

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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών



Όλγα Ν. Ανεστίδου

Επιβλέπων καθηγητής:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών

Determination of volatile components in olive oils of the Koroneiki and Kolovi varieties by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography – mass spectrometry

Όλγα Ν. Ανεστίδου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Καψοκεφάλου Μαρία, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Γαρδέλη Χρυσσαυγή, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Προσδιορισμός των πτητικών συστατικών σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών

*ΓΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων*

Περίληψη

Η ανάγκη για τον έλεγχο της ποιότητας και της αυθεντικότητας του παρθένου ελαιολάδου μέσω των πτητικών συστατικών του, έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για την εφαρμογή αναλυτικών τεχνικών για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών αυτών.

Ανάμεσα στις κύριες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αυθεντικότητας της ποικιλίας και της γεωγραφικής του προέλευσης του ελαιολάδου, βρίσκεται η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (SPME/GC-MS), για την απομόνωση και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων πλήθους ελληνικών ποικιλιών ελαιολάδου.

Για το σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης συλλέχθηκαν 69 δείγματα, προερχόμενα από καρπούς των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή, τα οποία παράχθηκαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων που θα διαχωρίσουν τα ελαιόλαδα με βάση τη γεωγραφική προέλευσή τους ήταν η SPME-GC-MS. Για τη διερεύνηση και τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων.

Ο αριθμός των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν ανήλθε στις 97 και κατηγοριοποιούνται σε αλκοόλες, αιθέρες, εστέρες, κετόνες, αλδεΐδες, οξέα, υδρογονάνθρακες, τερπενοειδή και άλλες. Τα αποτελέσματα των πολυμεταβλητών αναλύσεων έδωσαν ενθαρρυντικές ενδείξεις πως τα ελαιόλαδα της ποικιλίας Κορωνέικης από την Πελοπόννησο και την Κρήτη μπόρεσαν να διαχωριστούν με βάση το πτητικό προφίλ τους, τόσο στις ευρύτερες γεωγραφικές ζώνες (Πελοπόννησος-Κρήτη) όσο και στις υποπεριοχές της ίδιας γεωγραφικής ζώνης (υποπεριοχές Πελοποννήσου και Κρήτης). Ενώσεις βιοδείκτες των διαχωρισμών που παρατηρήθηκαν αποτέλεσαν κυρίως οι C6 αλδεΐδες όπως η (E)-2-εξενάλη, η εξανάλη και η (Z)-3-εξενάλη αλλά και άλλες όπως ο αιθανοϊκός εξυλεστέρας, το 4,8-διμεθυλο-1,7-εννεαδιένιο, η (E,E)-2,4-εξαδιενάλη και το εξανοϊκό οξύ, ενώσεις που ο ρόλος τους αναφέρεται εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία.

Επιστημονική περιοχή: Ελαιόλαδο

Λέξεις κλειδιά: Ελαιόλαδο, πτητικά συστατικά, μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, αέρια χρωματογραφία

Determination of volatile components in olive oils of the Koroneiki and Kolovi varieties by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography – mass spectrometry

*MSc Food, Nutrition & Health
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Chemistry & Analysis*

Abstract

The need to control the quality and authenticity of virgin olive oil through its volatile components has increased the interest in applying analytical techniques to identify and quantify these components. Among the main analytical techniques used to control the authenticity of the variety and geographic origin of the olive oil, there is the solid phase microcontroller in combination with gas chromatography and mass spectrometry (SPME/GC-MS), to isolate and identify volatile compounds from plurality of Greek varieties of olive oil. For the purpose of this postgraduate study, 69 samples were collected from the varieties Koroneiki and Kolovi fruits, which were produced in various regions of Greece. The method used to isolate and identify the volatile compounds to separate olive oil based on their geographical origin was SPME/GC-MS. In order to investigate and graphically depict the results, a multivariate data analysis was performed. The number of compounds identified amounted to 97 and categorized in alcohols, ethers, esters, ketones, aldehydes, acids, hydrocarbons, terpenoids and others. The results of the multivariate analysis gave encouraging indications that the olive oils of the Koroneiki variety from the Peloponnese and Crete were able to be separated based on their volatile profile, both in the wider geographic areas (Peloponnese - Crete) and in the sub-regions of the same geographical zones (sub-regions of Peloponnese and Crete). Compounds biojectors of the separations observed were mainly the C6 aldehydes such as (E) – 2 hexanal, hexanal, (Z)-3-hexenal and others such as ethyl acetate, 4,8-dimethyl-1,7-nonadiene, (E,E)-2,4-hexadienal and hexanoic acid, compounds that their role refers extensively in the international literature.

Scientific area: Olive oil

Keywords: Olive oil, volatile compounds, solid-phase microextraction, gas chromatography

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου μελέτης, κ.Αθανάσιο Μαλλούχο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, καθώς και για τη βοήθειά και την καθοδήγησή που μου παρείχε στον πειραματικό σχεδιασμό, την υλοποίηση και συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα Χρυσαιγή Γαρδέλη και κα Μαρία Καψοκεφάλου, που με χαρά δέχτηκαν να συμμετέχουν στην επιτροπή αξιολόγησης της μελέτης μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους μου, ευχαριστώντας τους για την αδιάκοπη στήριξη τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους γονείς μου και τον αδελφό μου, στους οποίους και αφιερώνω την παρούσα εργασία, για την αμέριστη στήριξη που μου παρείχαν αδιάκοπα κατά τη διάρκεια της φοιτητικής μου ζωής και την συνεχή τους ενθάρρυνση να προσπαθώ για το καλύτερο.

Ανεστίδου Όλγα

Με την άδειά μου, η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ίδρυμα και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Ευχαριστίες	5
Πίνακας Περιεχομένων	6
Συνοπτομογραφίες	7
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	8
1.1 Η ελιά	9
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση και ιστορική προέλευση	9
1.1.2 Ποικιλίες ελιάς.....	9
1.2 Ελαιόλαδο	10
1.3 Χημική σύσταση ελαιολάδου	11
1.3.1 Πτητικά συστατικά ελαιολάδου	12
1.4 Πτητικά συστατικά και αυθεντικότητα ελαιολάδου.....	17
1.5 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....	19
1.6 Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών	20
Κεφάλαιο 2: Σκοπός.....	21
Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι	23
3.1 Δειγματοληψία.....	24
3.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	26
3.3 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών	28
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση	30
4.1 Επισκόπηση της πορείας ανάλυσης των δεδομένων	31
4.2 Πρώτη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου βάσει γεωγραφικής προέλευσης.	35
4.3 Δεύτερη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου της Πελοποννήσου βάσει υποπεριοχής	39
4.4 Τρίτη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου της Κρήτης βάσει υποπεριοχής	43
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα	47
5.1 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές	48
Βιβλιογραφία	49

Συντομογραφίες

SPME: Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

GC/MS: αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

LOX: λιποξυγενάση

ΠΓΕ: Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη

VOO: Παρθένο ελαιόλαδο (Virgin Olive Oil)

PLS-DA: Διακριτική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

PCA: Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis)

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Η ελιά

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση και ιστορική προέλευση

Η ελιά (*Olea europaea*, Oleaceae) είναι μια από τις παλαιότερες καλλιέργειες στον κόσμο και αποτελεί παραδοσιακά σύμβολο αφθονίας, δόξας και ειρήνης (Kosma, Vatavali et al. 2017)(**Εικόνα 1**). Πρόκειται για ένα μικρό αειθαλές δένδρο με άκαμπτα κλάδια και κορμό χρώματος γκρι. Τα φύλλα στους βλαστούς βρίσκονται απέναντι και είναι λογχοειδή (Khan, Ranchal et al. 2007). Στην χώρα μας η καλλιέργειά της γίνεται σε πολλές περιοχές, ακόμα και σε εδάφη άγονα, όπως τα πετρώδη ή σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα αλατότητας, με ικανοποιητική στράγγιση. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι οι ήπιες κλιματικές συνθήκες με υγρούς αλλά όχι ψυχρούς χειμώνες και ζεστά ξηρά καλοκαίρια. Ο καρπός της, το έλαιό του και τα φύλλα της ελιάς έχουν πλούσια ιστορία διατροφικής, φαρμακευτικής και τελετουργικής χρήσης. Πρόκειται για μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στη λεκάνη της Μεσογείου, η οποία και παράγει το



98% του παγκόσμιου συνόλου, προσδίδοντας σημαντικά οικονομικά αλλά και διαιτητικά οφέλη για τους ανθρώπους (El and Karakaya 2009, Özcan and Matthäus 2017).

Εικόνα 1: Ελαιόδενδρο (*Olea europaea*, Oleaceae). Πηγή: <https://www.researchgate.net>.

1.1.2 Ποικιλίες ελιάς

Υπάρχουν τουλάχιστον 24 ποικιλίες ελαιολάδου στην Ελλάδα, με πιο γνωστή την ποικιλία Κορωνέικη, που απαντάται κυρίως στις περιοχές της Πελοποννήσου και της Κρήτης (Liouri, Sampsonidis et al. 2022). Εκτός από αυτή, άλλες γνωστές ποικιλίες αποτελούν η Κολοβή, η Αμφίσσης ή Κονσερβολιά και η Μεγαρίτικη (Revelou, Pappa et al. 2021). Οι ποικιλίες του ελαιολάδου συνδέονται με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και περιοχές και κατά συνέπεια χαρακτηρίζονται από διαφορετικά χημικά προφίλ, που τελικά αποτυπώνεται στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Messai, Farman et al. 2016). Η παραγωγή μονοποικιλιακών ελαιολάδων έχει αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό τον τελευταίο καιρό, καθώς η ποιότητα ενός ελαιολάδου εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την ποικιλία από την οποία προέρχεται (Skiada, Tsarouhas et al. 2020). Παρά το γεγονός ότι οι ποικιλίες μονοκαλλιέργειας είναι πολλές, με πιο κοινή ποικιλία ελιάς της Κορωνέικη, η πλειοψηφία των άλλων ποικιλιών παραμένουν

ανεπαρκώς διερευνημένες (Skiada, Tsarouhas et al. 2020). Παρόλο που η καλλιέργεια της ελιάς είναι πολύ διαδεδομένη στην κεντρική Ελλάδα, σχεδόν το 40% της ελαιοπαραγωγής συγκεντρώνεται στην Πελοπόννησο.

1.1.2.1 Κορωνέικη

Η ποικιλία Κορωνέικη είναι η πιο γνωστή και συστηματικά καλλιεργούμενη ποικιλία, το όνομα της οποίας προέρχεται από την Κορώνη, περιοχή νοτιοανατολικά της Μεσσηνίας στην Πελοπόννησο (Skiada, Tsarouhas et al. 2020). Η Κορωνέικη (*Olea europaea* var. *mastoides* ή *europaea* var. *microcarpa*) είναι ανθεκτική στις αντίξοες καιρικές συνθήκες, στα έντομα, στην ξηρασία και προσαρμόζεται σε ξηρές και υγρές περιοχές. Καλύπτει σχεδόν το 60% της συνολικής έκτασης της ελληνικής ελαιοκαλλιέργειας και ευδοκίμει σε μεγάλα υψόμετρα (>500 μέτρα) και το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από την εν λόγω ποικιλία χαρακτηρίζεται από μοναδική γεύση και άρωμα (Kandylis, Vekiaris et al. 2011). Η σύνθεσή του είναι πλούσια σε ελαϊκό οξύ και πολυφαινόλες (Kosma, Vatavali et al. 2017).

1.1.2.2 Κολοβή

Μία από τις μεγαλύτερες περιοχές καλλιέργειας ελαιόδενδρου της Ελλάδας είναι η Λέσβος. Τα ελαιόλαδα που προέρχονται από τη Λέσβο επιτρέπεται να διατίθενται στην αγορά με την ένδειξη ΠΓΕ (Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη ΠΓΕ). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την υψηλή θρεπτική αξία των ελαιόλαδων που παράγονται από καρπούς ελιάς της ποικιλίας Κολοβή (Kalogiouris, Kritikou et al. 2021). Πρόκειται για ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στη Λέσβο. Παρουσιάζει μέτριες απαιτήσεις σε έδαφος και καλλιεργητικές περιποιήσεις. Σε ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να δώσει αρκετά υψηλές αποδόσεις, ενώ θεωρείται μία από τις καλύτερες ελαιοποιήσιμες ποικιλίες, τόσο από πλευράς παραγωγικότητας, όσο και από πλευράς ποιότητας.

1.2 Ελαιόλαδο

Το παρθένο ελαιόλαδο είναι το μοναδικό βρώσιμο έλαιο μεγάλης παραγωγής παγκοσμίως που λαμβάνεται με μηχανικές - φυσικές μεθόδους από τον καρπό *Olea europaea* L. Αποτελεί ένα από τα παλαιότερα φυτικά έλαια της περιοχής της Μεσογείου (Kandylis, Vekiaris et al. 2011). Μεταξύ των ελαίων, το παρθένο ελαιόλαδο παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ζήτηση εξαιτίας των θρεπτικών και οργανοληπτικών ιδιοτήτων του (Amanrou, Kelebek et al. 2016). Η υψηλή θρεπτική αξία του ελαιόλαδου προκύπτει από την υψηλή συγκέντρωση μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (ελαϊκό οξύ) και την παρουσία άλλων ενώσεων όπως φαινολικές ενώσεις, τριτερπενικές αλκοόλες, βιταμίνες, καροτένια και στερόλες.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση ελαιόλαδου συμβάλλει στη μείωση της LDL χοληστερόλης, ενώ διατηρεί τα επίπεδα της HDL στο αίμα. Ακόμη η

κατανάλωση του έχει συσχετιστεί με τη βελτίωση της λειτουργίας του εντέρου, την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων, την εξισορρόπηση των επιπέδων σακχάρου και την αναζωογόνηση του δέρματος (Kosma, Vatavali et al. 2017).

Η Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα, η Ισπανία, η Ιταλία και η Ελλάδα πρωταγωνιστούν στην παραγωγή ελαιόλαδου (Revelou, Pappa et al. 2021). Πάνω από 350.000 τόνοι ελαιόλαδου παράγονται ετησίως στην Ελλάδα, γεγονός που καθιστά την καλλιέργεια της ελιάς υψίστης σημασίας για την Ελληνική οικονομία. Επιπλέον, η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση στην κατά κεφαλή κατανάλωση του ελαιόλαδου με σχεδόν 17,9 κιλά/ έτος ακολουθούμενη από την Ισπανία (12,6 κιλά/ έτος) και την Ιταλία (10,6 κιλά/ έτος). Στη χώρα μας, στην παραγωγή ελαιόλαδου, κυριαρχεί η ποικιλία Κορωνέικη, η οποία περιλαμβάνει περισσότερο από το 60% της εγχώριας παραγωγής ελαιόλαδου (Kosma, Vatavali et al. 2017). Περίπου το 85% του παραγόμενου ελαιόλαδου εντάσσεται στην κατηγορία «εξαιρετικά παρθένο» (Agrotypus 2013, Kosma, Vatavali et al. 2017).

1.3 Χημική σύσταση ελαιόλαδου

Σχεδόν 200 ενώσεις που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες έχουν ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί στις διάφορες ποικιλίες και κατηγορίες παρθένου ελαιόλαδου (Morales, Aparicio-Ruiz et al. 2013).

Γενικά, τα συστατικά του ελαιόλαδου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: το σαπωνοποίητο κλάσμα που αποτελεί περίπου το 1% της σύστασης του και το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (99%) που περιλαμβάνει τα λιπαρά οξέα, τις τριακυλογλυκερόλες, τις μονο- και διακυλογλυκερόλες, τους κηρούς και τα φωσφολιπίδια (**Πίνακας 1**). Οι συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών ποικίλλουν ανάλογα με την καλλιεργούμενη ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευση, τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, την ωριμότητα κατά τη συγκομιδή και τον τρόπο επεξεργασίας και αποθήκευσης που χρησιμοποιείται.

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό (C16:0), το παλμιτελαϊκό (C16:1), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), το λινελαϊκό (C18:2) και το λινολενικό (C18:3) (Boskou, Blekas et al. 2006). Η σύνθεση των λιπαρών οξέων μπορεί να διαφέρει από δείγμα σε δείγμα ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση, το κλίμα, την ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του καρπού. Για παράδειγμα τα ελληνικά, τα ιταλικά και τα ισπανικά ελαιόλαδα έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ, ενώ έχουν υψηλό ποσοστό ελαϊκού οξέος (Boskou, Blekas et al. 2006).

Όσον αφορά τους υδρογονάνθρακες, δύο είναι οι σημαντικότεροι ποσοτικά στο ελαιόλαδο: το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Το σκουαλένιο (2,6,10,15,19,23-εξαμεθυλοεικοσιπτετρα-2,6,10,14,18,22-εξαένιο) είναι ένα γραμμικό τριτερπενικό πολυμερές ισοπρενίου. Η παρουσία του στο ελαιόλαδο θεωρείται υπεύθυνη για τις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία του ανθρώπου (Rao, Newmark et al. 1998). Το σκουαλένιο αποτελεί πάνω από το 99% των υδρογονανθράκων του ελαιόλαδου (Boskou, Blekas et al. 2006).

Οι αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες που υπάρχουν στο ελαιόλαδο βρίσκονται είτε ελεύθερες είτε με τη μορφή εστέρων. Οι σημαντικότερες είναι οι λιπαρές και οι διτερπενικές αλκοόλες. Οι αλκανόλες, οι αλκενόλες (με λιγότερα από 10 άτομα

άνθρακα στο μόριο τους) και ορισμένες αρωματικές αλκοόλες όπως η βενζυλική αλκοόλη και η 2-φαινυλαιθανόλη αποτελούν συστατικά του πτητικού κλάσματος του ελαιόλαδου (Boskou, Blekas et al. 2006).

Ένα μείγμα πτητικών συστατικών είναι υπεύθυνο για το άρωμα του ελαιόλαδου το οποίο περιλαμβάνει κυρίως αλδεΐδες, αλκοόλες, κετόνες, εστέρες, τερπένια, λακτόνες, καρβοξυλικά οξέα και φαινόλες. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην συνολική αξιολόγηση της ποιότητας ενός ελαιόλαδου, στον εντοπισμό νοθείας με έλαια διαφορετικής σύστασης, ποιότητας και προέλευσης και στον προσδιορισμό της ποικιλίας (Boskou, Blekas et al. 2006, Amanpour, Kelebek et al. 2016).

Πίνακας 1: Η χημική σύσταση του ελαιόλαδου.

Χημική σύσταση ελαιόλαδου	
Σαπωνοποιήσιμο κλάσμα (99%)	Ασαπωνοποίητο κλάσμα (1%)
Ακυλογλυκερόλες	Στερόλες
Ελεύθερα λιπαρά οξέα	Υδρογονάνθρακες
Φωσφολιπίδια	Τοκοφερόλες
Κηροί	Αλειφατικές αλκοόλες
	Χρωστικές ουσίες

1.3.1 Πτητικά συστατικά ελαιόλαδου

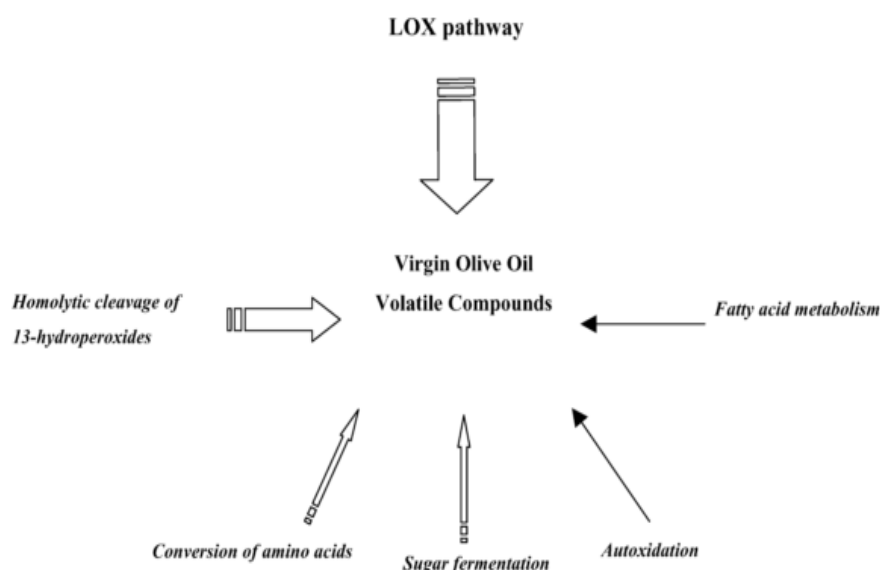
Πτητικές ενώσεις καλούνται ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που εξατμίζονται εύκολα σε θερμοκρασία δωματίου. Το άρωμα του ελαιόλαδου αποδίδεται στις αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, υδρογονάνθρακες, κετόνες, φουράνια και άλλες, ακόμη άγνωστες πτητικές ενώσεις (Kalua, Allen et al. 2007). Ο αριθμός των πτητικών συστατικών που έχουν ταυτοποιηθεί στο ελαιόλαδο έχει ανέλθει σε περισσότερες από 180 ενώσεις (Kalua, Allen et al. 2007). Ωστόσο έρευνες στα αρωματικά προφίλ διάφορων τροφίμων, μεταξύ αυτών και το ελαιόλαδο, έχουν δείξει ότι μόνο ένα μικρό μέρος αυτού του μεγάλου πλήθους ενώσεων συμβάλλει στην πραγματικότητα στο χαρακτηριστικό άρωμα που έχουν (Amanpour, Kelebek et al. 2016).

Οι κύριες πτητικές ενώσεις που αναφέρονται στα παρθένα ελαιόλαδα είναι ενώσεις με έξι και πέντε άτομα άνθρακα (C6 και C5, αντιστοίχως). Ακόμη, η 3-μεθυλοβουταν-1-ολη έχει ταυτοποιηθεί σε πολλά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα της Μεσογείου (Aparicio, Luna 2002).

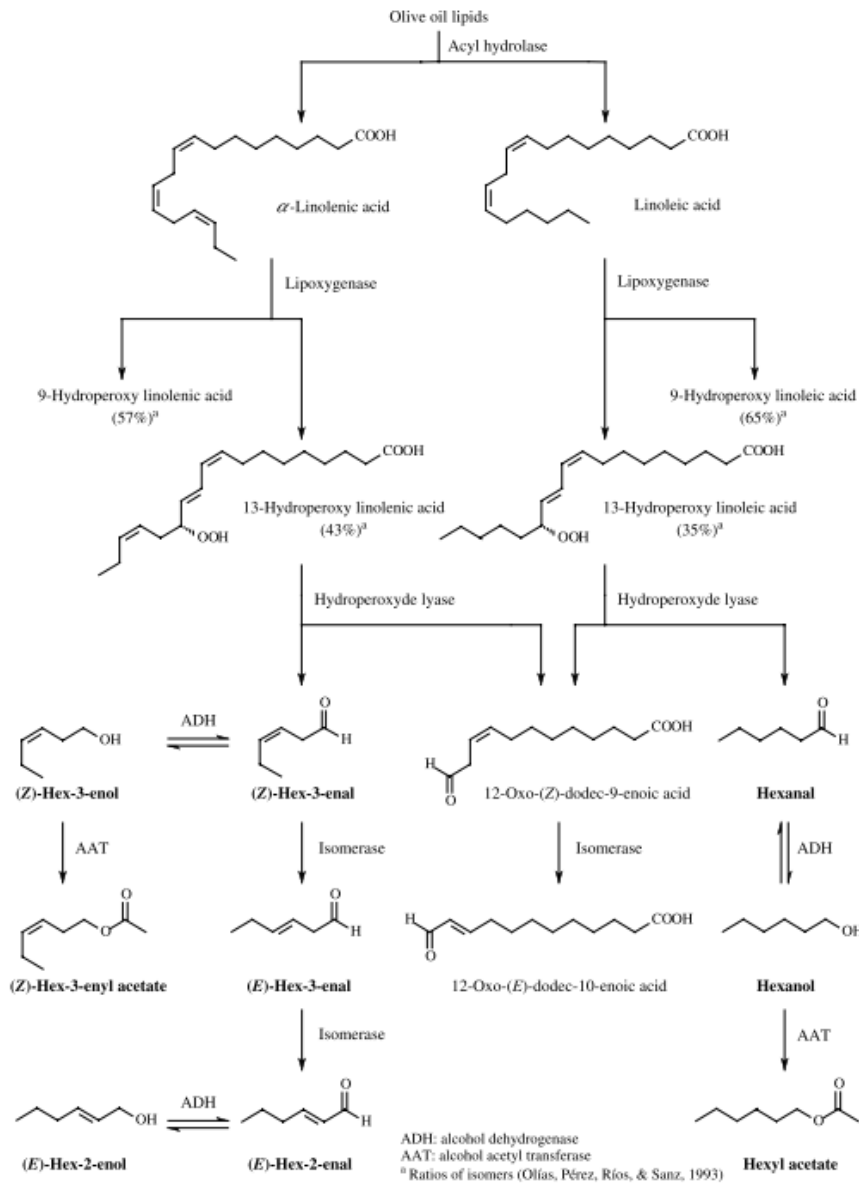
Η πλειονότητα των πτητικών ενώσεων στο ελαιόλαδο προέρχονται από ενζυμικές αντιδράσεις και αυτοοξειδωση (Kalua, Allen et al. 2007). Το μονοπάτι της λιποξυγενάσης αποτελεί μια εξέχουσα αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων, από την οποία παράγονται πτητικά συστατικά που συνεισφέρουν θετικά στο άρωμα του ελαιόλαδου (Vichi, Pizzale et al. 2003, Amanpour, Kelebek et al. 2016). Ενώσεις όπως η εξανάλη, η *trans*-2-εξενάλη, η εξαν-1-όλη και η 3-μεθυλοβουταν-1-όλη βρίσκονται στα περισσότερα παρθένα ελαιόλαδα στην Ευρώπη.

Οι περισσότερες C6-αλδεΐδες φτάνουν το μέγιστο της συγκέντρωσής τους όταν οι καρποί της ελιάς ωριμάζουν. Στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης οι ποσότητες των C6-αλδεϊδών είναι συγκρίσιμες με αυτές των αλκοολών (Angerosa and Basti 2001).

Η *trans*-2-εξενάλη, η κύρια πτητική ένωση στα περισσότερα ευρωπαϊκά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα, μειώνεται με την ωρίμανση στις περισσότερες ποικιλίες (Kalua, Allen et al. 2007). Οι διαφορές στην παραγωγή πτητικών ενώσεων C5 και C6 στα ελαιόλαδα μπορεί επίσης να σχετίζεται και με τη γεωγραφική περιοχή, όπως για παράδειγμα η κυριαρχία της *trans*-2-εξενάλης στα ευρωπαϊκά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα (Kalua, Allen et al. 2007). Οι τυπικές φρουτώδεις πράσινες νότες στα παρθένα ελαιόλαδα οφείλονται σε μια σειρά από C5 και C6 αλδεΐδες, αλκοόλες και εστέρες που προέρχονται κυρίως από την ενζυματική οξείδωση των λιπαρών οξέων λινελαϊκό και λινολενικό (μονοπάτι της λιποξυγενάσης) (LOX) (Cecchi, Migliorini et al. 2020, Liouri, Sampsonidis et al. 2022). Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζονται τα ενζυμικά και χημικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή των πτητικών ενώσεων στο ελαιόλαδο (Angerosa, Servili et al. 2004). Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζεται αναλυτικά το μονοπάτι της λιποξυγενάσης, το οποίο εμπλέκεται καθοριστικά στην παράγωγή πτητικών ενώσεων, που είναι υπεύθυνες για το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Cavalli, Fernandez et al. 2004).



Εικόνα 2: Ενζυμικά και χημικά μονοπάτια μέσω των οποίων παράγονται τα πτητικά συστατικά στο ελαιόλαδο (Angerosa, Servili et al. 2004).



Εικόνα 3: Το μονοπάτι της λιποξυγενάσης (Cavalli, Fernandez et al. 2004).

Το πτητικό προφίλ των ελαιολάδων επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, μεταξύ των οποίων η ποικιλία και η γεωγραφική προέλευση. Για παράδειγμα, διαφορετικές ποικιλίες ελιάς που καλλιεργούνται κάτω από τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες παράγουν ελαιόλαδα που διαφέρουν στην πτητική τους σύσταση. Κάτι τέτοιο εμφανίζεται και στην περίπτωση που η ίδια ποικιλία ελιάς καλλιεργείται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι τα ελαιόλαδα που παράγονται από την ποικιλία αυτή διαφέρουν στο πτητικό προφίλ (Morales, Luna et al. 2005). Εάν η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών είναι κάτω από το όριο οσφρητικής ικανότητας, τα συστατικά αυτά δεν συμβάλλουν στο άρωμα του ελαιόλαδου, ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο ως δείκτες ιχνηλασιμότητας. Μελέτες συνοψίζουν πως η μέθοδος καλλιέργειας, η ωριμότητα των καρπών, η μέθοδος εκχύλισης, η ποικιλία, η γεωγραφική προέλευση και οι εδαφοκλιματικές συνθήκες επηρεάζουν άμεσα την πτητική σύσταση του ελαιόλαδου (Morales, Alonso et al. 1995, Morales and Tsimidou 2000, Aparicio, Morales et al. 2012).

Οι πτητικές ενώσεις στο ελαιόλαδο μπορούν να συνδεθούν τόσο με θετικά όσο και με αρνητικά αισθητηριακά χαρακτηριστικά και έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα του ελαίου και ως εκ τούτου στην προτίμηση των καταναλωτών. Ένα ελαιόλαδο υποδεέστερης ποιότητας παρουσιάζει ένα πιο περίπλοκο προφίλ, με υψηλότερο αριθμό πτητικών συστατικών. Αυτά τα ελαιόλαδα παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση σε ενώσεις C5 και C6 ή και πλήρη απουσία των ενώσεων αυτών. Ταυτόχρονα, ορισμένες ενώσεις, όπως διακλαδισμένες αλδεΐδες, αλκοόλες, C7-C11 μονοακόρεστες αλδεΐδες ή C8 κετόνες μπορούν να συμβάλλουν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Τέτοιες ενώσεις είναι οφείλονται σε λασπώδη ιζήματα και τάγγιση (Morales, Luna et al. 2005). Ακόμη, η 1-πεντεν-3-όνη, που ανιχνεύεται κυρίως σε ελαιόλαδα από άγουρες ελιές σχετίζεται θετικά με την οξύτητα (Kalua, Allen et al. 2007). Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός του πτητικού κλάσματος VOO είναι σημαντικός για τη διασφάλιση της προστασίας των καταναλωτών (Liouri, Sampsonidis et al. 2022). Οι ενώσεις που συμβάλλουν στην «πράσινη» μυρωδιά του ελαιολάδου είναι η 3-εξενάλη, η (2E)-εξενάλη, η 2-εξεν-1-όλη και η εξαν-1-όλη (Vichi, Pizzale et al. 2003, Liouri, Sampsonidis et al. 2022). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποια πτητικά συστατικά του ελαιολάδου και περιγράφεται το άρωμα που προσφέρουν σε αυτό (**Πίνακας 2**) (Ullrich and Grosch 1988, Guth and Grosch 1991, Morales, Rios et al. 1997, Schnermann and Schieberle 1997, Reiners and Grosch 1998, Angerosa, Servili et al. 2004, Boskou, Blekas et al. 2006).

Πίνακας 2: Πτητικά συστατικά του ελαιόλαδου και χαρακτηρισμός του αρώματος που προσφέρουν σε αυτό (Ullrich and Grosch 1988, Guth and Grosch 1991, Morales, Rios et al. 1997, Schnermann and Schieberle 1997, Reiners and Grosch 1998, Angerosa, Servili et al. 2004, Boskou, Blekas et al. 2006).

Πτητικά συστατικά	Άρωμα
Αλδεΐδες	
Ακεταλδεΐδη	Πικάντικο, γλυκό, φρουτώδες
Προπανάλη	Πικάντικο, γλυκό
2-Μεθυλοπροπανάλη	Καραμέλας
Εξανάλη	Μήλο, κομμένο γρασίδι
Επτανάλη	Λιπαρό
Οκτανάλη	Κίτρου, σαπουνιού
Εννεανάλη	Κίτρου, σαπουνιού
Δεκανάλη	Κίτρου, σαπουνιού
2-Μεθυλοβουτανάλη	Βύνης
3-Μεθυλοβουτανάλη	Βύνης, γλυκό, φρουτώδες
2-Μεθυλο-2-βουτενάλη	Μήλο
<i>trans</i> -2-Πεντενάλη	Πράσινο, μήλο
<i>cis</i> -2-Πεντενάλη	Πράσινο
<i>trans</i> -2-Εξενάλη	Πικρό, αμυγδάλου, πράσινο, μήλου, λιπαρό, κομμένου γρασιδιού
<i>cis</i> -2-Εξενάλη	Πράσινο, γλυκό, φρουτώδες
<i>trans</i> -3-Εξενάλη	Αγκινάρα, πράσινο

<i>cis</i> -3-Εξενάλη	χόρτα, πράσινο, μήλο, φύλλου, κομμένου γρασιδιού
2-Οκτενάλη	Φρουτώδες, σαπούνι, λιπαρό
<i>cis</i> -2-Εννεανάλη	Πράσινο, λιπαρό
<i>trans</i> -2-Εννεανάλη	Χαρτί, λιπαρό, κομμένο γρασίδι
2-Δεκενάλη	Λιπαρό
2,4-Εξαδιενάλη	Κομμένο γρασίδι
2,4-Επταδιενάλη	Λιπαρό, καρύδι
2,4-Εννεαδιενάλη	Έντονο τηγανητό
2,6-Εννεαδιενάλη	Αγγούρι
2,4-Δεκαδιενάλη	Έντονο τηγανητό
Βενζαλδεΐδη	Αμύγδαλο
Φαινυλακεταλδεΐδη	Πικάντικο, φαινολικό
Κετόνες	
Πενταν-3-όνη	Γλυκό
1-Πεντεν-3-όνη	Γλυκό, φράουλα, πικάντικο, πράσινο, μέταλλο
1-Οκτεν-3-όνη	Μυκητοειδών
Αλκοόλες	
Αιθανόλη	Αλκοόλ, ώριμων μήλων
Πενταν-1-όλη	Πικάντικο
Εξαν-1-όλη	Φρουτώδες, αρωματικό, απαλό, κομμένου γρασιδιού
2-Μεθυλοπροπαν-1-όλη	Οξικού αιθυλεστέρα
2-Μεθυλοβουταν-1-όλη	Ιχθυέλαιο
<i>cis</i> -2-Πεντεν-1-όλη	Μπανάνα
<i>trans</i> -3-Εξεν-1-όλη	Πλούσιο, λιπαρό, πικάντικο, κομμένου γρασιδιού
<i>cis</i> -3-Εξεν-1-όλη	Μπανάνα, φύλλα, πράσινο-φρουτώδες, πικάντικο
<i>trans</i> -2-Εξεν-1-όλη	Πράσινο, χορτώδες, φρουτώδες, λιπαρό, πικάντικο
<i>cis</i> -2-Εξεν-1-όλη	Πράσινα φρούτα, πράσινο-φρουτώδες
1-Πεντεν-3-όλη	Βρεγμένο χώμα
Εστέρες	
Οξικός μεθυλεστέρας	Εστέρα
Οξικός βουτυλεστέρας	Πράσινο, πικάντικο, γλυκό
Οξικός αιθυλεστέρας	Γλυκό, αρωματικό
Προπανοϊκός αιθυλεστέρας	Γλυκό, φράουλα, μήλο
Βουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Τυρί, φρουτώδες
Ισοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες
2-Μεθυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες
3-Μεθυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας	Φρουτώδες
Οξικός <i>cis</i> -3-εξενυλεστέρας	πράσινη μπανάνα, φρουτώδες, πράσινο, πράσινων φύλλων, εστέρα
Οξικός εξυλεστέρας	Γλυκό, φρουτώδες

Οξικός 3-μεθυλοβουτυλεστέρας	Μπανάνα
2-Μεθυλοβουτανοϊκός μεθυλεστέρας	Φρουτώδες
Δεκανοϊκός μεθυλεστέρας	Φρέσκο
Εννεανοϊκός μεθυλεστέρας	Φρουτώδες, γλυκό
Οξέα	
Οξικό οξύ	Πικρό, όπως το οξικό οξύ
Προπανοϊκό οξύ	Αρωματικό, πικάντικο
Βουτανοϊκό οξύ	Βούτυρο
Πεντανοϊκό οξύ	Οσμή ιδρώτα, πικάντικο
Εξανοϊκό οξύ	Οσμή ιδρώτα, πικάντικο
3-Μεθυλοβουτανοϊκό οξύ	Οσμή ιδρώτα
2-Μεθυλοβουτανοϊκό οξύ	Οσμή ιδρώτα
Άλλες ενώσεις	
Μεθυλοβενζόλιο	Κόλλα, διαλύτης
Αιθυλοβενζόλιο	Ισχυρό
Αιθυλοφουράνιο	Γλυκό
Διμεθυλοσουλφίδιο	Βρεγμένο χώμα
Διπροπυλοδισουλφίδιο	Μαγειρεμένο κρέας
Κυκλοπροπάνιο	Μοσχάρι

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την απομόνωση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου. Το αυξημένο ενδιαφέρον για το παρθένο ελαιολάδο τόσο στις εγχώριες, όσο και στις διεθνείς αγορές οδηγεί τους ερευνητές σε μελέτες που σχετίζονται με τα ποιοτικά, διατροφικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Kaftan and Elmaci 2011). Πολλές από αυτές έγιναν με σκοπό την ταξινόμηση των παρθένων ελαιολάδων ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευσή τους, αξιοποιώντας δεδομένα σχετικά με την πτητική τους σύσταση (Cerrato Oliveros, Boggia et al. 2005).

1.4 Πτητικά συστατικά και αυθεντικότητα ελαιολάδου

Η βιομηχανία του ελαιολάδου καλείται να αντιμετωπίσει πλήθος προβλημάτων που αφορούν την ποιότητα και την αυθεντικότητα των παραγόμενων προϊόντων. Η ανάμειξη διαφόρων βρώσιμων ελαίων, όπως ηλιέλαιο και σογιέλαιο με ελαιολάδο είναι μια από τις πιο κοινές πρακτικές νοθείας στο ελαιολάδο. Ένα άλλο ζήτημα αφορά τη νοθοθεσία σχετικά με την Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ), μια ετικέτα που χορηγείται σε προϊόντα από συγκεκριμένες περιοχές και που τους επιτρέπει να πωλούνται σε υψηλότερες τιμές. Μια πρακτική νοθείας περιλαμβάνει την εσφαλμένη επισήμανση ενός ελαιολάδου ως ΠΟΠ με σκοπό την επίτευξη επιπλέον κέρδους. Τέλος, προβλήματα νοθείας παρουσιάζονται και στην περίπτωση ανάμειξης ελαιολάδου παλαιότερου έτους συγκομιδής με αυτό του τρέχοντος, επηρεάζοντας την φρεσκάδα και την ποιότητα του προϊόντος (Unsu and Ozen 2020). Η πιστοποίηση της αυθεντικότητας του ελαιολάδου περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, την

ταξινόμηση σύμφωνα με την ποικιλία ή/και τη γεωγραφική προέλευση, η οποία απαιτεί τη χρήση αναλυτικών τεχνικών σε συνδυασμό με χημειομετρία (Kosma, Vatavali et al. 2017).

Η γνώση της σύνθεσης και της περιεκτικότητας σε πτητικά συστατικά στα μονοποικιλιακά ελαιόλαδα είναι υψίστης σημασίας. Τα πτητικά συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον έλεγχο της ποιότητας του ελαιόλαδου (Kosma et al., 2016), της γεωγραφικής προέλευσης (Cajka, Riddellova, Klimancova, Cerna, Pudil et al., 2010), για την πρόβλεψη και επιβεβαίωση της κατηγορίας ποιότητας του εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την τεχνολογία παραγωγής (Angerosa, Servili et al. 2004) και τις τυπικές οργανοληπτικές ιδιότητες (Lukić, Carlin et al. 2019).

Σε μελέτη των Lukić, Carlin et al. (2019), όπου εξετάστηκαν δείγματα μονοποικιλιακών ελαιολάδων από την Κροατία ως προς την ποικιλιακή διαφοροποίηση, βρέθηκε πως ορισμένοι υδρογονάνθρακες διακλαδισμένης αλυσίδας και κάποια ισομερή του 3-αιθυλο-1,5-οκταδιενίου είχαν υψηλή διακριτική ικανότητα και σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στις ποικιλίες Buža και Rosinjola (Lukić, Carlin et al. 2019). Η ποικιλία Lastovka διακρίθηκε κυρίως για τις υψηλές ποσότητες εξανάλης και C6 αλκοολών, ενώσεις που συμβάλλουν στην «πράσινη» οσμή του ελαιόλαδου και προέρχονται από την ενζυμική αποδόμηση του λινελαϊκού οξέος και την οξειδωση (Angerosa 2002, Lukić, Carlin et al. 2019). Οι πτητικές αρωματικές ενώσεις που παράγονται από το μονοπάτι της λιποξυγενάσης συμβάλλουν επιτυχημένα στη διαφοροποίηση ποικιλιών ελαιολάδου εξαιτίας της ισχυρής εξάρτησης από τα γενετικά χαρακτηριστικά της ποικιλίας, όπως έχει επισημανθεί και σε μελέτες προηγούμενων ετών (Angerosa, Basti C Fau - Vito et al. 1999, Melucci, Bendini et al. 2016, Lukić, Carlin et al. 2019).

Αρκετές μελέτες αναφέρουν πως η πτητική σύνθεση του παρθένου ελαιόλαδου επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες όπως η ποικιλία, η γεωγραφική προέλευση, η ωριμότητα των καρπών, το κλίμα, το έδαφος. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες σχετίζονται με την ποιότητα και την αυθεντικότητα του ελαιόλαδου (Cecchi, Migliorini et al. 2021). Πολλοί συγγραφείς αναφέρουν τη γεωγραφική προέλευση ως πρωταρχικό κριτήριο διάκρισης και αξιολόγησης του ελαιόλαδου (Tura, Failla et al. 2013). Κάποιες μελέτες μονοποικιλιακών ελαιολάδων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές επικεντρώνουν το ενδιαφέρον τους στο περιεχόμενο των ελαιολάδων σε (E)-2-εξενάλη (Kesen, Kelebek et al. 2014, Hachicha Hbaieb, Kotti et al. 2016, Hachicha Hbaieb, Kotti et al. 2016, Vidal, Alcalá et al. 2019, Cecchi, Migliorini et al. 2021). Σε ακόμη μια μελέτη βρέθηκε πως η (E)-2-εξενάλη και η εξανάλη ήταν υπεύθυνες για το διαχωρισμό μονοποικιλιακών ελαιολάδων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Kesen, Kelebek et al. 2014). Ομοίως, οι Aparicio et al. 2012 παρατήρησαν πως στα ευρωπαϊκά παρθένα ελαιόλαδα οι ενώσεις που κυρίως ευθύνονται για το άρωμα τους είναι η (E)-2-εξενάλη, η εξανάλη, η εξανόλη και η 3-μεθυλο-1-βουτανόλη (Kalua, Allen et al. 2007). Οι ενώσεις αυτές έχουν βρεθεί σε πλήθος ποικιλιών ελαιόλαδου και έχει βρεθεί πως επηρεάζουν το διαχωρισμό των ελαιολάδων με βάση την περιοχή καλλιέργειας (γεωγραφική προέλευση).

Σε μελέτη που εστίασε στα πτητικά συστατικά χρησιμοποιώντας τα ως χημικούς δείκτες για τον έλεγχο της αυθεντικότητας εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων από 4 διαφορετικές ιταλικές ποικιλίες (Dolce Agogia, Frantoio, Leccino και Moraiolo), εντοπίστηκαν κάποιες διαφορές μεταξύ των ποικιλιών τόσο ως προς την ποσοστιαία

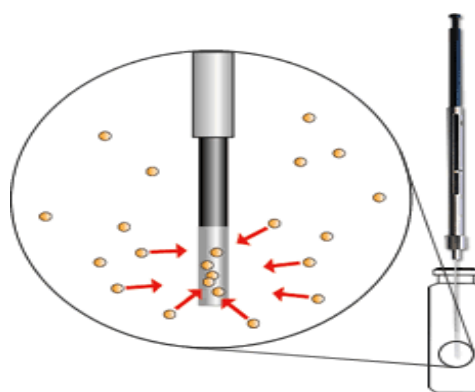
περιεκτικότητα σε *trans*-2-εξενάλη (ένωση παρούσα σε όλες τις ποικιλίες), όσο και σε άλλα δευτερεύοντα συστατικά. Η *trans*-2-εξενάλη βρέθηκε σε μικρότερη ποσότητα στην ποικιλία Moraiolo σε σχέση με την ποικιλία Frantoio. Άλλες παρατηρήσεις αφορούν την εκατοστιαία περιεκτικότητα σε *trans*-2-εξεν-1-ολη. Αυτή η ένωση λαμβάνεται από την αντίδραση της *trans*-2-εξενάλης με την αλκοολική αφυδρογονάση. Η ένωση αυτή βρέθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ποικιλία Moraiolo (Blasi, Pollini et al. 2019) και οι συγγραφείς επεσήμαναν πως η δραστηριότητα του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση επηρεάζεται από την ποικιλία.

Εκτός από την ομάδα των αλδευδών, έρευνες έχουν εστιάσει και στο ρόλο των αλκοολών στην προσπάθεια διαχωρισμού μονοποικιλιακών ελαιολάδων με βάση τη γεωγραφική προέλευση. Ειδικότερα, σε μελέτη που προσπάθησε να αξιολογήσει ελαιόλαδα της ίδιας ποικιλίας από διαφορετικές περιοχές της Τουρκίας, βρέθηκε πως στα ελαιόλαδα της μιας περιοχής, η συγκέντρωση των αλκοολών ήταν σχεδόν η διπλάσια από της άλλης. Στις ενώσεις αυτές, συμπεριλαμβάνονται κυρίως C6 αλκοόλες, όπως η εξανόλη, η (E)-2-εξενόλη και η (Z)-2-εξενόλη (Kesen, Kelebek et al. 2014, Cecchi, Migliorini et al. 2020). Σε σύγκριση με άλλες μελέτες, παρόμοιο μοτίβο των αλκοολών που αναφέρθηκαν εντοπίστηκε σε παρθένα ελαιόλαδα προερχόμενα από την Ισπανία, Ιταλία και Τυνησία (Vichi, Pizzale et al. 2003, Baccouri, Bendini et al. 2008, Gómez-Rico, Fregarane et al. 2008, Cecchi, Migliorini et al. 2020).

Με βάση όλα τα παραπάνω κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και εφαρμογή χημικών αναλυτικών μεθόδων για τον έλεγχο της αυθεντικότητας γεωγραφικής προέλευσης των παρθένων ελαιολάδων (Cecchi, Migliorini et al. 2020).

1.5 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Η Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αποτελεί μια τεχνική προετοιμασίας δείγματος που παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένου του αυτοματισμού και της απλότητας (Liouri, Sampsonidis et al. 2022). Στην SPME δεν χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες για την εκχύλιση και την παραλαβή των πτητικών συστατικών. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στα πτητικά συστατικά του δείγματος που κατανέμονται μεταξύ αυτού και μιας στερεάς στατικής φάσης (πολυμερές υλικό), με το οποίο είναι



Εικόνα 4: Η ίνα SPME και σε μεγέθυνση τα πτητικά συστατικά που απορροφώνται.

επικαλυμμένη η ίνα πηκτής διοξειδίου πυριτίου της συσκευής. Η SPME χρησιμοποιείται για υγρά, αέρια και στερεά δείγματα και δύναται να απομονώνει πτητικά και ημιπτητικά συστατικά δειγμάτων (**Εικόνα 4**). Η διασφάλιση της γνησιότητας του ελαιολάδου αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό ζήτημα τόσο από της

άποψη του μάρκετινγκ, όσο και από την άποψη της υγείας, και απαιτεί το συνδυασμό αναλυτικών δεδομένων με χημειομετρικές και στατιστικές μεθόδους (Messai, Farman et al. 2016). Μεταξύ των κύριων αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αυθεντικότητας της ποικιλίας του ελαιόλαδου, καθώς και της γεωγραφικής του προέλευσης βρίσκεται η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (SPME-GC-MS), που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και ταυτοποίηση πτητικών ενώσεων πλήθους ελληνικών ποικιλιών ελαιολάδου (Vichi, Guadayol et al. 2007, Revelou, Pappa et al. 2021). Σήμερα, μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης των πτητικών συστατικών σε παρθένα ελαιόλαδα βασίζεται στην απομόνωσή τους με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) και την επακόλουθη εκρόφηση τους και προσδιορισμό με σε αέριο χρωματογράφο (SPME-GC) (Oliver-Pozo, Aparicio-Ruiz et al. 2015).

1.6 Αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών

Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για αναλυτικές τεχνικές για την αξιολόγηση της ποιότητας του παρθένου ελαιόλαδου έχει οδηγήσει σε αρκετές μελέτες που αφορούν το πτητικό κλάσμα του (Vichi, Guadayol et al. 2007). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες αναλυτικές μέθοδοι για την ανάλυση των πτητικών ενώσεων που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο. Στην αέρια χρωματογραφία, τα συστατικά ενός εξαμισθέντος δείγματος διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της κατανομής τους μεταξύ μιας κινητής και μιας στατικής φάσης. Για την πραγματοποίηση ενός χρωματογραφικού προσδιορισμού, το δείγμα εξατμίζεται και στη συνέχεια εισάγεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλυση των ουσιών πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου (κινητή φάση) (Skoog 1998).

Μερικά από τα οφέλη του συνδυασμού μιας τεχνικής διαχωρισμού και φασματομετρίας μάζας συγκεντρώνονται παρακάτω (Di Donna, Mazzotti F Fau - Salerno et al. 2007):

- Τα δύο όργανα λειτουργούν σε επιμέρους επίπεδα και οι τεχνικές εφαρμόζονται συνεργατικά.
- Η υψηλή εκλεκτικότητα της φασματομετρίας μάζας στην ανίχνευση επιτρέπει την ταυτοποίηση συστατικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις
- Η αξιοπιστία ταυτοποίησης αυξάνεται εξαιτίας του χρόνου κατακράτησης που είναι γνωστός.
- Τα δείγματα πολλών συστατικών μπορούν να αναλυθούν απευθείας με ελάχιστη απώλεια δειγμάτων ταυτόχρονα εξοικονόμηση χρόνου.
- Η ευαισθησία της ανάλυσης
- Απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος για την ανάλυση

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση πτητικών οργανικών ενώσεων στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο δίνοντας έμφαση στην ανίχνευση ενώσεων βιοδεικτών, στον έλεγχο γνησιότητας και στα ζητήματα που σχετίζονται με την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων γενικότερα (Lioupi, Sampsonidis et al. 2022).

Κεφάλαιο 2: Σκοπός

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στον προσδιορισμό του πτητικού κλάσματος ελαιολάδων, προερχόμενα από καρπούς ελιάς των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή, τα οποία παράχθηκαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Κρήτη, Πελοπόννησος, Λέσβος) κατά την ελαιοκομική περίοδο 2020-2021. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της ποικιλίας και της γεωγραφικής προέλευσης στο πτητικό προφίλ με μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης με απώτερο στόχο την διάκριση των ελαιολάδων με βάση την περιοχή/ποικιλία προέλευσης.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και μέθοδοι

3.1 Δειγματοληψία

Για το σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης συλλέχθηκαν 69 δείγματα, προερχόμενα από καρπούς των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή, τα οποία παράχθηκαν σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Κρήτη, Πελοπόννησος, Λέσβος) κατά την ελαιοκομική περίοδο 2020-2021 (**Πίνακας 3**). Στη συνέχεια, δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων στην οποία αναφέρεται ο κωδικός του δείγματος, η ποικιλία, η γεωγραφική προέλευση (Ευρύτερη και υποπεριοχή) και η ημερομηνία συλλογής του. Η πλειονότητα των δειγμάτων που εξετάστηκαν προέρχονταν από την ποικιλία Κορωνέικη και την περιοχή της Πελοποννήσου. Τα δείγματα από τη Λέσβο, καθώς και τα εμφιαλωμένα ή εξευγενισμένα ελαιόλαδα δεν χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση καθώς ο αριθμός δειγμάτων ήταν μικρός.

Πίνακας 3: Δείγματα ελαιόλαδου που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αναφέρονται οι κωδικοί των δειγμάτων, η ποικιλία τους, η γεωγραφική προέλευση και η υποπεριοχή.

Κωδικός δείγματος	Ποικιλία	Γεωγραφική προέλευση	Υποπεριοχή
KOL_LES_00_50	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOL_LES_00_51	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOL_LES_00_52	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOL_LES_00_53	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOL_LES_00_54	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOL_LES_00_55	ΚΟΛΟΒΗ	ΛΕΣΒΟΣ	
KOR_ACH_00_01	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_02	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_03	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_04	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_05	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_06	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_07	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_08	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_09	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_ACH_00_10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΑΧΑΙΑ
KOR_CHA_00_14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_17	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_18	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_19	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_CHA_00_20	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΧΑΝΙΑ
KOR_EL_00_01	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_00_02	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_00_03	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_00_04	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ

KOR_EL_OO_05	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_06	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_07	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_08	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_09	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_EL_OO_11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_HER_OO_13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_17	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_18	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_19	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_20	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_21	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_22	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_23	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_HER_OO_24	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ
KOR_LAK_OO_11_MAIX	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΛΑΚΩΝΙΑ
KOR_LAK_OO_16	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΛΑΚΩΝΙΑ
KOR_LAS_OO_08	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_09	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_12	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_LAS_OO_15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΛΑΣΙΘΙ
KOR_MES_OO_13_MAIX	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ
KOR_MES_OO_5_MAIX	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ
KOR_MES_OO_7_MAIX	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ
KOR_MES_OO_9_MAIX	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΜΕΣΣΗΝΙΑ
KOR_OLY_OO_14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_OLY_OO_15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΣ	ΗΛΕΙΑ
KOR_RET_OO_09	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_10	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_11	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_12	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_13	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_14	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ
KOR_RET_OO_15	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΚΡΗΤΗ	ΡΕΘΥΜΝΟ

3.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Υλικά–Σκεύη:

- ✓ Γυάλινα φιαλίδια (χωρητικότητας 20 mL), με οπή και ελαστικό παρέμβυσμα από τεφλόν στο πώμα.
- ✓ Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- ✓ Ίνα SPME Carboxen/DVB/PDMS, 50/30 μm , Stableflex (2cm)(**Εικόνα 6**)
- ✓ Μαγνητάκια ανάδευσης

Συσκευές:

- ✓ Αναλυτικός ζυγός
- ✓ Συσκευή θερμοστάτησης
- ✓ Υδατόλουτρο

Για την προετοιμασία των δειγμάτων αρχικά μεταφέρθηκαν από τις σκουρόχρωμες φιάλες που ήταν αποθηκευμένα τα ελαιόλαδα, με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur και ζυγίστηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο 2 g ($\pm 0,01$ g) από κάθε δείγμα (**Εικόνα 5**). Έπειτα, προστέθηκε μαγνητάκι ανάδευσης, το φιαλίδιο πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε συσκευή θερμοστάτησης 40°C υπό ανάδευση για 5 λεπτά προς εξισορρόπηση του υπερκείμενου χώρου. Μετά την πάροδο των 5 λεπτών, έγινε εισαγωγή της ίνας SPME μέσω του πώματος που έφερε ελαστικό παρέμβυσμα από τεφλόν και έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο για 40 λεπτά υπό τις ίδιες συνθήκες, προκειμένου να προσροφηθούν τα πτητικά συστατικά του δείγματος (Oliver-Pozo, Aparicio-Ruiz et al. 2015) (Romero, García-González et al. 2015) (**Εικόνα 6,7**). Η εκρόφηση των πτητικών από την ίνα πραγματοποιήθηκε στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου στους 250°C για 5 λεπτά σε λειτουργία διαμορισμού (split ratio 1/5).



Εικόνα 5: Αναλυτικός ζυγός γυάλινα φιαλίδια και πλαστικές πιπέτες Pasteur.



Εικόνα 6: Η ίνα SPME (DVB/CAR/PDMS-50/30μm).



Εικόνα 7: Το δείγμα ελαιόλαδου με το μαγνητικό αναδευτήρα και την ίνα SPME στο υδατόλουτρο.

3.3 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μαζών

Ο προσδιορισμός των πτητικών συστατικών των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (**Εικόνα 8**). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα διατηρήθηκε στους 250°C. Οι συνθήκες της αέριας χρωματογραφίας για το διαχωρισμό των πτητικών συστατικών των ελαιόλαδων παρατίθεται στον **Πίνακα 4**. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GCMS Solution. Για την εν λόγω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε βαθμιδωτό θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Ειδικότερα, κατά το στάδιο της εισαγωγής του δείγματος η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 40 °C. Το βαθμιδωτό θερμοκρασιακό πρόγραμμα επιλέχθηκε με σκοπό να μειωθεί ο χρόνος της ανάλυσης και να διατηρηθούν οι κορυφές οξείες σε όλο το χρωματογράφημα. Να σημειωθεί ότι μεταξύ των δειγμάτων υπήρχε χρόνος για την επαναφορά του φούρνου στην αρχική θερμοκρασία πριν γίνει εισαγωγή του επόμενου. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη DB-WAX (Agilent, 28,5 m X 0,25mm, df 0,25 μm). Το θερμοκρασιακό παρουσιάζεται στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 4: Αναλυτικές συνθήκες αέριας χρωματογραφίας.

Στήλη	DB-WAX (Agilent, 28,5 m X 0,25mm, df 0,25 μm)
Θερμοκρασία φούρνου	40,0°C
Θερμοκρασία εισαγωγέα	250 °C
Φέρον αέριο	He (Ηλιο)
Λειτουργία διαμοιρασμού	1/5
Συνολικός χρόνος προγράμματος	40 λεπτά

Πίνακας 5: Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου.

	Τιμή	Τελική θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
0	-	40.0	5.00
1	5.00	180.0	0.00
2	30.00	240.0	5.00
3	0.00	0.0	0.00



Εικόνα 8: Σύστημα αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra του εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας Metaboanalyst.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Επισκόπηση της πορείας ανάλυσης των δεδομένων

Η επεξεργασία των δεδομένων που καταγράφηκαν από την ανάλυση των δειγμάτων ελαιόλαδου με GC-MS πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό MS-Dial και AMDIS. Κατά τη διαδικασία επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων που λήφθηκαν, πραγματοποιήθηκε αρχικά η ευθυγράμμιση τους, η αποσυνέλιξη των φασμάτων (deconvolution) και στη συνέχεια η ταυτοποίηση των ενώσεων, η οποία στηρίχθηκε κατά κύριο λόγο στον δείκτη κατακράτησης και στον βαθμό ομοιότητας των φασμάτων μάζας με τα αντίστοιχα προτύπων ουσιών καθώς και εκείνων που περιέχονται στη βιβλιοθήκη NIST14. Έπειτα, οι ταυτοποιημένες ενώσεις με τους δείκτες κατακράτησης τους αποτέλεσαν τη βάση για τη δημιουργία μιας νέας βιβλιοθήκης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων.

Το σύνολο των ταυτοποιημένων ενώσεων, οι δείκτες κατακράτησης καθώς και το ποσοστό τους σε κάθε δείγμα ελαιόλαδου που αναλύθηκε παραρροσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε υπολογίζοντας το αντίστοιχο εμβαδό της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος και στη συνέχεια η μετατροπή τους σε % ποσοστό του συνολικού εμβαδού όλων των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε ένα δείγμα. Ο αριθμός των ταυτοποιημένων ενώσεων ανήλθε στις 97 και κατηγοριοποιούνται σε αλκοόλες, αιθέρες, εστέρες, κετόνες, αλδεΐδες, οξέα, υδρογονάνθρακες, τερπενοειδή και άλλες (Lioupi, Sampsonidis et al. 2022). Οι περισσότερες από αυτές ταυτοποιούνται και στις μελέτες των Romero, García-González et al. και Morales, Aparicio-Ruiz et al. (Campeol, Flamini et al. 2001, Cerrato Oliveros, Boggia et al. 2005, Boskou, Blekas et al. 2006, Kalua, Allen et al. 2007, Kandyli, Vekiarí et al. 2011, Pouliarekou, Badeka et al. 2011, Morales, Aparicio-Ruiz et al. 2013, Romero, García-González et al. 2015). Οι ενώσεις αυτές στις περισσότερες μελέτες προσδιορίζονται με GC-MS και έχουν καθοριστικό ρόλο στο άρωμα του ελαιόλαδου και κατ'επέκταση στην ποιότητά του (Cerrato Oliveros, Boggia et al. 2005, Pouliarekou, Badeka et al. 2011, Morales, Aparicio-Ruiz et al. 2013). Οι περισσότερες από τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν ανιχνευθεί σε μελέτες τόσο σε Ιταλικά όσο και σε Ισπανικά ελαιόλαδα (Kesen, Kelebek et al. 2014).

Πίνακας 6: Περιεχόμενο (% ποσοστό) πτητικών συστατικών σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη και Κολοβή ανά περιοχή προέλευσης.

Ενώσεις	Αξιοπιστία Ταυτοποίησης ¹	Δείκτης Κατακράτησης ²	% Ποσοστό		
			Κορωνέικη	Κολοβή	
Αλκοόλες		PEL	CRE	LES	
Αιθανόλη	A	924.6	6.39	7.88	7.31
3-Πεντανόλη	A	1118.3	0.42	0.31	0.15
1-Βουτανόλη	A	1153.9	0.05	0.05	0.34
1-Πεντεν-3-ολη	A	1168.2	9.76	10.25	8.08
3-Μεθυλο-1-βουτανόλη	A	1216	0.08	0.07	0.12
1-Πεντανόλη	A	1256.3	0.32	0.29	0.3
Κυκλοπεντανόλη	B	1313.9	0.69	0.8	0.71
(Z)-2-Πεντεν-1-ολη	B	1321.5	3.35	4.42	3.53
1-Εξανόλη	A	1354.3	4.25	3.66	7.92
(E)-3-Εξεν-1-ολη	A	1363.2	0.21	0.14	0.18
(Z)-3-Εξεν-1-ολη	A	1382.3	6.77	6.16	7.44
(E)-2-Εξεν-1-ολη	B	1403.3	4.55	5.72	3.16
2-Οκτανόλη	B	1419.4	0.02	0.03	0.04
1-Οκτεν-3-ολη	A	1448.5	0.09	0.1	0.27
1-Επτανόλη	B	1454.6	0.07	0.1	0.07
2-Αιθυλο-1-εξανόλη	A	1488.4	0.14	0.05	0.12
1-Οκτανόλη	A	1560.7	0.11	0.11	0.13
1-Εννεανόλη	B	1669.6	0.12	0.09	0.03
2-Φαινυλοαιθανόλη	A	1907.9	0.52	0.49	0.48
Αιθέρες					
1-Μεθοξυ-εξάνιο	B	933.6	0.0008	0.001	0.6
(Z)-1-Μεθοξυ-3-εξένιο	C	1001.8	0.002	0.002	3.13
Εστέρες					
Οξικός μεθυλεστέρας	A	818.9	0.35	0.19	0.18
Οξικός αιθυλεστέρας	A	871.8	3.86	1.51	1.11
Βουτανικός μεθυλεστέρας	A	963	0.35	0.4	0.49
Οξικός 3-μεθυλοβουτυλεστέρας	A	1123.3	0.13	0.13	0.23
Οξικός εξυλεστέρας	A	1272.9	3.01	3.42	2.96
(E) Οξικός -3-εξενυλεστέρας	A	1314.5	12.99	11.54	8.98
Βενζοϊκός μεθυλεστέρας	B	1620.9	0.05	0.06	0.02
Σαλικυλικός μεθυλεστέρας	B	1778.5	0.11	0.11	0.21
2-Οξο-εξανοϊκός μεθυλεστέρας	B	1970.2	1.13	0.64	1.91
Κετόνες					
2-Βουτανόνη	B	886.8	0.05	0.03	0.03
3-Πεντανόνη	B	962.7	8.08	6.72	6.77
1-Πεντεν-3-όνη	B	1012	1.02	1.17	1.4
2-Επτανόνη	B	1183.3	0.04	0.07	0.25
3-Οκτανόνη	B	1254.4	0.01	0.01	0.02
Ακετοΐνη	A	1281.6	0.24	0.17	0.2
2-Οκτανόνη	B	1283.4	0.05	0.08	0.22
6-Μεθυλο-5-επτεν-2-όνη	B	1333.6	0.1	0.1	0.06
2-Εννεανόνη	B	1382.4	0.13	0.12	0.14

Ενώσεις	Αξιοπιστία Ταυτοποίησης ¹	Δείκτης Κατακράτησης ²		% Ποσοστό	
				Κορωνέικη	Κολοβή
3,5-Οκταδιεν-2-όνη	C	1514.2	0.03	0.02	0.02
5-Αιθυλοδιϋδρο-2(3H)-φουρανόνη	B	1706.4	0.06	0.05	0.02
1,4-Κυκλοεξ-2-ενδιόνη	C	1739.7	0.05	0.04	0.08
5-Αιθυλο-2(5H)-φουρανόνη	B	1762.6	0.42	0.28	0.62
Αλδεΐδες					
2-Μεθυλοβουτανάλη	B	901.5	0.3	0.35	1.32
3-Μεθυλοβουτανάλη	B	904.7	0.17	0.18	0.58
Πεντανάλη	A	963.3	0.49	0.56	0.75
Εξανάλη	A	1077.9	2.31	2.67	6.45
(Z)-2-Πεντανάλη	B	1105.1	0.07	0.11	0.12
(E)-2-Πεντενάλη	B	1127.2	0.37	0.42	0.51
(Z)-3-Εξανάλη	B	1137.7	0.44	0.57	0.88
(E)-3-Εξανάλη	B	1142.7	3.37	2.55	5.27
Επτανάλη	B	1185.1	0.08	0.11	0.09
(E)-2-Εξανάλη	B	1217.2	1.34	2.62	1.81
Οκτανάλη	A	1286.3	0.12	0.1	0.12
Εννεανάλη	B	1387.4	0.9	0.79	0.59
(E,E-) 2,4-Εξαδιενάλη	B	1394	0.27	0.23	0.42
(E,E-)2,4-Επταδιενάλη	B	1486.5	0.05	0.04	0.04
Βενζαλδεΐδη	A	1513.4	0.11	0.07	0.09
(E)-4-Οξοεξ-2-ενάλη	B	1591.7	1.86	1.03	1.95
Οξέα					
Οξικό οξύ	A	1443.4	3.08	3.71	2.74
Μεθανικό οξύ	B	1495.6	3.88	1.29	0.67
Προπανοϊκό οξύ	A	1534.3	0.12	0.14	0.11
Βουτανοϊκό οξύ	A	1630.8	0.08	0.15	0.24
3-μεθυλβουτανοϊκό οξύ	A	1676.1	0.02	0.03	0.02
Εξανοϊκό οξύ	A	1848.2	0.26	0.19	0.22
2-Αιθυλοεξανοϊκό οξύ	B	1954.4	0.04	0.02	0.02
Επτανοϊκό οξύ	B	1957	0.07	0.05	0.03
Οκτανοϊκό οξύ	A	2083.8	0.09	0.05	0.05
Νονανοϊκό οξύ	B	2174.2	0.74	0.3	0.25
Δεκανοϊκό οξύ	A	2303.3	0.01	0.01	0.01
Υδρογονάνθρακες					
κ-Οκτάνιο	A	799.8	0.2	0.2	0.13
1-Οκτένιο	B	828.8	0.047	0.06	0.03
Κυκλοαλκάνιο_946	C	946	0.28	0.42	0.37
Κυκλοαλκάνιο_953	C	953	0.25	0.37	0.33
3-Αιθυλο-1,5-οκταδιένιο (ισομερές 1)	C	1004	1.58	2.59	2.3
3-Αιθυλο-1,5-οκταδιένιο (ισομερές 2)	C	1019.3	0.62	0.91	0.78
4-Μεθυλο-2,6-οκταδιένιο	C	1074	0.93	1.55	1.32
4,8-Διμεθυλο-1,7-εννεαδιένιο	C	1080.7	1.46	2.46	2.27
Αλκένιο_1243	C	1242.6	1.12	1.32	2.01
(E)-4,8-Διμεθυλο-1,3,7-εννεατριένιο	C	1303.3	1.62	2.96	0.51
3-Αιθυλο-1,4-εξαδιένιο	C	1457.3	0.17	0.16	0.15

Ενώσεις	Αξιοπιστία Ταυτοποίησης ¹	Δείκτης Κατακράτησης ²	% Ποσοστό		
			Κορωνέικη	Κολοβή	
Ναφθαλίνο	B	1741.7	0.03	0.02	
Τερπενοειδή					
1R-α-Πινένιο	A	1010.7	0.08	0.07	
β-Thujene	B	1112.2	0.01	0.04	
D-Λιμονένιο	A	1194.1	0.05	0.02	
β-Οκιμένιο	B	1250	0.14	0.42	
ρ-Κυμένιο	A	1265	0.01	0.01	
Κοπαένιο	B	1484.3	0.03	0.04	
Σεσκισαμπινένιο	B	1646.5	0.001	0.02	
α-Φαρνεσένιο	B	1754.4	0.05	0.38	
Άλλες ενώσεις					
Διμεθυλοσουλφίδιο	B	741.3	0.03	0.04	
2-Μεθυλοφουράνιο	B	879	0.04	0.02	
2-Αιθυλοφουράνιο	B	936.3	0.1	0.11	
2-Μεθοξυφαινόλη	B	1857.4	0.02	0.04	
Βενζυλική αλκοόλη	B	1874.1	0.11	0.12	
Φαινόλη	B	2011.9	0.07	0.08	
3-Αιθυλοφαινόλη	B	2177	0.02	0.07	

¹ A: σε συμφωνία με το φάσμα μαζών και το RI της αυθεντικής ουσίας, B: διαφορά RI αγνώστου-RI βιβλιογραφίας <20 και βαθμός ομοιότητας φάσματος μαζών αγνώστου με το φάσμα της βιβλιοθήκης > 900, C: φάσμα μαζών με βαθμό ομοιότητας <900 ή/και ΔRI>20.

² Πειραματικός δείκτης κατακράτησης σε πολική στήλη (DB-WAX) βασισμένος σε κ-αλκάνια

³ PEL: Πελοπόννησος, CRE: Κρήτη, LES: Λέσβος

Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία, ενώσεις που έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάκριση παρθένων ελαιολάδων ως προς τη γεωγραφική προέλευση εμφανίζονται και στην παρούσα μελέτη. Οι βασικές από ποσοτικής άποψης ενώσεις που ανιχνεύτηκαν ήταν κατά φθίνουσα σειρά ο (E)-οξικός-3-εξενυλεστέρας, η 1-πεντεν-3-ολη, η αιθανόλη, η (Z)-3-εξεν-1-ολη και η (E)-2-εξεν-1-ολη. Οι ενώσεις αυτές βρέθηκαν ως βασικές από ποσοτική άποψη και στην μελέτη των Angerosa et al 2004 (Angerosa, Servili et al. 2004). Σε συμφωνία έρχεται και η μελέτη των Cavalli, Fernandez et al. (2003), όπου σε δείγματα γαλλικών ελαιόλαδων, ανάμεσα στις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες βρίσκονταν και όσες αναφέρθηκαν στην παρούσα μελέτη. Οι πτητικές αρωματικές ενώσεις που παράγονται από το μονοπάτι της λιποξυγενάσης συμβάλλουν επιτυχημένα στη διαφοροποίηση ποικιλιών ελαιολάδου, όπως έχει επισημανθεί και σε άλλες μελέτες (Angerosa, Basti C Fau - Vito et al. 1999, Melucci, Bendini et al. 2016, Lukić, Carlin et al. 2019) (Cavalli, Fernandez X Fau - Lizzani-Cuvelier et al. 2003). Οι ενώσεις αυτές έχουν συνδεθεί με τη διαφοροποίηση των ελαιόλαδων ως προς την γεωγραφική προέλευση και την ποικιλία. (Cavalli, Fernandez X Fau - Lizzani-Cuvelier et al. 2003). Σε μελέτη που εξέτασε ελαιόλαδα από διαφορετικές γεωγραφικές προελεύσεις, για το διαχωρισμό των ελαιόλαδων στηρίχθηκαν στην περιεκτικότητα σε (E)-2-εξενάλη και (E)-2-εξενόλη (Kesen, Kelebek et al. 2014, Hachicha Hbaieb, Kotti et al. 2016). Οι Blasi, Pollini et al. διαχώρισαν επιτυχώς 4 ποικιλίες ελαιόλαδου από την Ιταλία βασιζόμενοι στην επίσης στην (E)-2-εξενάλη και

(E)-2-εξεν-1-ολη. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία ήταν λογικό εξετάζοντας τους παράγοντες γεωγραφική προέλευση και ποικιλία στα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα να διακριθούν οι εν λόγω ενώσεις.

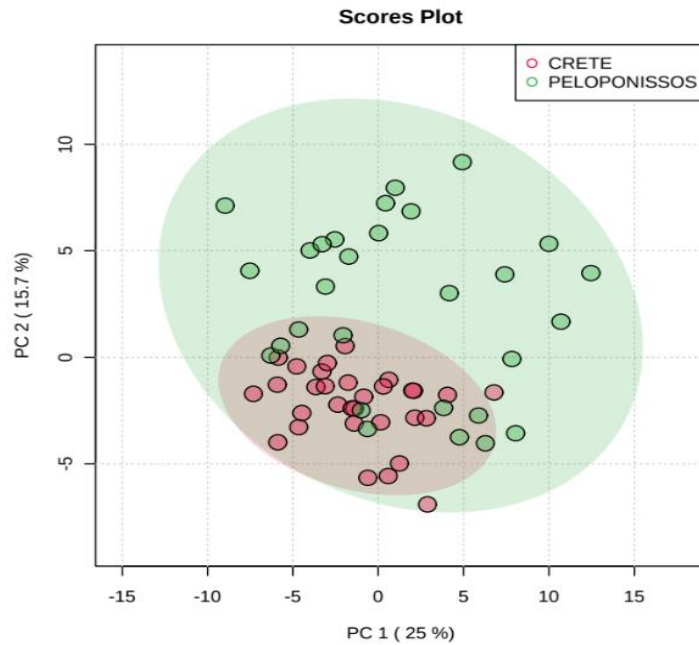
Διαφορές στα ποσοστά μεταξύ των δύο γεωγραφικών περιοχών που εξετάστηκαν (Πελοπόννησος και Κρήτη) παρουσίασαν οι ενώσεις (E)-2-εξενάλη, εξανόλη, εξανάλη, (E)-2-εξενόλη, μεθανικό οξύ και 3-πεντανόνη. Το ίδιο παρατηρήθηκε για τις συγκεκριμένες ενώσεις και σε άλλες μελέτες. Οι διαφορές που εντοπίζονται ενδέχεται να οφείλονται τόσο στις διαφορετικές ποικιλίες που εξετάστηκαν, όσο και στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές από τις οποίες προήλθαν τα δείγματα. (Youssef, Guido et al. 2011, Kosma, Vatavali et al. 2017, Cecchi, Migliorini et al. 2020). Ακόμη, παρόλο που υδρογονάνθρακες όπως το κοπαένιο και το α-φαρνεσένιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τη διαφοροποίηση ελαιολάδων από διαφορετική γεωγραφική προέλευση, στα δείγματα της παρούσας μελέτης τα ποσοστά των ενώσεων αυτών ήταν αρκετά χαμηλά (Youssef, Guido et al. 2011).

Σε μελέτη των Cavalli, Fernandez et al. (2004), όπου μελετήθηκαν 9 γαλλικά και ισπανικά παρθένα ελαιόλαδα βρέθηκε πως η (E)-2-εξενάλη ήταν η κύρια ένωση που απομονώθηκε από την SPME και χαρακτηριζε όλα τα ελαιόλαδα του πειράματος. Από τα υπόλοιπα πτητικά συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ξεχώρισαν η εξανάλη, η (Z)-3-εξενόλη, (E)-2-εξενόλη και η εξανόλη, ενώσεις οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στα δείγματα της παρούσας μελέτης, τόσο στα Πελοποννησιακά όσο και στα Κρητικά μονοποικιλιακά παρθένα ελαιόλαδα (Cavalli, Fernandez et al. 2004). Ακόμη, η παρακολούθηση της χημικής σύστασης των ελαιολάδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους έδειξε πως η (E)-2-εξενάλη μειώθηκε, ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκαν C6 αλκοόλες και C5 κετόνες. Οι τελευταίες κατηγορίες ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτης φρεσκάδας στα παρθένα ελαιόλαδα (Cavalli, Fernandez et al. 2004). Ειδικότερα, η 1-πεντεν-3-όνη ανιχνεύεται κυρίως σε ελαιόλαδα που παράγονται από άγουρες ελιές και σχετίζονται θετικά με την οξύτητα (Kalua, Allen et al. 2007). Κάποιες μελέτες έχουν συσχετίσει τη συγκεκριμένη ένωση με φρουτώδεις και ευχάριστες ιδιότητες, όμως σε άλλες αναφέρεται ως δείκτης αλλοίωσης (Baccouri, Bendini et al. 2008, Kandyliis, Vekiari et al. 2011). Στην παρούσα μελέτη η ποσότητα της βρέθηκε αρκετά χαμηλή.

Στη συνέχεια, για τη διερεύνηση και τη γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε πολυμεταβλητή ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα *Metaboanalyst*. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PCA.

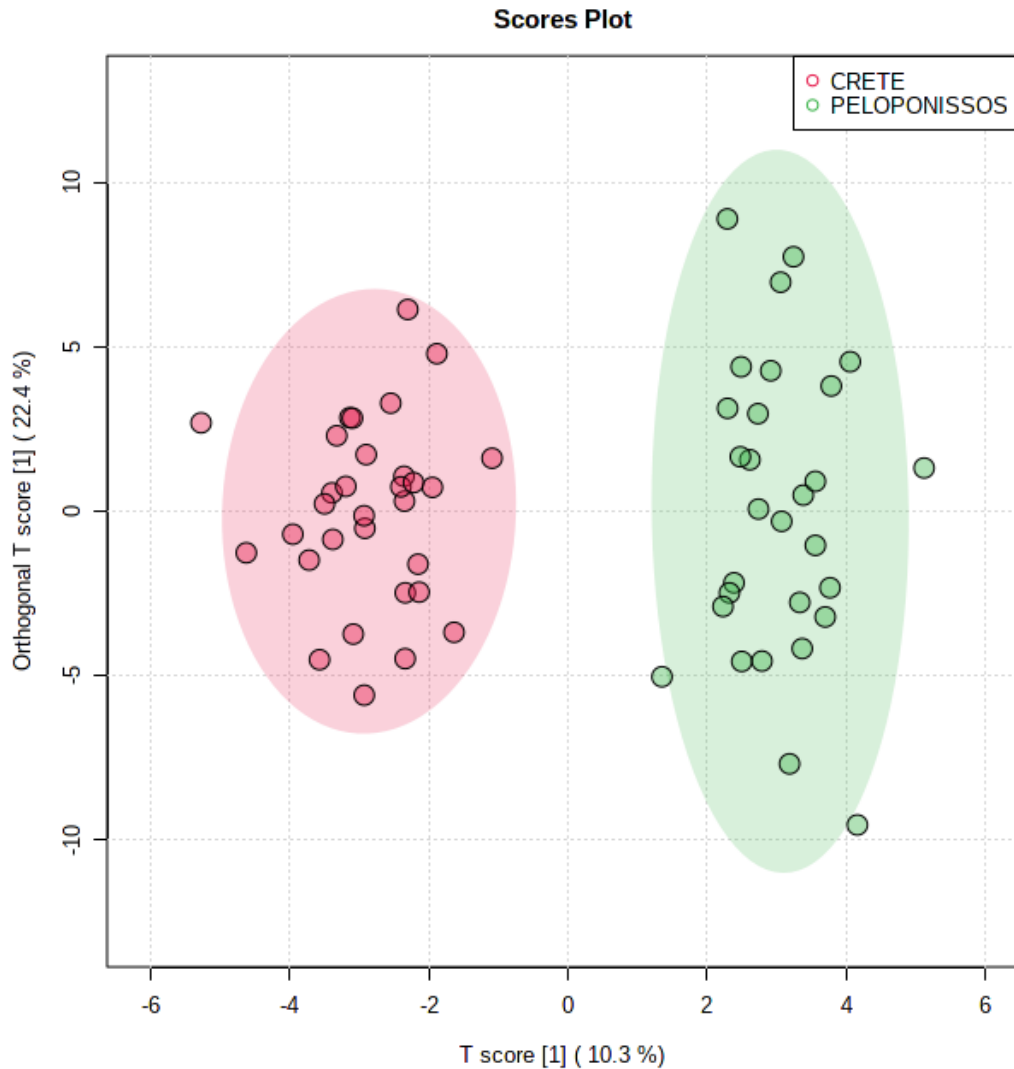
4.2 Πρώτη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου βάσει γεωγραφικής προέλευσης.

Σε πρώτη φάση επιλέχθηκαν όλα τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικης από την Πελοπόννησο και στη Κρήτη και εφαρμόστηκε η μέθοδος PCA. Στην **Εικόνα 9** παρουσιάζεται το γράφημα των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών. Φαίνεται ότι τα δείγματα της Κρήτης σχηματίζουν μια ομάδα, η οποία ωστόσο εμπεριέχεται στην ευρύτερη ομάδα των δειγμάτων της Πελοποννήσου.



Εικόνα 9: Γράφημα των βαθμών (scores plot) των δύο πρώτων κύριων συνιστωσών του μοντέλου PCA σε ελαιόλαδα της ποικιλίας Κορωνέικη από τις περιοχές Κρήτη (CRE) και Πελοπόννησο (PEL).

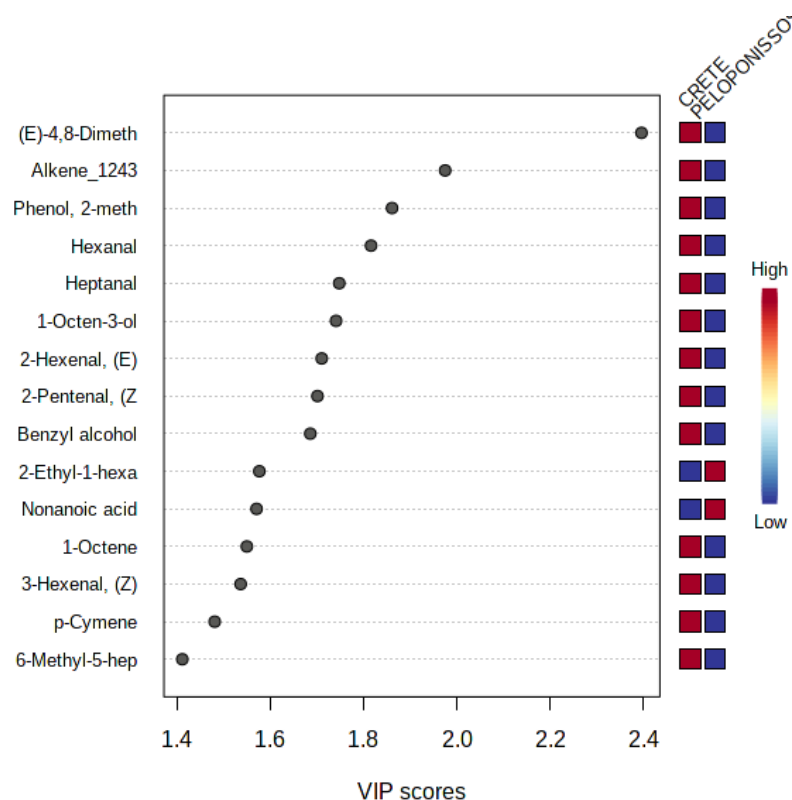
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος OPLS-DA (orthogonal projections to latent structures - discriminant analysis) (**Εικόνα 10**) βάσει της οποίας τα ελαιόλαδα της ποικιλίας Κορωνέικη διαχωρίστηκαν σαφώς στις δύο προεπιλεγμένες κλάσεις (CRETE/PELOPONISSOS).



Εικόνα 10: Γράφημα κύριων συνιστωσών του μοντέλου OPLS-DA σε ελαιόλαδα της ποικιλίας Κορωνέικη από τις περιοχές Κρήτη (CRETE) και Πελοπόννησο (PELOPONISSOS).

Παρόμοιο διαχωρισμό κατάφεραν να επιτύχουν και σε μελέτη των Kandyliis, Vekiaris et al. 2011, οι οποίοι διαχώρισαν ελαιόλαδα από την Κρήτη (δύο κατηγορίες βαθμού ωριμότητας) και την Τυνησία καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η πτητική σύνθεση των ελαιολάδων επηρεάζεται άμεσα και πρωτίστως από τη γεωγραφική προέλευση και δευτερευόντως από άλλους παράγοντες όπως ο βαθμός ωριμότητας (Kandyliis, Vekiaris et al. 2011). Σε μελέτη των Rouliarekou, Badeka et al. (2011) επιτεύχθη διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου τόσο με βάση τη γεωγραφική προέλευση όσο και με βάση την ποικιλία από την οποία προέρχονταν τα δείγματα (Rouliarekou, Badeka et al. 2011). Στη μελέτη των Kesen, Kelebek et al. (2014), όπου μελετήθηκαν παρθένα ελαιόλαδα από την Τουρκία με επιδιώκοντας το διαχωρισμό τους με βάση τη γεωγραφική προέλευση και την ποικιλία, βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο καλλιεργητικών περιοχών ως προς την περιεκτικότητα σε αλδεΐδες, οι οποίες βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ελαιόλαδα της περιοχής Bornova (Tura, Failla et al. 2013, Kesen, Kelebek et al. 2014).

Ο προαναφερόμενος διαχωρισμός των ελαιολάδων με βάση τη γεωγραφική προέλευση οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στις πτητικές ενώσεις που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 11**.



Εικόνα 11: Διάγραμμα των βαθμών VIP (variable importance in projection) στο των 15 πιο σημαντικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των ελαιολάδων. Τα τετραγωνίδια στο δεξιό κάθετο άξονα αντιπροσωπεύουν τη σχετική αφθονία κάθε ένωσης στα ελαιόλαδα από την Κρήτη και την Πελοπόννησο.

Οι πρώτες ενώσεις που δείχνουν υπεύθυνες για το διαχωρισμό των δειγμάτων ελαιολάδων είναι οι (E)-διμεθυλο-1,7-εννεατριένο, 2-μεθοξυφαινόλη, εξανάλη και επτανάλη. Οι ενώσεις αυτές αναφέρονται και σε άλλες παρόμοιες μελέτες ως ενώσεις κυρίως υπεύθυνες για το διαχωρισμό δειγμάτων ελαιολάδου με βάση τη γεωγραφική προέλευση (Cavalli, Fernandez et al. 2004). Ειδικότερα στη μελέτη των Campeol et al. 2001, μελετώντας την πτητική σύσταση 3 ποικιλιών ιταλικών ελαιολάδων, κατάφεραν να διαχωρίσουν επιτυχώς τις ποικιλίες με βάση την περιεκτικότητα σε 2-εξανάλη, επτανάλη και 2-επτενάλη, καθώς οι ενώσεις αυτές παρουσιάζονταν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα της ποικιλίας Leccino, ενώ ήταν σχεδόν απύθνη στην ποικιλία Frantoio (Campeol, Flamini et al. 2001). Όσον αφορά την εξανάλη, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βόρεια Ιταλία, εξετάζοντας δείγματα ελαιολάδου από 2 διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές της Ιταλίας (Gulf of Trieste και την περιοχή κοντά στη λίμνη Garda), οι υψηλές συγκεντρώσεις σε εξανάλη, (E)-2-εξανάλη και (Z)-3-εξανάλη κατάφεραν να διαχωρίσουν τα δείγματα της περιοχής Gulf of Trieste. Η μελέτη αυτή έδειξε πως τα επίπεδα εξανάλης, (E)-2-εξανάλης και (Z)-3-

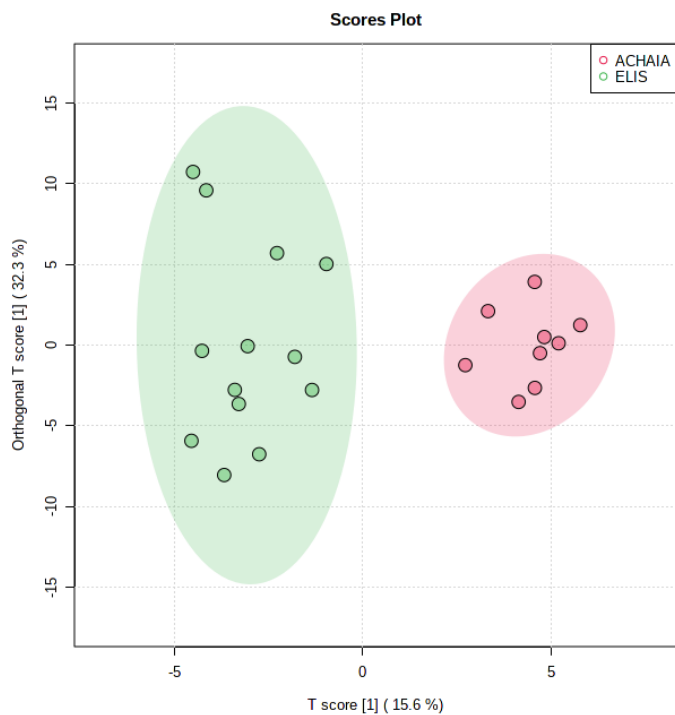
εξενάλης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων (Vichi, Pizzale et al. 2003, Ben Mansour, Chtourou et al. 2017).

Ανάμεσα στις πρώτες ενώσεις του διαγράμματος συμπεριλαμβάνονται και η (E)-2-εξενάλη και η (Z)-3-εξενάλη, ενώσεις που έχουν βρεθεί να επηρεάζουν τον παρατηρούμενο διαχωρισμό και σε άλλες παρόμοιες μελέτες (Cavalli, Fernandez et al. 2004, Youssef, Guido et al. 2011, Kesen, Kelebek et al. 2014, Ben Mansour, Chtourou et al. 2017, Kosma, Vatavali et al. 2017).

Επιπλέον, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 74 ελληνικά ελαιόλαδα της ποικιλίας Κορωνέικη από τέσσερις επιλεγμένες ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας (Μεσσηνία, Λακωνία, Ηράκλειο και Αιτωλοακαρνανία), επιτεύχθηκε διαχωρισμός των ελαιολάδων με βάση τη γεωγραφική προέλευση. Ο παρατηρούμενος διαχωρισμός στηρίχθηκε στο πτητικό προφίλ των ελαιολάδων και ειδικότερα αποδόθηκε σε αλκοόλες και αλδεΐδες C6. Και σε αυτή τη μελέτη ξεχώρισαν ενώσεις όπως (E)-2-εξενάλη, (E)-2-εξενόλη, εξανάλη και εξανόλη (Ben Mansour, Chtourou et al. 2017, Kosma, Vatavali et al. 2017). Τέλος, στα δεξιά του διαγράμματος μπορεί να παρατηρηθεί, πως η πλειονότητα των ενώσεων βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα ελαιόλαδα της Κρήτης. Λαμβάνοντας υπόψιν άλλες μελέτες, έχει αναφερθεί ότι το πτητικό προφίλ του ελαιόλαδου επηρεάζεται έντονα από την ποικιλία, τη γεωγραφική προέλευση, τον τρόπο αποθήκευσης και την ωριμότητα κατά τη συγκομιδή (Baccouri, Bendini et al. 2008).

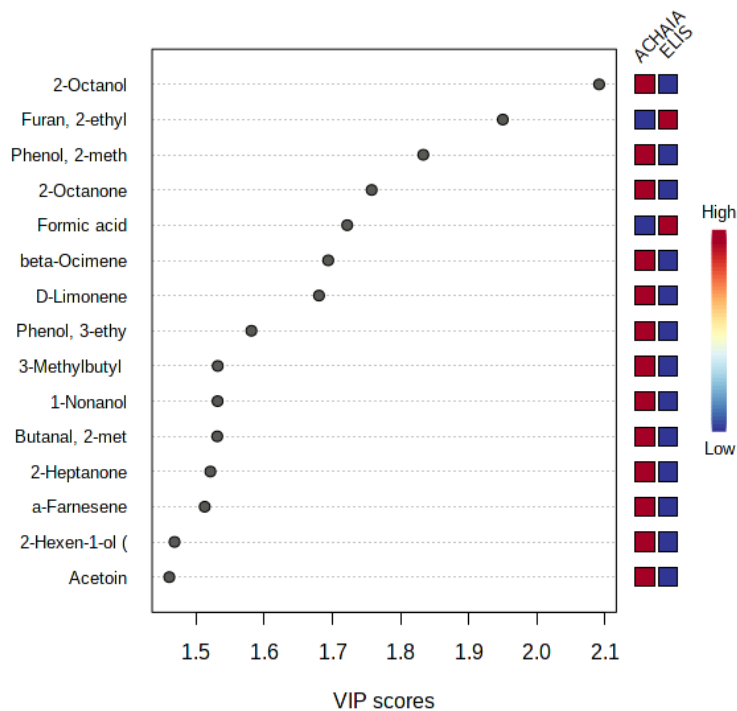
4.3 Δεύτερη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου της Πελοποννήσου βάσει υποπεριοχής

Στη δεύτερη φάση των αναλύσεων, επιλέχθηκαν τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικης από κάθε γεωγραφικό διαμέρισμα ξεχωριστά (Πελοπόννησος και Κρήτη) και εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή ανάλυση η μέθοδος PCA. Σκοπός αυτού ήταν η προσπάθεια διαχωρισμού των δειγμάτων μιας γεωγραφικής περιοχής με βάση την υποπεριοχή από την οποία προέρχονται. Τα αποτελέσματα για την Πελοπόννησο παρουσιάζονται στην **Εικόνα 12**. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν τα δείγματα του νομού Μεσσηνίας καθώς ο αριθμός τους ήταν πολύ μικρός. Στην περίπτωση της Πελοποννήσου τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, καθώς επιτεύχθηκε διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων από το νομό Αχαΐας και Ηλείας. Όπως φαίνεται στο OPLS-DA score plot της εικόνας τα δείγματα του νομού Αχαΐας και Ηλείας διαχωρίζονται επιτυχώς στις 2 προεπιλεγμένες κλάσεις (ACHAIA/ELIS).



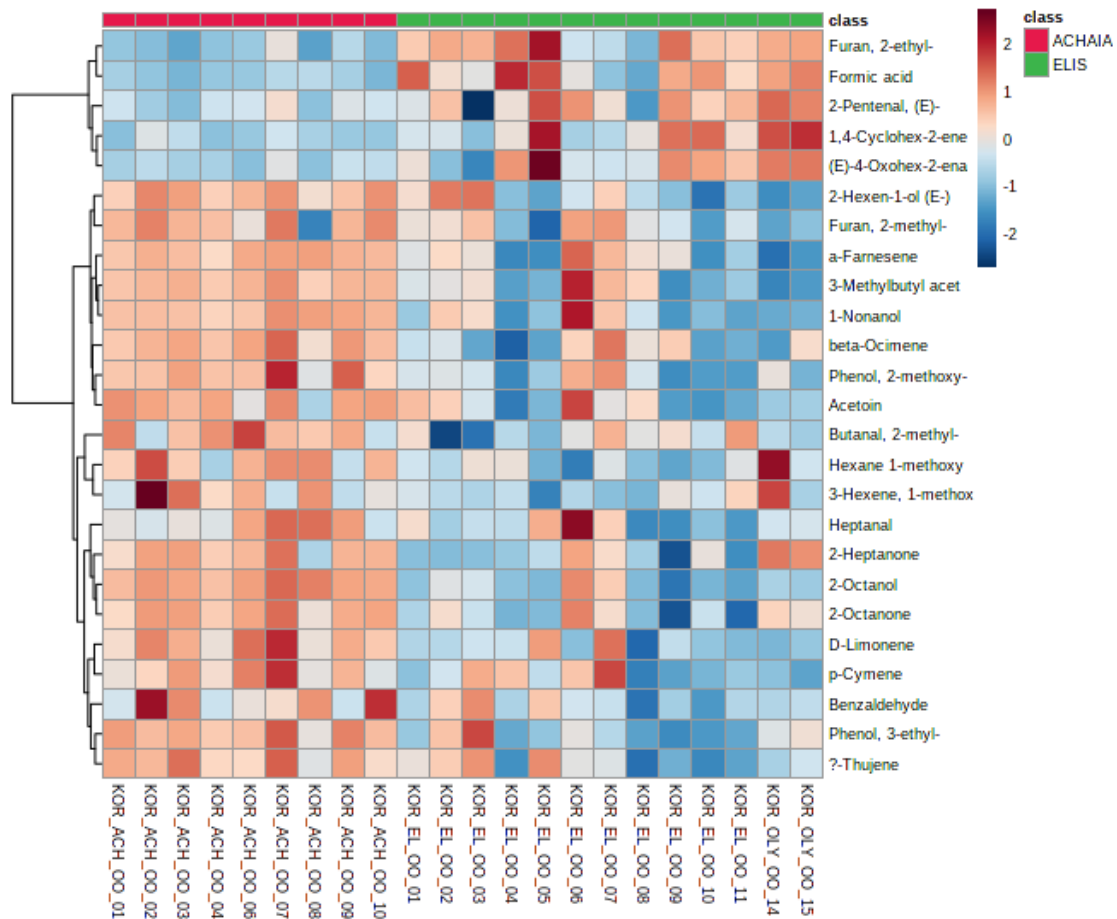
Εικόνα 12: OPLS-DA score plot των δειγμάτων ελαιολάδου από την Πελοπόννησο. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν επιτυχώς στις 2 προεπιλεγμένες κλάσεις (ACHAIA/ELIS).

Στην **Εικόνα 13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μοντέλου και σε VIP plot, όπου παρουσιάζονται οι 15 πιο σημαντικές ενώσεις που συνεισφέρουν στον διαχωρισμό των ελαιολάδων στις 2 υποπεριοχές της Πελοποννήσου. Οι ενώσεις που σε αυτή την περίπτωση παρουσιάζονται ως πιο σημαντικές για το διαχωρισμό είναι οι 2-αιθυλοφουράνιο, 2-οκτανόλη, 2-μεθυλοφαινόλη και το φορμικό οξύ.



Εικόνα 13: VIP plot των 15 πιο σημαντικών ενώσεων που συνεισφέρουν στον παρατηρούμενο διαχωρισμό των δειγμάτων ελαιολάδου στις 2 προεπιλεγμένες κλάσεις.

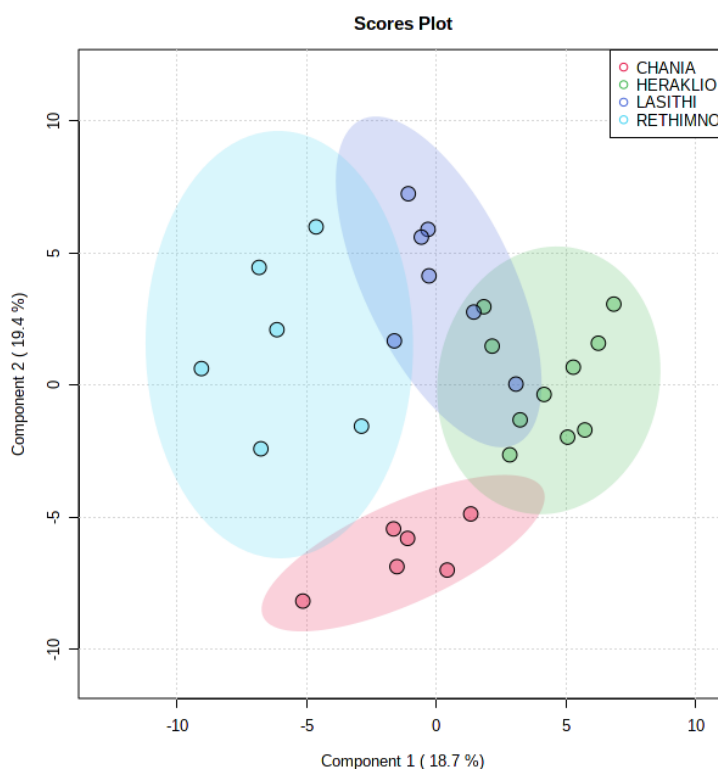
Τέλος στην **Εικόνα 14** απεικονίζεται το Heatmap των δειγμάτων και στα δεξιά οι ταυτοποιημένες ενώσεις. Παρατηρώντας τις χρωματικές διαβαθμίσεις στο Heatmap, στα δείγματα του νομού Ηλείας οι ενώσεις (E)-2-εξενόλη, 2-οκτανόλη και επτανάλη εμφανίζονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ στα δείγματα του νομού Αχαΐας σε υψηλές συγκεντρώσεις. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με τις ενώσεις 2-αιθυλοφουράνιο, φορμικό οξύ και (E)-2-πεντενάλη, οι οποίες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα του νομού Αχαΐας, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα του νομού Ηλείας. Η απεικόνιση των αποτελεσμάτων στο Heatmap επιβεβαιώνει πως οι ενώσεις που έπαιξαν σημαντικότερο ρόλο στον παρατηρούμενο διαχωρισμό μεταξύ των δειγμάτων 2 υποπεριοχών, βρίσκονται ανάμεσα σε όσες αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι ενώσεις αυτές αναφέρονται ανάμεσα σε άλλες ως υπεύθυνες για διαχωρισμούς δειγμάτων ελαιολάδου ως προς τη γεωγραφική τους προέλευση και σε άλλες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας (Campeol, Flamini et al. 2001, Baccouri, Bendini et al. 2008, Kandyliis, Vekiari et al. 2011).



Εικόνα 14: Heatmap των δειγμάτων ελαιολάδου από την Πελοπόννησο. Οι κλάσεις στα δεξιά του Heatmap με χρώμα κόκκινο και πράσινο συμβολίζουν τις 2 υποπεριοχές της Πελοποννήσου, Αχαΐα και Ηλεία αντίστοιχα. Τα τετραγωνίδια με τις διαβαθμίσεις του μπλε και κόκκινου χρώματος αποτελούν ένδειξεις της ποσότητας στην οποία κάθε ταυτοποιημένη ένωση βρίσκεται σε κάποιο δείγμα ελαιολάδου. Το μπλε και οι διαβαθμίσεις του επισημαίνουν χαμηλή ποσότητα της ένωσης στο δείγμα, ενώ του κόκκινου την υψηλή ποσότητα.

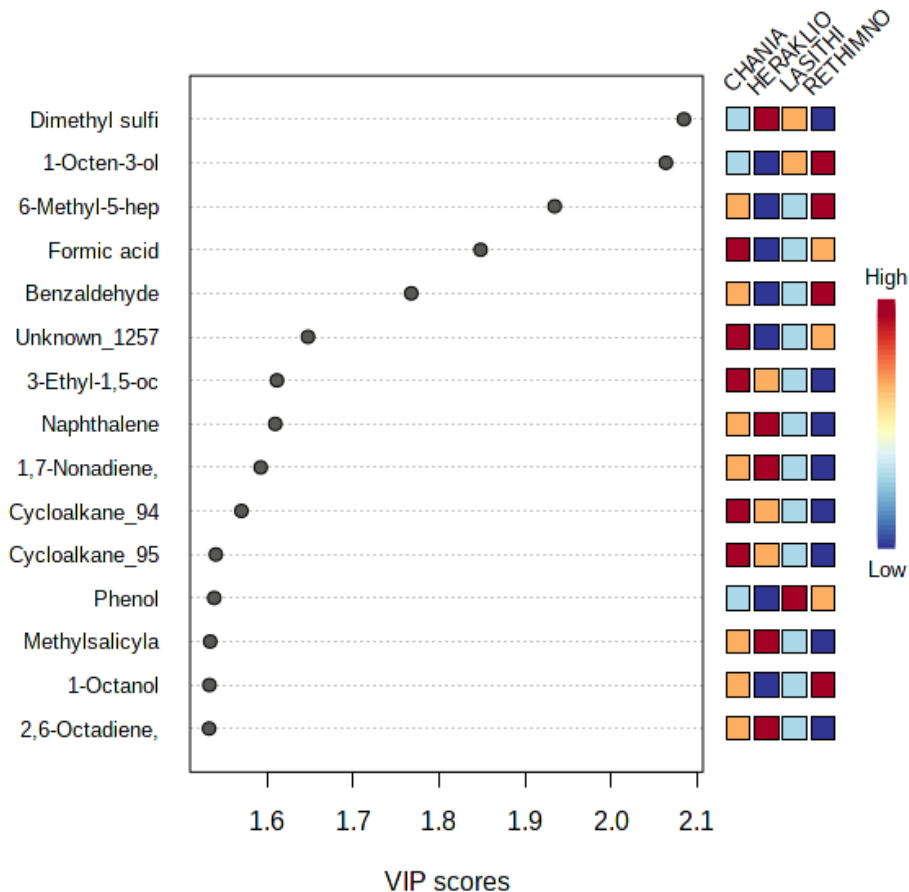
4.4 Τρίτη πολυμεταβλητή ανάλυση: Διαχωρισμός των δειγμάτων ελαιολάδου της Κρήτης βάσει υποπεριοχής

Για την τρίτη πολυμεταβλητή ανάλυση επιλέχθηκαν τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικης από την περιοχή της Κρήτης (4 νομοί) και εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή ανάλυση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στο OPLS-DA score plot της **Εικόνας 15**. Από την ανάλυση εξαιρέθηκαν τα εξευγενισμένα και τα εμφιαλωμένα ελαιόλαδα. Τα δείγματα έδειξαν να κατηγοριοποιούνται στις προεπιλεγμένες κλάσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις 4 διαφορετικές υποπεριοχές της Κρήτης.



Εικόνα 15: OPLS-DA score plot των δειγμάτων ελαιολάδου από την περιοχή της Κρήτης. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά στα 4 προεπιλεγμένες κλάσεις (CHANIA/HERAKLIO/LASITHI/RETHIMNO).

Παρόμοιο διαχωρισμό μεταξύ μονοποικιλιακών ελαιολάδων από διαφορετικές υποπεριοχές της ίδιας ευρύτερης περιοχής κατάφεραν να επιτύχουν στη μελέτη τους οι Kiralan, Ozkan et al.(2012), αφού κατάφεραν να διαχωρίσουν ελαιόλαδα της ποικιλίας Gemlik από 5 διαφορετικές γεωγραφικές ζώνες της Τουρκίας (Kiralan, Ozkan et al. 2012). Προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις που ήταν κυρίως υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο διαχωρισμό στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκε το VIP plot της **Εικόνας 16**.

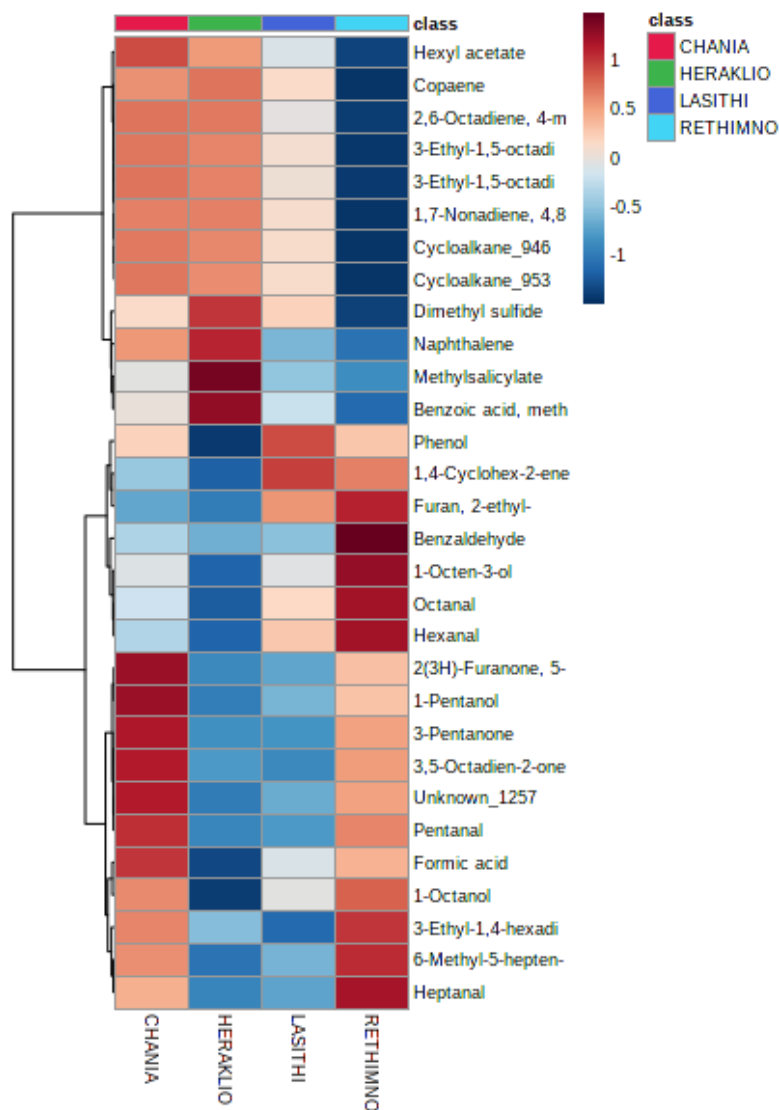


Εικόνα 16: VIP plot των 15 σημαντικότερων ενώσεων που φάνηκαν να είναι υπεύθυνες για τον παρατηρούμενο διαχωρισμό των δειγμάτων ελαιολάδου.

Οι ενώσεις που ξεχώρισαν για το ρόλο τους στον παρατηρούμενο διαχωρισμό ήταν οι διμεθυλοσουλφίδιο, 1-οκτεν-3-ολη, 6-μεθυλ-5-επτεν-2-ονη, φορμικό οξύ και βενζαλδεΐδη. Ο ρόλος των παραπάνω περιγράφεται και σε άλλες σχετικές μελέτες (Youssef, Guido et al. 2011, Lukić, Carlin et al. 2019). Σύμφωνα με τη μελέτη των Kosma; Vanoura et al.(2016), όπου μελέτησαν 74 δείγματα ελαιολάδων από 5 ελληνικές ποικιλίες, προσπάθησαν να διαχωρίσουν τις ποικιλίες με βάση το πτητικό προφίλ τους, μεταξύ των ενώσεων που συντέλεσαν στο διαχωρισμό των ποικιλιών ήταν και η βενζαλδεΐδη η οποία ανιχνεύτηκε σε 2 εκ των 5 ποικιλιών που εξετάστηκαν (Kosma, Badeka et al. 2016). Σε ακόμη μια μελέτη σε δείγματα ελαιολάδου, στο βορειοανατολικό τμήμα της Αλγερίας, παρατηρήθηκε πως η βενζαλδεΐδη βρέθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα σε ορισμένες από τις ποικιλίες που εξετάστηκαν, συνεπώς συντέλεσε στον επιτυχή διαχωρισμό τους (Cherfaoui, Cecchi et al. 2018). Στην **Εικόνα 17** παρουσιάζεται το Heatmap των δειγμάτων και στα δεξιά οι ταυτοποιημένες ενώσεις. Παρατηρώντας τις χρωματικές διαβαθμίσεις στα δεξιά, τα δείγματα ελαιολάδου από το Ρέθυμνο εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα σε 4-μεθυλο-2,6-οκταδιένιο, κοπαένιο, αιθανοϊκός εξυλεστέρα και διμεθυλοσουλφίδιο, ενώ εμφανίστηκαν σε υψηλές ποσότητες στα δείγματα από Χανιά και Ηράκλειο. Ενώσεις όπως 1-πεντανόλη, 3-πεντανόνη, πεντανάλη, 1-οκτανόλη και φορμικό οξύ

παρουσιάστηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα από Χανιά και Ρέθυμνο και σε χαμηλές στα δείγματα από Ηράκλειο και Λασιθί.

Οι ποσότητες των ενώσεων C5 έχει αναφερθεί πως επηρεάζονται από το στάδιο ωρίμανσης του ελαιόκαρπου και συμβάλλουν στις θετικές ιδιότητες του λαδιού που σχετίζονται με την αίσθηση του πικρού. Η περιεκτικότητα σε εστέρες πάντα κατά την ωρίμανση των ελιών. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των πτητικών θα μπορούσαν να προέρχονται από τις διαφορετικές δραστηριότητες των ενζύμων στα στάδια ωρίμανσης (Karagoz, Yilmazer et al. 2017). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να κριθεί η αυθεντικότητα ελαιόλαδου πρώιμης ή όψιμης συγκομιδής.



Εικόνα 17: Heatmap των δειγμάτων ελαιόλαδου από την Κρήτη. Οι κλάσεις στα δεξιά του Heatmap με 4 διαφορετικά χρώματα συμβολίζουν τις 4 υποπεριοχές της Κρήτης. Τα τετραγωνίδια με τις διαβαθμίσεις του μπλε και κόκκινου χρώματος αποτελούν ένδειξεις της ποσότητας στην οποία κάθε ταυτοποιημένη ένωση βρίσκεται σε κάποιο δείγμα ελαιόλαδου. Το μπλε και οι διαβαθμίσεις του επισημαίνουν χαμηλή ποσότητα της ένωσης στο δείγμα, ενώ του κόκκινου την υψηλή ποσότητα.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

5.1 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα σπουδαίας σημασίας προϊόν με υψηλή προστιθέμενη αξία τόσο από ιστορική αλλά και από οικονομική άποψη. Τα παρθένα ελαιόλαδα καλούνται να πληρούν αυστηρές προδιαγραφές ποιότητας και ασφάλειας, προκειμένου να διακινηθούν στην αγορά. Η ασφάλεια και το αίσθημα εμπιστοσύνης των καταναλωτών είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς τον τελευταίο καιρό ενδιαφέρονται όλο και περισσότερο για την γνησιότητα του ως προς την ποικιλία και τη γεωγραφική προέλευση.

Τα τελευταία χρόνια, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (SPME/GC-MS) έχει παρουσιάσει εκθετικά αυξανόμενη εφαρμογή στον τομέα της επιστήμης των τροφίμων. Σπουδαίας σημασίας είναι η χρήση της στον έλεγχο της ποιότητας, και την ανάλυση τεράστιας ποικιλίας τροφίμων, μεταξύ των οποίων και το ελαιόλαδο. Η αποτελεσματικότητα της παραπάνω μεθόδου στην απομόνωση και ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων που θα διαχωρίσουν τα ελαιόλαδα με βάση τη γεωγραφική προέλευσή τους αποδείχτηκε σε πληθώρα πειραμάτων με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως συνέβη και στην παρούσα μελέτη.

Με τη βοήθεια της πολυπαραγοντικής στατιστικής ανάλυσης, η ανάλυση SPME/GC-MS οδήγησε στην ταυτοποίηση ενώσεων βιοδεικτών που σχετίζονται με την ποιότητα και γνησιότητα του ελαιόλαδου και βοήθησε στον επιτυχή διαχωρισμό μεταξύ των δειγμάτων Κορωνέικης με βάση τη γεωγραφική τους προέλευση. Ενώσεις όπως η (E)-2-εξενάλη, η εξανάλη και η (Z)-3-εξενάλη αλλά και άλλες όπως ο αιθανοϊκός εξυλεστέρας, το 4,8-διμεθυλο-1,7-εννεαδιένιο, η επτανάλη, το (E)-διμεθυλο-1,7-εννεατριένο, η (E,E)-2,4-εξαδιενάλη και το εξανοϊκό οξύ αποτελούν τους σημαντικότερους δείκτες για την ιχνηλασιμότητα των ελαιόλαδων που αναλύθηκαν, ρόλος που αναφέρεται για πολλούς από αυτούς και στη διεθνή βιβλιογραφία.

Παρόλο που η μελέτη έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, περαιτέρω έρευνα στο κομμάτι των πτητικών συστατικών του ελαιόλαδου, μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων και παραλλακτικότητα (ποικιλία, γεωγραφική προέλευση, έτος σοδειάς, εφαρμοζόμενη καλλιεργητική πρακτική) μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να αναδείξει ασφαλέστερα τις διαφορές μεταξύ τους μέσω της ομαδοποίησης. Όλα τα παραπάνω, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων για τα ελληνικά παρθένα ελαιόλαδα, η οποία με συνεχείς ενημερώσεις θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στη διασφάλιση της ποιότητας και την πιστοποίησή τους.

Βιβλιογραφία

- Agrotypos. (2013). "Agrotypos News for Greece." from <http://www.agrotypos.gr/index.asp?mod=articles&id=80146>.
- Amanpour, A., H. Kelebek, S. Kesen and S. Selli (2016). "Characterization of Aroma-Active Compounds in Iranian cv. Mari Olive Oil by Aroma Extract Dilution Analysis and GC-MS-Olfactometry." Journal of the American Oil Chemists' Society **93**(12): 1595-1603.
- Angerosa, F. (2002). "Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels." European Journal of Lipid Science and Technology **104**(9-10): 639-660.
- Angerosa, F. and C. Basti (2001). "Olive oil volatile compounds from the lipoxygenase pathway in relation to fruit ripeness." Italian Journal of Food Science (Italy).
- Angerosa, F., R. Basti C Fau - Vito and R. Vito (1999). "Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some italian cultivars." (0021-8561 (Print)).
- Angerosa, F., M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto and G. Montedoro (2004). "Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality." Journal of Chromatography A **1054**(1): 17-31.
- Aparicio, R., M. T. Morales and D. L. García-González (2012). "Towards new analyses of aroma and volatiles to understand sensory perception of olive oil." European Journal of Lipid Science and Technology **114**(10): 1114-1125.
- Baccouri, O., A. Bendini, L. Cerretani, M. Guerfel, B. Baccouri, G. Lercker, M. Zarrouk and D. Daoud Ben Miled (2008). "Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils." Food Chemistry **111**(2): 322-328.
- Ben Mansour, A., F. Chtourou, W. Khbou, G. Flamini and M. Bouaziz (2017). "Phenolic and volatile compounds of Neb Jmel olive oil cultivar according to their geographical origin using chemometrics." European Food Research and Technology **243**(3): 403-418.
- Blasi, F., L. Pollini and L. Cossignani (2019). "Varietal Authentication of Extra Virgin Olive Oils by Triacylglycerols and Volatiles Analysis." Foods **8**(2).
- Boskou, D., G. Blekas and M. Tsimidou (2006). 4 - Olive Oil Composition. Olive Oil (Second Edition). D. Boskou, AOCS Press: 41-72.
- Campeol, E., G. Flamini, S. Chericoni, S. Catalano and R. Cremonini (2001). "Volatile Compounds from Three Cultivars of *Olea europaea* from Italy." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(11): 5409-5411.
- Cavalli, J.-F., X. Fernandez, L. Lizzani-Cuvelier and A.-M. Loiseau (2004). "Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers." Food Chemistry **88**(1): 151-157.
- Cavalli, J. F., L. Fernandez X Fau - Lizzani-Cuvelier, A.-M. Lizzani-Cuvelier L Fau - Loiseau and A. M. Loiseau (2003). "Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of French olive oils." (0021-8561 (Print)).
- Cecchi, L., M. Migliorini, E. Giambanelli, A. Rossetti, A. Cane, N. Mulinacci and F. Melani (2020). "Authentication of the geographical origin of virgin olive oils from the main worldwide producing countries: A new combination of HS-SPME-GC-MS analysis of volatile compounds and chemometrics applied to 1217 samples." Food Control **112**: 107156.

- Cecchi, L., M. Migliorini and N. Mulinacci (2021). "Virgin Olive Oil Volatile Compounds: Composition, Sensory Characteristics, Analytical Approaches, Quality Control, and Authentication." Journal of Agricultural and Food Chemistry **69**(7): 2013-2040.
- Cerrato Oliveros, M., R. Boggia, M. Casale, C. Armanino and M. Forina (2005). "Optimisation of a new headspace mass spectrometry instrument – Discrimination of different geographical origin olive oils." Journal of chromatography. A **1076**: 7-15.
- Cherfaoui, M., T. Cecchi, S. Keciri and L. Boudriche (2018). "Volatile compounds of Algerian extra-virgin olive oils: Effects of cultivar and ripening stage." International Journal of Food Properties **21**(1): 36-49.
- Di Donna, L., R. Mazzotti F Fau - Salerno, A. Salerno R Fau - Tagarelli, D. Tagarelli A Fau - Taverna, G. Taverna D Fau - Sindona and G. Sindona (2007). "Characterization of new phenolic compounds from leaves of *Olea europaea* L. by high-resolution tandem mass spectrometry." (0951-4198 (Print)).
- El, S. N. and S. Karakaya (2009). "Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health." Nutrition Reviews **67**(11): 632-638.
- Gómez-Rico, A., G. Fregapane and M. Salvador (2008). "Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding oils." Food Research International **41**: 433-440.
- Guth, H. and W. Grosch (1991). "A Comparative Study of the Potent Odorants of Different Virgin Olive Oils." Lipid / Fett **93**(9): 335-339.
- Hachicha Hbaieb, R., F. Kotti, M. Gargouri, M. Msallem and S. Vichi (2016). "Ripening and storage conditions of Chétoui and Arbequina olives: Part I. Effect on olive oils volatiles profile." Food Chemistry **203**: 548-558.
- Hachicha Hbaieb, R., F. Kotti, S. Vichi and M. Gargouri (2016). "Evolution of endogenous enzyme activities and virgin olive oil characteristics during Chétoui and Chemlali olive ripening: Enzymes changes and VOO quality during olive ripening." European Journal of Lipid Science and Technology **119**.
- Kaftan, A. and Y. Elmaci (2011). "Aroma Characterization of Virgin Olive Oil from Two Turkish Olive Varieties by SPME/GC/MS." International Journal of Food Properties **14**(5): 1160-1169.
- Kalogiouri, N. P., E. Kritikou, I. C. Martakos, C. Lazarou, M. Pentogennis and N. S. Thomaidis (2021). "Characterization of the Phenolic Fingerprint of Kolovi Extra Virgin Olive Oils from Lesvos with Regard to Altitude and Farming System Analyzed by UHPLC-QTOF-MS." Molecules **26**(18).
- Kalua, C. M., M. S. Allen, D. R. Bedgood, A. G. Bishop, P. D. Prenzler and K. Robards (2007). "Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review." Food Chemistry **100**(1): 273-286.
- Kandylis, P., A. S. Vekiari, M. Kanellaki, N. Grati Kamoun, M. Msallem and Y. Kourkoutas (2011). "Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting." LWT - Food Science and Technology **44**(5): 1333-1341.
- Karagoz, S. G., M. Yilmazer, G. Ozkan, Á. A. Carbonell-Barrachina, M. Kiralan and M. F. Ramadan (2017). "Effect of cultivar and harvest time on C6 and C5 volatile compounds of Turkish olive oils." European Food Research and Technology **243**(7): 1193-1200.
- Kesen, S., H. Kelebek and S. Selli (2014). "Characterization of the Key Aroma Compounds in Turkish Olive Oils from Different Geographic Origins by Application of Aroma

- Extract Dilution Analysis (AEDA)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(2): 391-401.
- Khan, Y., S. Panchal, N. Vyas, A. Butani and V. Kumar (2007). "Olea europaea: a phyto-pharmacological review." Pharmacognosy Reviews **1**(1): 114-118.
- Kiralan, M., G. Ozkan, F. Koyluoglu, H. Ugurlu, A. Bayrak and A. Kiritsakis (2012). "Effect of cultivation area and climatic conditions on volatiles of virgin olive oil." European Journal of Lipid Science and Technology **114**.
- Kosma, I., A. Badeka, K. Vatavali, S. Kontakos and M. Kontominas (2016). "Differentiation of Greek extra virgin olive oils according to cultivar based on volatile compound analysis and fatty acid composition." European Journal of Lipid Science and Technology **118**(6): 849-861.
- Kosma, I., K. Vatavali, S. Kontakos, M. Kontominas, A. Kiritsakis and A. Badeka (2017). "Geographical Differentiation of Greek Extra Virgin Olive Oil from Late-Harvested Koroneiki Cultivar Fruits." Journal of the American Oil Chemists' Society **94**(11): 1373-1384.
- Lioupi, A., I. Sampsonidis, C. Virgiliou, V. T. Papoti, K. G. Zinoviadou, A. Spyros and G. Theodoridis (2022). "Optimisation of the HS-SPME/GC-MS Approach by Design of Experiments Combined with Chemometrics for the Classification of Cretan Virgin Olive Oils." Metabolites **12**(2).
- Lukić, I., S. Carlin, I. Horvat and U. Vrhovsek (2019). "Combined targeted and untargeted profiling of volatile aroma compounds with comprehensive two-dimensional gas chromatography for differentiation of virgin olive oils according to variety and geographical origin." Food Chemistry **270**: 403-414.
- Melucci, D., A. Bendini, F. Tesini, S. Barbieri, A. Zappi, S. Vichi, L. Conte and T. Gallina Toschi (2016). "Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics." Food Chemistry **204**: 263-273.
- Messai, H., M. Farman, A. Sarraj-Laabidi, A. Hammami-Semmar and N. Semmar (2016). "Chemometrics methods for specificity, authenticity and traceability analysis of olive oils: Principles, classifications and applications." Foods **5**(4): 77.
- Morales, M. T., M. V. Alonso, J. J. Rios and R. Aparicio (1995). "Virgin Olive Oil Aroma: Relationship between Volatile Compounds and Sensory Attributes by Chemometrics." Journal of Agricultural and Food Chemistry **43**(11): 2925-2931.
- Morales, M. T., R. Aparicio-Ruiz and R. Aparicio (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. R. Aparicio and J. Harwood. Boston, MA, Springer US: 261-309.
- Morales, M. T., G. Luna and R. Aparicio (2005). "Comparative study of virgin olive oil sensory defects." Food Chemistry **91**(2): 293-301.
- Morales, M. T., J. J. Rios and R. Aparicio (1997). "Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(7): 2666-2673.
- Morales, M. T. and M. Tsimidou (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. Handbook of olive oil, Springer: 393-458.
- Oliver-Pozo, C., R. Aparicio-Ruiz, I. Romero and D. L. García-González (2015). "Analysis of Volatile Markers for Virgin Olive Oil Aroma Defects by SPME-GC/FID: Possible Sources of Incorrect Data." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(48): 10477-10483.

- Özcan, M. M. and B. Matthäus (2017). "A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves." European Food Research and Technology **243**(1): 89-99.
- Pouliarekou, E., A. Badeka, M. Tasioula-Margari, S. Kontakos, F. Longobardi and M. Kontominas (2011). "Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds." Journal of chromatography. A **1218**: 7534-7542.
- Rao, C. V., H. L. Newmark and B. S. Reddy (1998). "Chemopreventive effect of squalene on colon cancer." Carcinogenesis **19**(2): 287-290.
- Reiners, J. and W. Grosch (1998). "Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(7): 2754-2763.
- Revelou, P.-K., C. Pappa, E. Kakouri, C. D. Kanakis, G. K. Papadopoulos, C. S. Pappas and P. A. Tarantilis (2021). "Discrimination of botanical origin of olive oil from selected Greek cultivars by SPME-GC-MS and ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics." Journal of the Science of Food and Agriculture **101**(7): 2994-3002.
- Romero, I., D. L. García-González, R. Aparicio-Ruiz and M. T. Morales (2015). "Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects." (1873-3573 (Electronic)).
- Schnermann, P. and P. Schieberle (1997). "Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(3): 867-872.
- Skiada, V., P. Tsarouhas and T. Varzakas (2020). "Comparison and Discrimination of Two Major Monocultivar Extra Virgin Olive Oils in the Southern Region of Peloponnese, According to Specific Compositional/Traceability Markers." Foods **9**(2).
- Skoog, H., Crouch (1998). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη.
- Tura, D., O. Failla, D. Bassi, C. Attilio and A. Serraiocco (2013). "Regional and cultivar comparison of Italian single cultivar olive oils according to flavor profiling." European Journal of Lipid Science and Technology **115**(2): 196-210.
- Ullrich, F. and W. Grosch (1988). "Identification of the most intense odor compounds formed during autoxidation of methyl linolenate at room temperature." Journal of the American Oil Chemists' Society **65**(8): 1313-1317.
- Uncu, O. and B. Ozen (2020). "Importance of some minor compounds in olive oil authenticity and quality." Trends in Food Science & Technology **100**: 164-176.
- Vichi, S., J. M. Guadayol, J. Caixach, E. López-Tamames and S. Buxaderas (2007). "Comparative study of different extraction techniques for the analysis of virgin olive oil aroma." Food Chemistry **105**(3): 1171-1178.
- Vichi, S., L. Pizzale, L. S. Conte, S. Buxaderas and E. López-Tamames (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." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(22): 6572-6577.
- Vidal, A. M., S. Alcalá, A. de Torres, M. Moya and F. Espínola (2019). "Characterization of Olive Oils from Superintensive Crops with Different Ripening Degree, Irrigation Management, and Cultivar: (Arbequina, Koroneiki, and Arbosana)." European Journal of Lipid Science and Technology **121**(4): 1800360.
- Youssef, O., F. Guido, I. Manel, N. B. Youssef, C. P. Luigi, H. Mohamed, D. Daoud and Z. Mokhtar (2011). "Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from

Oueslati variety: Influence of geographical origin." Food Chemistry **124**(4): 1770-1776.