αρχικά, ένα δείγμα εγχέεται στο όργανο και στη συνέχεια εξατμίζεται. Στη συνέχεια, οι ενώσεις του δείγματος φορτίζονται με ορισμένες μεθόδους ιονισμού όπως ο ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI), ο χημικός ιονισμός (CI), ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI), ο ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας (MALDI) κ.ά. Τέλος, τα ιόντα που δημιουργήθηκαν αναλύονται ανάλογα με την αναλογία μάζας προς το φορτίο (m/z) στον αναλυτή. Απλοί, φθηνοί και με μεγάλο εύρος μετρούμενης μάζας είναι οι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (TOF).

Συνδυαστικά, η αποτελεσματική ικανότητα διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας και η υψηλή ευαισθησία και ικανότητα δομικού χαρακτηρισμού της φασματομετρίας μάζας οδηγούν σε αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, το TOF-MS έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με το απλό MS, όπως οι γρήγοροι ρυθμοί ανάκτησης, η υψηλή ακρίβεια στις μετρήσεις μάζας και το μεγάλο εύρος μετρούμενης μάζας. Ο συνδυασμός LC και ESI-TOF-MS μας επιτρέπει να αποκτήσουμε ισχυρή ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μορίων σε σύνθετα δείγματα, μειώνοντας τις παρεμβολές της μήτρας, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων. (Raja et al., 2021) Πιο συγκεκριμένα, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ηλεκτροψεκασμό και τετραπολική φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (HPLC-ESI-QTOF-MS) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση σύνθετων φαινολικών ενώσεων και άλλων μεταβολιτών. (Ma et al., 2019)

A.4.4. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Η φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια στον τομέα των τροφίμων και έχει γίνει ένα ιδιαίτερα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο στην μελέτη των βρώσιμων ελαίων και λιπών. Επιτρέπει τον ποιοτικό προσδιορισμό οργανικών ενώσεων καθώς ο χαρακτηριστικός τρόπος δόνησης κάθε μοριακής ομάδας προκαλεί την εμφάνιση ζωνών συγκεκριμένης συχνότητας στο φάσμα υπερύθρου, η οποία επηρεάζεται από τις υπάρχουσες λειτουργικές ομάδες. Επιπλέον, είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο ποσοτικής ανάλυσης καθώς η ένταση των ζωνών στο φάσμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης. Η φασματοσκοπία FTIR σε συνδυασμό με διακριτική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της νοθείας έξτρα παρθένων ελαιολάδων με ραφιναρισμένα έλαια, φυτικά λάδια και λάδια ξηρών καρπών και για την διάκριση της γεωγραφικής προέλευσης και τον διαχωρισμό μιγμάτων μονοποικιλικών δειγμάτων παρθένων ελαιολάδων. (Abdallah et al., 2016, Vlachos et al., 2006) Είναι μια γρήγορη, μη καταστροφική τεχνική, με το πλεονέκτημα της άμεσης εφαρμογής του δείγματος σε κρύσταλλο χωρίς προηγούμενη προετοιμασία ή επεξεργασία και ελάχιστη έως μηδενική χρήση διαλυτών και αντιδραστηρίων, γεγονός που την καθιστά πράσινη αναλυτική τεχνική. Μεγάλο της πλεονέκτημα είναι ότι επιτρέπει την ανάλυση των λιπών και των ελαίων συνολικά, αντί της ανάλυσης συγκεκριμένων συστατικών τους. (Revelou et al., 2020, Rohman et al., 2014) Συνήθως, η ανάλυση FTIR πραγματοποείται με την μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR), η οποία περιλαμβάνει την πίεση του δείγματος σε πρίσμα υψηλού δείκτη διάθλασης και τη μέτρηση του υπέρυθρου φάσματος χρησιμοποιώντας υπέρυθρο φως που ανακλάται πλήρως εσωτερικά του πρίσματος. (Shimadzu)

Α.5. Χημειομετρία

Τα τελευταία χρόνια, οι στατιστικές μέθοδοι πολυμεταβλητής ανάλυσης όπως η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA), η Ιεραρχική Ανάλυση Συστάδων (HCA), η Διακριτική Ανάλυση (DA) και η Ανάλυση Ταξινόμησης (CA), έχουν εκτενώς χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση και τον χαρακτηρισμό των παρθένων ελαιολάδων βάση της γεωγραφικής τους προέλευσης. Η μέθοδος PCA, μία από τις πιο απλές και χρησιμοποιούμενες μεθόδους, βασίζεται στην μείωση των μεταβλητών με γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών που καθορίζουν τις κύριες συνιστώσες (PC). Το σύνολο των μεταβλητών μειώνεται χωρίς να χάνονται βασικές πληροφορίες της ανάλυσης. (Diraman et al., 2010) Η PCA αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στις περιπτώσεις που στα πλαίσια μια ερευνητικής δραστηριότητας έχει συγκεντρωθεί ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών μεταβλητών από ένα επίσης μεγάλο αριθμό δειγμάτων και συνεπώς, η εξαγωγή συμπεράσματος είναι γρονοβόρα διαδικασία. Η PCA μπορεί σε αυτή την περίπτωση να αποκαλύψει ποιες μεταβλητές είναι περισσότερο σημαντικές, οδηγώντας σε ένα μικρότερο αριθμό από ομαδοποιημένες μεταβλητές. Κατά την ανάλυση, δημιουργείται ο πίνακας συσχετίσεων (correlation matrix) των μεταβλητών από τον οποίο υπολογίζονται οι γαρακτηριστικές ρίζες (eigenvalues). Οι χαρακτηριστικές ρίζες διατάσσονται σε φθίνουσα σειρά. Το διάγραμμα των γαρακτηριστικών ριζών είναι γνωστό ως scree plot. Το scree plot γενικά γρησιμοποιείται για την εύρεση του μέγιστου αριθμού των κύριων συνιστωσών. Με βάση το scree plot μπορούν να θεωρούνται σημαντικές μόνο οι κύριες συνιστώσες που έχουν ιδιοτιμή μεγαλύτερη του 1 (Kaiser's rule). (Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Zwick et al., 1986)

Α.6. Σκοπός της εργασίας

Στις μέρες μας, η ζήτηση του ελαιολάδου διαρκώς αυξάνεται λόγω τόσο των ευχάριστων οργανοληπτικών του ιδιοτήτων όσο και των πλεονεκτημάτων του για την υγεία. Οι ιδιότητες αυτές προέρχονται από το σύνθετο προφίλ του, που περιλαμβάνει λιπαρά οξέα, πολυφαινόλες, πτητικά συστατικά, βιταμίνες κ.ά. Η σύνθεση του ελαιολάδου συνδέεται στενά με την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση, τις καλλιεργητικές πρακτικές καθώς και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσής του. Με σκοπό την διασφάλιση της ποιότητας και της αυθεντικότητάς του, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει κριτήρια για τον χαρακτηρισμό των γεωργικών προϊόντων, ανάμεσα τους και του ελαιολάδου, ως προϊόντα Π.Ο.Π (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) και προϊόντα Π.Γ.Ε. (Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη). Οι πιστοποιήσεις αυτές, αφορούν ιδαίτερα την Ελλάδα, η οποία κατέχοντας ήδη την τέταρτη θέση στις εξαγωγές ελαιολάδου στην Ε.Ε., μπορεί να τις αξιοποιήσει ώστε το προϊόν της να αναδειγθεί στην διεθνή αγορά με γνώμονα την υψηλή ποιότητά του. Η ταξινόμηση των ελαιολάδων ανάλογα με την γεωγραφική και ποικιλιακή τους προέλευση πραγματοποιείται με σύγγρονες αναλυτικές μεθόδους συνδυασμένες με χημειομετρικές μεθόδους. Στην παρούσα εργασία, γίνεται προσπάθεια γεωγραφικής διαφοροποίησης δειγμάτων παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης (Κονσερβολιά), από δύο διαφορετικές περιοχές (Φωκίδα και Μαγησία). Η ποικιλία Αμφίσσης είναι μια ποικιλία που δεν έχει αναλυθεί σε μεγάλο βαθμό, καθώς η πιο διαδεδομένη Κορωνέικη ποικιλία έχει σχεδόν μονοπωλήσει το ερευνητικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, προκειμένου να επιτευχθεί η συγκριτική αξιολόγηση των δειγμάτων από τις δύο αυτές περιογές με σκοπό τον προσδιορισμό της γεωγραφικής αυθεντικότητας του ελαιολάδου πραγματοποιούνται οι εξής αναλύσεις: Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών με SPME-GC-MS, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων με GC-FID, ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, μελέτη των φαινολικών συστατικών με HPLC-ESI-QTOF-MS, λήψη των φασμάτων FTIR, στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων με τη χρήση της μεθόδου Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA).



Εικόνα 14: Χάρτης της Ελλάδας με σημειωμένες τις περιοχές προέλευσης των δειγμάτων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης (Φωκίδα και Μαγνησία)

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Β.1.Υλικά και Μέθοδοι

Β.1.1. Δείγματα ελαιολάδου

Τα δείγματα παρθένου ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν λήφθηκαν από τοπικούς παραγωγούς και ελαιοτριβεία στο πλαίσιο του προγράμματος QuaAuthentic_GR την περίοδο συγκομιδής 2018-2019. Προέρχονται από τις γεωγραφικές περιοχές της Φωκίδας (13 δείγματα) και της Μαγνησίας (25 δείγματα) (Πίνακας 1). Οι ελιές συλλέχθηκαν με το χέρι ή σε δίχτυα και επεξεργάστηκαν σε επιλεγμένα τοπικά ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν την τεχνολογία τριφασικού συστήματος. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τον Νοέμβριο έως τα τέλη Ιανουαρίου και αποθηκεύτηκαν σε σκούρες γυάλινες φιάλες των 500mL.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ
1	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-179	ΦΩΚΙΔΑ
2	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-180	ΦΩΚΙΔΑ
3	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-181	ΦΩΚΙΔΑ
4	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-219	ΦΩΚΙΔΑ
5	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-223	ΦΩΚΙΔΑ
6	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-224	ΦΩΚΙΔΑ
7	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-225	ΦΩΚΙΔΑ
8	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-226	ΦΩΚΙΔΑ
9	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-227	ΦΩΚΙΔΑ
10	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-228	ΦΩΚΙΔΑ
11	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-229	ΦΩΚΙΔΑ
12	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-230	ΦΩΚΙΔΑ
13	ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-231	ΦΩΚΙΔΑ
14	ΑΜΦ-ΜΑΓ-2018-146	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
15	ΑΜΦ-ΜΑΓ-2018-147	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
16	АМФ-МАГ-2019-120	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
17	АМФ-МАГ-2019-121	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
18	АМФ-МАГ-2019-134	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
19	АМФ-МАГ-2019-137	ΜΑΓΝΗΣΙΑ

Πίνακας 1 : Κωδικοποίηση δειγμάτων ελαιολάδου

20	АМФ-МАГ-2019-138	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
21	АМФ-МАГ-2019-139	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
22	АМФ-МАГ-2019-140	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
23	АМФ-МАГ-2019-141	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
24	АМФ-МАГ-2019-142	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
25	АМФ-МАГ-2019-143	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
26	АМФ-МАГ-2019-144	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
27	АМФ-МАГ-2019-145	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
28	АМФ-МАГ-2019-136	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
29	АМФ-МАГ-2019-203	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
30	АМФ-МАГ-2019-242	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
31	АМФ-МАГ-2019-243	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
32	АМФ-МАГ-2019-244	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
33	АМФ-МАГ-2019-245	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
34	АМФ-МАГ-2019-246	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
35	АМФ-МАГ-2019-247	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
36	АМФ-МАГ-2019-248	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
37	АМФ-МАГ-2019-250	ΜΑΓΝΗΣΙΑ
38	АМФ-МАГ-2019-251	ΜΑΓΝΗΣΙΑ

Η ανάλυση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου ΕΡΓΑΝΑΛ στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Ανάπτυξη καινοτόμων ''εργαλείων'' για τον προσδιορισμό της γνησιότητας βασικών εξαγώγιμων ελληνικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με συνδυασμό σύγχρονων τεχνικών: Ευαισθητοποίηση επαγγελματία και καταναλωτή» και ακρώνυμο QuaAuthentic GR(2018-2021).

B.1.2 Πειραματική πορεία για την ταυτοποίηση και τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών με SPME-GC-MS

Οι πτητικές ενώσεις προσδιορίσθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεάς φάσηςαέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (SPME-GC-MS) σύμφωνα με την μέθοδο των Kosma et al. με ορισμένες τροποποιήσεις. (^bKosma et al., 2016)

Β.1.2.1. Διαδικασία εκχύλισης των πτητικών συστατικών από το ελαιόλαδο με την τεχνική SPME

<u>Εξοπλισμός</u>

- Φιαλίδιο ανάλυσης χρωματογραφίας με βιδωτό πώμα και ελαστικό παρέμβυσμα PTFE/σιλικόνης
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Μαγνητάκι ανάδευσης
- Σιφώνιο μέτρησης
- Τνα διβινυλοβενζολίου/καρβοξενίου/πολυδιμεθυλοσιλοξανίου 1cm (SPME fiber DNB/CAR/PDMS, Supelco)

<u>Αντιδραστήρια</u>

Β-ιονόνη

Μέθοδος

- Ζυγίζονται 5g ελαιολάδου σε γυάλινο φυαλίδιο.
- Προστίθεται 1μL β-ιονόνη, ως εσωτερικό πρότυπο.
- Τοποθετείται μαγνητάκι στο φιαλίδιο και θερμαίνεται με συνεχή ανάδευση σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 50°C για 30 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών στο εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου. Ταυτόχρονα εισάγεται και η ίνα SPME στο GC-MS για ενεργοποίηση στους 260°C για 30 λεπτά.
- Μετά το πέρας του χρόνου, η ίνα εισάγεται στο φιαλίδιο για 15 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η προσρόφηση των πτητικών συστατικών του δείγματος (Εικόνα 15).
- Η ίνα αποσύρεται από το φιαλίδιο και εισάγεται στο GC/MS για ανάλυση.



Εικόνα 15: Προσρόφηση πτητικών συστατικών

B.1.2.2. Ανάλυση πτητικού κλάσματος με GC/MS

<u>Εξοπλισμός</u>

Αέριος χρωματογράφος Trace GC Ultra εφοδιασμένος με φασματόμετρο μάζας DSQ II (Thermo Fisher Scientific) (Εικόνα 16)

Μέθοδος

- Πριν από την μέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται η μέθοδος ''clean'' για 12,5 λεπτά.
 Παραμονή στους 40°C για 2 λεπτά και αύξηση στους 250°C με ρυθμό 20°C/λεπτό.
- Τα πρώτα 3 λεπτά της ανάλυσης πραγματοποιούνται με τον εισαγωγέα σε λειτουργία μη διαμοιρασμού (splitless injection). Στη συνέχεια η ίνα απομακρύνεται και η βαλβίδα διαμοιρασμού ανοίγει (split injection).
- Θερμοκρασία εισόδου στη λειτουργία splitless: 260°C για 3 λεπτά

- Ρυθμός ροής He: 1,0 mL/min
- Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη από τηγμένο χαλαζία (fused silica) με στατική φάση διφαίνυλο/διμέθυλο πολυσιλοξάνιο (diphenyl/dimethyl polysiloxane) (Rtx-5MS 30m, 0,25mm ID, 0,25µm, Restek).
- Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα έχει διάρκεια 42,33 λεπτά και παρουσιάζεται στον Πίνακα 2:

Βαθμίδα	Ρυθμός (°C/min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
Αρχική	-	40	6,00
1η	5,0	120	0,00
2η	3,0	160	0,00
3η	15,0	250	1,00

Πίνακας 2: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον αεριοχρωματογραφικό διαχωρισμό των πτητικών συστατικών ελαιολάδου

Συνθήκες φασματόμετρου μάζας: Θερμοκρασία τετραπόλου 150°C, θερμοκρασία πηγής(ion source) 240°C, θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς (MS transfer line) 290°C.



Εικόνα 16: TRACE GC Ultra- DSQ II MS

Η ρύθμιση της μεθόδου, η λήψη και η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το πρόγραμμα Thermo Xcalibur. Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό NIST MS Search 2.0, συγκρίνοντας τους δείκτες κατακράτησης (RI) και τα φασματικά δεδομένα από την βιβλιοθήκη.Οι τιμές του δείκτη κατακράτησης των πτητικών ενώσεων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας πρότυπα αλκανίων (C8-C20) (Supelco). Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με διαίρεση των εμβαδών των κορυφών των ενώσεων με το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (β-ιονόνη) και πολλαπλασιάζοντας αυτόν το λόγο με την αρχική ποσότητα του εσωτερικού προτύπου που προστέθηκε στο δείγμα.

Β.1.3. Πειραματικός προσδιορισμός ολικών πολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

<u>Εξοπλισμός</u>

- Φασματοφωτόμετρο UV/Vis (VWR® Spectrophotometers, μοντέλο V-1200)
- Κυψελίδες υάλινες
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου

- Διαχωριστική χοάνη
- Καλλιεργητικά τρυβλία

<u>Αντιδραστήρια</u>

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου Na₂CO₃, 20% w/w: Ζυγίζονται 20g Na₂CO₃ και διαλύονται σε 100mL απιονισμένου νερού.

Μέθοδος

- Ζυγίζονται 10g ελαιολάδου σε ποτήρι ζέσεως.
- Προσθέτονται 30 mL εξάνιο και μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη των 100 mL.
- Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με 8mL υδατικής μεθανόλης MeOH 60% στην κάθε εκχύλιση (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Παραλαβή μεθανολικού εκχυλίσματος

- Το μεθανολικό εκχύλισμα που περιέχει τα φαινολικά μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 25mL και αραιώνεται με MeOH 60% μέχρι τη χαραγή.
- Σε καλλιεργητικά τρυβλία 24 βοθρίων (well plates) εισάγονται 1,5 mL H₂O, 25µL δείγματος από την ογκομετρική των 25mL, και 125µL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. (Εικόνα 18)



Εικόνα 18: Καλλιεργητικό τρυβλίο μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου Folin- Ciocalteu.

Ύστερα από 3 λεπτά προσθέτονται 375μL Na₂CO₃ και 475μL απιονισμένο νερό και αφήνονται για επώαση 2 ωρών στο σκοτάδι. (Εικόνα 19)



Εικόνα 19: Καλλιεργητικό τριβλίο μετά την επώαση των 2 ωρών.

• Μετράται η απορρόφηση στα 725nm. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: Φασματοφωτόμετρο UV/Vis

Όλα τα δείγματα μετρούνται τρεις φορές. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος. (Εικόνα 21)



Εικόνα 21: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

B.1.4. Πειραματική πορεία για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών με HPLC-ESI-TOF/MS

Β.1.4.1. Παραλαβή φαινολικού κλάσματος από το ελαιόλαδο

Τα φαινολικά συστατικά απομονώθηκαν από τα δείγματα ελαιολάδου εφαρμόζοντας, με μικρές τροποποιήσεις, τη μέθοδο υγρής-υγρής εκχύλισης που προτείνεται από τους Bakhouche et al. (2014).

<u>Εξοπλισμός</u>

- Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (Heidolph Laborota 4000)
- Φυγόκεντρος
- Σφαιρική φιάλη εσμυρισμένη
- Υδρόφιλα φίλτρα (PVDF Syringe Filter 0.45μm)

<u>Αντιδραστήρια</u>

- Εξάνιο
- Μεθανόλη 50% v/v: 5mL μεθανόλης σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και αραίωση με απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή.

Μέθοδος

- Ζυγίζονται 2.5g δείγματος και διαλύονται σε 5mL εξάνιο
- Προσθέτονται 5mL μεθανόλης και το μίγμα ανακινείται έντονα με στροβιλισμό.
- Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 5000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 5°C.
- Το μεθανολικό εκχύλισμα συμπυκνώνεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα κενού στους 35°C.
 (Εικόνα 22)



Εικόνα 22: Συμπύκνωση μεθανολικού εκχυλίσματος

Στυ συνέχεια διαλύεται σε 1mL μίγματος μεθανόλης/νερού (50/50 v/v) και διηθείται με τη χρήση υδρόφιλου φίλτρου 0.45μm πριν την περαιτέρω ανάλυσή του. (Εικόνα 23)



Εικόνα 23: Αποτέλεσμα συμπύκνωσης/ Υδρόφιλο φίλτρο διήθησης

B.1.4.2. Ανάλυση φαινολικού κλάσματος με HPLC-ESI-QTOF/MS

<u>Εξοπλισμός</u>

- Φασματόμετρο μάζας (Agrilent 6530 Q-TOF LC/MS) (*Εικόνα 24*)
- Στήλη HPLC (EC 100/4.6 NUCLEOSHELL Bluebird RP18, 2.7μm)

<u>Μέθοδος</u>

Εφαρμόστηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας με τετραπολικό αρνητικό ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (HPLC-ESI-QTOF-MS) με τις εξής παραμέτρους:

- Θερμοκρασία στήλης: 30°C
- Κινητή φάση: Μίγμα διαλύματος 0.1% οξικού οξέος σε νερό και σε ακετονιτρίλιο

Χρόνος (min)	H ₂ O-Οξικό οξύ 0.1%	Ακετονιτρίλιο- Οξικό οξύ 0.1%	Poή (ml/min)	Πίεση (bar)
0,00	90,0 %	10,0 %	1,000	600,00
8,00	70,0 %	30,0 %	1,000	600,00
12,00	60,0 %	40,0 %	1,000	600,00
16,00	50,0 %	50,0 %	1,000	600,00
18,00	90,0 %	10,0 %	1,000	600,00
33,00	90,0 %	10,0 %	1,000	600,00

Πίνακας 3: Σύνθεση κινητής φάσης

- Αέριο σύγκρουσης: Άζωτο
- Θερμοκρασία αερίου αποδιαλύτωσης: 300°C

- Ροή αερίου αποδιαλύτωσης: 10 l/min
- Πίεση αερίου εκνεφωτή: 45 psig
- Δυναμικό τριχοειδούς: 3500V
- Δυναμικό θραυσματοποίησης: 170V

Τα φαινολικά συστατικά ταυτοποιήθηκαν με συνδυασμό των αποτελεσμάτων με πρότυπες φαινολικές ενώσεις που αναλύθηκαν στο ίδιο σύστημα έκλουσης (συγκέντρωση 50 ppm, όγκος ένεσης 10μL) και των δεδομένων που υπάρχουν στην βιβλιογραφία. Έγινε ανάλυση δύο δειγμάτων, ένα από κάθε περιοχή (Φωκίδα-Μαγνησία). Επιλέχθηκαν τα δείγματα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά. Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το πρόγραμμα Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00.



Εικόνα 24: Agrilent 6530 Q-TOF LC/MS

Β.1.5 Πειραματική πορεία για την καταγραφή των φασμάτων ATR-FTIR

<u>Εξοπλισμός</u>

• Φασματόμετρο FT-IR IROS-05 (Ostec) (*Εικόνα 25*)

Μέθοδος

- 1 σταγόνα δείγματος ελαιολάδου τοποθετείται στον κρύσταλλο ATR.
- Τα φάσματα καταγράφονται με ανάλυση 4cm⁻¹ και 100 σαρώσεις και η ταχύτητα του κινητού καθρέφτη του συμβολόμετρου είναι 0,6329 mm s⁻¹.
- Πριν από την καταγραφή του κάθε δείγματος συλλέγεται φάσμα υποβάθρου (background) χρησιμοποιώντας μόνο τον κρύσταλλο ATR.
- Τα φάσματα ATR-FTIR εξομαλύνονται χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Savitsky-Golay και η γραμμή βάσης διορθώνεται χρησιμοποιώντας την 'automatic baseline correct function''.
- Τα φάσματα ATR-FTIR των δεγμάτων ελαιολάδου καταγράφονται εις τριπλούν και το μέσο φάσμα κάθε δείγματος κανονικοποιείται. Κάθε μέσο φάσμα εξάγεται και αποθηκεύεται ως αρχείο csv για χρήση σε στατιστική ανάλυση.
- Η συλλογή και επεξεργασία των φασματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού OMNIC version 9.1.24 (Thermo Fisher Scientific).



Εικόνα 25: FT-IR IROS-05 (Ostec)

Β.1.6. Στατιστική επεξεργασία

Πριν από την στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δειγμάτων (Shapiro-Wilk normality test) με το λογισμικό XLSTAT ver. 2020.3.1.0 (Addinsoft). Με το λογισμικό JMP version 13.0 (SAS Institute Inc.) προσδιορίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ (Spearman's ρ correlation coefficient) και πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA). Επίσης, υπολογίστηκαν με το Microsoft Excel οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση των παραμέτρων των δεικτών ποιότητας, με βάση τα δείγματα κάθε περιοχής (v=13 για την Φωκίδα και v=25 για την Μαγνησία).

Β.2. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Β.2.1. Ανάλυση λιπαρών οξέων

Στα δείγματα που αναλύθηκαν ταυτοποιήθηκε η παρουσία 11 λιπαρών οξέων (Πίνακας 4). Οι % μέσες τιμές τους είναι μέσα στα όρια του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (International Olive Council). Το ελαϊκό οξύ (C18:1) κυριαρχεί και στις δύο περιοχές (Φωκίδα 75,71% ± 1,99, Μαγνησία 75,18% ± 1,23). Ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις παλμιτικού (C16:0), α-λινολενικού (C18:3) και αραχιδονικού οξέος (C20:4) παρατηρήθηκαν στα δείγματα από την περιοχή της Μαγνησίας. Τα κύρια κορεσμένα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) με υψηλότερη συγκέντρωση στη Μαγνησία (11,24% ± 0,76) και το στεατικό οξύ (C18:0) με υψηλότερη συγκέντρωση στη Φωκίδα (2,33% ± 0,21). Οι μικρές αποκλίσεις στην σύνθεση των λιπαρών οξέων των δύο περιοχών είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης των δειγμάτων (σύνθεση του εδάφους, κλιματολογικές συνθήκες, καλλιεργητικές πρακτικές, τεχνικές συγκομιδής). (Kosma et al., 2017) Οι λόγοι MUFA/PUFA και ελαϊκό/λινελαϊκό οξύ (C_{18:1}/C_{18:2}) είναι ιδιαίτερα σημαντικές παράμετροι για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της σταθερότητας των ελαιολάδων. Η υψηλή αναλογία MUFA/PUFA προστατεύει το ελαιόλαδο από την οξειδωτική φθορά, ενώ η αναλογία C_{18:1}/C_{18:2} επηρεάζει τη γεύση του παρθένου ελαιολάδου. (^aKosma et al., 2016)

Λιπαρά οξέα	Φωκίδα	Μαγνησία
	Μέση Τιμή ±S.D.	Μέση Τιμή ±S.D.
Αραχιδικό οξύ (C20:0)	0,44 ± 0,03	$0,44 \pm 0,02$
Αραχιδονικό οξύ (C20:4)	0,70 ± 0,10	0,97 ± 0,13
Βεχενικό οξύ (C22:0)	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Γαδολεϊκό οξύ (C20:1)	0,34 ± 0,03	0,34 ± 0,01
Ελαϊκό οξύ (C18:1)	75,71 ± 1,99	75,18 ± 1,23
Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0)	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Λινελαϊκό οξύ (C18:2)	8,09 ± 0,38	8,07 ± 0,82
α-Λινολενικό οξύ (C18:3)	0,71 ± 0,09	0,75 ± 0,04
Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1)	0,67 ± 0,21	0,66 ± 0,10
Παλμιτικό οξύ (C16:0)	$10,72 \pm 1,57$	$11,24 \pm 0,76$
Στεατικό οξύ (C18:0)	2,33 ± 0,21	2,31 ± 0,16
γ∑ ^{SFAs}	13,69 ± 1,57	$14,19 \pm 0,62$
δ∑MUFAs	76,72 ± 1,82	76,17 ± 1,19

Πίνακας 4: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (Stanadard Deviation, S.D.) της σύνθεσης των λιπαρών οξέων (%) των δειγμάτων από τις περιοχές της Φωκίδας (ν=13), και της Μαγνησίας (ν=25).

≈∑PUFAs	$9,49 \pm 0,37$	9,78 ± 0,77
στMUFA/PUFA	8,10 ± 0,46	7,84 ± 0,65
$C_{18:1}/C_{18:2}$	9,39 ± 0,62	9,42 ± 0,98

Σημείωση: ^γΣ^{SFAs}= Άθροισμα κορεσμένων λιπαρών οξέων; ^δΣ^{MUFAs}= Άθροισμα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων; ^εΣ^{PUFAs}= Άθροισμα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων; ^{στ}MUFA/PUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Διαφορές λόγω της γεωγραφικής προέλευσης διαπίστωσαν και οι Kosma et al. στην ανάλυση Κορωνέικης ποικιλίας από διαφορετικές περιοχές, τόσο στην συγκέντρωση του ελαϊκού οξέος (από 76,68 ± 0,99% στα δείγματα της Μεσσηνίας σε 75,45 ± 0,76 στα δείγματα του Ηρακλείου) αλλά και των κύριων κορεσμένων λιπαρών οξέων (12,39 ±0,74% στη Λακωνία και 3,01±0,12 στο Ηράκλειο). (Kosma et al., 2017) Μείωση του ποσοστού του παλμιτικού οξέος στα δείγματα της ίδιας ποικιλίας από τον νότο προς τον βορρά παρατήρησαν και οι Issaoui et al. Μελετώντας την επίδραση της περιοχής της καλλιέργειας στα χαρακτηριστικά του ελαιολάδου σε δύο Τυνησιακές ποικιλίες,παρατήρησαν μεγάλη διαφοροποίηση στα ποσοστά του παλμιτικού, του παλμιτελαϊκού, του στεατικού, του ελαϊκού και του λινελαϊκού οξέος μεταξύ των δειγμάτων της ποικιλίας Chemlali σε βορρά και νότο (10,6% και 18,4%, 0,3% και 2,8%, 3,1% και 1,9%, 66,8% και 20,1%, 15,8% και 20,1% για τα δείγματα της βόρειας και της νότιας Τυνησίας αντίστοιγα). Επίσης, και για τις δύο ποικιλίες που μελετήθηκαν (Chemlali και Chetoui), η αναλογία MUFA/PUFA ήταν υψηλότερη στα δείγματα του βορρά. Οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων μεταξύ των δειγμάτων, αποδίδονται στα διαφορετικά υψόμετρα των τοποθεσιών. (Issaoui et all, 2010) Σύμφωνα με τους Stefanoudaki et al., με την αύξηση του υψόμετρου μειώνεται σημαντικά η συγκέντρωση του παλμιτελαϊκού οξέος, ενώ σε τοποθεσίες με χαμηλό υψόμετρο και υψηλές μέσες θερμοκρασίες αυξάνεται και η περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, κάτι που επιβεβαιώνουν και οι Ktirioti et al., στην μελέτη τους σχετικά με τις εναλλαγές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων σε δείγματα Κυπριακής και Κορωνέικης ποικιλίας από περιοχές με διαφορετικά υψόμετρα. Η διαφοροποίηση που παρατηρείται εξαρτάται από το μικροκλίμα κάθε περιοχής. (Stefanoudaki et al., 1999, Kritioti et al., 2017) Επίσης, έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές ότι το ποσοστό του ελαϊκού οξέος έχει λανθασμένα συσχετισθεί με την σχετική ατμοσφαιρική υγρασία της κάθε περιοχής. (Ranalli et al., 2017)

Από την ανάλυση των Diraman et al. σε Τούρκικες ποικιλίες προκύπτει διαφοροποίηση στα ποσοστά των λιπαρών οξέων όχι μόνο λόγω γεωγραφικής προέλευσης αλλά και σε δείγματα διαφορετικών περιόδων συγκομιδής. (Diraman et al., 2010) Σε μελέτη που έγινε για την σύνθεση των λιπαρών οξέων σε 4 διαδεδομένες ελληνικές ποικιλίες προέκυψε ότι η ποικιλία Αμφίσσης έχει την

υψηλότερη συγκέντρωση σε ελαϊκό οξύ (75,36 \pm 1,14%) σε σχέση με την Κορωνέικη (74,70 \pm 1,58%), την Μεγαρίτικη (65,81 \pm 2,75%) και το Μανάκι (70,15 \pm 1,72%), κάτι που επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη από τα υψηλά επίπεδα ελαϊκού οξέος και για τις δύο περιοχές.Τα υψηλά ποσοστά μονοακόρεστων λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκαν στην ίδια μελέτη για την ποικιλία Αμφίσσης (76,37 ±1,09 %), καθώς και η υψηλή αναλογία MUFA/PUFA (8,06 ± 0,53 %) υποδεικνύουν υψηλή οξειδωτική σταθερότητα των δειγμάτων της ποικιλίας. (Revelou et al., 2021) Τα παρόντα αποτελέσματα σχετικά με την σύνθεση των λιπαρών οξέων σε δείγματα ποικιλίας Αμφίσσης δύο διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών συμφωνούν σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα των Kosma et al. για 6 ελληνικές ποικιλίες, τα αποτελέσματα των Piravi-Vanak et al. για ιρανικές ποικιλίες, τα αποτελέσματα των D'Imperio et al. για ποικιλίες από την Σικελία και τα αποτελέσματα των Longobardi et al. για μονοποικιλιακά δείγματα από 4 νησιά της Δυτικής Ελλάδας. (^bKosma et al., 2016, Vanak et al., 2009, D'Imperio et al., 2007) Οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στο προφίλ των λιπαρών οξέων μεταξύ των δειγμάτων δικαιολογούνται ανάλογα με την ποικιλία, τις συνθήκες καλλιέργειας, το γεωγραφικό πλάτος, το κλίμα και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, ενώ το έτος συγκομιδής φαίνεται να μην το επηρεάζει σημαντικά, εκτός εάν οι κλιματικές συνθήκες είναι εξαιρετικά κακές. (Diraman et al., 2010, D'Imperio et al., 2007)



Β.2.2. Ανάλυση πτητικών ενώσεων

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 και εκφράζονται σε mg/Kg. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα και από τις δύο γεωγραφικές

περιοχές των δειγμάτων φαίνονται στις Εικόνες 27 και 28. Σαράντα έξι πτητικές ενώσεις (9 αλκοόλες, 13 αλδεΰδες, 8 κετόνες, 1 εστέρας, 14 υδρογονάνθρακες και 2 άλλες ενώσεις) ταυτοποιήθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική SPME-GC-MS. Η ταυτοποίηση του πτητικού προφίλ της γεύσης του ελαιολάδου είναι σημαντικό για την ποιοτική του αξιολόγηση. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα των πτητικών ουσιών δεν είναι οι καθοριστικοί παράγοντες του αρώματος και της γεύσης του ελαιολάδου. Άλλοι παράγοντες, όπως το μέγεθος, το σχήμα, η τοποθέτηση της λειτουργικής ομάδας και η διαμόρφωση της ένωσης έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το άρωμα περισσότερο από την συγκέντρωση. (Revelou et al., 2020) Οι κύριες ενώσεις και των δύο γεωγραφικών περιοχών (Φωκίδα και Μαγνησία) που ανιχνεύθηκαν είναι η (E)-2-εξεν-1-όλη, η 1-εξανόλη, η εξανάλη, η (E)-2-εξενάλη, το β-οκιμένιο και το μεθυλοκυκλοδεκάνιο.

Ενώσεις	^a R.I.	R.I. Βιβλιογραφίας	Φωκίδα Μέση Τιμή ± S.D.	Μαγνησία Μέση Τιμή ± S.D.			
Αλκοόλες							
Αιθανόλη	<500	443	$3,\!89 \pm 7,\!17$	$1,84 \pm 2,54$			
1-πεντεν-3-όλη	681	684	$0,01 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,76$			
3-μεθυλο-1- βουτανόλη	714	723	$0,83 \pm 0,74$	0.63 ± 0.58			
2-μεθυλο-1- βουτανόλη	715	724	$1,3 \pm 2,26$	$0,34\pm0,82$			
1-πεντανόλη	754	762	$0,\!17 \pm 0,\!56$	$0,\!28 \pm 0,\!73$			
2-πεντεν-1-όλη	758	765	$2,\!24 \pm 2,\!07$	$1,\!48 \pm 1,\!30$			
3-εξέν-1-όλη	875	868	$53,22 \pm 46,18$	$4,12 \pm 10,57$			
(Ε)-2-εξεν-1-όλη	863	851	$15,61 \pm 15,72$	$16,37 \pm 19,67$			
1-εξανόλη	867	863	$32,94 \pm 24,65$	$14,10 \pm 16,22$			
Σύνολο			110,21± 18,82	39,47 ± 6,30			
		Αλδεΰδ	ες				
2-βουτενάλη	624	627	$0,1 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,31$			
Πεντανάλη	697	704	$0,14 \pm 0,13$	$1,01 \pm 2,12$			
(E)-2-πεντενάλη	738	744	$0,23 \pm 0,46$	$0,99 \pm 0,80$			
3-εξενάλη	818	814	$2,08 \pm 5,42$	$1,67 \pm 4,87$			
Εξανάλη	815	806	$12,59 \pm 9,09$	$17,\!48 \pm 21,\!98$			
(E)-2-εξενάλη	847	846	$84,49 \pm 67,47$	$194,44 \pm 142,25$			
Επτανάλη	898	901	$0,28 \pm 0,31$	$0,87 \pm 1,05$			
(E,E)-2,4- εξαδιενάλη	909	907	$0,75 \pm 1,34$	$1,36 \pm 2,10$			
(E)-2-επτενάλη	955	947	$0,33 \pm 0,52$	$1,07 \pm 1,48$			
Οκτανάλη	1001	998	$0,65 \pm 0,71$	1,18 ±1,06			
2-οκτενάλη	1082	1049	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,05$			

Πίνακας 5: Μέση τιμή (mg/kg) και τυπική απόκλιση (Stanadard Deviation, S.D.) των ταυτοποιημένων πτητικών ενώσεων από τις περιοχές της Φωκίδας (v=13) και της Μαγνησίας (v=25)

Εννεανάλη	1104	1100	$2,52 \pm 1,23$	5,36 ± 3,9			
(E)-2-εννεανάλη	1159	1161	$0,00 \pm 0,00$	0,01 ± 0,03			
Σύνολο			19.57 ± 3.55	225,64 ± 51,53			
Κετόνες							
1-πεντεν-3-όνη	680	678	$2,01 \pm 3,56$	$4,03 \pm 4,34$			
2-πεντανόνη	685	689	$4,36 \pm 6,01$	$0,00 \pm 0,00$			
3-πεντανόνη	690	694	$9,77 \pm 14,55$	$3,91 \pm 3,73$			
2-εξανόνη	763	771	$0,01 \pm 0,05$	$0,00 \pm 0,01$			
2-επτανόνη	885	892	$0,15 \pm 0,53$	$0,35 \pm 1,10$			
6-μεθυλο-5- επτεν-2-όνη	983	989	$0,11 \pm 0,14$	$1,70 \pm 3,69$			
3-οκτεν-2-όνη	1062	1030	$0,00 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,02$			
6-μεθυλο-5-(1-							
μεθυλοαιθυλιδεν ο)-6,8-εννεαδιεν-	1411	1387	$0,\!05\pm0,\!06$	$0,\!06\pm0,\!06$			
2-όνη							
Σύνολο			$16,47 \pm 3,48$	$10,06 \pm 1,70$			
		Εστέρε	ες I				
Οζικος εστερας	1004	1004	$0,\!00 \pm 0,\!01$	0.09 ± 0.22			
<u>της 4-εζεν-1-ολης</u>		VSaanavier					
1	705	<u>4 ορογονανι</u> 700	$\frac{0.01+0.02}{0.01+0.02}$	0.28 + 0.26			
1-οκτενιο	780	700	0.01 ± 0.03 0.80 + 3.00	$0,20 \pm 0,30$ 1.60 ± 4.31			
(7) 2 $\alpha \kappa \tau \epsilon \kappa n \alpha$	806	808	$\frac{800}{0.89 \pm 3.09}$				
(<i>L</i>)-2-0κτενιο 1 3-οκταδιένιο	810	820	0.01 ± 0.03	$0,37 \pm 1,07$ 0.02 ± 0.07			
1,5-0810012010	019	820	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,07			
3-αιθυλο-1,5-	026		4.25 + 0.02	2.17 . 2.02			
οκταδιενιο	936	930	$4,35 \pm 2,93$	$3,17 \pm 2,02$			
ισομερες Ι							
3-αιθυλο-1,5-	0.40		6 7 2 4 5 0				
οκταδιένιο	942	930	$6,73 \pm 4,58$	$5,78 \pm 4,03$			
ισομερές 2	020	022	0.27 0.65	0.00 0.00			
α-πινένιο	930	932	$0,37 \pm 0,65$	$0,23 \pm 0,26$			
Λιμονενιο	1027	1024	$0,11 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,54$			
β-οκιμενιο	1046	1044	$6,33 \pm 3,74$	$10,22 \pm 7,71$			
2-αιθενυλο-1,1- διμεθυλο-3- μεθυλενο- κυκλοεζάνιο	1112	-	0,54 ± 0,33	2,51 ± 2,70			
Μεθυλοκυκλοδε κάνιο	1205	1202	17,71 ± 8,56	13,23 ± 9,19			
α-κοπαένιο	1376	1374	$6,65 \pm 3,30$	$4,26 \pm 2,59$			
α-μουουρολένιο	1497	1499	$0,93 \pm 0,39$	$0,85 \pm 0,45$			
(<i>E,E</i>)-α- φαρνεσένιο	1503	1505	2,66 ± 1,53	$4,73 \pm 3,70$			
Σύνολο			$47,29 \pm 4,90$	$47,92 \pm 4,02$			
		Άλλες ενά	σεις				
Οξικό οξύ	576	576	$1,06 \pm 2,16$	$1,60 \pm 3,62$			
2,3-	615	-	$0,02 \pm 0,07$	0,00 ± 0,00			

Διυδροφουράνιο			
Σύνολο πτητικών		279,118 ± 15,05	324,78 ± 28,29

Σημείωση: RI=tentative identification by retention index

Οι ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα (C5 και C6 ενώσεις), και ειδικά οι γραμμικές ακόρεστες C6 αλδεΰδες, αντιπροσωπεύουν το πιο σημαντικό αρωματικό κλάσμα των παρθένων ελαιολάδων υψηλής ποιότητας. (Kosma et al., 2017) Παράγονται ενζυματικά από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μέσω της οδού της λιποξυγενάσης (LOX pathway), η οποία ξεκινά μόλις οι ιστοί του ελαιοκάρπου διαταραχθούν με μηχανικά μέσα. (Bubola et al., 2012) Οι λιποξυγενάσες, μετά την απελευθέρωσή τους λόγω της κυτταρικής διάσπασης του καρπού, ενεργοποιούνται αμέσως και μετατρέπουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λινολενικό και λινελαϊκό στα αντίστοιχά τους 9- και 13- υδροϋπεροξείδια. Η απουσία των C9 μεταβολιτών στα παρθένα ελαιόλαδα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μόνο τα 13-υδροϋπεροξείδια αποτελούν τα υποστρώματα για τις περαιτέρω ενζυματικές και χημικές διαδικασίες. (Angerosa et al., 1998) Η συγκέντρωση των ενώσεων που σχηματίζονται σε αυτό το μονοπάτι, και κατ'επέκταση από την ωριμότητα των ενζύμων που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι, και κατ'επέκταση από την ωριμότητα του καρπού, την γεωγραφική περιοχή και την ποικιλία. (Kalua et al., 2017)

Οι C5 ενώσεις που περιέχονται στο ελαιόλαδο συμβάλλουν στις θετικές γευστικές ιδιότητες (πικράδα) και το φρουτώδες άρωμά του. (^bKosma et al., 2016) Προέρχονται από την διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων του λινολενικού οξέος. (Kosma et al., 2017) Αυτές που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι: 1-πεντεν-3-όλη, 3-μεθυλο-1-βουτανόλη, 2-μεθυλο-1-βουτανόλη, 1-πεντανόλη, πεντανάλη, (*E*)-2-πεντενάλη, 1-πεντεν-3-όνη, 2-πεντανόνη και 3-πεντανόνη. Η 1-πεντέν-3-όνη, η οποία ταυτοποιήθηκε στα δείγματα και των δύο περιοχών (2,01 ± 3,56 mg/kg στη Φωκίδα και 4,03 ± 4,34 mg/kg στη Μαγνησία), αλλά και η 3-πεντανόνη (9,77 ± 14,55 mg/kg Φωκίδα, 3,91 ± 3,73 mg/kg Μαγνησία) είναι ενώσεις που συμβάλλουν στις θετικές νότες του αρώματος του ελαιολάδου. (^aKosma et al., 2016) Σύμφωνα με την έρευνα των Issaoui et al., ο αριθμός των αρωματικών ενώσεων διαφέρει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, τα ελαιόλαδα από τις βόρειες ποικιλίες περιείχαν περισσότερες αρωματικές ενώσεις από αυτές της νότιας Τυνησίας. Έτσι προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι αρωματικές ενώσεις διαφέρουν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή αλλά και την ποικιλία των δειγμάτων. (Issaoui et al., 2010)

Οι C6 ενώσεις, κύρια συστατικά του πτητικού προφίλ, είναι αυτές που ευθύνονται για την "πράσινη νότα" του ελαιολάδου. (^bKosma et al., 2016) Η διακύμανση στις συγκεντρώσεις των αλκοολών και των αλδεϋδών με 6 άτομα άνθρακα μπορεί να εξηγηθεί από την διαφορετική δράση της αλκοολικής αφυρογονάσης (ADH), του ενζύμου που καταλύει τον μετασχηματισμό των αλδεϋδών σε αλκοόλες, μια διαδικασία που φαίνεται να επηρεάζεται από περιβαλλοντικές παραμέτρους. (Kosma et al., 2017) Οι C6 ενώσεις προέργονται από την καταλυόμενη οξείδωση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος μέσω του μονοπατιού της λιποξυγενάσης. Αυτές που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι: 3εξεν-1-όλη, (Ε)-2-εξεν-1-όλη, 1-εξανόλη, 3-εξενάλη, εξανάλη, (Ε)-2-εξενάλη, (Ε,Ε)-2,4-εξαδιενάλη και 2-εξανόνη. Η (Ε)-2-εξενάλη, είναι η ένωση με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στα δείγματα και των δύο περιοχών, με την Μαγνησία βέβαια να έχει σημαντικά υψηλότερη (84,49 ± 67,47 Φωκίδα, 194,44 ± 142,25 Μαγνησία). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με πολλές μελέτες στις οποίες η (Ε)-2-εξενάλη είναι η ένωση με την μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα και μάλιστα αντιπροσωπεύει κατά μέσο όρο το 70% του πτητικού κλάσματος, και επιβεβαιώνει την υψηλή συγκέντρωση που βρέθηκε στα δείγματα ποικιλίας Αμφίσσης στην έρευνα των Revelou et al. (147,8 \pm 108,4 για ποικιλία Αμφίσσης, 79,2 \pm 51,3 για Κορωνέικη ποικιλία και 79,1 ± 57,6 για Μεγαρείτικη ποικιλία). (Squeo et al., 2019, Angerosa et al., 2004, Zunin et al., 2004, Revelou et al., 2020) Η (Ε)-2-εξενάλη είναι και αυτή προϊόν της οδού L.O.X. και σγετίζεται με το στάδιο ωριμότητας και οξείδωσης του ελαιολάδου. Χρησιμοποιείται ως δείκτης για την ποικιλιακή διαφοροποίηση του ελαιολάδου. (bKosma et al., 2016) Σύμφωνα με την έρευνα των Issaoui et al., η (E)-2-εξενάλη δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα ποικιλιών που καλλιεργήθηκαν σε μεγαλύτερα υψόμετρα με χαμηλές θερμοκρασίες, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης για την γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων. (Issaoui et al., 2012) Μαζί με την εξανάλη που επίσης βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση (12,59 \pm 9,09 mg/kg Φωκίδα και 17,48 \pm 21,98 mg/kg Μαγνησία), είναι ευρύτατα διαδεδομένες στο ελαιόλαδο και έχουν βρεθεί τόσο σε ελληνικές, όσο και σε ιταλικές, τυνησιακές, κροατικές και τουρκικές ποικιλίες. (^aKosma et al., 2016, Angerosa et al., 1998, Zarrouk et al., 2007, Bubola et al., 2012, Kesen et al., 2013) Η 3-εξενάλη, παρόλο που εμφανίζεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την, (Ε)-2-εξενάλη, συμβάλλει και αυτή στο άρωμα "πρασίνου", λόγω του χαμηλότερου ορίου οσμής της. (Kotsiou & Tasioula-Margari, 2015) Η συγκέντρωση της είναι σχετικά υψηλή (2,08 \pm 5,42 mg/kg στα δείγματα της Φωκίδας και 1,67 \pm 4,87 mg/kg στα δείγματα της Μαγνησίας) σε σχέση με τα αποτελέσματα των Kosma et al. στα δείγματα Κορωνέικης ποικιλίας (υψηλότερη συγκέντρωση 0.185 ± 0.182 mg/kg στα δείγματα από την Αιτωλοακαρνανία). (Kosma et al., 2017)

Η (E)-2-εξεν-1-όλη, που βρέθηκε σε μεγάλη συγκέντρωση και στα δύο δείγματα (15,61 ± 15,72 mg/kg στη Φωκίδα και 16,37 ± 19,67 mg/kg στη Μαγνησία) συμβάλλει στο άρωμα ''πρασίνου'' και την στυφή-πικρή γεύση του ελαιολάδου. Τα επίπεδά της στο ελαιόλαδο εξαρτώνται από το γενετικό επίπεδο της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH) της ποικιλίας. (Kesen et al., 2013) Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Revelou et al. και επιβεβαιώνουν ότι η (E)-2-εξεν-1-όλη αποτελεί σημαντικό συστατικό της ποικιλίας Αμφίσσης. (17,8 ± 12,4 mg/kg για την ποικιλία Αμφίσσης, 10,8 ± 11,2 mg/kg για την Κορωνέικη και 14,2 ± 22,7 mg/kg για την Μεγαρείτικη). (Revelou et al., 2020) Τέλος, σε όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν η 3-εξεν-1-όλη και η 1-εξανόλη, που επίσης προέρχονται από την οδό L.O.X.

(^bKosma et al., 2016) Πιο συγκεκριμένα, η 1-εξανόλη σύμφωνα με τους Kosma et al. μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης για την ποικιλία και τα στάδια ωριμότητας του ελαιολάδου. (^aKosma et al., 2016). Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στη συγκέντρωση της 1εξανόλης μεταξύ των δειγμάτων ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής περιοχής (32,94 ± 24,65 mg/kg Φωκίδα, 14,10 ± 16,22 mg/kg Μαγνησία) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο καρπός συλλέχθηκε σε διαφορετικό στάδιο ωριμότητας.

Η 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη είναι άλλη μία σημαντική καρβονυλική ένωση που ταυτοποιήθηκε, με υψηλότερη συγκέντρωση στα δείγματα της Μαγνησίας (0,11 \pm 0,14 mg/kg Φωκίδα, 1,70 \pm 3,69 mg/kg Μαγνησία), η οποία σχηματίζεται μέσω του μεταβολισμού των ψευδομονάδων (αποικοδόμηση των τερπενικών αλκοολών του ελαιολάδου). Συμβάλλει στην πικάντικη και φρουτώδη μυρωδιά, όμως αν βρίσκεται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το κατώφλι οσμής της (1,0 mg/kg) θεωρείται ασθητηριακό ελάττωμα. (Kosma et al., 2017) Η εξανάλη, η επτανάλη, η 2-επτανάλη, η οκτανάλη και η εννεανάλη που επίσης ανιγνεύθηκαν, σγηματίζονται μέσω αντιδράσεων αυτοοξείδωσης που αναπόφευκτα ξεκινούν μετά την εκχύλιση του ελαίου και θεωρούνται υπεύθυνες για τα αρνητικά χαρακτηριστικά του. Η εξανάλη και η εννεανάλη υπάρχουν και στα φρέσκα έλαια, ενώ η πεντανάλη, η επτανάλη και η 2-επτενάλη σχηματίζονται κατά την αποθήκευση και χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλό όριο οσμής, που σημαίνει ότι η συμβολή τους στα αρνητικά γευστικά γαρακτηριστικά είναι σημαντική. (Kotsiou & Tasioula-Margari, 2015) Η παρουσία τους στα δείγματα που εξετάζονται πιθανώς να δικαιολογείται από το γεγονός ότι τα δείγματα προέρχονται από σοδειά προηγούμενης χρονιάς και επομένως έχουν υπάρξει σε συνθήκες αποθήκευσης. Δεδομένου ότι η αιθανόλη (πρόδρομος πολλών αρωματικών ενώσεων) και το οξικό οξύ ανιγνεύθηκαν στα δείγματα και των δύο περιογών, είναι πιθανό οι ζύμες να είναι ενεργές. (Revelou et al., 2020) Ως το αποτέλεσμα ζυμώσεων, προσδίδουν και οι δύο οσμή κρασιού-ξυδιού στο ελαιόλαδο. (^aKosma et al., 2016)

Οι εστέρες και οι κετόνες θεωρούνται δευτερεύουσες γευστικές ενώσεις σε σύγκριση με τις αλδεΰδες και τις αλκοόλες, αν και συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στο άρωμα του ελαιολάδου. Η φρουτώδης και γλυκιά γεύση είναι αποτέλεσμα του οξικού εξυλεστέρα, ενώ ο οξικός (Z)-3εξενυλεστέρας δημιουργεί το άρωμα του πρασίνου και της μπανάνας. Εδώ ανιχνεύθηκε μόνο ο οξικός εστέρας της 4-εξεν-1-όλης στα δείγματα της Μαγνησίας και μάλιστα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση (0,09 \pm 0,22 mg/kg). Αρκετοί από τους υδρογονάνθρακες που βρίσκονται στα ελαιόλαδα, είναι συνήθως προϊόντα μόλυνσης του περιβάλλοντος. Το πεντάνιο κα το εξάνιο είναι προϊόντα οξείδωσης του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος, και δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα της παρούσας εργασίας. Οι τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες β-οκιμένιο, α-κοπαένιο και (*E*,*E*)-α-φαρνεσένιο ανιχνεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις και έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με την έρευνα των Revelou et al. (10,3 ± 6,5 mg/kg, 6,0 ± 3,7 mg/kg και 5,4 ± 5,1 mg/kg αντίστοιχα για την ποικιλία Αμφίσσης). Τα πτητικά αυτά σχετίζονται με τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών και η εμφάνισή τους σχετίζεται έντονα με την βοτανική προέλευση. (Revelou et al., 2020) Τα ισομερή του 3- αιθυλο-1,5-οκταδιένιο ανιχνεύθηκαν και στις δύο περιοχές και προέρχονται από το μονοπάτι της λιποξυγενάσης. (^aKosma et al., 2016) Τερπενοειδείς υδρογονάνθρακες, όπως το λιμονένιο και το α-πινένιο ποικίλλουν ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση.(^bKosma et al., 2016) Εδώ ανιχνεύθηκαν και οι δύο με συγκεντρώσεις 0,11 ± 0,08 mg/kg και 0,37 ± 0,65 mg/kg για την Φωκίδα και 0,58 ± 0,54 mg/kg και 0,23 ± 0,26 mg/kg για την Μαγνησία αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση των συνολικών πτητικών είναι 279,118 ± 15,05 mg/kg για την Φωκίδα και 324,78 ± 28,29 mg/kg για την Μαγνησία. Οι τιμές αυτές είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές που αναφέρονται για τρεις διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες από τους Revelou et al. ($252,5 \pm 12,5$ mg/kg Kopωνέικη,166,9 ± 11,7 mg/kg Μεγαρείτικη, $266,2 \pm 21,9$ mg/kg Αμφίσσης) και αρκετά υψηλότερες από αυτά που αναφέρονται από τους Zarrouk et al. για Τυνησιακές ποικιλίες (από 94,14 ± 1,73- 98,10 ± 0,85 mg/kg για 3 ποικιλίες) αλλά και από 5 ελληνικές ποικιλίες των Kosma et all. (Revelou et al., 2020, Issaoui et al., 2010, ^aKosma et al., 2016) Με βάση τα αποτελέσματα που περιγράφονται παραπάνω, η σύνθεση των πτητικών ενώσεων στο ελαιόλαδο, εκτός από την ποικιλία και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, επηρεάζεται έντονα και από την περιοχή της καλλιέργειας (μορφολογία του εδάφους, θερμοκρασία, υγρασία, βροχοπτώσεις), δηλαδή την γεωγραφική προέλευση.



Εικόνα 27: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης πτητικών ενώσεων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας με SPME-GC-MS



Εικόνα 28: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ανάλυσης πτητικών ενώσεων ελαιολάδου ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας με SPME-GC-MS

B.2.3. Ανάλυση ολικών πολικών φαινολικών ενώσεων

Η συγκέντρωση των ολικών πολικών φαινολικών των δειγμάτων των δύο περιοχών φαίνεται στον Πίνακα 6. Τα δείγματα με την υψηλότερη συγκέντρωση είναι το ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-181 για την Φωκίδα (85,5 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου) και το ΑΜΦ-ΜΑΓ-2019-242 για την Μαγνησία (105,9 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για την ανάλυση του φαινολικού κλάσματος με υγρή χρωματογραφία. Τα δείγματα της Μαγνησίας παρουσίασαν μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση ολικών φαινολικών σε σχέση με τα δείγματα της Φωκίδας (41,12 ± 18,58 και 55,78 ± 30,08 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου αντίστοιχα).

1 70 5 15	
ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ (mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου)
ΦΩΚΙΔΑ	
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-179	26,9
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-180	51,5
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-181	85,5
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-219	62,2
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-223	37,8
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-224	58,1
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-225	29,7

Πίνακας 6: Ολικά φαινολικά δειγμάτων ελαιολάδου (mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου) από τις περιοχές της Φωκίδας (v=13) και της Μαγνησίας (v=25)

AMA AOK 2010 226	21.5
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-220	24.8
$\frac{AM\Psi - \Psi \Omega K - 2019 - 227}{AM\Phi \Phi O K - 2010 - 228}$	22.4
$AM\Phi - \Phi \Omega X - 2019 - 228$	23,4
$AM\Phi - \Phi \Omega K - 2019 - 229$	51,5
AMΦ-ΦΩΚ-2019-230	20
ΑΜΦ-ΦΩΚ-2019-231	41,9
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	41,12 ± 18,58
ΜΑΓΝΗΣΙΑ	
АМФ-МАГ-2018-146	24,1
ΑΜΦ-ΜΑΓ-2018-147	31,9
АМФ-МАГ-2019-120	24,5
АМФ-МАГ-2019-121	56,3
АМФ-МАГ-2019-134	60,4
АМФ-МАГ-2019-137	66,3
АМФ-МАГ-2019-138	84
АМФ-МАГ-2019-139	99,2
АМФ-МАГ-2019-140	74,6
АМФ-МАГ-2019-141	52,6
АМФ-МАГ-2019-142	65,9
АМФ-МАГ-2019-143	34,5
АМФ-МАГ-2019-144	47,8
АМФ-МАГ-2019-145	27,4
АМФ-МАГ-2019-136	62,6
АМФ-МАГ-2019-203	9,7
АМФ-МАГ-2019-242	105,9
АМФ-МАГ-2019-243	54,8
АМФ-МАГ-2019-244	71,3
АМФ-МАГ-2019-245	135,6
АМФ-МАГ-2019-246	79,6
АМФ-МАГ-2019-247	23,7
АМФ-МАГ-2019-248	21,9
АМФ-МАГ-2019-250	36,9
АМФ-МАГ-2019-251	43
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	55,78 ± 30,08

Η συγκέτρωση των ολικών φαινολικών στο ελαιόλαδο είναι πολύ σημαντική λόγω της ικανότητάς τους να το προστατεύουν από την οξείδωση. (Kosma et al., 2017) Η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στα ελαιόλαδα διαφέρει από μελέτη σε μελέτη. Έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 100 έως 800 mg/kg. (Tuck et al., 2002) Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στα ελαιόλαδα μειώνεται με την ωρίμανση του καρπού, πιθανώς λόγω των μεταβολών των φαινολικών ουσιών που αρχικά περιέχονται στον καρπό σε αυτές που τελικά θα ανιχνευθούν στο δείγμα ελαιολάδου. (Brenes et al., 1999) Σύμφωνα με τους Koseoglu et al. τα επίπεδα των ολικών φαινολικών συστατικών εξαρτώνται από την ποικιλία, τις κλιματικές συνθήκες, το στάδιο ωριμότητας του καρπού, το χρόνο συγκομιδής και την τελική επεξεργασία του ελαιολάδου, γι'αυτό και μπορεί να παρατηρηθεί μεγάλο εύρος τιμών ανάμεσα στα δείγματα ακόμα και της ίδιας ποικιλίας. (Koseoglu et al., 2018) Διαφοροποίηση στην συγκέντρωση των ολικών φαινολικών παρατήρησαν οι Kritikou et al. στις αναλύσεις δειγμάτων από 7 διαφορετικές ζώνες της Λέσβου. Τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα της 5^{ης} και 6^{ης} ζώνης, που βρίσκονται στο βόρειο τμήμα του νησιού εμφανίζουν κατά μέσο όρο χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά. (Kritikou et al., 2021) Οι Issaoui et al., παρατήρησαν και αυτοί διαφορές στα ολικά φαινολικά μεταξύ των δειγμάτων της νότιας και της βόρειας Τυνησίας. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα ποικιλίας Chemlali και Chetaoui από τον βορρά είχαν συγκέντρωση ολικών φαινολικών 572,5 και 551,1 mg/kg αντίστοιχα ενώ τα δείγματα του νότου 172,5 και 274,0 mg/kg αντίστοιχα. (Issaoui et al., 2010)

Γενικά, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων της παρούσας μελέτης εμφανίζονται αρκετά μειωμένες σε σχέση με αυτές των δειγμάτων άλλων ερευνών (για παράδειγμα, στην έρευνα των Kotsiou et al. σε Ελληνικές ποικιλίες, η πλειοψηφία των δειγμάτων παρουσιάζουν συγκέντρωση ολικών φαινολικών αρκετά πάνω από τα 100 mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου, ενώ στην έρευνα των Kosma et al. σε δείγματα Κορωνέικης ποικιλίας η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών συστατικών κυμαίνεται από $186,19 \pm 59,87$ έως $324,20 \pm 134,7$ mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου σε 4 διαφορετικές περιοχές). (Kotsiou et al., 2015, Kosma et al., 2017) Αυτό μπορεί να οφείλεται στην διάρκεια αποθήκευσης των δειγμάτων, καθώς αποτελούν δείγματα της περιόδου 2018-2019. Οι Taniglan et al. αναφέρουν ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στα δείγματα από 5 διαφορετικές περιοχές της Τουρκίας κυμαίνεται από 22,5-97,1 mg/kg γαλλικού οξέος, συμβαδίζοντας περισσότερο με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. (Tanilgan et al., 2007) Γενικά κατά την αποθήκευση οι φαινολικές ενώσεις υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές λόγω αποσύνθεσης (υδρόλυση σεκοϊριδοειδών) και αντιδράσεων οξείδωσης. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Brenes et al. αλλα και από τους Gutierrez et al. για τα δείγματα διαφορετικών ισπανικών ποικιλιών που ανέλυσαν, μετά από 1 χρόνο και 6 μήνες αποθήκευσης αντίστοιχα. (Brenes et al., 2001, Gutierez & Fernandez, 2002) Η συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες μειώνεται και, κατά συνέπεια, μειώνεται και η ένταση της κλασικής πικρής και πικάντικης γεύσης του φρέσκου ελαιολάδου. (Esti et al., 2009) Επίσης, μειώνεται και η αντιοξειδωτική δράση του ελαιολάδου, όπως διαπίστωσαν και οι Lavelli et al. κατά την ανάλυση ελαιολάδων ισπανικών και ιταλικών ποικιλιών. (Lavelli et al., 2006) Το πόσο σημαντικές θα είναι οι μεταβολές στη σύσταση, εξαρτάται από τις συνθήκες αποθήκευσης, δηλαδή από τη θερμοκρασία, το φως, το διαθέσιμο οξυγόνο

και από το αν το ελαιόλαδο διατηρείται σε βιομηχανική δεξαμενή ή σε εμπορική συσκευασία. (Mendez et al., 2007)

Β.2.4. Ανάλυση φαινολικών ενώσεων

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων φαίνονται στον Πίνακα 7. Κάθε περιοχή αντιπροσωπεύεται από ένα δείγμα, αυτό που έδειξε την υψηλότερη συγκέντρωση σε ολικά πολικά φαινολικά κατά τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Ανιχνεύθηκαν ενώσεις από όλες τις χαρακτηριστικές κατηγορίες φαινολικών του ελαιολάδου.

Πίνακας 7: Ταυτοποιημένες φαινολικές ενώσεις των δειγμάτων ελαιολάδου από τις περιοχές της Φωκίδας (v=13) και της Μαγνησίας (v=25)

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΜΟΡΙΑΚ ΟΣ ΤΥΠΟΣ	[«] ΘΕΩΡΗΤ IKH MAZA [M-H] ⁻	ПАРАТНРОУМЕNН MAZA [M-H] ⁻		ΣΦΑΛΜΑ ΜΑΖΑΣ		R _y (min)		
			ΦΩΚΙΔΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΦΩΚΙΔΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	ΦΩΚΙΔΑ	ΜΑΓΝΗΣΙΑ	
				Φαινολικά οξέα					
Πρωτοκατεχικ ό οξύ	$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0197	153,0188	-2,61	3,27	1,41	1,41	
Βανιλικό οξύ	$C_8H_8O_4$	167,035	167,0349	167,0347	0,6	1,8	2,12	2,12	
p-κουμαρικό οξύ	$C_9H_8O_3$	163,0401	163,0407	163,0397	3,7	2,5	5,47	5,49	
Καφεϊκό οξύ	$C_9H_8O_4$	179,035	-	179,0346	-	2,2	-	3,23	
Ομοβανιλικό οξύ	$C_9H_{10}O_4$	181,0501	181,0502	181,0504	-0,6	-1,66	5,92	5,87	
Φερουλικό οξύ	$C_{10}H_{10}O_4$	193,0506	-	193,0505	-	0,5	-	7,66	
Ελενολικό οξύ	$C_{11}H_{14}O_6$	241,0718	241,0716	241,0715	0,8	1,2	6,78	6,81	
			Φα	αινολικές αλκοόλ	ιες				
Τυροσόλη (p- ΗΡΕΑ)	$C_8H_{10}O_2$	137,0608	137,0609	137,0609	0,7	0,7	2,90	2,99	
Υδροξυτυροσό	$C_8H_{10}O_3$	153,0557	153,0559	-	-1,3	-	4,99	-	
λη (3,4- DHPEA)									
--	--	----------	----------	----------	------	------	-------	-------	--
Παράγωγα φαινολικών αλκοολών									
Οξική υδροξυτυροσό λη	$C_{10}H_{12}O_4$	195,0663	-	195,0662	-	0,5	-	7,73	
Παράγωγα σεκοϊριδοειδών									
Ελαιοκανθάλη (p-HPEA- EDA)	$C_{17}H_{20}O_5$	303,1238	303,1235	303,1235	0,99	0,99	9,39	9,38	
Ελαιασίνη (3,4-DHPEA- EDA)	$C_{17}H_{20}O_6$	319,1188	319,118	319,1179	2,2	2,5	9,66	9,62	
Αγλυκόνη του λιγκστροσίδη (p-HPEA-EA)	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	361,1291	-	361,1286	-	1,4	-	13,91	
Αγλυκόνη της ελευρωπαΐνης (3,4-DHPEA- EA)	C19H22O8	377,1242	377,1236	377,1231	1,6	2,9	11,95	11,95	
Φλαβόνες									
Απιγενίνη	$C_{15}H_{10}O_5$	269,0455	269,045	269,0447	1,9	3,0	11,69	11,68	
Λουτεολίνη	$C_{15}H_{10}O_{6}$	285,0405	285,0401	285,0401	1,4	1,4	10,06	10,06	
Λιγνάνες									
1- ακετοξυπινορε σινόλη	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	415,1398	415,1388	415,1382	2,41	3,85	10,4	10,36	

(α): Θεωρητικές μάζες από Capriotti et al., 2014, Kano et al., 2015, Krieger & Schneider, Kritikou et al., 2020

Η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση των φαινολών των παρθένων ελαιολάδων επηρεάζεται έντονα από εγγενείς (π.χ. καλλιεργούμενη ποικιλία) και εξωγενείς παράγοντες (π.χ. κλίμα, έδαφος και γεωγραφία της ελαιοκομικής περιοχής, χρόνος συγκομιδής, συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης).

(Bajoub et al., 2016, Koseoglu, 2018, Perez et al., 2014) Στην παρούσα ανάλυση, παρατηρείται διαφοροποίηση στη σύσταση του φαινολικού κλάσματος μεταξύ των δειγμάτων των δύο περιοχών. Η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε μόνο στην περιοχή της Φωκίδας, ενώ το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ, η οξική υδροξυτυροσόλη και η αγλυκόνη του λιγκστροσίδη ταυτοποιήθηκαν μόνο στα δείγματα από τη Μαγνησία. Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Kritikou et al. και τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα δείγματά πέντε ελληνικών νησιών του βοειοανατολικού Αιγαίου. Οι παρατηρούμενες διαφορές στο φαινολικό προφίλ των δειγμάτων τόσο από τις πέντε διαφορετικές περιοχές, αλλά και των διαφορετικών γεωγραφικών ζωνών στο νησί της Λέσβου οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η γεωγραφικη προέλευση επηρεάζει τα επίπεδα των φαινολών στα παρθένα ελαιόλαδα. (Kritikou et al., 2021)

Οι απλές φαινόλες που συναντώται συχνότερα στα ελαιόλαδα είναι η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το p-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το ομοβανιλικό οξύ, το βανιλικό οξύ και το συρινγκικό οξύ. Οι δύο τελευταίες δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου στα δείγματά μας, ενώ μαζί με τις υπόλοιπες αποτελούν χαρακτηριστικά συστατικά των Ισπανικών ελαιολάδων. (Brenes et al, 1999) Σύμφωνα με τους Kesen et al., η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ και το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ παρουσιάζουν την μεγαλύτερη επίδραση στα αισθητηριακά χαρακτηριστικά αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο ελαιόλαδα, λογω της παρουσίας του τμήματος ο-διυδροξυφαινυλίου στο μόριό της. (Annunziata et al., 2021) Η τυροσόλη, διαθέτει παρόμοια δομή με την υδροξυτυροσόλη αλλά στερείται υδροξυλικής ομάδας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με την υδροζυτυροσόλη, προστατεύει όμως αποτελεσματικά τα κύτταρα από τραυματισμούς λόγω οξείδωσης. (Kesen et al., 2013) Η οξική υδροξυτυροσόλη, που ανιχνεύθηκε και στην μελέτη των Perez et al. σε ισπανικά ελαιόλαδα, έχει αναφερθεί ότι προστατεύει από το οξειδωτικό στρες και έχει αντικαρκινική δράση. (Perez et al., 2014)

Η ελευρωπαΐνη, η κύρια φαινολική ένωση στους καρπούς της ελιάς, δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα. Η περιεκτικότητά της μειώνεται με την ωρίμανση, επιτρέποντας την αύξηση των συγκεντρώσεων της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης οι οποίες δεν απαντώνται συνήθως στον φρέσκο και άγουρο καρπό. Με ωρίμανση, και ενζυμική αποικοδόμηση των αντίστοιχων γλυκοζιτών τους, παράγονται, και περιέχονται στο ελαιόλαδο. Ο μετασχηματισμός αυτός απαιτεί ενζυματική δραστηριότητα η οποία ενεργοποιείται κυρίως κατά την διάρκεια της άλεσης και της μάλαξης του καρπού. (Brenes et al, 1999) Σύμφωνα με τους Bajoub et al., η υδροξυτυροσόλη, το ελενολικό οξύ, η αγλυκόνη της ελευρωπαΐνης, η 1-ακετοξυπινορεσινόλη και η αγλυκάνη του λιγκστροσίδη, ενώσεις που ανιχνεύθηκαν και στην παρούσα μελέτη, είναι αυτές με την μεγαλύτερη συνεισφορά σε αναλύσεις με LC-MS αλλά και GC-MS σε 5 Ισπανικές ποικιλίες. (Bajoub et al., 2016)

Τα πολλαπλά οφέλη του ελαιολάδου για την υγεία, η αντιοξειδωτική του δράση καθώς και η διάρκεια ζωής του αποδίδονται κυρίως στα σεκοϊριδοειδή παράγωγα της ελευρωπαΐνης, δηλαδή την ελαιασίνη (διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένη με την υδροξυτυροσόλη, 3,4-DHPEA-EDA), την ελαιοκανθάλη (διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένη με την τυροσόλη, p-HPEA-EDA), την αγλυκόνη της ελευρωπαΐνης (3,4-DHPEA-EA), την αγλυκόνη του λιγκστροσίδη (p-HPEA-EA), καθώς και στις λιγνάνες πινορεσινόλη και 1-ακετοξυπινορεσινόλη. (Veneziani et al., 2018, Esti et al., 2009) Εξαρτόμενα ελάχιστα από εξωτερικούς παράγοντες και την διαδικασία της επεξεργασίας του ελαιολάδου, οι λιγνάνες και τα παράγωγα του λιγκστροσίδη, εμφανίζουν την χαμηλότερη μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων. Αντίθετα, τα παράγωγα της ελευρωπαΐνης, που αποτελούν και τις φαινολικές ενώσεις με την μεγαλύτερη αφθονία στα ελαιόλαδα, παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ευαισθησία στις συνθήκες επεξεργασίας. Οι Brenes et al., μελέτησαν την επίδραση της οξύτητας στην υδρόλυση των αγλυκόνων των σεκοϊριδοειδών και τις αλλαγές στο φαινολικό κλάσμα κατά την αποθήκευση παρθένων ελαιολάδων Ισπανικών ποικιλιών υπό τις συνθήκες φωτός και οξυγόνου που επικρατούν στο εμπόριο, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ενώ το φρέσκο παρθένο ελαιόλαδο περιείχε υψηλή αναλογία σε λιπόφιλες ενώσεις (αγλυκόνες σεκοϊριδοειδών), μετά την αποθήκευση υπερίσχυσαν οι υδρόφιλες ενώσεις (τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη). (Brenes e al., 2001) Επίσης, σύμφωνα με έρευνα των Esti et al. σε δείγματα εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, τα παράγωγα της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσίδη συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην πικράδα και την όξινη-πικάντικη γεύση του ελαιολάδου. (Esti et al., 2009) Πιο συγκεκριμένα, οι Genovese et al. διευκρινίζουν ότι η 3,4-DHPEA-EDA και η 3,4-DHPEA-EA είναι υπεύθυνες για την πικράδα, ενώ η p-ΗΡΕΑ-ΕDΑ και η p-ΗΡΕΑ-ΕΑ συνδέονται με την όξινη γεύση. (Genovese et al., 2021)

Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος των λιγνανών, είναι η 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η οποία ταυτοποιήθηκε και στα δύο δείγματα. Μαζί με την πινορεσινόλη, ανιχνεύθηκε σε υψηλά ποσοστά από τον Louadj et al. στην μελέτη τους σε Αλγερινά ελαιόλαδα., ενώ χαρακτηριστικά είναι και τα υψηλά ποσοστά τους στην ποικιλία Arbequina της Ισπανίας. (Louadj and Giuffre, 2010, Bajoub et al., 2016) Οι ενώσεις αυτές υπάρχουν στο ενδοκάρπιο της ελιάς και απουσιάζουν από τον πολτό και τα φύλλα. Η συγκέντρωσή τους εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του φυτού, το μέγεθος του καρπού και την αναλογία σάρκας/κουκουτσιού. Η παρουσία τους στα ελαιόλαδα, σε ανιχεύσιμη μορφή, πιθανότατα οφείλεται σε έντονη μηχανική επεξεργασία κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. (Louadj and Giuffre, 2010) Η λουτεολίνη και η απιγενίνη είναι τα κύρια φλαβονοειδή του ελαιολάδου και προέρχονται από τους αντίστοιχους γλυκοζίτες τους που βρίσκονται στη σάρκα των καρπών. (Kesen et al., 2013) Τα φλαβονοειδή είναι σημαντικά για την ανθρώπινη υγεία καθώς έχουν υψηλή φαρμακολογική δράση και υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. (Perez, 2014) Υψηλά ποσοστά απιγενίνης βοήθησαν και τους Kalogiouri et al. στην ταξινόμηση δειγμάτων ποικιλίας Αμφίσσης, ανάμεσα σε 5 διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες. (Kalogiouri et al., 2018)



Εικόνα 29: Χρωματογράφημα ανάλυσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας με HPLC-ESI-QTOF/MS



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα ανάλυσης των φαινολικών συστατικών του δείγματος ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας με HPLC-ESI-QTOF/MS

B.2.5. Ανάλυση φασμάτων FTIR

Η σημασία της φασματοσκοπίας υπερύθρων για την αναγνώριση των μοριακών δομών έγκειται στη δυνατότητα συσχετισμού ορισμένων ζωνών απορρόφησης με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες. (Rohman & Che Man, 2010) Η ανάλυση FTIR πραγματοποήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική ATR. Οπτική εξέταση των φασμάτων ATR-FTIR των δειγμάτων του ελαιολάδου έδειξε ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στα φασματικά τους χαρακτηριστικά. (*Εικόνα 31*) Κάθε κορυφή και ώμος στους κυματάριθμους περίπου από 400 cm⁻¹ έως 4000 cm⁻¹ που υποδεικνύουν λειτουργικές ομάδες υπεύθυνες για την απορρόφηση υπερύθρων, αντιστοιχούν σε δονήσεις κάμψεις ή δονήσεις τάσης των λειτουργικών αυτών ομάδων. (Rohman et al., 2014) Στα λίπη και στα έλαια, οι περισσότερες κορυφές και ώμοι του φάσματος αποδίδονται σε συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες. Επειδή μάλιστα το κύριο συστατικό τους είναι τα τριγλυκερίδια, αυτά κυριαρχούν στο φάσμα. (Rohman & Che Man, 2010) Οι ζώνες απορρόφησης των φασμάτων του ελαιολάδου που μας ενδιαφέρουν είναι στους εξής κυματάριθμους: 3005 cm⁻¹ (δόνηση τάσης cis διπλών δεσμών), 2924 cm⁻¹ (δόνηση τάσης αλειφατικής ομάδας CH₂), 2853 cm⁻¹ (δόνηση τάσης αλειφατικών ομάδων CH₂ και CH₃), 1743 cm⁻¹ (δόνηση τάσης εστερικών καρβονυλικών ομάδων των τριγλυκερίδίων), 1460 cm⁻¹ (δόνηση κάμψης διπλών δεσμών), 1200-1000 cm⁻¹ (δόνηση τάσης των εστερικών ομάδων C-O), 965 cm⁻¹ (δόνηση κάμψης των trans –HC=CH- ομάδων των διυποκατεστημένων ολεφινών) και 721 cm⁻¹ (δόνηση κάμψης αλειφατικών ομάδων CH₂). (Revelou et al., 2020)



Εικόνα 31: Φάσματα ATR-FTIR δειγμάτων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας και της Μαγνησίας

Πιο συγκεκριμένα, ο κυματάριθμος 3007 cm⁻¹ προέρχεται από τον cis-C=H ολεφινικό δεσμό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης του βαθμού ακορεστότητας ελαίων και λιπών. Όσο υψηλότερη η

ένταση της κορυφής σε αυτόν τον κυματάριθμο, τόσο μεγαλύτερος κι ο βαθμός ακορεστότητας του δείγματος. (Rohman et al., 2014) Η μετατόπιση δε της ζώνης στα 3009 cm⁻¹, επιτρέπει τον προσδιορισμό της νοθείας του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, λόγω της σύνθεσης των φυτικών ελαίων που συνήθως χρησιμοποιούνται για την νοθεία. Περιέχουν υψηλότερη αναλογία λινολενικών ή λινολεϊκών ακυλομάδων ενώ το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο αποτελείται από μεγαλύτερη αναλογία ελαϊκών ακυλομάδων. (Vlachos et al., 2006) Επίσης, οι ζώνες στα 2924 cm⁻¹ και 2853 cm⁻¹, οι γνωστές ως κορυφές απορρόφησης μεθυλενίου συνδέονται με συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης του αλειφατικού C-Η των -CH₂ και των τερματικών -CH₃ ομάδων. Επιπλέον, η απότομη κορυφή στα 1745 cm⁻¹ είναι γνωστή και ως εστερική κορυφή λόγω της δόνησης τάσης του δεσμού C=O της καρβονυλομάδας των τριγλυκεριδίων, ενώ η αδύναμη ζώνη απορρόφησης στα 1654 cm⁻¹ αποδίδεται σε δόνηση τάσης της C=C ομάδας των cis-ολεφινών. Ζώνες στην περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint region) των 1464-983 cm⁻¹ συνδέονται με ταλάντωση και δόνηση κάμψης των αλειφατικών -CH₂ και -CH₃ ομάδων. Συμμετρική κάμψη του H-C-H στα 1377 cm⁻¹ μπορεί να αποδοθεί στην ομάδα Ο-CH2 της γλυκερόλης (των μονο-, δι- και τρι-γλυκεριδίων). Η ζώνη απορρόφησης μεταξύ 1125 και 1095 cm⁻¹ οφείλεται στην δόνηση τάσης του δεσμού C=O των εστερικών ομάδων. (Uncu et al., 2019) Τέλος, αλλαγές στην φασματική περιοχή 3050-2800 και 1745 cm⁻¹ εμφανίζονται μετά από θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες και βοηθούν στην παρακολούθηση της διαδικασίας οξείδωσης. (Vlachos et al., 2006)

1. Region of functional groups							
1 a. Region of hydrogen's stretching							
3009cm ⁻¹	C—H stretching vibration of the						
	cis-double bond (=CH)						
2925 cm ⁻¹ , 2854 cm ⁻¹	Symmetric and asymmetric stretching						
	vibration of the aliphatic CH ₂ group						
2962 cm ⁻¹ , 2872 cm ⁻¹	Symmetric and asymmetric stretching						
	vibration shoulder of the aliphatic CH ₃						
	group						
1b. Region of double bond's stretching							
1746cm ⁻¹	Ester carbonyl functional group of the						
	triglycerides						
$1700 \mathrm{cm}^{-1}$	Free fatty acids shoulder						
$1654{ m cm}^{-1}$	C=C stretching vibration of <i>cis</i> -olefins						
1465 cm =1	Reading and bendings						
1460 cm -	Bending vibrations of the CH_2 and CH_3						
1410	alipnatic groups						
1418 cm -	Kocking vibrations of CH bonds of						
1007 -1	cus-disubstituted olefins						
139/ cm ⁻¹	Bending in plane vibrations of CH						
l	cus-olefinic groups						
$1377 {\rm cm}^{-1}$	Bending vibrations of CH ₂ groups						
2. Fingerprint region							
1238 cm ⁻¹ , 1163 cm ⁻¹	Stretching vibration of the C—O ester						
	groups						
723 cm ⁻¹	Overlapping of the CH ₂ rocking						
	vibration and the out-of-plane vibration						
	of <i>cis</i> -disubstituted olefins						

Εικόνα 32: Αξιολόγηση του φάσματος FTIR (Vlachos et al., 2006)

Β.3. Στατιστική Ανάλυση

B.3.1. Συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ

Οι περιοχές της Φωκίδας (Εικόνα 33) και της Μαγνησίας (Εικόνα 34) μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας τους συντελεστές συσχέτισης του Spearman's ρ (Spearman's rho correlation coefficients) προκειμένου να διαπιστωθούν οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Οι συντελεστές συσχέτισης του Spearman's ρ επιλέχθηκαν έναντι των συντελεστών συσχέτισης Pearson (Pearson's correlations) επειδή παρατηρήθηκαν μικρές αποκλίσεις από την κανονικότητα χρησιμοποιώντας το Shapiro-Wilk normality test. Παρατηρήθηκαν μοτίβα ισχυρής θετικής συσχέτισης (p ≤ 0.01) για τα λιπαρά οξέα λινολενικό οξύ (18:3)-αραχιδικό οξύ (20:0) και για τα βεχενικό οξύ (22:0)- αραχιδικό οξύ (20:0), αλλά και μοτίβα αρνητικής συσχέτισης μεταξύ γαδολεϊκού οξέος (εικοσενοϊκό οξύ, 20:1)-παλμιτικού οξέος (16:0) και στις δύο περιοχές. Μέτριες έως ισχυρές ανταγωνιστικές σχέσεις

ανιχνεύθηκαν και μεταξύ ελαϊκού οξέος (18:1)-παλμιτελαϊκού οξέος (16:1). Οι συσχετίσεις μεταξύ βεχενικού οξέος-αραχιδικού οξέος, γαδολεϊκού οξέος-παλμιτικού οξέος και ελαϊκού οξέος-παλμιτικού οξέος έχουν αναφερθεί και από τους Revelou et al. για τα δείγματα από ποικιλία Αμφίσσης που μελέτησαν. (°Revelou et al., 2021)

Στα δείγματα ελαιολάδων της Φωκίδας καταγράφηκε ισχυρή ανταγωνιστική σχέση μεταξύ παλμιτικού οξέος (16:0) και ελαϊκού οξέος (18:1) και ισχυρή θετική σχέση μεταξύ λινολενικού οξέος (18:3)-βεχενικού οξέος (22:0) και λινολενικού οξέος (18:3)-αραχιδικού οξέος (20:0). Στα δείγματα της Μαγνησίας παρατηρήθηκαν ισχυρές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των ενώσεων: στεατικό οξύ (18:0)αραχιδικό οξύ (20:0), στεατικό οξύ (18:0)-βεχενικό οξύ (22:0), παλμιτικό οξύ (16:0)-παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), και μέτριες έως ισχυρές αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των: παλμιτικό οξύ (16:0)-βεγενικό οξύ (22:0) και στεατικό οξύ (18:0)-παλμιτικό οξύ (16:0). Επίσης βρέθηκε και μέτρια έως ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ στεατικού οξέος (18:0)-ελαϊκού οξέος (18:1). Οι Revelou et al. είχαν παρατηρήσει συσχέτιση μεταξύ παλμιτικού-παλμιτελαϊκού, αραχιδικού-στεατικού και στεατικού-ελαϊκού σε δείγματα ποικιλίας Αμφίσσης, και οι Stefanoudaki et al. και Kritrioti et al. συσχέτιση παλμιτικού-παλμιτελαϊκού, αραχιδικού-στεατικού και στεατικού-ελαϊκού σε δείγματα Κρητικών και Κυπριακών ποικιλιών αντίστοιχα. ("Revelou et al., 2021, Stefanoudaki et al., 1999, Kritioti et al., 2018) Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν από τις κινητικές διαφορές των μετασχηματισμών που λαμβάνουν θέση κατά την βιοσυνθετική διαδρομή των λιπαρών οξέων και πιο συγκεκριμένα, από τη μεταβλητότητα της δραστηριότητας των ενζύμων (δεσατουράσες των λιπαρών οξέων) που ρυθμίζουν την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων κατά την ωρίμανση του ελαιόκαρπου. Το πρώτο που παράγεται κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι το παλμιτικό οξύ (16:0), το οποίο μετατρέπεται σε στεατικό οξύ (18:0). Στη συνέχεια, παράγονται το ελαϊκό οξύ (18:1), το λινελαϊκό οξύ (18:2) και το λινολενικό οξύ (18:3) από την καταλυτική δράση εξειδικευμένων δεσατουρασών (στεατοϋλο-δεσατουράση, ελαϊκή δεσατουράση και λινελαϊκή δεσατουράση). (^cRevelou et al., 2021, Kritioti et al., 2018)

Στις πτητικές ενώσεις, μοτίβα ισχυρής θετικής συσχέτισης υπάρχουν και στις δύο περιοχές μεταξύ των δύο ισομερών του 3-αιθυλο-1,5-οκταδιενίου, μεταξύ της (*E*)-2-εξεν-1-όλης και της 1εξανόλης και μεταξύ του α-κοπαένιου και του μεθυλοκυκλοδεκάνιου. Στην περιοχή της Φωκίδας καταγράφηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της (*E*)-2-πεντενάλης με το 1-οκτένιο, της (*E*)-2-εξεν-1όλης με της 2-πεντεν-1-όλη και της 3–εξεν-1-όλης με την 3-μεθυλο-1-βουτανόλη. Διαφορές παρατηρήθηκαν στα δείγματα της Μαγνησίας. Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκαν ισχυρές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των ενώσεων: (*E*)-2-εξενάλη με 1-πεντεν-3-όνη, 1-εξανόλη με (*E*)-2-εξεν-1-όλη, (*E*)-2-εξεν-1-όλη με α-κοπαένιο, εννεανάλη με επτανάλη, εννεανάλη με οκτανάλη και εννεανάλη με 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη. Τα αποτελέσματα αυτά είναι λογικά δεδομένου ότι οι περισσότερες πτητικές ενώσεις είναι τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων από την στιγμή που ξεκινά η εκχύλιση του ελαιολάδου. Οι συσχετίσεις εννεανάλης-επτανάλης-οκτανάλης και 6-μέθυλο-5-επτεν-2-όνης είναι αναμενόμενες καθώς οι ενώσεις αυτές δημιουργούνται από αντιδράσεις αυτοξείδωσης (επτανάλη, οκτανάλη, εννεανάλη) και αποικοδόμησης των αλκοολών (6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη) του ελαιολάδου μετά από την αποθήκευσή του.



Εικόνα 33: Color map με τις συσχετίσης μεταξύ των λιπαρών οξέων και των πτητικών ενώσεων των παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Φωκίδας

Αραχιδικό οξύ (C20:0) Αραχιδονικό οξύ (C20:4) Βεχενικό οξύ (C22:0) Εικοσευοϊκό οξύ (C20:1) Εικοσευοϊκό οξύ (C20:1) Νηνοκηρικό οξύ (C18:1) Λινελαϊκό οξύ (C18:2) Λινολενικό οξύ (C18:3) Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) Παλμιτικό οξύ (C16:0) Στεατικό οξύ (C18:0) 2-Βουτενάλη Πεντανάλη Οξικό οξι 1-Πεντεν-3-όν 3-Εξέν-1-όλ 1-Εξανόλ 3-Πεντανό 3-Εξενά) Ξξανά (E)-2-Εξεν-1-6/ Οξικός εστέρας της 4-εξεν-1-όλι Ολικά Φαινολικά (mg γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδο ,3-Οκταδιέν (E)-2-Εξενά (Ε,Ε)-2,4-Εξαδιενά 3-Αιθυλο-1,5-οκταδιένιο ισομερέ 3-Μεθυλο-1-βουτανό 2-Μεθυλο-1-βουτανό 3- Αιθυλο-1,5-οκταδιένιο ισομερέ (E)-2-Πεντεν 6-Μεθυλο-5-επτεν-2-Αιθενυλο-1,1-διμεθυλο-3-μεθυλενο-κυ 6-Μεθυλο-5-(1-μεθυλοαιθυλιδενο)-6,8-



Εικόνα 34: Color map με τις συσχετίσης μεταξύ των λιπαρών οξέων και των πτητικών ενώσεων των παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης από την περιοχή της Μαγνησίας

Β.3.2. Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Ρ.C.A.)

Β.3.2.1 Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των λιπαρών οξέων

Η ανάλυση κύριων συνιστών (Principal component analysis, PCA) χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η πιθανή ομαδοποίηση των δειγμάτων των παρθένων ελαιολάδων σύμφωνα με την γεωγραφική τους προέλευση (Φωκίδα-Μαγνησία). Με βάση τα δεδομένα της σύνθεσης των λιπαρών οξέων, οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εξήγησαν το 64,9% της συνολικής διακύμανσης, ενώ οι 3 πρώτες το 77,1%.(*Εικόνα 35*) Σύμφωνα με το scores plot, έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε κάποιο βαθμό, αν και είναι προφανές ότι αρκετά δείγματα της Φωκίδας ταξινομούνται στην περιοχή της Μαγνησίας. Οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των δειγμάτων, αν και η δεύτερη κύρια συνιστώσα διαχωρίζει τις περιοχές των δειγμάτων σε μεγαλύτερο βαθμό. Από το scree plot της ανάλυσης (*Εικόνα 37*) καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν ικανοποιητικά τον διαχωρισμό των δεδομένων (επιλέγουμε τις ιδιοτιμές >1 σύμφωνα με τον κανόνα του Kaiser). (Zwick et al., 1986) Τα λιπαρά οξέα που τοποθετούνται μακριά από τον άξονα της κύριας συνιστώσας και συμβάλλουν στον διαχωρισμό (*Εικόνα 36*), είναι για την πρώτη το γαδολεϊκό οξύ (εικοσαενοϊκό οζύ, 20:1), το παλμιτικό οξύ (16:0), το αραχιδικό οξύ (20:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), το βεχενικό οξύ (22:0) και το ελαϊκό οξύ (18:1). Στη δεύτερη κύρια συνιστώσα τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα είναι το λιγνοκηρικό οξύ (24:0) και το αραχιδονικό οξύ (20:4), ενώ στην τρίτη το στεατικό οξύ (18:0) και το λινελαϊκό οξύ (18:2). Ισχυρές αρνητικές συσχετίσεις παρατηρούνται μεταξύ παλμιτικού οξέος (16:0)-ελαϊκού οξέος (18:1) και παλμιτικού οξέος (16:0)-γαδολεϊκού οξέος (20:1), επιβεβαιώνοντας τους συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ που αναφέρθηκαν πιο πάνω.

Σε αρκετές μελέτες έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά η μέθοδος PCA για τον γεωγραφικό διαχωρισμό δειγμάτων ελαιολάδου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η έρευνα των D'Imperio et al., όπου ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδων από τη Σικελία ανέδειξε ως ισχυρές μεταβλητές με διαχωριστική ισχύ το ελαϊκό (18:1), το παλμιτικό (16:0) και το λινελαϊκό οξύ (18:2). (D'Imperio et al., 2007) Διαχωρισμος των Κρητικών ελαιολάδων ανάλογα με την τοποθεσία προέλευσης επιτεύχθηκε στη μελέτη των Stefanoudaki et al. και πιο συγκεκριμένα μεταξύ των δειγμάτων χαμηλού και υψηλού υψόμετρου, καθώς και διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων (σχετική υγρασία, βροχοπτώσεις), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι τα δεδομένα των λιπαρών οξέων έχουν διαγωριστική δύναμη ακόμη και μεταξύ κοντινών γεωγραφικών περιοχών. (Stefanoudaki et al., 1999) Αποτελεσματικός διαχωρισμός και γεωγραφική διαφοροποίηση προέκυψε και από την μελέτη των Gurdeniz et al. (2008) σε Τούρκικες ποικιλίες, με το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), το ελαϊκό οξύ (18:1), το λινελαϊκό οξύ (18:2) και το λινολενικό οξύ (18:3) να είναι τα πιο σημαντικά της ανάλυσης. (Gurdeniz et al., 2008) Η υψηλή συμβολή του παλμιτικού οξέος (16:0), του παλμιτελαϊκού οξέος (16:1) και του ελαϊκού οξέος (18:1) στην γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων επιβεβαιώνεται και από την παρούσα μελέτη. Ομοίως, οι Olivier et al., προσδιορίζοντας τα λιπαρά οξέα γαλλικών Π.Ο.Π. ελαιολάδων από 5 διαφορετικές περιοχές, τα διαχώρισαν με επιτυχία ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση. (Olivier et al., 2006). Οι Longobardi et al., προσπάθησαν να διαγωρίσουν δείγματα ελληνικών παρθένων ελαιολάδων από 4 νησιά της δυτικής Ελλάδας σύμφωνα με την γεωγραφική τους προέλευση χρησιιμοποιώντας συμβατικές και ενόργανες αναλυτικές τεχνικές. Το ποσοστό ταξινόμησης ήταν 97,7%, με την ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων να αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές μεταβλητές. (Longobardi et al., 2012) Τέλος, οι Diraman e al., κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο PCA, είναι αρκετά επιτυχημένη ως προς την ποικιλία, την γεωγραφική προέλευση και το έτος συγκομιδής, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των δειγμάτων από την επαρχία της Σμύρνης. (Diraman et al., 2010)



Εικόνα 35: Scores plot λιπαρών οξέων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)











Εικόνα 38: Partial contribution λιπαρών οξέων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)

Β.3.2.2 Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των πτητικών ενώσεων

Αποτελεσματικός διαχωρισμός παρατηρήθηκε και από την εφαρμογή της PCA στις συγκεντρώσεις των πτητικών συστατικών των δειγμάτων. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εξηγούν το 36,4% της συνολικής διακύμανσης, ενώ οι τρεις πρώτες το 50,4%. Σύμφωνα με το scores plot η πρώτη κύρια συνιστώσα είναι η πιο σημαντική για τον διαχωρισμό των δειγμάτων, με αρκετά βέβαια δείγματα

της μίας περιοχής να ταξινομούνται στην άλλη (Εικόνα 39). Επίσης, οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες σε αυτή την περίπτωση δεν καλύπτουν την ιδιοτιμή 1.0 στο scree plot (Εικόνα 41). Καλύπτουν το 50,4%, οπότε ο διαχωρισμός θεωρείται αποδεκτός (Εικόνα 40). (Kaiser, 1974) Τα πτητικά συστατικά που συμβάλλουν κυρίως στον διαχωρισμό των δειγμάτων είναι η πεντανάλη, η εξανάλη, το 1-οκτένιο, η επτανάλη, η οκτανάλη και η εννεανάλη για την πρώτη κύρια συνιστώσα, η 2-πεντεν-1-όλη, η 3πεντανόνη, η 2-μέθυλο-1-βουτανόλη και η 1-εξανόλη για την δεύτερη κύρια συνιστώσα και η 1-πεντεν-3-όνη, η (Ε)-2-εξενάλη, το 2-αιθένυλο-1,1-διμεθυλο-3-μεθυλενο-κυκλοεξάνιο, το β-οκιμένιο και η (Ε)-2πεντενάλη για την τρίτη κύρια συνιστώσα (Εικόνα 42). Η πλειονότητα των πτητικών συστατικών συσχετίζονται θετικά, γεγονός που επιβεβαιώνει τους συντελεστές συσχέτισης Spearman's ρ που αναφέρθηκαν προηγουμένως. (Εικόνα 40)

Ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των δειγμάτων από τις περιοχές της Φωκίδας και της Μαγνησίας έχει επιτευχθεί με βάση αρκετές αλδεϋδες και αλκοόλες. Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές παράγονται μέσω του μονοπατιού της λιποξυγενάσης (LOX pathway), το οποίο περιλαμβάνει τα ένζυμα λιποξυγενάση και υδροϋπεροξειδική λυάση (HPL) που οξειδώνουν και διασπούν, αντίστοιχα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως το λινελαϊκό (18:2) και το λινολενικό (18:3) οξύ για να δώσουν αλδεϋδες. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται φυσικά στον καρπό της ελιάς και ενεργοποιούνται όταν ο καρπός συνθλίβεται στο ελαιοτριβείο. Οι αλδεΰδες που παράγονται, ανάγονται σε αλκοόλες από το ένζυμα αλκοολική αφυδρογονάση (ADH). Η 1-εξανόλη παράγεται από το λινελαϊκό οξύ (18:2) ενώ η (*E*)-2-πεντενάλη και η (*E*)-2-εξενάλη -όλες ενώσεις που συνεισφέρουν και στον διαχωρισμό των δειγμάτων της παρούσας μελέτης- προκύπτουν από την οξείδωση του λινολενικού οξέος (18:3). (Revelou et al., 2021, Genoveese et al., 2021, Kalua et al., 2017)

Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι οι αλδεΰδες είναι σημαντικές ενώσεις για την πιστοποίηση της γνησιότητας του ελαιολάδου. (Revelou et al., 2021) Οι Kosma et al., μελέτησαν την γεωγραφική επίδραση στα λιπαρά οξέα και τις πτητικές ενώσεις ελαιολάδων Κορωνέικης ποικιλίας από 4 διαφορετικές περιοχές (Ηράκλειο, Μεσσηνία, Λακωνία και Αιτωλοακαρνανία). Ενώ το ποσοστό ταξινόμησης των λιπαρών οξέων ήταν χαμηλό και επομένως δεν επετεύχθει διαχωρισμός, οι πτητικές ενώσεις διαχωρίστηκαν σε ποσοστό 95,5%. (Kosma et al., 2017) Οι Ogras et al. μελέτησαν δείγματα τουρκικών ποικιλιών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Μεσόγειο, Αιγαίο, Νοτιανατολική Ανατολία, Μαρμαρά και Μαύρη Θάλασσα) και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αλδεΰδες, και ιδιαίτερα η (*E*)-2-εξενάλη, είναι οι πιο σημαντικές ενώσεις για τον διαχωρισμό των δειγμάτων τόσο ανά ποικιλία όσο και ανά γεωγραφική περιοχή. (Ogras et al., 2018) Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη όπου οι ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα κυριαρχούν στην διαφοροποίηση των δειγμάτων, οι Vichi et al., μετά από ανάλυση δειγμάτων ελαιολάδου 2 ιταλικών ποικιλιών της νότιας Ιταλίας, κατέληξαν σε ορισμένα ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Πιο συγκεκριμένα αναφέρουν ότι τα επίπεδα των C6 αλδεϋδών

και αλκοολών, όπως η εξανάλη, 1-εξενόλη και η (E)-2-εξενάλη, έδειξαν ισχυρή εξάρτηση από την γεωγραφική προέλευση, υποδηλώνοντας την επίδραση των συνθηκών του περιβάλλοντος (βροχοπτώσεις, θερμοκρασία, σύσταση εδάφους) στην δραστηριότητα της ADH. Τα διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε περιοχή εξηγούνται από την διαφορετική δραστηριότητα της ADH, η οποία μετατρέπει τις C6 αλδεΰδες στις αντίστοιχες αλκοόλες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ποικιλιών για τις C5 ενώσεις, όπως η πεντανόλη, η (E)-2-πεντενάλη και η 1-πεντεν-3-όνη και η 2-πεντανόνη. (Vichi et al., 2003)

Όλα τα παραπάνω εξηγούνται σύμφωνα με τους Oueslati et al. (2018) από την εξάρτηση της ποιοτικής και ποσοτικής σύνθεσης του πτητικού κλάσματος με το επίπεδο και την δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για όλες τις βιοσυνθετικές οδούς των ενώσεων αυτών. Ναι μεν είναι γενετικά καθορισμένα, αλλά η παραγωγή των μεταβολιτών τους εξαρτάται από τον βαθμό ωριμανσης του καρπού, τον χρόνο αποθήκευσης του τελικού προϊόντος, τις συνθήκες παραγωγής του ελαιολάδου καθώς και από το κλιμα και τον τύπο του εδάφους. Ακριβώς για αυτό τον λόγο μεγάλες διαφορές στην σύνθεση των πτητικών ενώσεων δεν παρουσιάζουν μόνο ποικιλίες που καλλιεργούνται κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες, αλλά και ίδιες ποικιλίες που καλλιεργούνται σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. (Oueslati et al., 2018)

Σύμφωνα με την έρευνα των Zunin et al. (2005) σε δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων από 5 διαφορετικές περιοχές της Μεσογείου (Δυτική Λιγυρία, Απουλία, Ελλάδα, Ισπανία και Τυνησία), οι τερπενοειδείς ενώσεις του ελαιολάδου, που προέρχονται από τον μεταβολισμό των φυτών και συνδέονται με την ποικιλία της ελιάς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για τον γεωγραφικό διαχωρισμό των Ιταλικών ειδικά ελαιολάδων. Εφόσον η βιοσύνθεσή τους εξαρτάται από την παρουσία παρασίτων, επηρεάζεται άμεσα από την θερμοκρασία, την ξηρασία και γενικά τις συνθήκες του περιβάλλοντος της κάθε περιοχής. Πράγματι, τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι ενώ μεν το α-κοπαένιο και το αμουουρολένιο συνεισφέρουν στο διαχωρισμό μεταξύ των Ιταλικών δειγμάτων και των δειγμάτων από τις άλλες τρεις περιοχές (Ελλάδα, Ισπανία, Τυνησία), η συγκέντρωση του α-φαρνεσένιου είναι καθοριστική για την γεωγραφική διάκριση των δειγμάτων της Ιταλίας. (Zunin et al., 2005)



Εικόνα 39: Scores plot πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)



Εικόνα 40: Loadings plots πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)



Εικόνα 41: Scree plot πτητικών ενώσεων



Εικόνα 42: Partial contribution πτητικών ενώσεων (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)

Β.3.2.3 Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει συνδυασμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι προκειμένου να αυξηθεί η ακρίβεια στον διαχωρισμό, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια εφαρμογής της PCA με συνδυασμό των λιπαρών οξέων με τις πτητικές ενώσεις, των λιπαρών οξέων με τα ολικά πολικά φαινολικά συστατικά, συνδυασμό των πτητικών ενώσεων με τα ολικά φαινολικά συστατικά αλλά και συνδυασμό ολικών φαινολικών-λιπαρών-πτητικών. Και στις τέσσερις περιπτώσεις, οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες καλύπτουν ποσοστό μικρότερο απ' ότι χωρίς τους συνδυασμούς (44,5%, 72,5% αντί για 77,1%, 49,5% αντί για 50,4% και 43,9% αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τους Karabagias et al., οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός των φυσικοχημικών παραμέτρων σε συνδυασμό με την χημειομετρική ανάλυση δίνει τη δυνατότητα καλύτερης διαφοροποίησης των ελαιολάδων με βάση την γεωγραφική τους προέλευση, ακόμα και για κοντινές περιοχές. (Karabagias et al., 2013) Επίσης, οι Kosma et al., ταξινόμησαν τα δείγματα Κορωνέικης ποικιλίας 4 διαφορετιών περιοχών βάσει συνδυασμού των λιπαρών οξέων και των πτητικών ενώσεων με ποσοστό ταξινόμησης 94,7%. (Kosma et al., 2017) Απ' ότι φαίνεται, τα ολικά φαινολικά συστατικά δεν συνεισφέρουν καθόλου στην γεωγραφική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ολικά φαινολικά συστατικά εξαρτώνται κυρίως από την ποικιλία, την ωριμότητα του καρπού και τις συνθήκες αποθήκευσης του ελαιολάδου.

B.3.2.4 Γεωγραφικός διαχωρισμός βάσει των φασμάτων ATR-FTIR

Επιτυχής είναι και ο διαχωρισμός βάσει των φασμάτων ATR-FTIR. Οι δύο πρώτες κύριες συνιστώσες εξηγούν 75,9% της συνολικής διακύμανσης (*Εικόνα 43*), ενώ οι 3 πρώτες κύριες συνιστώσες το 84,94% της συνολικής διακύμανσης (*Εικόνα 44*). Πρόκειται δηλαδή για έναν πολύ ικανοποιητικό διαχωρισμό. Σύμφωνα με το scores plot, έχει επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δειγμάτων σε κάποιο βαθμό, αν και είναι προφανές ότι αρκετά δείγματα της μίας περιοχής ταξινομούνται στην άλλη. Οι περιοχές που συνεισφέρουν πιο πολύ στον διαχωρισμό επιλέχθηκαν με βάση τις τιμές του formatted loading matrix. Πιο συγκεκριμένα, υψηλή συνεισφορά (τιμή>0.9) έχουν για την πρώτη κύρια συνιστώσα η δόνηση τάσης εστερικών καρβονυλικών ομάδων των τριγλυκεριδίων, η δόνηση κάμψης αλειφατκών ομάδων CH₂, η δόνηση κάμψης των cis διπλών δεσμών και η δόνηση κάμψης διπλών δεσμών. Στην δεύτερη κύρια συνιστώσα συνεισφέρει η δόνηση τάσης των εστερικών ομάδων C-O, ενώ στην τρίτη η δόνηση τάσης cis διπλών δεσμών, η δόνηση τάσης αλειφατικής ομάδας CH₂ και η δόνηση τάσης αλειφατικών ομάδων CH₂ και CH₃. Στην επιτυχή διαφοροποίηση με την χρήση των φασμάτων ATR-FTIR ιταλικών δειγμάτων 3 διαφορετικών περιοχών (Emilia Romagna, Sardinia, Sicily) κατέληξαν και οι Bendini et al. (Bendini et al., 2007) Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα των Tapp et al., οι οποίοι με συνδυασμό υπέρυθρης φασματοσκοπίας και παραγοντικής ανάλυσης διαχώρισαν επιτυχώς τα δείγματα παρθένων ελαιολάδων 4 διαφορετικών χωρών (Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία, Πορτογαλία). (Tapp et al., 2003)

Τα φάσματα FTIR έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό ποικιλιών. Οι Revelou et al., κατέληξαν σε ικανοποιητικό διαχωρισμό δειγμάτων ανάμεσα σε ελληνικές ποικιλίες (Αμφίσσης, Κορωνέικη και Μεγαρείτικη με ποσοστό ταξινόμησης 96,1%) και οι Concha-Herrera et al. σε διαχωρισμό ποικιλιών από την Ισπανία (Arbequina, Borriolenc, Canetera, Farga, Hojiblanca, Picual και Serrana) με ποσοστό ταξινόμησης 100%. (Revelou et al., 2020, Concha-Herrera et al., 2009) Οι Abdallah et al., χρησιμοποιώντας την τεχνική FTIR σε συνδυασμό με χημειομετρικές τεχνικές με στόχο την διάκριση εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων από διαφορετικές Τυνησιακές ποικιλίες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εκτός από την βοτανική διαφοροποίηση, μπορεί να επιτευχθεί και ανίχνευση μειγμάτων ελαιολάδων διαφορετικών ποικιλιών. (Abdallah et al., 2016) Επίσης, οι Rohman και Che-Man χρησιμοποίησαν το FTIR για επιτυχή ανίχνευση νοθείας σε Μαλαισιανά ελαιόλαδα. (Rohman & Che-Man, 2010) Πολλά υποσχόμενη, δείχνει να είναι και η φασματοσκοπία NIR (Near Infrared-Εγγύς Υπέρυθρο) αφού παρουσιάζει υψηλή δυνατότητα ποσοτικοποίησης χημικών ενώσεων παρθένων ελαιολάδων της γεωγραφικής τους προέλευσης. (Galtier et al., 2007)

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι η μέθοδος ATR-FTIR, εκτός από εύκολη, γρήγορη και καθόλου κοστοβόρα, είναι και αποτελεσματική στην εφαρμογή της για τον γεωγραφικό διαχωρισμό των δειγμάτων ελαιολάδου, στην περίπτωσή μας στην ποικιλία Αμφίσσης.



Εικόνα 43: Scores plot φασμάτων ATR-FTIR (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)



Εικόνα 44: Loadings plots φασμάτων ATR-FTIR (3 πρώτες κύριες συνιστώσες)



Εικόνα 45: Scree plot φασμάτων ATR-FTIR

Β.4. Συμπέρασμα

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των λιπαρών οξέων, των πτητικών ενώσεων, των φαινολικών συστατικών και των φασμάτων FTIR 38 δειγμάτων παρθένων ελαιολάδων ποικιλίας Αμφίσσης από τις περιοχές της Φθιώτιδας και της Μαγνησίας. Με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων έγινε προσπάθεια της γεωγραφικής διαφοροποίησης των δειγμάτων βάσει των λιπαρών οξέων, των πτητικών ενώσεων και τον φασμάτων FTIR.

Τα υψηλά επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (76,72 ± 1,82% για την Φωκίδα και 76,17 ± 1,19% για την Μαγνησία) καθώς και η υψηλή αναλογία μονοακόρεστων/πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA/PUFA) (8,10 ± 0,46% για την Φωκίδα και 7,84 ± 0,65% για την Μαγνησία) υποδεικνύουν υψηλή οξειδωτική σταθερότητα των δειγμάτων αυτης της ποικιλίας. Υψηλή παρουσιάζεται η συγκέντωση των αλδεϋδών στο πτητικό προφίλ και των δύο περιοχών. Πρωταγωνιστεί η (*E*)-2-εξενάλη (84,49 ± 67,47 mg/kg Φωκίδα, 194,44 ± 142,25 mg/kg Μαγνησία) , η ένωση που παρέχει την χαρακτηριστική ''πράσινη νότα'' του ελαιολάδου. Τα ολικά πολικά φαινολικά και στις δύο περιοχές εμφανίζονται αρκετά μειωμένα σε σχέση με άλλες έρευνες, πιθανών λόγω της περιόδου συγκομιδής των δειγμάτων. Χαρακτηριστικές ενώσεις του φαινολικού κλάσματος, η ελαιασίνη, η ελαιοκανθάλη, η αγλυκόνη της ελευρωπαΐνης, η αγλυκόνη του λιγκστροσίδη (ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα της Φωκίδας). Η ελευρωπαΐνη, σημαντική ουσία του καρπού της ελιάς, δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα.

Ο προσδιορισμός των συντελεστών συσχέτισης Spearman's ρ πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τις δύο περιοχές και τελικά αποκάλυψε διαφορές και ομοιότητες που πιθανώς σχετίζονται με τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και την παραγωγή των πτητικών ενώσεων από διαφορετικές μεταβολικές οδούς. Η εφαρμογή της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA), ήταν αποτελεσματική στον γεωγραφικό προσδιορισμό των δειγμάτων με βάσει τα λιπαρά οξέα, τις πτητικές ενώσεις και τα φάσματα FTIR. Την υψηλότερη συμβολή στον διαχωρισμό είχαν τα λιπαρά οξέα εικοσαενοϊκό (20:1), παλμιτικό (16:0), αραχιδικό (20:0), παλμιτελαϊκό (16:1), βεχενικό (22:0) και το ελαϊκό (18:1), ενώ στον διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων συνέβαλαν οι αλδεΰδες πεντανάλη, εξανάλη, (E)-2-εξενάλη, επτανάλη, οκτανάλη και εννεανάλη και οι υδρογονάνθρακες 1-οκτένιο και β-οκιμένιο. Ο συνδυασμός των παραπάνω μεταβλητών και με τα ολικά πολικά φαινολικά συστατικά δεν οδήγησε σε ισχυρότερο διαχωρισμό. Επίσης, ο διαχωρισμός με βάση τα φάσματα FTIR ήταν επιτυχής, με τις τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες να εξηγούν το 84,94% της συνολικής διακύμανσης.

Λαμβάνοντας υποψη τα παραπάνω, η παρούσα ερευνητική μελέτη αναδεικνύει τα μοναδικά χαρακτηριστικά του ελληνικού ελαιολάδου και προωθεί την περαιτέρω έρευνα στην ποικιλία Αμφίσσης, που δεν έχει ερευνηθεί αρκετά, στο πλαίσιο της προσπάθειας διασφάλισης της αυθεντικότητας των ελληνικών ελαιολάδων. Μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων ελαιολάδου, από διαφορετικές περιόδους συγκομιδής και τοποθεσίες θα παρείχε ακόμα περισσότερες χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την διαφοροποίηση των ελαιολάδων ανάλογα με την γεωγραφική τους προέλευση.

Γ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γ.1. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γιαννακοπούλου, Ε. (2010), Επίδραση του γονότυπου, του περιβάλλοντος και του χρόνου συλλογής των δειγμάτων στη συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών στα φύλλα και τους καρπούς δύο ελληνικών ποικιλιών ελιάς (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Αθήνα.
- Γκαβίδου, Ν., Ζωγράφου, Ε., (2008), Ελαιόλαδο, χημική σύνθεση και ιδιότητες (Πτυχιακή Εργασία). Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης,Σχολή Επαγγελμάτων Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Αισθητικής- Κοσμητολογίας, Θεσσαλονίκη.
- Δούκας, Χ., Δαλιγκάρου, Μ., (2008), Το ελαιόλαδο, τα συστατικά του και οι ευεργετικές τους ιδιότητες (Πτυχιακή Εργασία). Σχολή Επαγγελμάτων Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Αισθητικής, Αθήνα.
- Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ), (2015), Κανόνες Εμπορίας και Επισήμανσης Ελαιολάδου, Διεύθυνση Αξιολόγησης και Εγκρίσεων, Αθήνα.
- Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2013), Κανονισμός (ΕΕ) αριθμ. 1308/2013, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2012), Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 29/2012, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2012), Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 1151/12, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2009), Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 182/2009, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (2006), Κανονισμός (ΕΕ) αριθμ. 1898/2006, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (1992), Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθμ. 510/2006, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (1992), Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθμ. 2081/92, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (1992), Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθμ. 2082/92, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή, (1991), Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθμ. 2568/91, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Καραγιαννοπούλου, Π., Σ., (2019), Ελαιοκομία, Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου, Καλαμάτα.

- Κασιμάτη, Α., (2020), Επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης στην αντιοξειδωτική ικανότητα, το πολικό φαινολικό κλάσμα και τα πτητικά συστατικά επιτραπέζιας ελιάς της ποικιλίας Καλαμών (Πτυχιακή Μελέτη). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστηριο Αναλυτικής Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, Αθήνα.
- Κουμπούρης, Γ., (2018), Παραγωγή ποιοτικού ελαιολάδου-πρακτικές συμβουλές για τη συγκομιδή της ελιάς, Δήμητρα, 23, 14-17.
- Κυριτσάκης, Κ., (2018), Βελτίωση της ποιότητας του ελαιολάδου και παραγωγλη νέων προϊόντων με τον εμπλουτισμό του με δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης (Διδακτορική Διατριβή). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Γεωπονική Σχολή, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Θεσσαλονίκη.
- Κώτσιου, Κ., (2015), Μεταβολές των συστατικών του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση και το μαγείρεμα (Διδακτορική Διατριβή). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα.
- Λιόντου, Ν., Π., (2020), Μελέτη των πτητικών συστατικών ελαιολάδου, ποικιλίας Κορωνέικης με SPME-GC-MS και γεωγραφική διαφοροποίηση με χρήση χημειομετρικών μεθόδων (Μεταπτυχιακή Μελέτη). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Αθήνα.

- Μανωλόπουλος, Φ., (2018), Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων και αντιοξειδωτικής ικανότητας σε δείγματα αρωματισμένου ελαιολάδου (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία). Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Θεσσαλονίκη.
- Μηνιώτη, Α.Ι., (2009), Ανάπτυξη νέων μεθόδων προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ενεργότητας και εφαρμογή στο ελαιόλαδο (Διδακτορική Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Εργαστήριο Χημείας, Αθήνα.
- Μητσόπουλος, Γ., (2012), Ταυτοποίηση, ποσοτικός προσδιορισμός και εποχικές μεταβολές φαινολικών ενώσεων μεταξύ και εντός ποικιλιών ελιάς και μοριακή ταυτοποίηση- ιχνηλασία των προϊόντων ελιάς (Διδακτορική Διατριβή). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Αθήνα.
- Παπαδάκης, Γ.Α., Βαγγέλογλου, Ε., Λίτου, Κ., Το λάδι στον κύκλο της ζωής και ο κύκλος της ζωής του ελαιολάδου, Πολυτεχνείο Κρήτης, INFOIL LIFE08 INF/GR/581
- Παπαδόπουλος, Γ., Κ., (1993), Μελέτη των πολικών φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου-Απομόνωση, προσδιορισμός, αντιοξειδωτική δράση και τεχνολογική σημασία (Διδακτορική Διατριβή). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Θεσσαλονίκη.
- Παρθενίου, Ε., (2006), Ο ρόλος της ελιάς και του λαδιού στην ιστορία του τόπου και η πολύπλευρη σημασία τους στην οικονομία, τη διατροφή και την υγιεινή (Πτυχιακή Εργασία). Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Πρόγραμμα Σπουδών Επιλογής (ΠΣΕ), Καλαμάτα.
- Πασχαλοπούλου, Ε., (2008), Το ελαιόλαδο. Επιστημονικές μελέτες και έρευνες για τη δράση του (Πτυχιακή Εργασία). Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Σχολή Επαγγελμάτων Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Αισθητικής- Κοσμητολογίας, Θεσσαλονίκη.
- Χαλαστάρα, Σ., (2008), Επίδραση του βαθμού ωρίμανσης των καρπών ελιάς της ποικιλίας χονδρολιά Χαλκιδικής στην περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πτητικά συστατικά (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία). Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Θεσσαλονίκη.

Γ.2. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Abdallah, M., Vergara-Barber, Lerma-Garcıa, M.J., Manuel Herrero-Martınez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Guerfel, M., (2016), Cultivar discrimination and prediction of mixtures of Tunisian extra virgin olive oils by FTIR, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 118, 1236–1242. DOI:http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201500041
- Angerosa, F., M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto and G. F. Montedoro. (2004), Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. J. Chromatogr. A. 1054: 17-31
- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Basti, C., Vito, R., (1998), Biogeneration of Volatile Compounds in Virgin Olive Oil: Their Evolution in Relation to Malaxation Time, J. Agric. Food Chem., 46, 2940-2944
- Annunziata, F., Contente, M., Pinna, C., Tamborini., L., (2021), Biocatalyzed Flow Oxidation of Tyrosol to Hydroxytyrosol and Efficient Production of Their Acetate Esters, Antioxidants, 10, 1142, DOI:https://doi.org/10.3390/antiox10071142
- Bajoub,A., Pacchiarotta, T., Hurtado-Fernández, E., Olmo-García, L., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., Mayboroda, O.A., Carrasco-Pancorbo, A., (2016), Comparing two metabolic profiling approaches (liquidchromatography and gas chromatography coupled to massspectrometry) for extra-virgin olive oil phenolic compounds analysis:A botanical classification perspective, Journal of Chromatography A, 1428, 267–279. DOI:http:// doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.059
- Bakhouche, A., Lozano-Sanchez, J., Ballus, C.A., Martinez-Garcia, M., Velasco, M.G., Govantew, A.O., Gallina-Toschi, T., Fernandez-Gutierez, A., Segura-Carretero, A., (2014), Monitoring the moisture reduction and status of bioactive compounds in extra-virgin olive oil over the industrial filtration process, Food Control, 40, 292-299. DOI:<u>https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.012</u>
- Bendini, A., Cerretani, L., Di Virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G., (2007), Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils, Journal of Food Quality, 30, 424-437.
- Boronat, A., Martínez-Huélamo, M., Cobos, A., de la Torre, R., (2018), Wine and Olive Oil Phenolic Compounds Interaction in Humans, Diseases, 6, 76. DOI:http://dx.doi.org/10.3390/diseases6030076

- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Garrido, A., (2001), Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin , Olive Oil, J. Agric. Food Chem., 49, 5609-5614. DOI: 0.1021/jf0107860
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J.J., Garrido, A., (1999), Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils, J. Agric. Food Chem., 47, 3535-3540. DOI:10.1021/jf9900090
- Bubola, K.B., Koprivnjak, O., Sladonja, B., Lukic, I., (2012), Volatile Compounds and Sensory Profiles of Monovarietal Virgin Olive Oil from Buza, Crna and Rosinjola Cultivars in Istria (Croatia), Food Technol. Biotechnol. 50 (2) 192–198.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., Lagana, A., (2014), Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry, Food Chemistry 158 , 392–400. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.130
- Chen, L.Y., Cheng, C.W., Liang, J.Y., (2015), Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols, Food Chemistry 170, 10–15, DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038

Codex Alimentarius, (1981). Standar for olive oils and olive pomace oils. Codex Stan 33-1981.

- Concha-Herrera, V., Lerma-Garcia, M.J., Herrero-Martinez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., (2009), Prediction of the Genetic Variety of Extra Virgin Olive Oils Produced at La Comunitat Valenciana, Spain, by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, J. Agric. Food Chem., 57, 9985–9989, DOI:10.1021/jf901730p
- D'Imperio, M., Dugo, G., Alfa, M., Mannina, L., Segre, A.L., (2007), Statistical analysis on Sicilian olive oils, Food Chemistry 102, 956–965. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.03.003
- Diraman, H., Saygi, H., Hisil, Y., (2010), Relationship Between Geographical Origin and Fatty Acid Composition of Turkish Virgin Olive Oils for Two Harvest Years, J Am Oil Chem Soc, 87:781–789. DOI:10.1007/s11746-010-1557-2

- Esti., M., Contini, M., Moneta, E., Sinesio, F., (2009, Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage, Food Chemistry 113, 1095–1100, DOI:10.1016/j.foodchem.2008.08.076
- Galtier, O., Dupuy, N., Le Dr´eau, Y., Ollivier, D., Pinatel, C., Kister, J., Artaud, (2007), Geographic origins and compositions of virgin olive oils determinated by chemometric analysis of NIR spectra, Analytica Chimica Acta 595, 136–144. DOI:10.1016/j.aca.2007.02.033
- Genovese, A., Caporaso, N., Sacchi, R., (2021), Flavor Chemistry of Virgin Olive Oil: An Overview, Applied Sciences, 11, 1639. DOI: <u>https://doi.org/10.3390/app11041639</u>
- Gomez da Silva, M.D.R., Costa Freitas, A.M., Cabrita, M.J.B., Garcia, R., (2012), Olive Oil Composition: Volatile Compounds, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, Chapter 12. DOI:<u>10.5772/28512</u>
- Gutierez, F., Fernandez, J.L., (2002), Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond Which the Oil Is No Longer of "Extra" Quality, J. Agric. Food Chem, 50, 571-577. DOI:0.1021/jf0102158
- Gurdeniz, G., Ozen, B., Tokatli, F., (2008), ClassiWcation of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy, Eur Food Res Technol, 227:1275–1281. DOI 10.1007/s00217-008-0845-7

Hinshaw, J.V., (2005), The Flame Ionization Detector, LCGC North America, 23, 122-1272.

International Olive Council (IOC), (2012), Policies, Greece

Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Hassine, K.B., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammami, M., (2010), Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils, Food Chemistry 119, 220–225, DOI:10.1016/j.foodchem.2009.06.012
Kaiser, H.F., (1974), An index of factorial simplicity, Psychometrika, 39, No.1, 31-36.

- Kalogiouri, N.P., Aalizadeh, R., Thomaidis, N.S., (2018), Application of an advanced and wide scope non-target screening workflow with LC-ESI-QTOF-MS and chemometrics for the classification of the Greek olive oil varieties, Food Chemistry 256, 53–61. DOI:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.101
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood Jr, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., (2017), Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review, Food Chemistry 100, 273–286. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.09.059
- Kano, S., Komada, H., Yonekura, L., Sato, A., Nishiwaki, H., Tamura, H., (2015), Absorption, Metabolism, and Excretion by Freely Moving Rats of 3,4-DHPEA-EDA and Related Polyphenols from Olive Fruits (*Olea europaea*), Journal of Nutrition and Metabolism. DOI: http://dx.doi.org/10.1155/2016/9104208
- Karabagias, I., Michos, Ch., Badeka, A., Kontakos, S., Stratis, I., Kontominas, M.G., (2013), Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses, Food Research International, 54, 1950–1958. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.023
- Kesen, S., Kelebek, H., Selli, S., (2013), Characterization of the Volatile, Phenolic and Antioxidant Properties of Monovarietal Olive Oil Obtained from cv. Halhali, J Am Oil Chem Soc, 90:1685–1696. DOI:10.1007/s11746-013-2327-8
- Koseoglu, O., Sevim, D., Ulas, M., Ozdemir, D., (2018), Determination of Bitterness Index (K₂₂₅), and Total Fenol Contetn of Olive Oils Obtained with Different Regions, Varieties and Processing Systems., Ege Univ. Ziraat Fak. Derg., 55(2), 171-178. DOI:10.20289/zfdergi.340262
- Kosma, I., Vatavali, K., Kontakos, S., Kontominas, M., Kiritsakis, A., Badeka, A., (2017), Geographical Differentiation of Greek Extra Virgin Olive Oil from Late-Harvested Koroneiki Cultivar Fruits, Journal of the American Oil Chemist's Society. DOI:10.1007/s11746-017-3036-5
- ^aKosma, I., Vavoura, M., Kontakos, S., Karabagias, I., Kontominas, M., Kiritsakis, A., Badeka, A., (2016), Characterization and Classification of Extra Virgin Olive Oil from Five Less Well-Known Greek Olive Cultivars, J Am Oil Chem Soc, 93, 837-848. DOI:10.1007/s11746-016-2822-9

- ^bKosma, I., Badeka, A., Vatavali, K., Kontakos, S., Kontominas, M., (2016), Differentiation of Greek extra virgin olive oils according to cultivar based on volatile compound analysis and fatty acid composition, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 118, 849–86. DOI:10.1002/ejlt.201500293
- Kotsiou, K., Tasioula-Margari, M., (2015), Changes occurring in the volatile composition of Greek virgin olive oils during storage: Oil variety influences stability, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 117, 514–522. DOI:10.1002/ejlt.201400231
- Krieger, S., Schneider, S., Quality Analysis of Extra Virgin Olive Oils Part 7/ Nutritive Benefits Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil Using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution, Agilent Technologies, Inc.
- Kritikou, E., Kalogiouri, N.P., Kostakis, M., Kanakis, D.C., Martakos, I., Lazarou, C., Pentogennis, M., Thomaidis, N.S., (2021), Geographical Characterization of Olive Oils from the North Aegean Region Based on the Analysis of Biophenols with UHPLC-QTOF-MS, Foods, 10, 2102. DOI:https://doi.org/10.3390/foods10092102
- Kritikou, E., Kalogiouri, N.P., Kolyvira, L., Thomaidis, N.S., (2020), Target and Suspect HRMS Metabolomics for the Determination of Functional Ingredients in 13 Varieties of Olive Leaves and Drupes from Greece, Molecules, 25, 4889. DOI:10.3390/molecules25214889
- Kritioti, A., Menexes, G., Drouza, C., (2018), Chemometric characterization of virgin olive oils of the two major Cypriot cultivars based on their fatty acid composition. DOI: https://doi.org/10.1021/jf0529181
- Lavelli V., Fregapane, G., Desamparados, M.S., (2006), Effect of Storage on Secoiridoid and Tocopherol Contents and Antioxidant Activity of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils, J. Agric. Food Chem., 54, 3002-3007, DOI:10.1021/jf0529181
- Longobardi, F., Ventrella, A., Casiello, G., Sacco, D., Tasioula-Margari, M., Kiritsakis, A.K., Kontominas, M.G., (2012), Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis, Food Chemistry 133, 169–175. DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.130

- Louadj, L., Giuffre, A.M., (2010), Analytical characteristics of olive oil produced with three different processes in Algeria, La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse-Vol. LXXXVII.
- Ma, C., Dunshea, F.R., Suleria, H.A.R., (2019), LC-ESI-QTOF/MS Characterization of Phenolic Compounds in Palm Fruits (Jelly and Fishtail Palm) and Their Potential Antioxidant Activities, Antioxidants, 8, 483. DOI:http://dx.doi.org/10.3390/antiox8100483
- Mendez, A.I., Falque, E., (2007), EVect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil, Food Control 18, 521–529. DOI:10.1016/j.foodcont.2005.12.012
- Mohan, S.V., Rohit, M.V., Subllash, G.V., Chandra, R., Devi, M.P., Butti, S.K., Rajesh, K., (2019), Biofuels from Algae (Second Edition), 12, 287-323. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00012-3</u>
- Muzammil, S., Kanwal, H., Shahzad, T., Hussain, S., Nadeem, H.U., Rasul, I., Imran, M., Afzal, M., Iftikhar, K., Siddique, M.H., (2021), Olive oil, Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science, 17-. DOI:<u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821886-0.00009-9</u>
- Ogras, S.S., Kaban, G., Kaya, M.,(2018), Volatile compounds of olive oils from different geographic regions in Turkey, International Journal of Food Properties, Vol. 21, NO. 1, 1833–1843, DOI:https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1508159
- Olivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., Guerere, M., (2006), Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions and chemometrics, Food Chemistry 97, 382–393. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.024
- Oueslati, I., Haddada, F.M., Manai, H., Zarrouk, W., Taamalli, W., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Zarrouk, M., (2008), Characterization of Volatiles in Virgin Olive Oil Produced in the Tunisian Area of Tataouine, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7992–7998. DOI: 10.1021/jf801022c
- Papanikolaou, C., Melliou, E., Magiatis, P., (2019) Olive Oil Phenols, Functional Food. DOI:<u>http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81394</u>

Perez, A.G., Leon, L., Pascual, M., Romero-Segura, C., Sanchez-Ortiz, A., de la

- Rosa, R., Sanz, C, (2014), Variability of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in a Segregating Progeny from a Single Cross in Olea europaea L. and Sensory and Nutritional Quality Implications, PlosOne, Volume 9, Issue 3.
- Peršuric, A.S.I., Damijanic, A.T., (2021), Connections between Healthy Behaviour, Perception of Olive Oil Health Benefits, and Olive Oil Consumption Motives, Sustainability, 13, 7630. DOI:https://doi.org/10.3390/su13147630
- Raja, P.M.V., Barron, A.R., (2021), ESI-QTOF-MS Coupled to HPLC and its Application for Food Safety, LibreTexts, <u>https://chem.libretexts.org/@go/page/55893?pdf</u>
- Ranalli, G., G. de Mattia, M.L. Ferrante, and L. Giansante, (2017), Incidence of Olive Cultivation Area on the Analytical Characteristics of the Oil, Note 1, Riv. Ital. Sostanze Grasse 74:501–508
- Revelou, P.K., Xagoraris, M., Theodorikou, D.V., Xera, E., Kanakis, D.C., Papadopoulos, G.K., Pappas, C.S., TarantiliS, P.A., (2021), Estimation of Geographical Origin of Amfissis Cultivar Olive Oil Based on GC-FID/MS and Chemometrics, Biomed J Sci & Tech Res., 37. DOI:10.26717/BJSTR.2021.37.005998
- ^cRevelou, P.K., Xagoraris, M., Alexandropoulou, A., Kanakis, C.D., Papadopoulos, G.K., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Chemometric Study of Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Four Widespread Greek Cultivars, Molecules, 26, 415, DOI:https://doi.org/10.3390/molecules26144151
- Revelou, P.K., Pappa, C., Kakouri, E., Kanakis, C.D., Papadopoulos, G.K., Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., (2020), Discrimination of botanical origin of olive oil from selected Greek cultivars by SPME-GC-MS and ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics, J Sci Food Agric, DOI:10.1002/jsfa.10932
- Rohman, A., Gupitasari, I., Purwanto, Triyana, K., Rosman, A.S., Ahmad, S.A.S., Yusof, F.M., (2014), Quantification of Lard in the Mixture with Olive Oil in Cream Cosmetics Based on FTIR Spectra and Chemometrics for Halal Authentication, Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering) 69:1), 113–11.
- Rohman, A., Che Man, Y.B., (2010), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, Food Research International 43, 886–892. DOI:10.1016/j.foodres.2009.12.006

- Squeo, G., Difonzo, G., Paradiso, V.M., Summo, C., Pasqualone, A., Caponio, F., (2019), Fatty acid ethyl esters in virgin olive oils: A correlation study with the volatile profile, Emirates Journal of Food and Agriculture, 31(9): 735-740. DOI:10.9755/ejfa.2019.v31.i9.2012
- Stefanoudaki, E., Kotsifaki, F., Koutsaftakis, A., (1999), Classification of Virgin Olive Oils of the Two Major Cretan Cultivars Based on Their Fatty Acid Composition, JAOCS 76, 623–626.
- Tanilgan, K., Ozcan, M.M., Unver, A., (2007), Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (Olea europea L.), varieties and their oils, Gracas y Aceites, 58 (2), 142-147
- Tapp, H., Defernez, M., Kemsley, E.K., (2003), FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis Can Distinguish the Geographic Origin of Extra Virgin Olive Oils, J. Agric. Food Chem., 51, 6110-6115. DOI: 10.1021/jf030232s
- Tuck, K.,L., Hayball, P.J., (2002), Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects, Journal of Nutritional Biochemistry, 13,636–644. DOI:S0955-2863(02)00229-2
- Uncu, O., Ozen, B., Tokatli, F., (2019), Use of FTIR and UV–visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils, Talanta 201, 65–73. DOI:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.116
- Vanak, Z.P., Ghavami, M., Ezzatpanah, H., Arab, J., Safafar, H., Ghasemi, J.B., (2009), Evaluation of Authenticity of Iranian Olive Oil by Fatty Acid and Triacylglycerol Profiles, Am Oil Chem Soc, 86:827– 833. DOI:10.1007/s11746-009-1419-y
- Vaz-Freire, L., Gouveia, J.M.J., Freitas, A.M.C., (2008), Analytical characteristics of olive oils produced by two different extraction techniques, in the Portuguese olive variety 'Galega Vulgar', Grasas y aceites, 59 (3), 260-266.
- Veneziani, G., Eposto, S., Taticchi, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Sordini, B., Servili, M., (2018), Characterization of phenolic and volatile composition of extra virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste, LWT - Food Science and Technology 87, 523e528. DOI:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.034

- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E., (2003), Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Characterization of Virgin Olive Oils from Two Distinct Geographical Areas of Northern Italy, J. Agric. Food Chem., 51, 6572-6577. DOI:10.1021/jf030269c
- Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., Andrade, P.B., (2005), Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (Olea europaea L.): Influences of cultivar and geographical origin, Food Chemistry 89, 561–568, DOI:10.1016/j.foodchem.2004.03.012
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., Tegou, E., (2006), Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils, Analytica Chimica Acta 573–574, 459–465. DOI:10.1016/j.aca.2006.05.034
- Zarrouk, W., Haddada, F., M., Baccouri, B., Oueslati, I., Taamalli, W., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., Daoud, D., Zarrouk, M., (2007), Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia, European Journal of Lipid Science and Technology, *110*, 81–88. DOI:<u>https://doi.org/10.1002/ejlt.200700085</u>
- Zunin, P., Boggia, R., Salvadeo, P., Evangelisti, F., (2005), Geographical traceability of West Liguria extravirgin olive oils by the analysis of volatile terpenoid hydrocarbons, Journal of Chromatography A, 1089, 243– 249. DOI:10.1016/j.chroma.2005.07.005
- Zunin, P., R. Boggia, S. Lanteri, R. Leardi, R. De Andreis and F. Evangelisti. (2004), Direct thermal extraction and gas chromatographic mass spectrometric determination of volatile compounds of extra-virgin olive oils. J. Chromatogr. A. 1023: 271-276.
- Zwick, W.R., Velicer, W.F., (1986), Comparison of Five Rules for Determining the Number of Components to Retain, Psychological Bulletin, Vol. 99, No. 3, 452-442.

Γ.3. Διαδικτυακές Αναφορές

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, «http://www.minagric.gr/index.php/el/»

Σύνδεσμος, Ελληνικών Βιομηχανιών Τυποποιήσεως Ελαιολάδου (ΣΕΒΙΤΕΛ), «https://sevitel.gr/»

Μπακέας, (2008), Αεριοχρωματογραφία (Gass Chromatography),

https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM165/%CE%91%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE %BF%CF%87%CF%81%CF%89%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%BF%CE%B3%CF%81%CE%B1 %CF%86%CE%AF%CE%B1_2009.pdf

European Commision, Olive oil in the EU, Factsheet: EU olive oil. « <u>https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_en»</u>

MyOlivePlant, https://myoliveplant.gr/elaivnas/poikilies-elias/

- Peak Scientific, (2019), How does a Flame Ionization Detector work?, https://www.peakscientific.com/discover/news/how-does-an-fid-work/
- Shimadzu (Science in Science), FTIR Accessories: Attenuated Total Reflectance (ATR), <u>https://www.ssi.shimadzu.com/products/ftir-spectrophotometers/ftir-accessories-attenuated-total-reflectance-atr.html</u>
- Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA), <u>https://courses.chemeng.ntua.gr/download/2110</u>
Δ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Δ.1. Χρωματογραφήματα πτητικών ενώσεων

Δ.1.1. Φωκίδα



Εικόνα 46: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-179



Εικόνα 47: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-180



Εικόνα 48: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-181



Εικόνα 49: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-219



Εικόνα 50: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-223







Εικόνα 52: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-225



Εικόνα 53: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-226



Εικόνα 54: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-227



Εικόνα 55: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-228



Εικόνα 56: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-229



Εικόνα 57: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-230



Εικόνα 58: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΦΩΚ-2019-231









Εικόνα 60: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-MAΓ-2018-147



Εικόνα 61: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-MAΓ-2019-120



Εικόνα 62: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-121



Εικόνα 63: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-134



Εικόνα 64: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-137



Εικόνα 65: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-138



Εικόνα 66: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-MAΓ-2019-139



Εικόνα 67: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-140



Εικόνα 68: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-141



Εικόνα 69: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-142



Εικόνα 70: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-143



Εικόνα 71: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-144



Εικόνα 72: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-145



Εικόνα 73: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-136



Εικόνα 74: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος AMF-MAΓ-2019-203



Εικόνα 75: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-242



Εικόνα 76: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-243



Εικόνα 77: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-244



Εικόνα 78: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-245







Εικόνα 80: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-247



Εικόνα 81: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-248



Εικόνα 82: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-250



Εικόνα 83: Αεριοχρωματογράφημα των πτητικών συστατικών του δείγματος ΑΜΕ-ΜΑΓ-2019-251

Δ.2. Φάσματα FTIR

Δ.2.1. Φωκίδα



Εικόνα 85: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-180







Εικόνα 87: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-219







Εικόνα 89: Φάσμα ΑΤR-FTIR του δείγματος ΑΜF-ΦΩΚ-2019-224



Εικόνα 90: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-225



Εικόνα 91: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-226



Εικόνα 92: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-227



Εικόνα 93: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-228



Εικόνα 94: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-229



Εικόνα 95: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-ΦΩΚ-2019-230





Δ.2.1. Μαγνησία











Εικόνα 99: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-120







Εικόνα 101: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-134







Εικόνα 103: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-138







Εικόνα 105: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-140



Εικόνα 107: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-142



Εικόνα 108: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-143



Εικόνα 109: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-144







Εικόνα 111: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-136



Εικόνα 112: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-203



Εικόνα 113: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-242



Εικόνα 114: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-243



Εικόνα 115: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-244







Εικόνα 117: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-246






Εικόνα 119: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-248



Εικόνα 120: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-250



Εικόνα 121: Φάσμα ATR-FTIR του δείγματος AMF-MAΓ-2019-251