



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΥΓΕΙΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της προσθήκης άλατος και νερού κατά τη μάλαξη
στα φαινολικά συστατικά του παραγόμενου ελαιόλαδου

Ευαγγελία Α. Κουτλή

Επιβλέπων καθηγητής:

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της προσθήκης άλατος και νερού κατά τη μάλαξη
στα φαινολικά συστατικά του παραγόμενου ελαιόλαδου

“Effect of addition of salt and water during mashing
on the phenolic components of the produced olive oil”

Ευαγγελία Α. Κουτλή

Εξεταστική Επιτροπή:

Αθανάσιος Μαλλούχος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Χρυσανγή Γαρδέλη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μαρία Καψοκεφάλου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Επίδραση της προσθήκης άλατος και νερού κατά τη μάλαξη στα φαινολικά συστατικά του παραγόμενου ελαιόλαδου

*ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή & Υγεία
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Ανάλυσης Τροφίμων*

Περίληψη

Το ελαιόλαδο εξάγεται από τον ελαιόκαρπο της *Olea europaea* L. και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής χάρις την υψηλή θρεπτική του αξία. Τα φαινολικά του συστατικά όπως φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, φλαβονοειδή, υδροξυ-ισοχρωμάνες, σεκοϊριδοειδή και λιγνάνες συντελούν στην αναβάθμιση της ποιότητας, εμπλουτίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου και ενισχύουν την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Είναι ευρέως διαδεδομένο πώς οι συνθήκες μάλαξης έχουν αναγνωριστεί ως ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία στη διαδικασία εκχύλισης του ελαιολάδου διότι έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν την περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων. Εξαιτίας αυτού, η χρήση τεχνολογικών συμπληρωμάτων όπως το χλωριούχο νάτριο (αλάτι), και το ταλκ (MNT) μελετάται από την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα για την μεγιστοποίηση της απόδοσης της περιεκτικότητας των φαινολών στο ελαιόλαδο.

Στη παρούσα διπλωματική μελέτη, παρήχθησαν 21 δείγματα ελαιόπαστας προερχόμενα από ελαιόκαρπο ποικιλίας Κορωνέικη στα οποία προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες άλατος και νερού, σταθερή ποσότητα μικροϊνισμένου φυσικού τάλκη MNT σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου μάλαξης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολών στα δείγματα ακολουθήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC και η δοκιμή με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Στη συνέχεια με την βοήθεια στατιστικών εργαλείων, μελετήθηκε η επίδραση των παραγόντων αλάτι-νερό στο φαινολικό περιεχόμενο του τελικού προϊόντος. Προέκυψε πώς η ιδανική πειραματική συνθήκη για την συγκέντρωση των παραγόντων Άλατος και Νερού για την επίτευξη της υψηλότερης απόδοσης εκχύλισης φαινολών στο ελαιόλαδο ήταν Αλάτι 10%, Νερό 100mL σε 500g ελαιόπαστας με προσθήκη 5g MNT κατά τη διάρκεια της μάλαξης σε θερμοκρασία 30°C για χρονικό διάστημα 30min στον μαλακτήρα.

Επιστημονική Περιοχή: Ανάλυση ελαιολάδου

Λέξεις κλειδιά: Ελαιόλαδο, Φαινολικό περιεχόμενο, Αλάτι, Νερό, HPLC, αντιδραστήριο F-C

Effect of addition of salt and water during mashing on the phenolic components of the produced olive oil

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

Abstract

Olive oil is extracted from the fruit of *Olea europaea* L. and constitutes an integral part of the Mediterranean Diet due to its high nutritional value. Its phenolic components such as phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids, hydroxy-isochromans, secoiridoids, and lignans contribute to the enhancement of quality, enrich the organoleptic characteristics of olive oil, and reinforce its antioxidant capacity. It is widely recognized that milling conditions have been identified as one of the most critical points in the olive oil extraction process, as they have the ability to influence the content of phenolic compounds. Therefore, the use of natural supplements such as sodium chloride (salt), water, and talc (MNT) is being studied by the global scientific community to maximize the phenol content in olive oil.

In the present thesis study, 21 samples of olive paste were produced from the fruit of the Koroneiki variety, to which different quantities of salt and water were added, along with a constant amount of micronized natural talc (MNT) under stable temperature and milling time conditions. For the quantitative determination of phenols in the samples, the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) and the Folin-Ciocalteu reagent method were followed.

Subsequently, with the help of statistical tools, the influence of salt-water factors on the phenolic content of the final product was studied. It was found that the ideal experimental condition for concentrating salt and water factors to achieve the highest extraction yield of phenols in olive oil was 10% salt, 100mL water in 500g olive paste, with the addition of 5g MNT during milling at a temperature of 30°C for a duration of 30 minutes in the malaxer.

Scientific area: Olive oil Analysis

Keywords: Olive oil, Phenolic compound, NaCl, Water, HPLC, Folin-Ciocalteu

Δήλωση έργου

Βεβαιώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία έχει συνταχθεί από εμένα και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Σε περιπτώσεις που έχω βασιστεί σε ιδέες άλλων συγγραφέων, έχω προσπαθήσει να προσδιορίζεται επαρκώς μέσα στο κείμενο με την χρήση των αναφορών καθώς και στο τέλος της Διπλωματικής Εργασίας παρατίθεται αναλυτικά το τμήμα της βιβλιογραφίας.

Ευαγγελία Κουτλή

09/03/2024

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας αυτή την μοναδική διαδρομή της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που στάθηκαν αρωγοί καθ' όλη την διάρκεια αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα και οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ Αθανάσιο Μαλλούχο, Επίκουρο Καθηγητή στην Ανάλυση Τροφίμων στο Τμήμα Επιστήμης Τροφής και Διατροφής Ανθρώπου, για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη και την στήριξη που έδειξε στο πρόσωπό μου σε κάθε στάδιο της εργασίας μου. Συγκεκριμένα από την επιλογή του θέματος, το οποίο ανταποκρίνεται στα μαθησιακά και επαγγελματικά μου ενδιαφέροντα, μέχρι και στην άψογη επικοινωνία μας συμβουλευόντάς με συνεχώς ώστε να επέλθει η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου με απόλυτη επιτυχία.

Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να εξαιρέσω την αρωγή που μου προσέφερε η Κα Αγγελική-Ευστρατία Κουζούμη, Υπεύθυνη του Εργαστηρίου Ελαιόλαδου Μυτιλήνης, η οποία και κατά το στάδιο της πρακτικής μου και μεταγενέστερα με εμπλούτισε με πολλές γνώσεις και αρκετά συγγράμματα, τα οποία ήταν απαραίτητα, τελικώς, για την συγγραφή της παρούσας.

Τέλος, ευχαριστώ την μητέρα μου, η οποία στάθηκε δίπλα μου τόσο κατά τις Προπτυχιακές όσο και κατά τις Μεταπτυχιακές μου σπουδές, στηρίζοντας και προσφέροντάς με την ηθική συμπαράσταση σε κάθε εύκολη και δύσκολη στιγμή μου, καθώς είναι το κίνητρό μου για συνεχίσω να εξελίσσομαι διαρκώς και στην συνέχεια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract	4
Ευχαριστίες.....	6
Περιεχόμενα.....	7
Κατάλογος εικόνων	9
Κατάλογος πινάκων.....	10
Κατάλογος διαγραμμάτων	11
Θεωρητικό μέρος	12
Εισαγωγή	12
Το δέντρο της ελιάς	12
Βοτανολογικά χαρακτηριστικά.....	13
Ποικιλίες ελαιόκαρπου.....	16
Ελληνικές ποικιλίες ελαιόδεντρων.....	17
Ελαιόλαδο.....	21
Κατηγορίες ελαιόλαδου	21
Παραγωγική διαδικασία.....	22
Οφέλη στην υγεία	26
Χημική σύσταση ελαιόλαδου.....	27
Πολικά φαινολικά συστατικά ελαιόλαδου	29
Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα του φαινολικού περιεχομένου.....	30
Βοηθήματα στην εκχύλιση του ελαιόλαδου	33
Σκοπός μελέτης	36
Πειραματικό μέρος.....	37
Υλικά και μέθοδοι.....	37
Δείγματα και στάδια ελαιοποίησης	37
Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών ελαιόλαδου.....	41
Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	41
Αρχή της μεθόδου	41
Παρασκευή διαλυμάτων	42
Εκχύλιση φαινολικών συστατικών	42
Μέθοδος Folin- Ciocalteu.....	46
Αρχή της μεθόδου	46
Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	47
Αποτελέσματα	49
Υπολογισμός βιοφαινολών στο ελαιόλαδο.....	49

Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC.....	49
Δοκιμή με το αντιδραστήριο F-C.....	52
Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	54
Ανάλυση δεδομένων για την επίδραση των δύο παραγόντων στο φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου με τη μέθοδο της HPLC	54
Ανάλυση δεδομένων για την επίδραση των δύο παραγόντων στο φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου με τη μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu.....	59
Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	62
Βιβλιογραφία.....	64

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Ελαιόδεντρο, IOC	12
Εικόνα 2: Κορμός ηλικιωμένου παραγωγικού ελαιόδεντρου, CNN.....	13
Εικόνα 3: Στάδια ανάπτυξης άνθους ελιάς από την ανώριμη φάση έως την πτώση των πετάλων (2)	14
Εικόνα 4: Κλαδί ελαιόδεντρου σε πλήρη άνθηση, Mediterranean Garden Society	14
Εικόνα 5: Εγκάρσια τομή σε ελαιόκαρπο (Zeb και Murkovic 2011).....	15
Εικόνα 6: Καρπός ελιάς ποικιλίας Αδραμυττινής (International Olive Oil Council 2000)	17
Εικόνα 7: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Αμυγδαλολιάς(International Olive Oil Council 2000)	18
Εικόνα 8: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Χαλκιδικής (International Olive Oil Council 2000).....	18
Εικόνα 9: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Καλάμων (International Olive Oil Council 2000)	19
Εικόνα 10: Ελαιόκαρπος της ποικιλίας Κορωνέικη (International Olive Oil Council 2000).....	19
Εικόνα 11: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Μαστοειδούς (International Olive Oil Council 2000)	20
Εικόνα 12: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Μεγαρίτικης (International Olive Oil Council 2000)	20
Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας ελαιόλαδου (Jimenez-Lopez κ.ά. 2020).....	26
Εικόνα 14: Χημική δομή φαινόλης (Al-Khalid και El-Naas 2012)	29
Εικόνα 15: Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, (Bouhia κ.ά. 2023).....	30
Εικόνα 16: Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Phelps και Young 1997)	30
Εικόνα 17: Άλεση ελαιόκαρπων	38
Εικόνα 18: Ζύγιση ελαιόπαστας.....	38
Εικόνα 19: Προσθήκη νερού κατά την διάρκεια της μάλαξης.....	39
Εικόνα 20: Μάλαξη ελαιόπαστας.....	39
Εικόνα 21: Προετοιμασία 1ης φυγοκέντρισης.....	40
Εικόνα 22: Διαχωρισμός ελαιόλαδου από την πάστα.....	40

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Πειραματικός σχεδιασμός ελαιοποίησης	37
Πίνακας 2: Σύστημα υγροχρωματογράφου και συνθήκες ανάλυσης.....	43
Πίνακας 3: Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης.....	43
Πίνακας 4: Προσδιορισμός κορυφών φαινολικών ενώσεων στο χρωματογράφημα.....	45
Πίνακας 5:Υπολογισμός συντελεστών απόκρισης των εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης	49
Πίνακας 6:Υπολογισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιόλαδου στα 21 δείγματα με τη μέθοδο HPLC.....	51
Πίνακας 7:Υπολογισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιόλαδου στα 21 δείγματα με τη μέθοδο FC	53
Πίνακας 8 :Ανάδειξη του κατάλληλου στατιστικού μοντέλου για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC μέσω του λογισμικού Design Expert.....	54
Πίνακας 9: Έλεγχος ANOVA για την καταλληλότητα του μοντέλου παλινδρόμησης 2FI για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC.....	55
Πίνακας 10: Ανάδειξη του κατάλληλου στατιστικού μοντέλου για την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τη μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu	59
Πίνακας 11: Έλεγχος ANOVA για την καταλληλότητα του γραμμικού μοντέλου για την επεξεργασία των δεδομένων από τη μέθοδο με το αντιδραστήριο F-C	59

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.....	52
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα κανονικής κατανομής υπολοίπων για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC.....	56
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα κατανομής υπολοίπων ως προς τις προβλεπόμενες τιμές για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC.....	56
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα Box- Cox για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC.....	57
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την απόδοση της εκχύλισης ως συναρτήσει του παράγοντα αλάτι (A) και νερό (B) για την αύξηση της απόδοσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο της HPLC.....	58
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα Κανονικότητας Υπολοίπων από τη μέθοδο με αντιδραστήριο FC	60
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Κατανομής Υπολοίπων προς τις Προβλεπόμενες τιμές από τα δεδομένα που προέκυψαν από την μέθοδο με αντιδραστήριο FC.....	60
Διάγραμμα 8: Διάγραμμα Box-Cox από τα δεδομένα της μεθόδου με αντιδραστήριο FC	61
Διάγραμμα 9: Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την απόδοση της εκχύλισης ως συναρτήσει του παράγοντα αλάτι (A) και νερό (B) για την αύξηση της απόδοσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο με αντιδραστήριο FC	61

Θεωρητικό μέρος

Εισαγωγή

Το δέντρο της ελιάς

Η ελιά, συστηματική ονομασία *Olea europaea* L. ανήκει στην οικογένεια των ελαιδών Oleaceae και αποτελεί το μοναδικό είδος της Oleaceae που παράγει βρώσιμο καρπό (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Ayesha Mushtaq, Muhammad Adnan Ayub κ.ά. 2019; Dimitrios Boskou 2006). Χαρακτηρίζεται με μεγάλη ανθεκτικότητα καθώς μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχές με μικρής συχνότητας βροχοπτώσεις, βραχώδη και ιδιαίτερα άγονα χώματα (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b). Οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης του φυτού χαρακτηρίζονται ήπιες συνθήκες και συγκεκριμένα υγροί μήνες του χειμώνα και ζεστοί ξηροί εαρινοί μήνες. (Ayesha Mushtaq, Muhammad Adnan Ayub κ.ά. 2019)



Εικόνα 1: Ελαιόδεντρο, IOC

Στην βιβλιογραφία, ως κύριο χαρακτηριστικό του γένους *Olea* αναφέρεται η μακροβιότητα, για αυτό η μέγιστη παραγωγικότητα της ελιάς θεωρείται όταν το δέντρο αγγίζει τα 25-30 έτη ζωής, ωστόσο μπορεί να βλαστάνει για αιώνες και περισσότερο. Για να επιτευχθεί η διαρκής παραγωγικότητα του, ο καλλιεργητής οφείλει να πραγματοποιεί πρακτικές κλαδέματος και σε μεγάλης ηλικίας δέντρα συνιστάται το κλάδεμα σε συνδυασμό με κορμοτομή (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Ozturk κ.ά. 2021).

Ιστορικά φαίνεται πως το δέντρο της ελιάς καλλιεργείται στη Μεσόγειο πριν από περίπου 5.000-6.000 χρόνια. Ορισμένες πηγές αναφέρουν πως και στη Συρία, την Ινδία και την Μικρά Ασία η ελιά βρίσκεται τόσα χρόνια πριν (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a; Γεώργιος Δ. Μπαλατσούρας 2004; Polymerou-Kamilakis 2006). Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιοκομίας (International Olive Council, IOC) φαίνεται πως το ελαιόδεντρο πλέον έχει ταξιδέψει και πέραν της Μεσογείου, προς τα βάθη της Ανατολής και συγκεκριμένα πως καλλιεργείται στην Νότια Αφρική, την περιοχή της Κίνας και της Ιαπωνίας καθώς και της Αυστραλίας (International Olive Oil Council χ.χ.-b)

Βοτανολογικά χαρακτηριστικά

Η ελιά αποτελεί ένα είδος μικρού αειθαλούς δέντρου (Ozturk κ.ά. 2021). Το πυκνό φύλλωμα αποτελείται από βραχύ μίσχο, ανανεώνεται ανά τα χρόνια και χαρακτηριστικό του είναι το ανοιχτό πράσινο χρώμα στο πάνω μέρος του ενώ στο κάτω φέρει ασημένιους τόνους με τριχίδια για να αποφεύγεται η απώλεια της υγρασίας. Ο κορμός του δέντρου χαρακτηρίζεται από το κυλινδρικό και τραχύ σχήμα του. Τα εξογκώματα στο σώμα του μπορούν να φανερώσουν την ηλικία του καθώς αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα των ηλικιωμένων δέντρων ενώ οι κοιλότητες σηματοδοτούν την προσβολή από μικροοργανισμούς όπως μύκητες (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Hashmi κ.ά. 2015; Kiritsakis και Markakis 1988).



Εικόνα 2: Κορμός ηλικιωμένου παραγωγικού ελαιόδεντρου, CNN

Τα άνθη του ελαιόδεντρου περιγράφονται μικρά σε μέγεθος με κρεμ λευκό ή κιτρινοπράσινο χρώμα, μονοπέταλα και εμφανίζονται κυρίως σε βλαστούς του προηγούμενου έτους κατά την περίοδο της άνοιξης και συγκεκριμένα τον Μάιο (9). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τα τέλεια και τα ατελή ανάλογα τους στημόνες και τον ύπερο και εξαρτώνται ποσοτικά από την ποικιλία καθώς και τις καιρικές και περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την διάρκεια της χρονιάς (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007α; Hashmi κ.ά. 2015).

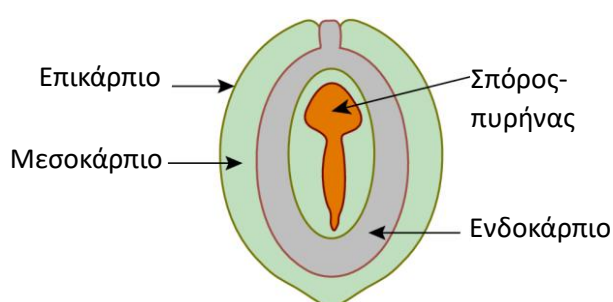


Εικόνα 3: Στάδια ανάπτυξης άνθους ελιάς από την ανώριμη φάση έως την πτώση των πετάλων (2)



Εικόνα 4: Κλαδί ελαιόδεντρου σε πλήρη άνθηση, Mediterranean Garden Society

Ο ελαιόκαρπος χαρακτηρίζεται ως πυρηνόκαρπος (δρύπη) και το σχήμα του είναι ωοειδές συνήθως με μυτερό άκρο. Το χρώμα του στην άγουρη μορφή του καρπού παρατηρείται ανοιχτό πράσινο και καταλήγει σε μαύρο-μπορντό στην πλέον ώριμη φάση συνήθως τέλη φθινοπώρου με αρχές χειμώνα όπου πραγματοποιείται η διαδικασία της συγκομιδής (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007α; Hashmi κ.ά. 2015). Ο καρπός απαρτίζεται από τρία μέρη, το επικάρπιο ή επιδερμίδα, το μεσοκάρπιο το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο βάρος του ελαιόκαρπου και το ενδοκάρπιο ή πυρήνας (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007).



Εικόνα 5:Εγκάρσια τομή σε ελαιόκαρπο (Zeb και Murkovic 2011)

Ο καρπός της ελιάς αναφέρεται ως πλούσιος σε συστατικά τα οποία έχουν την τάση να μεταβάλλονται σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης του. Το κύριο συστατικό του είναι το νερό καθώς αποτελεί το 70% του βάρους του. Το υπόλοιπο μέρος της σάρκας σε ένα ποσοστό του 20% αποτελείται από το ελαιόλαδο, τα τρία σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη και τα οργανικά οξέα κιτρικό, μηλικό και οξαλικό, συστατικά τα οποία διαφοροποιούνται ποσοτικά ανάλογα την ποικιλία της ελιάς, της καλλιεργήσιμη περιοχή, το έτος και τη φάση ωρίμανσης του ελαιόκαρπου. Στον καρπό βρίσκονται και κόμμεα- ρητίνες, ανόργανα συστατικά, ταννίνες και ελευρωπαΐνη, η οποία συναντάται σε όλο το μήκος του ελαιόδεντρου και είναι υπεύθυνη για την απόδοση του πικρού (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Sánchez κ.ά. 2021).

Ο ελαιόκαρπος της ποικιλίας ελιάς στον οποίο περιέχεται μικρή ποσότητα ελαιολάδου και μεγάλη ποσότητα σακχάρων αξιοποιείται τις περισσότερες φορές ως βρώσιμες ή επιτραπέζιες ελιές. Αντιθέτως ποικιλία ελιάς με μεγάλη ποσότητα ελαιολάδου, γίνεται χρήση της για ελαιοποίηση και στην περίπτωση αυτή, ο καρπός βρίσκεται συνήθως σε μεσαίο

μέγεθος. Ωστόσο είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι μία ποικιλία μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως βρώσιμη είτε ως ελαιοποιήσιμη, διπλού σκοπού (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007).

Ποικιλίες ελαιόκαρπου

Η ποικιλία του καρπού της ελιάς είναι άρρικτα συνδεδεμένη με την ποιότητα του ελαιόλαδου και συγκεκριμένα τις οργανοληπτικές του ιδιότητες όπως το άρωμα και την γεύση (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007). Παγκοσμίως υπολογίζεται πως οι ποικιλίες που καλλιεργούνται ανέρχονται τις 600, αριθμός ο οποίος δύσκολα συναντάται σε άλλα είδη φυτών (Γεώργιος Δ. Μπαλατσούρας 2004).

Στην Ελλάδα, πρωτοπόρος στην κατηγοριοποίηση της ελιάς στάθηκε ο Καθηγητής Δεντροκομίας Πάνος Αναγνωστόπουλος, ο οποίος χρησιμοποίησε ως κύριο παράγοντα ταξινόμησης το βάρος του ελαιοκάρπου συμπεριλαμβανομένων και των χαρακτηριστικών των φύλλων, του βλαστού, του άνθους και του πυρήνα. Ως αποτέλεσμα προέκυψε ο διαχωρισμός 38 ποικιλιών σε μικρόκαρπες, μεσόκαρπες και αδρόκαρπες (Δημήτριος Παπαναστασίου 1966; Πάνος Θ. Αναγνωστόπουλος 1940). Στην συνέχεια ακολούθησαν και άλλοι διαχωρισμοί όπως για παράδειγμα του Νικόλαου Λύχνου, ο οποίος ταξινόμησε τις ελληνικές ποικιλίες ελιάς στηριζόμενος στη μορφολογία και τις ιδιαιτερότητες του πυρήνα του ελαιόκαρπου και του φυλλώματος, παράγοντες που σπανίως διαφοροποιούνται από το περιβάλλον και επομένως συνήθως μένουν σταθεροί. Από τον διαχωρισμό 42 ποικιλιών, ανέκυψαν τρεις κατηγορίες, μικροπύρηνες με πυρήνα βάρους 0,16-0,35g, μεσοπύρηνες με 0,35-0,65g και μακροπύρηνες 0,65-1,3g (Νικόλαος Δ. Λύχνος 1949).

Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, τα κριτήρια για την κατηγοριοποίηση της ποικιλίας της ελιάς εξαρτώνται από

- Τα χαρακτηριστικά του ελαιόδεντρου όπως το μέγεθος και το ύψος
- Χαρακτηριστικά όπως η μορφολογία του φυλλώματος και των ανθών
- Τα χαρακτηριστικά του ελαιόκαρπου και η αναλογία σάρκας-πυρήνα
- Ωρίμανση και απόδοση ελιάς
- Μικροβιολογική αντοχή
- Προσαρμοστική ικανότητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες και αλλαγές
- Αξιοποίηση δεικτών DNA για την ανάλυση και διάκριση ποικιλίας ελιάς (Ioannis Nikolaos Therios 2009)

Ελληνικές ποικιλίες ελαιόδεντρων

Στην Ελλαδικό χώρο συναντώνται περισσότερες από 32 ποικιλίες ελιάς. Ανάμεσα τους, οι πιο αναγνωρίσιμες και με απόδοση υψηλής ποιότητας ελαιολάδου αναφέρονται η Κορωνέικη, η Κολοβή και η Μαστοειδής. (Ioannis Nikolaos Therios 2009)

Προς το στάδιο της ωρίμανσης, ο ελαιόκαρπος μεταβάλλει το χρώμα του από πράσινο σε ερυθρό και έπειτα μαύρο. Η συγκομιδή ορισμένων επιτραπέζιων ελιών λαμβάνει χώρα στο πράσινο χρώμα όταν ο ελαιόκαρπος έχει το επιθυμητό μέγεθος. Ωστόσο, αναλόγως την ποικιλία παρατηρείται και χρήση της ελιάς στο πιο ώριμο στάδιο της στο οποίο η σάρκα έχει αποκτήσει πλέον μαύρο χρώμα (International Olive Oil Council χ.χ.-).

- Αδραμυτινή ή Αδραμυτιανή

Γνωστή και με τους χαρακτηρισμούς Αϊβαλιώτικη, Φραγκολιά, Μυτιληνιά και Περαϊκή. Η ποικιλία καλύπτει περίπου 20% της ελαιοκομικής έκτασης της Λέσβου και συναντάται και στα νησιά της Χίου και της Εύβοιας. Η απόδοση της παραγωγής αναφέρεται ως μέτρια και εναλλασσόμενη ενώ το ελαιόλαδο που παράγεται χαρακτηρίζεται ως υψηλής ποιότητας. Το δέντρο της είναι ευαίσθητο σε προσβολές από μύγες της ελιάς και δεν παρουσιάζει υψηλή ανθεκτικότητα στις κρύες συνθήκες (International Olive Oil Council 2000) .



Εικόνα 6: Καρπός ελιάς ποικιλίας Αδραμυτινής (International Olive Oil Council 2000)

- Αμυγδαλολιά

Εναλλακτική ονομασία, Ισπανική, Κουρουμύτα και Στραβομύτα. Καλλιεργείται στις περιοχές της Αττικής και της Φωκίδας και αναφέρεται ως διπλού στόχου. Ως επιτραπέζια ελιά χρησιμοποιείται στην πράσινη μορφή της ενώ ως ελαιοποιήσιμη, η επίδοση της παραγωγικά χαρακτηρίζεται μέτρια και υφίσταται διακυμάνσεις (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 7: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Αμυδαλολιάς (International Olive Oil Council 2000)

- Χαλκιδικής

Συνώνυμη ονομασία Χονδρολιά Χαλκιδικής. Από το όνομα, μαρτυράται και η θέση της, Χαλκιδική στην οποία η ποικιλία φαίνεται να ευδοκμεί. Χρησιμοποιείται περισσότερο ως επιτραπέζια ελιά καθώς αποδίδει μέτρια παραγωγή σε ελαιόλαδο. Το είδος αυτό παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στο ψύχος και στη ξηρασία (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 8: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Χαλκιδικής (International Olive Oil Council 2000)

- Καλαμών

Η συγκεκριμένη ποικιλία φέρει και τις ονομασίες Αετονυχολιά, Χονδρολιά και Καλαματιανή. Εντοπίζεται στις περιοχές της Πελοποννήσου, Μεσσηνία και Λακωνία, και στη Λαμία. Αναφέρεται πως περίπου το 15-20% τη συνολικής παραγωγής βρώσιμης ελιάς της Ελλάδας, καλύπτεται από την ποικιλία των Καλάμων και φέρει το χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Όσο αφορά το ελαιόλαδο, παράγεται υψηλής ποιότητας αλλά σε κανονική ποσότητα. Επιπρόσθετα, τα ελαιόδεντρα χαρακτηρίζονται με μεγάλη αντοχή σε κρύες θερμοκρασίες αλλά μεγάλη ευαισθησία στις υψηλές (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 9: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Καλάμων (International Olive Oil Council 2000)

- Κορωνέικη

Εναλλακτική ονομασία Κορώνι, Κρητικιά, Λαδολιά και Ψιλολιά. Η ποικιλία αυτή βρίσκεται στην περιοχή της Πελοποννήσου, του νησιού της Ζάκυνθου, της Κρήτης και της Σάμου. Πρόκειται για ελαιοποιήσιμη ελιά καθώς καλύπτει το 50-60% της συνολικής εθνικής παραγωγής με υψηλής ποιότητας ελαιόλαδο πλούσιο σε ελαϊκό οξύ (C18:1). Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στα ξηρά κλίματα σε αντίθεση με τα ψυχρά. Για το λόγο αυτό σε περιοχές όπως της Κρήτης, σε μεγάλα υψόμετρα, η ποικιλία αυτή έχει αντικατασταθεί από την Μαστοειδή ποικιλία (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 10: Ελαιόκαρπος της ποικιλίας Κορωνέικη (International Olive Oil Council 2000)

- Μαστοειδής

Γνωστή και ως Αθηνολιά ή Τσουνάτη. Εντοπίζεται κυρίως στην Πελοπόννησο και την Κρήτη. Παρουσιάζει μεγάλη αντοχή στο κρύο και λιγότερη στις ξηρές θερμοκρασίες για το λόγο αυτό μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγάλα υψόμετρα όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Η ποικιλία ανήκει και στις βρώσιμες ελιές καθώς καλύπτει ένα ποσοστό της παραγωγής μαύρων

ελιών σε άλμη και στις ελαιοποιήσιμες καθώς αποδίδει ελαιόλαδο υψηλής ποιότητας (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 11: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Μαστοειδούς (International Olive Oil Council 2000)

- Μεγαρίτικη

Εναλλακτική ονομασία Λαδολιά και Περαχωρατική. Καλλιεργείται στις περιοχές της Αττικής, της Βοιωτίας καθώς και της Πελοποννήσου και ταξινομείται ως επιτραπέζια και ελαιοποιήσιμη ποικιλία. Ως βρώσιμη χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινου και μαύρου τουρσιού ελιάς ενώ το λάδι που παράγεται αποδίδεται ως μέτριας προς υψηλή ποιότητας. Η ποικιλία φαίνεται να έχει υψηλή αντοχή έναντι των ξηρών συνθηκών και χαμηλότερη προς των κρύων (International Olive Oil Council 2000).



Εικόνα 12: Ελαιόκαρπος ποικιλίας Μεγαρίτικης (International Olive Oil Council 2000)

Ελαιόλαδο

Από την παραγόμενη διεθνώς ετήσια ποσότητα ελιών, η ποσότητα η οποία καταναλώνεται ως βρώσιμη ελιά είναι αρκετά μικρή καθώς η παραγωγή ελαιολάδου είναι ο κλάδος ο οποίος αξιοποιεί το μεγαλύτερο μέρος αυτής. Στον παγκόσμιο χάρτη οι πρώτες τρεις χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή ελαιόλαδου χαρακτηρίζονται η Ισπανία, η Ελλάδα και η Ιταλία (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007).

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ως ελαιόλαδο αναφέρεται το έλαιο το οποίο εξάγεται από τον ελαιόκαρπο της *Olea europaea* L. με μηχανικά μέσα και μεθόδους ή φυσικές μεθόδους επεξεργασίας σε θερμοκρασίες οι οποίες δεν αλλοιώνουν το τελικό προϊόν (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009)

Κατηγορίες ελαιόλαδου

Παρθένο ελαιόλαδο

Πρόκειται για έλαια τα οποία λαμβάνονται από τον καρπό της ελιάς με μηχανικές ή φυσικές μεθόδους κυρίως κάτω από θερμικές συνθήκες, χωρίς να αλλοιώνεται το προϊόν και χωρίς λοιπές επεξεργασίες. Στην περίπτωση αυτή εξαιρούνται έλαια τα οποία μπορεί να λαμβάνονται έπειτα από επεξεργασία ή μίγματα ελαίων (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2009) , στην κατηγορία αυτή ανήκει το

- Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO)

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η μέγιστη δυνατή τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ είναι 1 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

- Παρθένο ελαιόλαδο (VOO)

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η μέγιστη δυνατή τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ είναι 2 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

- Κοινό παρθένο ελαιόλαδο (OO)

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η μέγιστη δυνατή τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ είναι 3,3 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

- Μειονεκτικό ελαιόλαδο (LAMPANTE)

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ ξεπερνάει το 3,3 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

Εξευγενισμένο ελαιόλαδο (ραφινέ)

Ελαιόλαδο το οποίο προκύπτει από την διαδικασία του εξευγενισμού παρθένων ελαιολάδων και του οποίου η τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ είναι κατώτερη του 0,5 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

Ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο το οποίο προέρχεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένου και του οποίου η τιμή της οξύτητας εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ είναι κατώτερη του 1,5 g ανά 100 g και του οποίου τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με αυτά που ορίζει η νομοθεσία (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009).

Παραγωγική διαδικασία

Παραλαβή ελαιόκαρπου

Μετά την διαδικασία της συγκομιδής, οι ελαιόκαρποι μεταφέρονται στο ελαιοτριβείο μέσω ειδικών τελάρων ή τσουβαλιών τα οποία επιτρέπουν τον αερισμό του καρπού, με σκοπό να ξεκινήσουν οι διαδικασίες για την παραγωγή ελαιολάδου. Σε περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί άμεσα η κατεργασία των καρπών τότε είναι αναγκαίο να αποθηκευτούν για βραχύχρονο διάστημα σε κατάλληλο χώρο. Κατά την προσέλευση του καρπού στο ελαιοτριβείο, είναι σημαντικό να διαχωρίζεται ανάλογα με την ποικιλία, την μέθοδο συγκομιδής δηλαδή αν ο καρπός προέρχεται από το δέντρο ή από το έδαφος και τέλος την εξωτερική του κατάσταση, όπως για παράδειγμα αν είναι προσβεβλημένος από κάποια ασθένεια. Το στάδιο αυτό είναι υψίστης σημασίας διότι διαμορφώνει την σειρά επεξεργασίας των καρπών στο ελαιοτριβείο, καθώς είναι σημαντικό η παραγωγή να ξεκινάει από το υψηλής ποιότητας ελαιόλαδο, το οποίο προέρχεται από υγιείς καρπούς (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Petrakis 2006).

Αποφύλλωση και πλύσιμο ελαιόκαρπου

Η παραγωγική διαδικασία ξεκινάει για κάθε είδους ελαιολάδου από την λεκάνη τροφοδοσίας η οποία οδηγεί τους ελαιόκαρπους στο αποφυλλωτήριο για την επιτυχή απομάκρυνση του φυλλώματος και των μεγάλων ξένων σωμάτων. Είναι σημαντικό να μην παραμείνει μεγάλη ποσότητα φυλλώματος καθώς μπορεί να αλλοιωθεί η ποιότητα του ελαιόλαδου

εμπλουτίζοντας το με χλωροφύλλη αλλά ένα μικρό ποσοστό περίπου 3% καθώς θα το αναβαθμίσει σε φαινόλες, φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιόλαδου. Ύστερα ακολουθεί η πλύση των ελαιοκαρπων όπου εκεί το νερό παρασύρει τις σκόνες και τα υπολείμματα χρωμάτων παρεμποδίζοντας έτσι τυχόν ίχνη φυτοφαρμάκων καρπούς (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Petrakis 2006).

Σπάσιμο και άλεση ελαιοκάρπου

Στη συνέχεια, ο καθαρός καρπός μεταφέρεται στον σπαστήρα για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της άλεσης, το πρώτο στάδιο επεξεργασίας για την παραγωγή ελαίου. Πλέον οι πιο διαδεδομένοι είναι οι μεταλλικοί σπαστήρες που τείνουν να αντικαταστήσουν τους μεταλλικούς μύλους λόγω του μικρότερου μεγέθους και κόστους τους, της υψηλότερης απόδοσης και της ικανότητας αδιάκοπης λειτουργίας και ευχέρειας καθαρισμού τους. Από τον σπαστήρα προκύπτει ένα προϊόν, η ελαιοζύμη (ή ελαιόπαστα) από την οποία στη συνέχεια διαχωρίζεται και παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a; Petrakis 2006; Servili και Montedoro 2002).

Μάλαξη ελαιόπαστας

Στο στάδιο της μάλαξης, η ελαιοζύμη τοποθετείται σε ειδικούς μαλακτήρες από τους οποίους κινείται μέσω των τοιχωμάτων τους ζεστό νερό με σκοπό της θέρμανση της (περίπου 27°C). Είναι σημαντικό ο μαλακτήρας να είναι κλειστός με σκοπό την αποφυγή επαφής του ατμοσφαιρικού αέρα με την ελαιόπαστα διότι στην περίπτωση αυτή μπορεί να σημειωθούν απώλειες στα αρώματα του ελαιόλαδου και να προκληθεί οξειδωτική τάγγιση (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007). Στον μαλακτήρα προστίθεται επίσης και νερό ανάλογα με τη ποσότητα της πάστας πριν την διαδικασία της φυγοκέντρισης. Στο σημείο αυτό τα κύρια συστατικά της ελαιοζύμης μετά το μαλακτήρα είναι το ελαιόλαδο, κομμάτια από τον πυρήνα της ελιάς, νερό και υπολείμματα κυττάρων (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; H. Ouazzane κ.ά. 2017; Petrakis 2006)

Πρακτικές ελαιοποίησης

Μέθοδος Πίεσης

Η πίεση αποτελεί την πιο παραδοσιακή τεχνική εκχύλισης του ελαιόλαδου. Στο συγκεκριμένη διαδικασία ασκείται ασυνεχής πίεση στην ελαιοζύμη με σκοπό την διαμόρφωση μιας υγρής φάσης η οποία αποτελείται από νερό και ελαιόλαδο. Τα υπολείμματα της πάστας (στερεή φάση) απομακρύνονται για να ξηρανθούν και να αξιοποιηθούν για την παραγωγή πυρηνελαίου. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος των μηχανημάτων, [ελαιοδιαφράγματα (ντορμπάδες)], χαμηλή ανάγκη σε ενέργεια και εξασφάλιση ποιοτικού ελαιόλαδου όταν προέρχεται από υγιείς καρπούς και επιμελώς καθαρά μηχανήματα. Ωστόσο,

το εργατικό δυναμικό ανυψώνει το κόστος και οι κίνδυνοι αλλοίωσης της ποιότητας του ελαιόλαδου όπως η ύπαρξη ανεπιθύμητων ουσιών 2-μεθυλοπροπανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη και οξικό οξύ, αποτέλεσαν μειονεκτήματα της μεθόδου και λόγοι αντικατάστασης των μηχανημάτων πίεσης από διπλής και τριπλής φυγοκέντρισης (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; H. Ouazzane κ.ά. 2017; Petrakis 2006).

Μέθοδος Φυγοκέντρισης

Η φυγοκέντριση αποτελεί την πλέον διαδεδομένη μέθοδο στη βιομηχανία ελαιόλαδου. Από τους μαλακτήρες, η ελαιοζύμη αραιώνεται με νερό και έπειτα τοποθετείται σε φυγόκεντρος (decanter, διαχωριστήρας) τριών φάσεων για τον διαχωρισμό του ελαιόλαδου, του νερού και των στερεών υπολειμμάτων (πυρήνας). Συγκεκριμένα τοποθετείται σε οριζόντια φυγόκεντρο για να διαχωριστεί η στερεή από την υγρή φάση και στη συνέχεια σε κάθετη φυγόκεντρο για τον τελικό διαχωρισμό του ελαίου από το νερό (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; H. Ouazzane κ.ά. 2017; Petrakis 2006) .

Ωστόσο αρκετά διαδεδομένες είναι και οι διαχωριστήρες δύο φάσεων, οι οποίοι διαφοροποιούνται από των τριών στο ότι δεν εμπλουτίζεται με νερό η ελαιοζύμη στην οριζόντια φυγοκέντριση αλλά ανακυκλώνεται το φυτικό. Επομένως πραγματοποιείται απευθείας διαχωρισμός του ελαίου από το νερό και του πυρήνα. Με τη χρήση των μηχανημάτων αυτών, επιτυγχάνεται μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος και παραγωγή ελαιόλαδου με αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά, γεγονός το οποίο το καθιστά υψηλότερης ποιότητας και ανθεκτικότερο στην οξείδωση (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; H. Ouazzane κ.ά. 2017; Petrakis 2006).

Αξίζει να αναφερθεί πως η φυγοκέντριση δύο φάσεων μπορεί να αποτελεί την πιο οικολογική λύση και να παράγει ένα ποιοτικό προϊόν ωστόσο η περιεκτικότητα του πυρήνα σε υγρασία ανέρχεται στο 50-70% με αποτέλεσμα η μεταφορά του καθώς και η ξήρανση να καθίσταται αρκετά κοστοβόρα. Αντιθέτως, στους διαχωριστήρες δύο φάσεων συναντάται η χαμηλότερη υγρασία με 25-30% ενώ στους αντίστοιχους τριών φάσεων φαίνεται η υγρασία να είναι στα όρια του 45-60% (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; H. Ouazzane κ.ά. 2017; Petrakis 2006).

Μέθοδος εκλεκτικής διήθησης/συνάφεια

Η συνάφεια πραγματοποιείται αντί της φυγοκέντρωσης ή της πίεσης μέσω του μηχανήματος Sinolea, ελάσματα από μέταλλο το οποίο φαίνεται να έχει υψηλή εκλεκτική συνάφεια με το ελαιόλαδο, το οποίο απομακρύνεται από την ελαιοζύμη σε μορφή μικρών σταγονιδίων

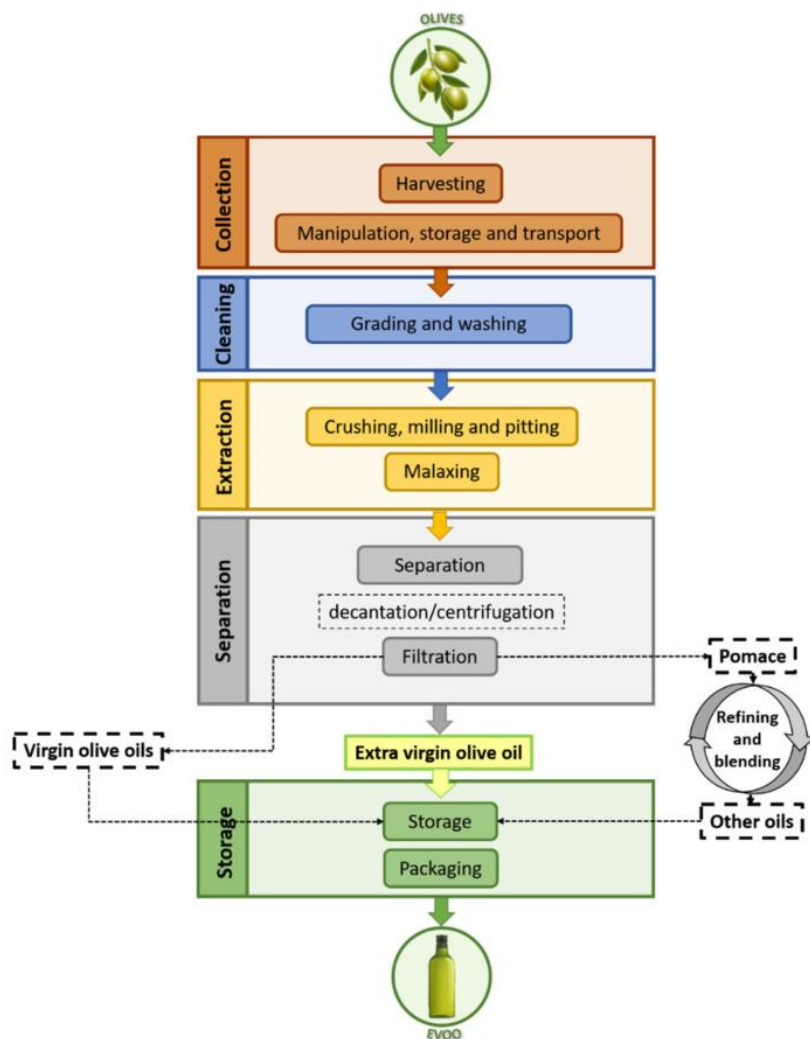
αφήνοντας το νερό και τον πυρήνα. Το προϊόν που παράγεται αναφέρεται ως υψηλής ποιότητας και τα αρωματικά του γνωρίσματα καθώς και τα φαινολικά συστατικά, μεταφέρονται από τον καρπό στο ελαιόλαδο εμπλουτίζοντας τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Παρόλο τα οφέλη της μεθόδου, δεν εφαρμόζεται στην Ελλάδα (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002).

Τελικός διαχωρισμός- καθαρισμός ελαιόλαδου

Ανεξαρτήτως της μεθόδου παραλαβής που ακολουθήθηκε, τελικό στάδιο είναι το πέρασμα του ελαιόλαδου από τον ελαιοδιαχωριστήρα. Κατά την έξοδο από το μηχάνημα, η υφή του ελαίου θα πρέπει να είναι παχύρρευστη και η θερμοκρασία να είναι μικρότερη των 27°C προς αποφυγή αλλοίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007).

Αποθήκευση και εμφιάλωση ελαιολάδου

Έπειτα από την παραγωγή ελαιολάδου, αυτό αποθηκεύεται σε ειδικές δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του προϊόντος. Στο σημείο αυτό πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία καθώς η παραμικρή επαφή με το οξυγόνο και το φως κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση του. Επίσης η θερμοκρασία του χώρου απαιτείται να υπακούει στις προδιαγραφές που ορίζονται από την νομοθεσία και οι δεξαμενές να είναι όσο το δυνατόν γεμάτες, σε διαφορετική περίπτωση θα πρέπει να τροφοδοτούνται με αέριο άζωτο. Στην συνέχεια το ελαιόλαδο μπορεί να οδηγηθεί στα τυποποιητήρια για την ασφαλή εμφιάλωση του (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020; Otero κ.ά. 2021)



Εικόνα 13: Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας ελαιόλαδου (Jimenez-Lopez κ.ά. 2020)

Οφέλη στην υγεία

Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι το Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο (EVOO) αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής χάρης της υψηλής θρεπτικής του αξίας. Οι αντιοξειδωτικές του ικανότητες που προσδίδονται από τα φαινολικά συστατικά, τις τοκοφερόλες, το σκουαλένιο και τις στερόλες το καθιστούν ένα από τα κυριότερα και ωφέλιμα βρώσιμα έλαια σε παγκόσμια κλίμακα. Οι διαδικασίες παραγωγής και μέθοδοι επεξεργασίας παρεμποδίζουν την υποβάθμιση του ελαίου με αποτέλεσμα την διατήρηση των φυσικών βιοδραστικών στοιχείων του (Alves, Domingues, και Domingues 2023; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020). Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες έχει προκύψει ότι η κατανάλωση του ελαιόλαδου προσδίδει οφέλη στην υγεία καθώς έχει διαπιστωθεί σύνδεση μεταξύ της διατροφής με εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο με καρδιαγγειακές παθήσεις όπως φλεγμονές, υπέρταση, αθηροσκλήρωση, αγγειακή γήρανση, σακχαρώδη διαβήτη καθώς και ορισμένες μορφές καρκίνου (Salvador και Fregarane 2010; Suvarna και Sharma 2021; Tarabanis κ.ά.

2023). Επιπρόσθετα, μελέτες αναφέρουν ότι η κατανάλωση του μπορεί να σχετίζεται με την ομαλή λειτουργία του εντέρου και την αναγέννηση του δέρματος (Kosma κ.ά. 2017). Συστηματικές ανασκοπήσεις επίσης όπως αυτή των Yiwei Ma, Xinyue Ding, Jie Gu, Shengmin Zhou, Yuanrong Jiang,(2023) (32) αξιολόγησε την απόδοση του ελαιόλαδου σε σχέση με ηπατικές δυσλειτουργίες του οργανισμού. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι το προϊόν φαίνεται να επηρεάζει θετικά την ηπατική στεάτωση ωστόσο καθίστανται αναγκαίες επιπλέον έρευνες. Παρόλο όμως τις συνεχείς μελέτες και έρευνες δεν έχουν σταθεί αρκετές ούτως ώστε να αποκτήσει το ελαιόλαδο ισχυρισμό υγείας για αυτό το πεδίο μελέτης του ελαιόλαδου για τις ευεργετικές του ιδιότητες είναι ακόμη ενεργό.(Ma κ.ά. 2023)

Χημική σύσταση ελαιόλαδου

Η σύσταση του ελαιόλαδου αποτελείται από το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα σε ποσοστό 99% και το ασαπωνοποιήτο σε ποσοστό 1%. Στην πρώτη κατηγορία υπάγονται οι μονο-, δια- και τριακυλογλυκερόλες, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια και οι κηροί ενώ στην δεύτερη κατηγορία εντάσσονται οι υδρογονάνθρακες, οι λιπαρές αλκοόλες, οι χρωστικές, οι στερόλες και οι τοκοφερόλες (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Pedan κ.ά. 2019). Η περιεκτικότητα των συστατικών συνήθως τείνει να μεταβάλλεται ανάλογα του είδους της καλλιεργήσιμης ποικιλίας, των περιβαλλοντικών συνθηκών, τις τεχνικές επεξεργασίας και τις συνθήκες αποθήκευσης του ελαιόλαδου (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020; Malheiro, Rodrigues, και Pereira 2015).

Λιπαρά οξέα

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα τα οποία συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι το παλμιτικό (C16:0) 7,5-20% , το παλμιτελαϊκό (C16:1) 0,5-5%, το στεατικό (C18:0) 0,3-3,5%, το ελαϊκό (C18:1) 7,5-20%, το λινελαϊκό (C18:2) 7,5-20% και το λινολενικό (C18:3) 0,0-1,5%. Το μυριστικό (C14:0), το δεκαεπτανοϊκό και το εικοσανοϊκό οξύ εντοπίζονται ως ίχνη (Boskou, Blekas, και Tsimidou 2006; Borges κ.ά. 2017; Ambra κ.ά. 2017). Αξίζει να αναφερθεί πως τα ελαιόλαδα της Ελλάδας, της Ιταλίας και της Ισπανίας χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα ελαϊκού οξέος και χαμηλής λινελαϊκού και παλμιτικού (Alves κ.ά. 2023; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002).

Τριακυλογλυκερόλες

Στο ελαιόλαδο, οι τριαλογλυκερόλες που εντοπίζονται είναι η τριελαϊνή OOO σε ποσοστό 45-59%, η παλμιτοδιελαϊνή POO σε 12-20%, η παλμιτοελαϊολινελαϊνή POL σε 5,5-7% και στεατοδιελαϊνή SOO 3-7% (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002).

Μονο- και διακυλογλυκερόλες

Η ύπαρξη των γλυκερολών αυτών οφείλεται σε ατελή βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών ή σε υδρολυτικές αντιδράσεις. Η συγκέντρωση των διακυλογλυκερολών στο παρθένο ελαιόλαδο κυμαίνεται μεταξύ του 1-2,8% και των μονοακυλογλυκερολών είναι γενικώς μικρότερη του 0,25% (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002).

Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια εντοπίζονται σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση στο ελαιόλαδο. Ο ρόλος τους μπορεί να αφορά την ενίσχυση της αναγέννησης των αντιοξειδωτικών όπως της α-τοκοφερόλης ή άλλων φαινολών καθώς και να συνδράμουν στην απομάκρυνση των μετάλλων (Boskou κ.ά. 2006).

Υδρογονάνθρακες

Το σκουαλένιο $C_{30}H_{50}$ αποτελεί τον κύριο υδρογονάνθρακα που περιέχεται στο ελαιόλαδο, η παρουσία του οποίου υποστηρίζεται πως προσφέρει ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου και κυρίως αντικαρκινικές. Σε μικρότερες ποσότητες εντοπίζεται και το β-καροτένιο (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Boskou κ.ά. 2006; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020).

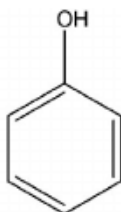
Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες αποτελούν σημαίνουσες λιποδιαλυτές βιταμίνες αναβαθμίζοντας τη διατροφική αξία του ελαιολάδου. Η βιταμίνη Ε συναντάται κυρίως ως α-τοκοφερόλη σε ποσότητα 10,2-208 mg/kg με σημαντική δράση έναντι των ελεύθερων ριζών και της οξείδωσης του ελαίου σε συνδυασμό με την ύπαρξη του β-καροτένιου (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020). Η β-τοκοφερόλη και η γ-τοκοφερόλη ανευρίσκονται σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις (0,75-1,05 mg/kg και 0,7-2,1 mg/kg αντίστοιχα) (Ambra κ.ά. 2017; Borges κ.ά. 2017; Umaru, Abah, και Umaru 2024).

Πολικά φαινολικά συστατικά ελαιόλαδου

Χημική σύσταση φαινολικών ενώσεων

Ως φαινόλες ορίζονται οι ενώσεις οι οποίες στο μόριο τους περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν βενζολικό δακτύλιο στον οποίο είναι συνδεδεμένα ένα ή περισσότερα υδροξύλια (Εικόνα 15) (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007). Ως πολικές ενώσεις είναι κυρίως υδατοδιαλυτές με έντονη δράση κατά της οξείδωσης του ελαιόλαδου, η οποία αυξάνεται καθώς προστίθεται δεύτερο ή τρίτο φαινολικό υδροξύλιο στο υπάρχον μόριο (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007).

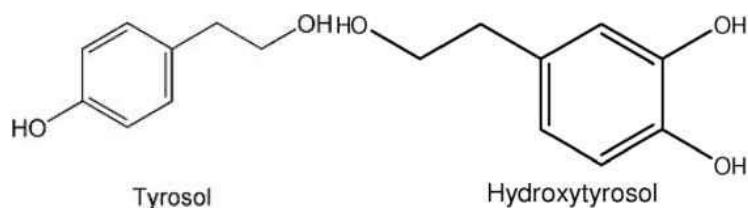


Εικόνα 14: Χημική δομή φαινόλης (Al-Khalid και El-Naas 2012)

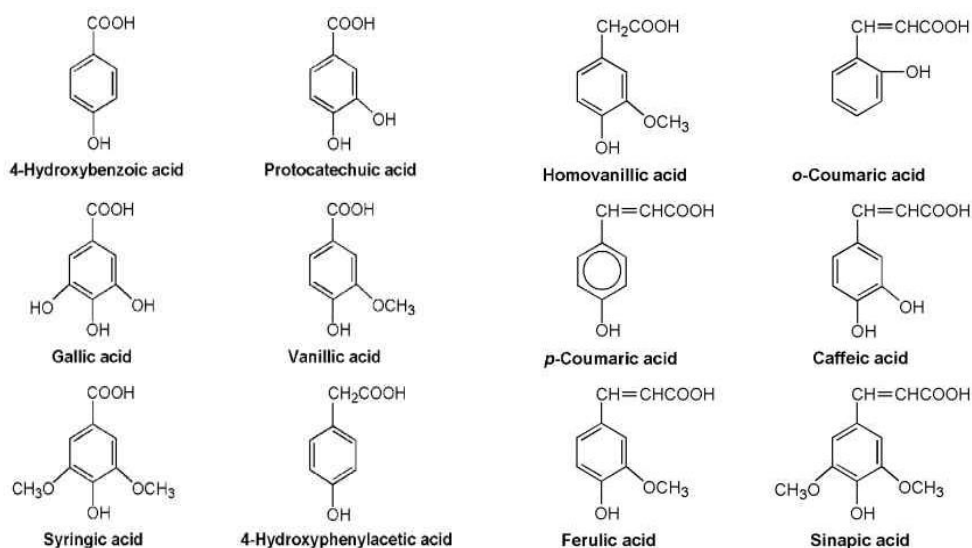
Στο ελαιόλαδο, οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στο πολικό κλάσμα του ελαίου που παράγεται μέσω της μεθόδου εκχύλισης με μεθανόλη-νερό (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002). Προέρχονται κυρίως από τον καρπό της ελιάς ενώ ένα μικρότερο ποσοστό αυτών από το φύλλωμα της τα οποία περνάνε από το αποφυλλωτήριο και αλέθονται από κοινού (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a). Το τυπικό εύρος συγκεντρώσεων των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 213-450 mg/kg του ελαιολάδου και σχετίζονται με τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά του όπως το πικρό και το πικάντικο στη γεύση, με την ανθεκτικότητα του στην οξείδωση και κατά συνέπεια με τις ευεργετικές ιδιότητες που προσφέρει στον οργανισμό του ανθρώπου. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις του ΕΝΟΟ έχουν προληπτική δράση έναντι των χρόνιων νοσημάτων και ότι ενισχύουν τον ανθρώπινο οργανισμό έναντι των φλεγμονών, των μικροβίων και του καρκίνου (Ambra κ.ά. 2017; Boskou κ.ά. 2006; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020; Pedan κ.ά. 2019; Schmidt κ.ά. 2023; Servili κ.ά. 2004; Tsimidou 2013).

Στο εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο εντοπίζονται φαινολικά οξέα, φαινολικές αλκοόλες, флаβονοειδή, υδροξυ-ισοχρωμάνες, σεκοϊριδοειδή και λιγνάνες με τις δύο τελευταίες κατηγορίες να απαντώνται σε μεγαλύτερες ποσότητες (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Jimenez-Lopez κ.ά. 2020). Πιο αναλυτικά, μερικές φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου είναι το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό, το ο- και π- κουμαρικό, το φερουλικό, το πρωτοκατεχικό, το συριγγικό, η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη (Εικόνα 17). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η ελευρωπαΐνη και τα παράγωγα υδρόλυσης της, τυροσόλη (4-υδροξυφαινολοϊθανόλη) και υδροξυτυροσόλη

(3,4-διυδροξυφαινολοαιθανόλη) αποτελούν κύρια φαινολικά συστατικά του παρθένου ελαιόλαδου (Εικόνα 16) (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Pedan κ.ά. 2019; Schmidt κ.ά. 2023; Servili κ.ά. 2004; Servili και Montedoro 2002; Tsimidou 2013; Tuck και Hayball 2002).



Εικόνα 15: Χημική δομή τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης, (Βουχία κ.ά. 2023)



Εικόνα 16: Χημικές δομές φαινολικών ενώσεων (Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Phelps και Young 1997)

Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα του φαινολικού περιεχομένου Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η σύσταση των φαινολικών ενώσεων ποικίλλει μεταξύ των ελαιολάδων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα μοναδικά χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας, στον βαθμό ωρίμανσης του ελαιόκαρπου κατά την συγκομιδή καθώς και τη φυσική του κατάσταση, στη γεωγραφική περιοχή και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η πρόσβαση σε νερό. Επιπλέον η περιεκτικότητα επηρεάζεται και από τις τεχνικές επεξεργασίας του καρπού όπως η άλεση, ο χρόνος και η θερμοκρασία μάλαξης αλλά και το προστιθέμενο νερό κατά την παραμονή της ελαιοζύμης στον μαλακτήρα και τη μέθοδο εκχύλισης (πίεση, φυγοκέντριση, συνάφεια)(Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a; Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou 2002; Malheiro κ.ά. 2015; Petrakis 2006; Servili κ.ά. 2004; Tsimidou 2013) .

Ποικιλίες ελαιόδεντρων

Έρευνες έχουν δείξει ότι η ποικιλία της καλλιεργήσιμης ελιάς συνδέεται άρρηκτα με την περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις στο ελαιόλαδο (Suvarna και Sharma 2021:14) Η Vasilisa και οι συνεργάτες της (2021) μελέτησαν τρεις ποικιλίες ελιών ως προς το φαινολικό περιεχόμενο και παρατήρησαν σημαντικές διαφορές. Επίσης απέδειξαν πως οι λιγνάνες μπορούν να αξιοποιηθούν και ως δείκτες ταυτοποίησης διαφορετικών ποικιλιών (Pedan κ.ά. 2019).

Ωρίμανση ελαιόκαρπου

Η ωρίμανση του καρπού υποστηρίζεται πως επηρεάζει τα συστατικά του ελαιόλαδου. Η υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινόλες στο έλαιο επιτυγχάνεται μεταξύ του πράσινου και του πιο σκούρου χρώματος της επιδερμίδας της ελιάς. Σύμφωνα με τον Maurizio Servili και τους συνεργάτες του (2004) , κατά την ωρίμανση του καρπού, παρατηρείται μείωση της ελευρωπαΐνης και αύξηση της απομεθυλοελευρωπαΐνης ενώ παρατηρείται αισθητή μείωση και των δύο ενώσεων στις εξαιρετικά ώριμες ελιές (Servili κ.ά. 2004). Μελέτη επίσης έδειξε ότι η σχέση φαινολικά στοιχεία- στάδιο ωρίμανσης παρουσιάζεται ως κλιμακωτή και συγκεκριμένα πράσινες> πράσινες/ώριμες> ώριμες (Pedan κ.ά. 2019). Το φαινόμενο αυτό βρίσκει απόλυτη εξήγηση στο ότι η περιεκτικότητα των υδρόφιλων φαινολών εντοπίζεται αρκετά μικρότερη στους κατά πολύ ώριμους ελαιόκαρπους (Servili κ.ά. 2004). Ως εκ τούτου, για να εξασφαλιστεί η ποιότητα του ελαιολάδου , είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης το χρώμα του καρπού για την ορθή ως προς το χρόνο συγκομιδή του ελαιόλαδου (Esti, Cinquanta, και La Notte 1998; Pedan κ.ά. 2019; Servili και Montedoro 2002).

Γεωγραφική περιοχή

Το υψόμετρο στο οποίο καλλιεργούνται τα ελαιόδεντρα, φαίνεται να μεταβάλλει την συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο παραγόμενο ελαιόλαδο. Πιο αναλυτικά, το ελαιόλαδο το οποίο προέρχεται από καλλιέργεια σε χαμηλό υψόμετρο, περιέχει υψηλότερο ποσοστό φαινολικών. Κατά τον Κωνσταντίνο Κυριτσάκη, (2007) το γεγονός αυτό εξηγείται εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν σε αυτή τη γεωγραφική ζώνη με αποτέλεσμα να αυξάνεται η περιεκτικότητα των υδατανθράκων και κατά συνέπεια και των φαινολών (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a).

Περιβαλλοντικές συνθήκες

Σύμφωνα με έρευνες σχετικά με το φαινολικό περιεχόμενο και τις αγρονομικές τεχνολογικές συνθήκες παραγωγής, συμπεραίνεται πως η άρδευση των ελαιόδεντρων επηρεάζει την περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων και κατά συνέπεια τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την αντιοξειδωτική ικανότητα του ελαιολάδου (Servili κ.ά. 2004; Tovar,

Motilva, και Romero 2001). Αναλυτικότερα έρευνα του M. Jesús Tovar και των συνεργατών του (2001) κατέληξε στο συμπέρασμα πως τα επίπεδα της ελευρωπαϊνης αυξάνονται σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού ενώ της βανιλίνης αυξάνονται όταν αυξάνεται και η ποσότητα του νερού άρδευσης των ελαιόδεντρων. Επιπρόσθετα, αναφέρουν πως επηρεάζεται και η συγκέντρωση των λιγνανών καθώς μετρήσεις έδειξαν χαμηλή περιεκτικότητα σε ελαιόλαδα που παράχθηκαν με μειωμένη άρδευση. Ωστόσο δεν έχουν ληφθεί ακριβή συμπεράσματα για τη σχέση αυτή και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες (Tovar κ.ά. 2001).

Τεχνικές επεξεργασίας

Η περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο φαίνεται να επηρεάζεται και από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται πριν και μετά τη συγκομιδή των καρπών. Αρχικά, ο σωστός χειρισμός καθώς και ο ελάχιστος χρόνος αποθήκευσης τους στο ελαιουργείο πριν την εκκίνηση των διαδικασιών επεξεργασίας συντελούν στην διατήρηση των φαινολικών συστατικών ήδη από τα πρώτα στάδια. Πιο αναλυτικά, ο χρόνος αποθήκευσης συστήνεται να είναι λιγότερος των 48 ωρών, αντιθέτως θα προκληθεί οξειδωση στο παραγόμενο ελαιόλαδο (Boskou κ.ά. 2006; Petrakis 2006; Safarzadeh Markhali 2021).

Είναι ευρέως γνωστό πως τα ενδογενή ένζυμα του ελαιόκαρπου καθορίζουν την μετέπειτα ύπαρξη των υδρόφιλων φαινολών (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη) στο ελαιόλαδο και είναι επόμενο πως η περιεκτικότητα τους επηρεάζεται από τις διαδικασίες εξαγωγής του. Συγκεκριμένα ο Maurizio Servili και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν πως οι μέθοδοι της άλεσης και της μάλαξης αποτελούν κρίσιμα σημεία (CP) της παραγωγικής διαδικασίας. (Servili κ.ά. 2004)

Άλεση

Ο Francesco Caronio και οι συνάδελφοι του (1999) (49) πραγματοποίησαν πειραματική έρευνα σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Ogliarola Salentina και Coratina για τον προσδιορισμό της επίδρασης μεταξύ των δύο τεχνικών άλεσης και της διαδικασίας ζύμωσης ως προς το φαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου (Caronio, Alloggio, και Gomes 1999). Με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων και ο χρόνος παραμονής στους σπαστήρες συσχετίζονται αρνητικά. Επιπλέον ανέφεραν πως σημαντικό ρόλο έχει και η επιλογή του μηχανήματος άλεσης σε συνδυασμό με τον μαλακτήρα για την επίτευξη και διατήρηση της ποιότητας του παραγόμενου ελαιολάδου (Boskou κ.ά. 2006).

Μάλαξη

Κατά την πειραματική διαδικασία σε μελέτη του Maurizio Servili και των συνεργατών του (2004), καταγράφηκε μείωση των συγκεντρώσεων των σεκοϊριδοειδών και των φαινολικών αλκοολών στην ελαιόπαστα και στο έλαιο κατά την μάλαξη με αύξηση του χρόνου παραμονής και της θερμοκρασίας επεξεργασίας. Ωστόσο κατέληξαν πως οι παράγοντες που προκαλούν μείωση της συγκέντρωσης των φαινολών στο ελαιόλαδο είναι η περιεκτικότητα των υδρόφιλων φαινολών κατά τον διαχωρισμό του ελαίου από την υδατική φάση καθώς και οι οξειδωτικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μαλακτήρα ενεργοποιώντας την οξείδωσή τους. (Servili κ.ά. 2004)

Την επίδραση της θερμοκρασίας μάλαξης μελέτησε πιο αναλυτικά η Itala M.G. Marx (2021), η οποία πρότεινε την εξαγωγή του ελαιόλαδου περίπου στους 22°C και γενικά σε χαμηλές θερμοκρασίες, με σκοπό την επίτευξη υψηλού επιπέδου φαινολικών ενώσεων στο έλαιο και ως εκ τούτου υψηλότερα οφέλη για την υγεία του καταναλωτή (Marx κ.ά. 2021). Σε αντίθετη περίπτωση, χρήση υψηλής θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει ενζυματικές αντιδράσεις με αποτέλεσμα να επέλθει οξείδωση του προϊόντος (Boskou κ.ά. 2006; Safarzadeh Markhali 2021).

Όσο αφορά το χρόνο μάλαξης, έρευνα του Panagiotis Diamantakos και των λοιπών συνεργατών του (2020) έπειτα από σύγκριση ελληνικών ποικιλιών, έφτασε στο συμπέρασμα πως σε όλες τις μελετηθείσες ποικιλίες, ο υψηλός χρόνος μάλαξης επηρεάζει αρνητικά την περιεκτικότητα του ολικού φαινολικού περιεχομένου (Diamantakos κ.ά. 2020) (Safarzadeh Markhali 2021).

Διαχωρισμός ελαιόλαδου

Ο Κωνσταντίνος Κυριτσάκης (2007) αναφέρει πως ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου με μηχανικά μέσα ή με χρήση διαλυτών επηρεάζει σημαντικά την αντοχή στην οξείδωση (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007a). Αναλυτικά, η περιεκτικότητα φαινολών σε ελαιόλαδα τα οποία παραλήφθηκαν με την μέθοδο της πίεσης υπολογίστηκε στο 50-157 mg/kg, με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης περίπου στο 120 mg/kg ενώ με διαλύτες 321- 574 mg/kg. Το γεγονός αυτό εξηγείται απόλυτα καθώς η χρήση των διαλυτών ευνοούν την παραλαβή περισσότερων φαινολικών από τον ελαιόκαρπο με αποτέλεσμα κατά την επεξεργασία να αυξάνουν την ολική περιεκτικότητα των φαινολών στο έλαιο (Safarzadeh Markhali 2021).

Βοηθήματα στην εκχύλιση του ελαιόλαδου

Προσθήκη ενζύμων

Έχει αποδειχθεί πως κατά την διάρκεια της μάλαξης, η προσθήκη ενζύμων ευνοεί την αύξηση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας,

οξυγόνου και pH, και ενισχύει την αντοχή του στην οξείδωση (Squeo κ.ά. 2020). Για παράδειγμα η προσθήκη αερίου αζώτου αυξάνει την περιεκτικότητα των αντιοξειδωτικών διότι τα ένζυμα αποδεσμεύουν περισσότερες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες χάρης στο άζωτο προστατεύονται από την οξείδωση (Απόστολος Κ.Κυριτσάκης 2007b) .Ωστόσο, τέτοιου είδους πρακτικές δεν αξιοποιούνται ακόμη από τις βιομηχανίες διότι η προσθήκη ενζύμων κατά επεξεργασία του ελαιολάδου και γενικά των πρόσθετων μη φυσικής, έρχονται αντίθετες με την νομοθεσία και απαγορεύονται (De Faveri κ.ά. 2008; Umaru κ.ά. 2024).

Σύμφωνα με τους κανονισμούς της ΕΕ (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών 2009), η προσθήκη φυσικών συμπληρωμάτων κατά την επεξεργασία του ελαιολάδου και συγκεκριμένα κατά τη μάλαξη, δεν απαγορεύεται χάρης της φυσικής τους προέλευσης. Επιπρόσθετα ενισχύουν τον διαχωρισμό του γαλακτώματος λαδιού-νερού με αποτέλεσμα να διευκολύνεται ο διαχωρισμός του ελαίου, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την απόδοση. (Caronio κ.ά. 2016)

Προσθήκη μικροϊνισμένου φυσικού ταλκ, MNT

Στα βοηθήματα επεξεργασίας του ελαιολάδου υπάγεται ο μικροϊνισμένος φυσικός τάλκης (Micronised Natural Talc, MNT). Πρόκειται για ένα αρκετά μελετημένο τεχνολογικό συμπλήρωμα και πρόσθετο τροφίμων (E553b), το οποίο δεν φαίνεται να επηρεάζει χημικά ή βιοχημικά την ελαιόπαστα (Caronio κ.ά. 2016; Squeo κ.ά. 2020). Η υφή, το χρώμα του καθώς και η υψηλή θερμική αγωγιμότητα και χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι λίγα από τα χαρακτηριστικά του που τον καθιστούν ευρέως διαδεδομένο. Επίσης χάρης τον αμφιφιλικό του χαρακτήρα, ο MNT κατά το πέρας της εκχύλισης, αποβάλλεται στο στερεό υπόλειμμα της ελαιοζύμης ενώ δεν ανιχνεύεται η ουσία στο ελαιόλαδο. Ο Sebastián Sánchez και οι συνάδελφοι του σε έρευνα το 2022 για την προσθήκη του MNT κατά την επεξεργασία του ελαιόλαδου, κατέγραψαν βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης και της ποιότητας καθώς σημείωσαν 10,4% αύξηση των πολυφαινολών και 21,5% των τοκοφερολών ενισχύοντας την αντιοξειδωτική του ικανότητα (Sánchez κ.ά. 2022). Άλλες έρευνες αναφέρουν ότι η αύξηση των φαινολικών ενώσεων παρατηρείται ανεξαιρέτου ποικιλίας. Ωστόσο επιδημιολογικά ευρήματα έχουν συσχετίσει τον MNT με εμφάνιση καρκίνου σε εργαζόμενους ελαιουργείων καθιστώντας το σημαντικό μειονέκτημα του (Caronio κ.ά. 2016; Squeo κ.ά. 2020).

Προσθήκη ανθρακικού ασβεστίου CaCO₃

Ακόμη ένα ευρέως διαδεδομένο φυσικό συνεπικουρικό αποτελεί το ανθρακικό ασβέστιο CaCO₃ (E170). Στην μελέτη του Francesco Caronio το 2015, αναφέρεται πως λόγω της κρυσταλλικής δομής του, το ανθρακικό ασβέστιο δεν αντιδρά με τα συστατικά του ελαιόλαδου και η αφαίρεση του καθίσταται εύκολη μέσω φυγοκέντρισης (Caronio κ.ά. 2016; Squeo κ.ά. 2020). Το συμπέρασμα της μελέτης αυτής ήρθε να συμπληρώσει ο Samia Ben

Brahim και οι συνεργάτες του (2015), ο οποίος σε δική του μελέτη υποστήριξε ότι η προσθήκη της ουσίας σε αναλογία 1,6% στην ελαιόπαστα κατά την μάλαξη στους 31°C για 20 min, αυξάνει κατά 2% την συγκέντρωση των φαινολών και των χρωστικών ουσιών χωρίς να αλλοιώνεται η ποιότητα του προϊόντος (Ben Brahim κ.ά. 2015). Ωστόσο, στη μελέτη του Giacomo Squeo και των συνεργατών του (2020), φάνηκε η ουσία να αυξάνει τις οξειδάσεις στο ελαιόλαδο με αποτέλεσμα να μειώνει τις φαινολικές ενώσεις του ελαιόλαδου και επί της ουσίας της αντοχής του στην οξείδωση. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις παρενέργειες της χρήσης του CaCO₃ στη ποιότητα του ελαιόλαδου, θα εξασφαλίσουν πιο σαφή αποτελέσματα (Squeo κ.ά. 2020).

Προσθήκη άλατος NaCl

Η εκχύλιση του ελαιόλαδου μπορεί να ενισχυθεί και μέσω του φυσικού βοηθητικού κοινού αλατιού NaCl καθώς χάρης του αυξημένου ιοντικού φορτίου και της πυκνότητας του, προκαλείται απώθηση μεταξύ του ελαιόλαδου και των υδρόφιλων ενώσεων (Caronio κ.ά. 2016; Sadkaoui κ.ά. 2016). Ο Sergio Cruz (2006) χρησιμοποίησε στα πειράματα του ποσότητα 0,6% και 1,2% άλατος κατά την εκχύλιση του ελαίου και κατέληξε στο συμπέρασμα πως η απόδοση του δεν διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από αυτή στην οποία χρησιμοποιήθηκε MNT (Cruz κ.ά. 2007). Επίσης παρατήρησε μία ελάχιστη αλλά αισθητή αύξηση στην ένταση του πικρού στη γεύση, στις χρωστικές και στην αντοχή του έναντι στην οξείδωση. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl δεν επέφερε οφέλη στην απόδοση του ελαιολάδου (Pérez κ.ά. 2008).

Προσθήκη νερού

Οι Martinez, Munoz, Alba και Lanzo (1975) στάθηκαν πρωτοπόροι για την χρήση χλιαρού νερού κατά την διαδικασία της μάλαξης για την αύξηση της απόδοσης κατά την εκχύλιση του ελαιόλαδου (Clodoveo 2012). Συγκεκριμένα, πρότειναν προσθήκη 50-70 L ανά 100 kg ελαιόπαστας στον μαλακτήρα. Οι Velasco και Dobarganes, (2002) στήριξαν την πρόταση αυτή ερμηνεύοντας πως το χλιαρό νερό διευκολύνει την εκχύλιση του ελαιολάδου ωστόσο παρατηρείται μείωση των υδρόφιλων φαινολικών ενώσεων επομένως χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Velasco και Dobarganes 2002). Για να αποφευχθεί το γεγονός αυτό, προτάθηκε η χρήση διαχωριστήρα δύο φάσεων με προστιθέμενη ποσότητα χλιαρού νερού έως 0,2 L/kg, με αποτέλεσμα την εξασφάλιση της παραγωγής ελαιολάδου με αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις (Gimeno κ.ά. 2002; Sadkaoui κ.ά. 2016).

Σκοπός μελέτης

Οι συνθήκες μάλαξης έχουν αναγνωριστεί ως ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία στη διαδικασία εκχύλισης του ελαιολάδου καθώς ασκούν επιρροή σε σημαντικές παραμέτρους ικανές να μεταβάλλουν την ποιότητα, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την οξειδωτική σταθερότητα του παραγόμενου ελαιολάδου. Υπεύθυνες για τις συγκεκριμένες μεταβολές χαρακτηρίζονται οι φαινολικές ενώσεις του ελαίου οι οποίες βάσει βιβλιογραφίας μπορούν να ενισχυθούν με φυσικά συμπληρώματα. Ως εκ τούτου, η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό μελέτης τη διερεύνηση της προσθήκης χλωριούχου νατρίου (κοινό αλάτι) και του νερού κατά την παραμονή του ελαιολάδου στον μαλακτήρα με σταθερή ποσότητα ΜΝΤ και σταθερή θερμοκρασία και χρόνου μάλαξης. Επιπρόσθετα, με τη βοήθεια στατιστικών εργαλείων, μελετήθηκε η επίδραση των ανωτέρων στοιχείων στο φαινολικό περιεχόμενο του τελικού προϊόντος, το οποίο έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC και με τη μέθοδο με αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu με απώτερο σκοπό την εύρεση και κατανόηση του κατάλληλου συνδυασμού άλατος-νερού για την μέγιστη περιεκτικότητα φαινολικών ενώσεων.

Πειραματικό μέρος

Υλικά και μέθοδοι

Δείγματα και στάδια ελαιοποίησης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 18 kg ελαιοκάρπου ποικιλίας Κορωνέικη, ο οποίος παραχωρήθηκε από παραγωγό της Μεσσηνίας (Καλαμάτα). Η ανωτέρω ποσότητα ελαιοκάρπου χωρίστηκε σε τρία δείγματα των 6 kg. Το 1^ο δείγμα ελιών υποβλήθηκε άμεσα (την επόμενη της παραλαβής ημέρα) σε ελαιοποίηση. Τα άλλα δύο δείγματα αποθηκεύτηκαν σε οικιακό καταψύκτη για 2-3 ημέρες.

Η ελαιοποίηση πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Abencor της εταιρείας MC2 S.L, (Ισπανία) το οποίο αποτελείται από σφυρόμυλο, θερμομαλακτήρα και φυγόκεντρο. Οι παράγοντες της ελαιοποίησης οι οποίοι μελετήθηκαν, παρατίθενται στον Πίνακα 1. Πιο αναλυτικά, το κάθε δείγμα ελαιοκάρπου υποβλήθηκε σε επτά ελαιοποιήσεις όπου διέφερε η ποσότητα άλατος (NaCl) και ζέοντος νερού που προστέθηκαν κατά το στάδιο της μάλαξης.

Πίνακας 1: Πειραματικός σχεδιασμός ελαιοποίησης

Δείγμα	Σειρά ελαιοποίησης	Άλατι (NaCl) (% m/m)	Νερό (mL)	Ελαιόπαστα (g)	Ετικέτα
1	1	10	200	500,21	Δ1 H1
1	2	0	200	501,42	Δ2 H1
1	3	5	100	501,34	Δ3 H1
1	4	10	200	501,41	Δ4 H1
1	5	5	100	501,26	Δ5 H1
1	6	1,8	200	500,59	Δ6 H1
1	7	5	200	500,65	Δ7 H1
2	8	0	100	500,60	Δ1 H2
2	9	10	100	500,72	Δ2 H2
2	10	0	100	500,19	Δ3 H2
2	11	5,2	200	500,28	Δ4 H2
2	12	10	100	500,82	Δ5 H2
2	13	3,5	200	500,24	Δ6 H2
2	14	10	200	500,43	Δ7 H2
3	15	0	200	500,98	Δ1 H3
3	16	7,7	200	501,01	Δ2 H3
3	17	7,5	100	500,39	Δ3 H3
3	18	0	200	500,05	Δ4 H3
3	19	2,5	100	500,18	Δ5 H3
3	20	5	100	500,27	Δ6 H3
3	21	5	200	500,68	Δ7 H3

Πλύσιμο ελαιόκαρπων

Το πλύσιμο των καρπών πραγματοποιήθηκε την ίδια ημέρα της ελαιοποίησης λίγο πριν την έναρξη της διαδικασίας της άλεσης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε σχολαστικό πλύσιμο τρεις φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και απομάκρυνση του φυλλώματος, κλαδιών και άλλων ξένων υλών. Έπειτα, το δείγμα στραγγίστηκε με σουρωτήρι για την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερου νερού.

Διαδικασία άλεσης

Η άλεση του κάθε δείγματος ελαιόκαρπου (6 kg) πραγματοποιήθηκε κατά παρτίδες (ανά 2 kg) σε σφυρόμυλο Abencor (Εικόνα 17). Η παραγόμενη ελαιόπαστα συλλέχθηκε σε πλαστικό δοχείο και αναμίχθηκε ελαφρώς με σπάτουλα. Κατόπιν, ζυγίστηκαν 500 g ελαιόπαστας (με ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων) σε δοχείο μάλαξης (Εικόνα 18), προστέθηκαν 5 g MNT (1% m/m) καθώς και η κατάλληλη ποσότητα νερού και άλατος σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Το περιεχόμενο αναδεύθηκε με σπάτουλα για 1 min και υποβλήθηκε σε μάλαξη (Εικόνα 19).



Εικόνα 17: Άλεση ελαιόκαρπων



Εικόνα 18: Ζύγιση ελαιόπαστας



Εικόνα 19: Προσθήκη νερού κατά την διάρκεια της μάλαξης

Διαδικασία μάλαξης

Για την έναρξη της μάλαξης, τοποθετήθηκαν τα δοχεία μάλαξης στον μαλακτήρα για 30 min στους 30 °C (Εικόνα 20). Μετά το πέρας της διαδικασίας, καθαρίστηκαν οι περιστρεφόμενες λεπίδες για να μην χαθεί η ποσότητα της πάστας από τυχόν υπολείμματα. Η διαδικασία αυτή είναι κρίσιμη για τα αποτελέσματα του πειράματος καθώς η καθυστέρηση της επανεκκίνησης της μάλαξης για τα υπόλοιπα μπρίκια, μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα.



Εικόνα 18: Μάλαξη ελαιόπαστας

Διαδικασία φυγοκέντρησης

Φυγοκέντρηση δύο φάσεων

Για το παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση δύο φάσεων ξεχωριστά για το περιεχόμενο κάθε δοχείου μάλαξης. Αρχικώς, μεταφέρθηκε ποσοτικώς η ελαιόπαστα (ενός δοχείου μάλαξης) εντός της οριζόντιας φυγοκέντρου (Εικόνα 21). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε σε αυτό το βήμα, καθώς κατά την περιστροφή ήταν σημαντική η αφαίρεση του πώματος από τον πυθμένα του μηχανήματος, προκειμένου με το πέρας της διαδικασίας η υγρή φάση (ελαιόλαδο, απόνερα) να κινηθεί στην έξοδο του τυμπάνου και να συλλεχθεί σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL (Εικόνα 22). Στη συνέχεια, εφόσον επανατοποθετήθηκε το πώμα της φυγοκέντρου, προστέθηκαν 100 mL ζέοντος νερού τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως για την έκπλυση του δοχείου μάλαξης και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση (3500 rpm για 2 min). Στο πέρας της διαδικασίας, όλο το ελαιόλαδο που παράχθηκε από το ένα δοχείο μάλαξης περιεχόταν στον ίδιο κύλινδρο. Για την προετοιμασία της φυγοκέντρου για το επόμενο δείγμα, απομακρύνθηκε από το τύμπανο το στερεό υπόλειμμα με σπάτουλα, εκπλύθηκε το τύμπανο με καυτό νερό και τοποθετήθηκε το πώμα και νέος κύλινδρος στην έξοδο του τυμπάνου.



Εικόνα 19: Προετοιμασία 1ης φυγοκέντρησης



Εικόνα 22: Διαχωρισμός ελαιόλαδου από την πάστα

Κάθε κύλινδρος πωματίστηκε με παραφίλμ και έπειτα με αλουμινόχαρτο και εφόσον αριθμήθηκε, παρέμεινε σε ηρεμία και στο σκοτάδι για μία ώρα. Πριν την κάθετη φυγοκέντρηση, μετρήθηκε και σημειώθηκε ο όγκος του ελαίου μέσω της ανάγνωσης των διαβαθμίσεων του ογκομετρικού κυλίνδρου.

Κάθετη φυγοκέντρηση

Στη συνέχεια, παραλήφθηκε και μεταφέρθηκε το έλαιο με τη βοήθεια σύριγγας των 50 mL σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 50mL. Ζυγίστηκαν με το καπάκι ώστε να είναι εφικτή η τοποθέτηση τους αντιδιαμετρικά στην κάθετη φυγόκεντρο φυγόκεντρο (μοντέλο Z326K, Hermle Labor Technik, Germany), σε αντίθετη περίπτωση προστέθηκε νερό βρύσης. Η φυγοκέντριση πραγματοποιήθηκε 3000 rpm για 15 min. Κατόπιν, η ανώτερη φάση (ελαιόλαδο) μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια με την κωδική ονομασία, εκδιώχθηκε το οξυγόνο του υπερκείμενου χώρου με διαβίβαση αερίου αζώτου και αποθηκεύτηκαν οικιακό καταψύκτη.

Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών ελαιολάδου

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων των ελαιολάδων που παρήχθησαν, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu.

Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο με υδατομεθανολικό διάλυμα και στη συνέχεια διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση με HPLC με τη βοήθεια ανιχνευτή UV στα 280 nm. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το συριγγικό οξύ. Η περιεκτικότητα της φυσικής και της οξειδωμένης μορφής της ελευρωπαΐνης και του λιγκστροσιδίου, των λιγνανών, φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων εκφράστηκε σε ισοδύναμα τυροσόλης (mg/kg).

Εξοπλισμός

- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL και των 100 mL τύπου A
- Μηχανικά σιφώνια των 100 mL, 1000 mL και των 5000 mL
- Φιαλίδια με βιδωτό πώμα 10 mL
- Αναδευτήρας τύπου Vortex για τους δοκιμαστικούς σωλήνες
- Υδατόλουτρο
- Φίλτρα σύριγγας \varnothing 13 mm, τύπου PVDF 0,45 μ m
- Φυγόκεντρος με ικανότητα λειτουργίας με ταχύτητα 5000 min^{-1}
- Αναλυτικός ζυγός (ευαισθησίας 0,1 mg)
- Πλαστικές σύριγγες, 5 mL.
- Συνήθη εργαστηριακά γυάλινα σκεύη

Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες πρέπει να είναι χρωματογραφικής καθαρότητας (HPLC) και τα αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας (for analysis).

- Ορθοφωσφορικό οξύ, 85% (v/v).
- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο
- Νερό
- τυροσόλη [2-(4-υδροξυφαινυλο)αιθανόλη] $\geq 98\%$.
- συριγγικό οξύ (3,5 διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ) $\geq 97\%$.

Παρασκευή διαλυμάτων

- Διάλυμα εκχύλισης: μεθανόλη/νερό 80/20 (v/v).
- Διάλυμα εσωτερικού προτύπου (συριγγικό οξύ)

Για την παρασκευή του διαλύματος εσωτερικού προτύπου, ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό 0,015 g συριγγικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και συμπληρώθηκε ο υπολειπόμενος όγκος με το διάλυμα εκχύλισης. Από το διάλυμα αυτό, μεταφέρθηκε 1 mL σε ογκομετρική φιάλη 100 mL και συμπληρώθηκε ξανά με διάλυμα εκχύλισης. Τελική συγκέντρωση του διαλύματος 0,015 mg/mL και μπορεί να διατηρηθεί σταθερό για 3 μήνες αν φυλαχτεί στους 4°C.

- Διάλυμα εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης (τυροσόλη και συριγγικό οξύ).

Για την παρασκευή του εξωτερικού πρότυπου διαλύματος, ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό, 0,030 g τυροσόλης και 0,015 g συριγγικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ο όγκος συμπληρώθηκε με διάλυμα εκχύλισης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν 100 μ L του διαλύματος σε νέα ογκομετρική φιάλη των 10 mL και συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με διάλυμα εκχύλισης. Το προκύπτον διάλυμα αποτελείται από τυροσόλη 0,030 mg/mL και συριγγικό οξύ 0,015 mg/mL και μπορεί να διατηρηθεί σταθερό για 3 μήνες αν φυλαχτεί στους 4°C.

Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Σε δοκιμαστικό σωλήνα 10 mL με βιδωτό πώμα, ζυγίστηκαν με ακρίβεια (0,1 mg) περίπου 2 g δείγματος ελαιολάδου και στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL του διαλύματος εσωτερικού προτύπου. Ο σωλήνας πωματίστηκε και τοποθετήθηκε σε κυκλοαναμίκτη για 30 s. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mL του διαλύματος εκχύλισης και αναδεύθηκε στο κυκλοαναμίκτη για 1 min. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές/λεπτό για 25 min. Τέλος, μέρος της υπερκείμενης φάσης (υδατομεθανολική) διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας (PVDF 0,45 μ m),

συλλέχθηκε σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη και αποθηκεύτηκε σε οικιακό καταψύκτη μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

HPLC

Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας και οι συνθήκες ανάλυσης αναφέρονται στον Πίνακα 2 και το βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης αναφέρεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 2: Σύστημα υγροχρωματογράφου και συνθήκες ανάλυσης

Αντλία	PU-980 (JASCO)
Αυτόματος δειγματολήπτης	AS-1555 (JASCO)
Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων	MD-910 (JASCO) - εύρος σάρωσης από 200 nm έως 400 nm
Στήλη χρωματογραφίας	Waters Spherisorb C18 ODS-2 (4,6 mm X 250 mm), μέγεθος σωματιδίων 5μm, 100 Å°
Διαλύτες έκλουσης	(A): Νερό 0,2% H ₃ PO ₄ (v/v) (B): μεθανόλη (C): ακετονιτρίλιο
Ροή κινητής φάσης	1 mL/min
Όγκος έκχυσης	20 μL
Μήκος κύματος προσδιορισμού	280 nm
Θερμοκρασία στήλης	25 °C

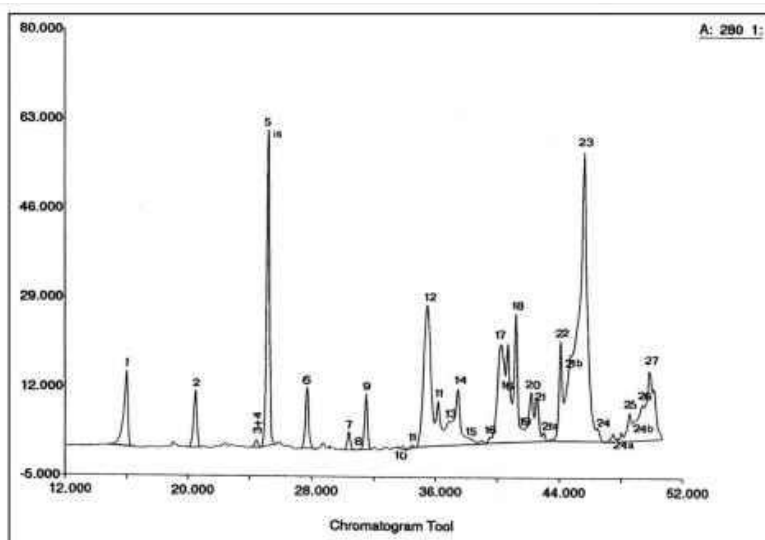
Πίνακας 3: Βαθμιδωτό σύστημα έκλουσης

Χρόνος (min)	Ροή (mL/min)	A%	B%	C%
0	1.00	96	2	2
40	1.00	50	25	25
45	1.00	40	30	30
60	1.00	0	50	50
70	1.00	0	50	50
72	1.00	96	2	2
82	1.00	96	2	2

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της χρωματογραφικής στήλης με έκλυση της αρχικής σύστασης των διαλυτών για τουλάχιστον 30 λεπτά. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ένας λευκός προσδιορισμός με έγχυση 20 μL διαλύτη εκχύλισης στο σύστημα της HPLC. Το βήμα

αυτό είναι απαραίτητο βήμα διότι με τον τρόπο αυτό βεβαιώνεται η μη ύπαρξη παρεμποδίζουσων ουσιών. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε έγχυση 20 μL του διαλύματος εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης και καταγράφηκε το χρωματογράφημα στα 280nm, από το οποίο, υπολογίστηκε η συγκέντρωση ο συντελεστής απόκρισης για 1 μg τυροσόλης RRF_{tyr} και 1 μg συριγγικού οξέος RRF_{syr} καθώς και ο σχετικός συντελεστής απόκρισης του συριγγικού οξέος προς την τυροσόλη, $RRF_{syr/tyr}$. Για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου, εκτελέστηκαν δύο ανεξάρτητοι προσδιορισμοί στο ίδιο δείγμα. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα ελαιολάδου που παρασκευάστηκαν. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η στήλη εκπλύθηκε με μεθανόλη/ακετονιτρίλιο 1/1 (v/v) με ροή 1,0 mL/min για τουλάχιστον 30 min.

Ο υπολογισμός του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών συστατικών προέκυψε από το άθροισμα των επιφανειών των μεμονωμένων κορυφών που εμφανίζονται στο εκάστοτε χρωματογράφημα για κάθε δείγμα. Ενδεικτική απεικόνιση ενός χρωματογραφήματος HPLC στα 280 nm για το προφίλ των φαινολικών συστατικών ενός εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου φαίνεται στην Εικόνα 23.



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα HPLC στα 280 nm για το προφίλ φαινολικών συστατικών (International Olive Oil Council 2022)

Πίνακας 4: Προσδιορισμός κορυφών φαινολικών ενώσεων στο χρωματογράφημα

Αριθμός κορυφής	Φαινολική ένωση
1	Υδροξυτυροσώλη
2	Τυροσώλη
3	Βανιλικό οξύ
4	Καφεϊκό οξύ
5	Συρινγγικό οξύ (εσωτερικό πρότυπο)
6	Βανιλίνη
7	π-Κουμαρικό οξύ
8	Οξική υδροξυτυροσώλη
9	Φερουλικό οξύ
10	ο-Κουμαρικό οξύ
11	Μορφή οξειδωμένης διαλδεΐδης
12	Μορφή διαλδεΐδης
13	Ελευρωπαϊνή
14	Μορφή διαλδεΐδης
15	Οξικός τυροσουλεστέρας
16	Μορφή διαλδεΐδης
17	Μορφή διαλδεΐδης
18	Πινορεσινόλη
19	Κινναμικό οξύ
20	Μορφή διαλδεΐδης
21	Αγλυκόνη ελευρωπαϊνης
22	Λουτεολίνη
23	Αγλυκόνη ελευρωπαϊνης
24	Αγλυκόνη λιγκοτροσιδίου
25	Απιγενίνη
26	Μεθυλολουτεολίνη
27	Αγλυκόνη λιγκοτροσιδίου

Μέθοδος Folin- Ciocalteu

Το ολικό φαινολικό κλάσμα του ελαιόλαδου μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου υπεριώδους – ορατού (UV-vis), με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 765 nm. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών συστατικών διαφόρων φυτικών εκχυλισμάτων.

Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο, αρχικά πραγματοποιείται απομόνωσή τους με εκχύλιση με χρήση μίγματος Μεθανόλη:Νερό (80:20 v/v ή 60:40 v/v). Στη συνέχεια ακολουθεί φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός μέσω της μέτρησης της απορρόφησης στα 765nm με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (F-C).

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών που περιέχονται στο ελαιόλαδο, από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (διάλυμα φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος), σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο κυανού χρώματος σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 10).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γαλλικού ή καφεϊκού οξέος. Ωστόσο η ταυτοποίηση της εκάστοτε φαινολικής ένωσης δεν υφίσταται δυνατή και για αυτό υπολογίζεται η περιεκτικότητα του ελαίου σε ολικά φαινολικά συστατικά. Το αποτέλεσμα αυτό συνήθως εκφράζεται σε mg ισοδυνάμων καφεϊκού (ή γαλλικού) οξέος / kg ελαίου. Αυτό συμβαίνει διότι οι συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών στα εκχυλίσματα οι οποίες έχουν προσδιοριστεί βάσει της μεθόδου Folin-Ciocalteu δεν αποτελούν απόλυτες τιμές των ποσοτήτων των φαινολών στο εκχύλισμα αλλά στη πραγματικότητα βασίζονται στην αναγωγική τους ικανότητα αναφορικά ισοδύναμη με την αναγωγική ικανότητα του γαλλικού ή καφεϊκού οξέος.

Εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο ορατού / υπεριώδους φωτός
- Πλαστικές κυψελίδες
- Αναλυτικός ζυγός
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Ογκομετρικές φιάλες 10 mL
- Σιφώνια των 2 mL
- Σιφώνια μετρήσεως των 10 mL
- Σιφώνια μετρήσεως των 1 ή 2 mL
- Γυάλινοι σωλήνες φυγοκέντρου των 10 mL με βιδωτό πώμα
- Δοκιμαστικοί σωλήνες των 15 mL

- Στατώ
- Γυάλινα φιαλίδια των 4 mL
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου 100-1000 μL και 10-100 μL
- Πιπέττες μιας χρήσεως
- Προστατευτικά γάντια και γυαλιά
-

Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Καφεϊκό (ή γαλλικό) οξύ, καθαρότητας > 98%
- Μεθανόλη, αναλυτικής καθαρότητας
- Εξάνιο, αναλυτικής καθαρότητας
- Μίγμα Μεθανόλη:Νερό 80:20 v/v
- Απιονισμένο νερό
- Υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 5 % m/v

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

1. Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος

Για την παρασκευή πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ζυγίστηκαν 0,0545g γαλλικού οξέος και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, η οποία περιείχε περίπου 30 mL μίγματος Μεθανόλη:Νερό (80:20 v/v). Το περιεχόμενο της φιάλης αναδεύτηκε προσεκτικά προκειμένου να διαλυθεί πλήρως το οξύ και τέλος, συμπληρώθηκε ο όγκος με μίγμα Μεθανόλη:Νερό .

2. Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης

Από το μητρικό διάλυμα γαλλικού οξέος 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, μεταφέρθηκαν με μηχανικό σιφώνιο 100, 200, 400, 600 και 800 μL σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, συμπληρώθηκαν έως τη χαραγή με απιονισμένο νερό και αναδεύτηκαν επιμελώς.

Εκχύλιση φαινολικών συστατικών

Για την παρασκευή των δειγμάτων ελαιολάδου, αρχικά ζυγίστηκε 1 g ελαιολάδου με ακρίβεια 0,1 mg σε σωλήνες φυγόκεντρου των 10-15mL στους οποίους προστέθηκε 2 mL εξάνιο με σιφώνιο και πραγματοποιήθηκε ανάδευση του περιεχομένου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL μίγματος Μεθανόλη: Νερό (80:20 v/v) με σιφώνιο και το μίγμα τοποθετήθηκε στον κυκλοαναμίκτη για 2 min. Εφόσον η διαδικασία έχει πραγματοποιηθεί για όλα τα δείγματα, τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο για 10 min στις 2500 rpm. Έπειτα εφόσον αφαιρέθηκε η άνω στοιβάδα του εξανίου με χρήση πλαστικής πιπέτας Pasteur και απορρίφθηκε, συλλέχθηκε τμήμα της κατώτερης στοιβάδας σε φιαλίδια με βιδωτό πώμα, η οποία περιείχε τα φαινολικά συστατικά του δείγματος.

Μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC)

Αρχικά, σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 mL μεταφέρθηκαν 0,5 mL φαινολικού εκχυλίσματος και προστέθηκαν 0,5 mL απιονισμένο νερό. Έπειτα προστέθηκαν 5 mL αντιδραστηρίου F-C 1:10 (v/v αραιωμένο), αναδεύθηκε σε κυκλοαναμίκτη και παρέμεινε σε ηρεμία για 3 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 mL διαλύματος ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 (5% m/v), αναδεύθηκε και παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος για 2h. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 765nm σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (JASCO).

Για κάθε διάλυμα βαθμονόμησης, μεταφέρεται στον δοκιμαστικό σωλήνα των 15 mL, 1 mL από κάθε διάλυμα ενώ για τον λευκό προσδιορισμό 1 mL απιονισμένο νερό. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, είναι ίδια με την προαναφερθείσα.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν.

Αποτελέσματα

Υπολογισμός βιοφαινολών στο ελαιόλαδο

Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC

1. Μέτρηση της μάζας στα 21 δείγματα που μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10mL με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
2. Υπολογισμός των συντελεστών απόκρισης των εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης (RF)

Για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης RRF_{tyr} και RRF_{syr} , έγινε εφαρμογή των παρακάτω σχέσεων για κάθε επαναληπτική μέτρηση των προτύπων διαλυμάτων και λήφθηκε η μέση τιμή \bar{x} .

RF1 μg (syringic acid)=Area syringic acid/ μg syringic acid injected

Rf2 μg (tyrosol)= Area tyrosol/ μg tyrosol injected

Πίνακας 5:Υπολογισμός συντελεστών απόκρισης των εξωτερικών προτύπων βαθμονόμησης

	Tyrosol	Syringic
CAL 1	5,986	14,539
CAL 2	5,436	14,436
CAL 3	5,652	14,456
CAL 4	5,514	14,375
Επομένως για κάθε CAL προκύπτει		
Syringic		
CAL 1	Rf1 μg syringic	46,5994
CAL 2	Rf1 μg syringic	46,2692
CAL 3	Rf1 μg syringic	46,3333
CAL 4	Rf1 μg syringic	46,0737
	Μέση τιμή \bar{x}	46,3189
Tyrosol		
CAL 1	Rf2 μg tyrosol	9,8779
CAL 2	Rf2 μg tyrosol	8,9703
CAL 3	Rf2 μg tyrosol	9,3267
CAL 4	Rf2 μg tyrosol	9,0990
	Μέση τιμή \bar{x}	9,3185

Σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από τον Πίνακα 5, η αναλογία του παράγοντα απόκρισης του συριγγικού οξέος προς την τυροσόλη υπολογίστηκε 4,9706 ($RRF_{syr/tyr}=4,9706$). Η τιμή αυτή είναι σύμφωνη με τις προδιαγραφές του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιοκομίας καθώς η τιμή του $RRF_{syr/tyr}$ απαιτείται να είναι σταθερή και εντός των ορίων $5,1\pm 0,4$, ώστε το

τελικό αποτέλεσμα να εκφράζεται ως τυροσόλη, χρησιμοποιώντας το συριγγικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο (International Olive Oil Council 2022).

3. Αποτελέσματα υπολογισμών για το βιοφαινολικό περιεχόμενο στα δείγματα με τη μέθοδο της HPLC

Η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου (υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, φυσική και οξειδωμένη ελευρωπαΐνη και παράγωγα λιγκστροσίδης, λιγνάνες, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα), υπολογίστηκε μέσω της μέτρησης του αθροίσματος των περιοχών των σχετικών χρωματογραφικών κορυφών (Πίνακας 4) και εκφράζεται σε mg/kg,.

Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (2022), ο μαθηματικός τύπος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο εξής:

$$\text{mg/kg} = \frac{(\Sigma A) * 1000 * \text{RRF}_{\frac{\text{SYR}}{\text{TYR}}} * W_{\text{SYR.acid}}}{(A_{\text{SYR.acid}}) * (W)}$$

όπου

- ΣΑ: το άθροισμα των εμβαδών κορυφής των φαινολικών ενώσεων που καταγράφηκαν στα 280 nm.
- A *syр.acid*: το εμβαδό κορυφής του εσωτερικού προτύπου συριγγικού οξέος που καταγράφεται στα 280 nm.
- 1000: ο παράγοντας που χρησιμοποιείται για την έκφραση του αποτελέσματος σε mg/kg.
- W: η μάζα του δείγματος ελαιόλαδου σε g.
- $\text{RRF}_{\text{SYR/TYR}}$: ο σχετικός συντελεστής απόκρισης για την έκφραση των τελικών αποτελεσμάτων ως ισοδύναμα τυροσόλης.
- W *syр. οξύ*: η μάζα (σε mg) του συριγγικού οξέος που προστέθηκε στο δείγμα (International Olive Oil Council 2022)

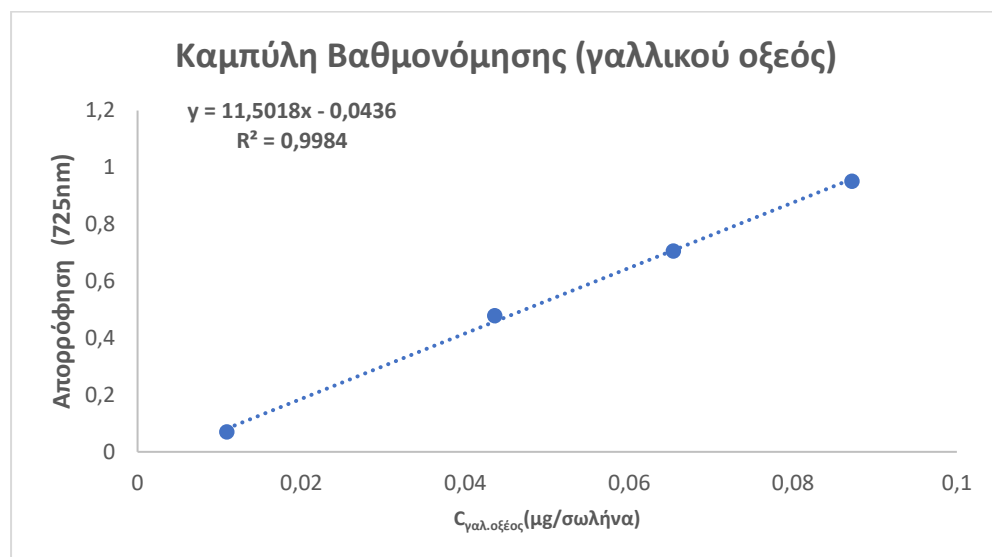
Πίνακας 6:Υπολογισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιόλαδου στα 21 δείγματα με τη μέθοδο HPLC

Δείγματα	Μάζα g	Εμβαδόν Βιοφαινολών	Εμβαδόν Συρ.οξέος	Συγκέντρωση mg/kg
Δ1Η1	2,0239	17,362	3,174	208
Δ2Η1	2,016	13,378	1,542	331
Δ3Η1	2,025	14,34	1,843	296
Δ4Η1	2,003	25,619	1,143	862
Δ5Η1	2,0028	4,774	2,933	63
Δ6Η1	2,015	13,719	1,732	303
Δ7Η1	2,0194	21,93	1,914	437
Δ1Η2	2,002	12,822	2,006	246
Δ2Η2	2,0279	22,707	1,628	530
Δ3Η2	2,0042	10,418	2,091	191
Δ4Η2	2,0143	18,208	1,968	354
Δ5Η2	2,0267	31,511	1,7	704
Δ6Η2	2,0021	19,909	1,992	385
Δ7Η2	2,0182	12,967	2,82	175
Δ1Η3	2,0158	20,369	1,635	476
Δ2Η3	2,0107	16,301	2,017	310
Δ3Η3	2,0055	22,79	1,384	632
Δ4Η3	2,0148	9,002	1,684	204
Δ5Η3	2,009	16,701	1,914	334
Δ6Η3	2,0018	13,035	1,948	257
Δ7Η3	2,014	18,095	2,083	332

Δοκιμή με το αντιδραστήριο F-C

1. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις και οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων στα 765nm .

Σύμφωνα με τα δεδομένα που αναγράφονται στον πίνακα 7 και την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης (Διάγραμμα 1) με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, προκύπτει η εξίσωση $y=11,5018x - 0,0436$ με συντελεστή προσδιορισμού $R^2 = 0,9984$.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων

2. Αποτελέσματα υπολογισμών για το βιοφαινολικό περιεχόμενο στα δείγματα με τη μέθοδο του αντιδραστήριου F-C.

Πίνακας 7:Υπολογισμός του βιοφαινολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιόλαδου στα 21 δείγματα με τη μέθοδο FC

Κωδ. Δείγματος	Μάζα (g)	Απορρόφηση (765 nm)	μg ισοδυνάμων γαλλικού οξέος/σωλήνα	mg ισοδ. Γαλλικού οξέος/kg ελαιολάδου
Δ1Η1	2,0239	0,7815	67,9909	425
Δ2Η1	2,0160	0,4804	40,6182	271
Δ3Η1	2,0250	0,3443	28,2455	200
Δ4Η1	2,0030	0,6870	59,4000	381
Δ5Η1	2,0028	0,7133	61,7909	394
Δ6Η1	2,0150	0,4592	38,6909	260
Δ7Η1	2,0194	0,6313	54,3364	349
Δ1Η2	2,0020	0,3601	29,6818	210
Δ2Η2	2,0279	0,7921	68,9545	430
Δ3Η2	2,0042	0,7240	62,7636	400
Δ4Η2	2,0143	0,6603	56,9727	365
Δ5Η2	2,0267	0,7719	67,1182	420
Δ6Η2	2,0021	0,7025	60,8091	389
Δ7Η2	2,0182	0,7430	64,4909	407
Δ1Η3	2,0158	0,6936	60,0000	382
Δ2Η3	2,0107	0,5424	46,2545	304
Δ3Η3	2,0055	0,7762	67,5091	426
Δ4Η3	2,0148	0,3632	29,9636	211
Δ5Η3	2,0090	0,7018	60,7455	387
Δ6Η3	2,0018	0,6908	59,7455	383
Δ7Η3	2,0140	0,5613	47,9727	313

Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων ελαιόλαδου με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης HPLC και με τη δομική με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Design Expert.

Ανάλυση δεδομένων για την επίδραση των δύο παραγόντων στο φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου με τη μέθοδο της HPLC

Σύμφωνα με το Design Expert, το ιδανικό στατιστικό μοντέλο για την ανάδειξη της κατάλληλης ποσότητας παραγόντων άλατος- νερού για την αύξηση των ολικών φαινολικών ενώσεων από τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από την μέθοδο της HPLC, φάνηκε να είναι το μοντέλο παλινδρόμησης 2FI, το οποίο περιλαμβάνει τους δύο παράγοντες (αλάτι, νερό) και την αλληλεπίδρασή τους.

Πίνακας 8 :Ανάδειξη του κατάλληλου στατιστικού μοντέλου για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC μέσω του λογισμικού Design Expert

Source	Model p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Design Model	0.0376	0.7793	0.4894	0.1809	
Linear	0.2813	0.4581	0.0465	-0.5962	
2FI	0.0012	0.8463	0.5561	0.2560	Suggested
Quadratic	0.4798	0.8306	0.5395	0.1809	Aliased

Γενικά για κάθε μοντέλο, η σημαντικότητα των όρων οφείλεται να αξιολογείται με ANOVA, η οποία εκτελεί μια σύγκριση της διακύμανσης στην απόκριση με την διακύμανση που προκύπτει από τυχαία λάθη.

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την καταλληλότητα του μοντέλου που προέκυψαν από τον έλεγχο με ANOVA. Η τιμή *p-value* του στατιστικού μοντέλου ήταν μικρότερη του 0,05 σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% και επομένως το μοντέλο 2FI κρίνεται σημαντικό. Επίσης, προκύπτει πως ο παράγοντας A (αλάτι) καθώς και η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων (AB) ήταν στατιστικώς σημαντικοί όροι, ενώ ο παράγοντας B (νερό) δεν βρέθηκε σημαντικός. Επομένως, οι στατιστικώς σημαντικοί όροι του μοντέλου επηρεάζουν την περιεκτικότητα των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο.

Πίνακας 9: Έλεγχος ANOVA για την καταλληλότητα του μοντέλου παλινδρόμησης 2FI για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	9881.83	2	4940.91		
Model	2.407E+05	3	80238.96	7.68	0.0033 significant
A-salt	54612.18	1	54612.18	5.23	0.0396
B-water	25307.94	1	25307.94	2.42	0.1436
AB	1.783E+05	1	1.783E+05	17.07	0.0012
Residual	1.358E+05	13	10446.30		
Lack of Fit	82131.93	10	8213.19	0.4591	0.8463 not significant
Pure Error	53669.98	3	17889.99		
Cor Total	3.864E+05	18			

Η καταλληλότητα του μοντέλου μπορεί να υποστηριχθεί και από τον έλεγχο έλλειψης καλής προσαρμογής (Lack of Fit) καθώς η τιμή 0,8463 υποδηλώνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής προσδιορισμού R^2 (Predicted $R^2 = 0,2560$) δεν είναι τόσο κοντά στον προσαρμοσμένο συντελεστή προσδιορισμού R^2 (Adjusted $R^2 = 0,5561$) καθώς η διαφορά είναι μεγαλύτερη από 0,2. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδεικνύει μία μεγάλη επίδραση του παράγοντα τμηματοποίησης του μοντέλου (Block effect), η οποία στην περίπτωση της παρούσας μελέτης πιθανότατα οφείλεται στην κατάψυξη των δύο δειγμάτων ελαιοκάρπου ενώ το 1^ο δείγμα υποβλήθηκε σε μάλαξη άμεσα (χωρίς κατάψυξη).

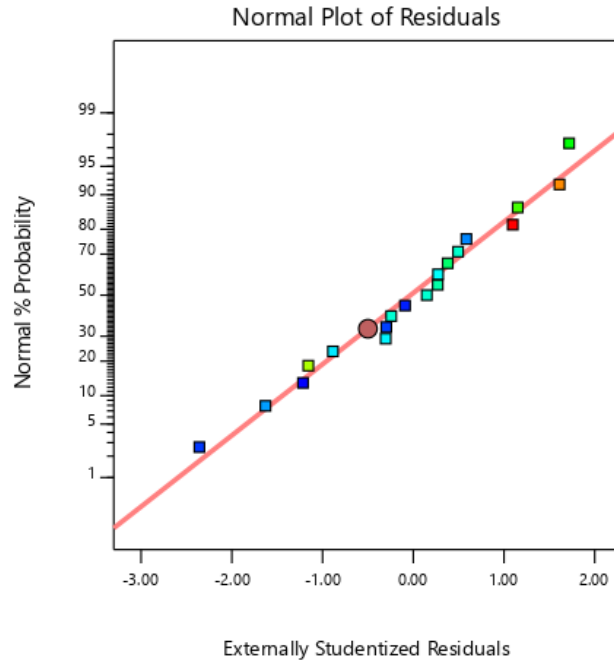
Τα διαγνωστικά του μοντέλου ελέγχθηκαν και αφαιρέθηκαν από την ανάλυση τα δείγματα Δ4H1 και Δ5H1 ως έκτροπες τιμές. Μετά την αφαίρεση αυτών των τιμών, πραγματοποιήθηκε εκ νέου διαγνωστικός έλεγχος του μοντέλου. Από το διάγραμμα κανονικής κατανομής των υπολοίπων (Normal Plot of Residuals) (Διάγραμμα 2) καθώς και από το διάγραμμα των υπολοίπων σε σχέση με τα προβλεπόμενα υπόλοιπα (Διάγραμμα 3) παρατηρείται μία σχετικά ομοιόμορφη κατανομή κοντά στην ευθεία και εντός των ορίων αντίστοιχα, γεγονός που επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του στατιστικού μοντέλου που επιλέχθηκε.

Design-Expert® Software

R1

Color points by value of R1:

175.538  704.642



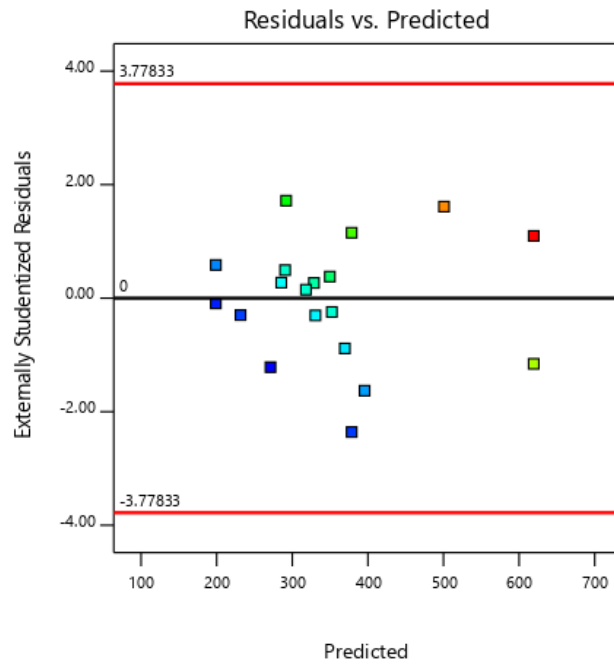
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα κανονικής κατανομής υπολοίπων για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC

Design-Expert® Software

R1

Color points by value of R1:

175.538  704.642



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα κατανομής υπολοίπων ως προς τις προβλεπόμενες τιμές για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC

Σύμφωνα με το διάγραμμα Box-Cox, η τιμή του λ η οποία παράγει το σύνολο δεδομένων με μικρότερη διασπορά υπολειμμάτων ισούται με 0,92 με διάστημα εμπιστοσύνης 0,13-1,8. Από την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας μεθόδου, το λ ισούται με 1, οπότε επιβεβαιώνεται ότι δεν απαιτείται μετασχηματισμός της μεταβλητής.

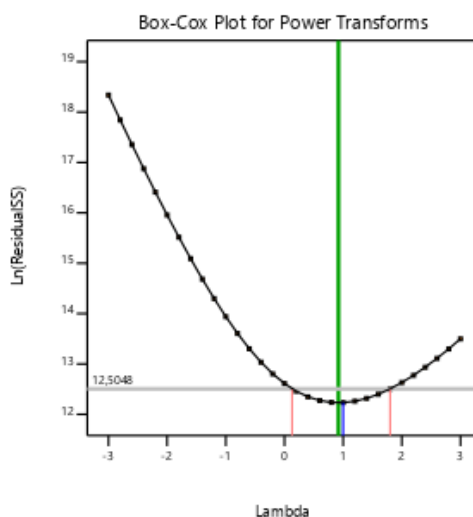
Design-Expert® Software

R1

Current transform:
None

Current Lambda = 1
Best Lambda = 0,92
CI for Lambda: (0,13, 1,8)

Recommended transform:
None
(Lambda = 1)



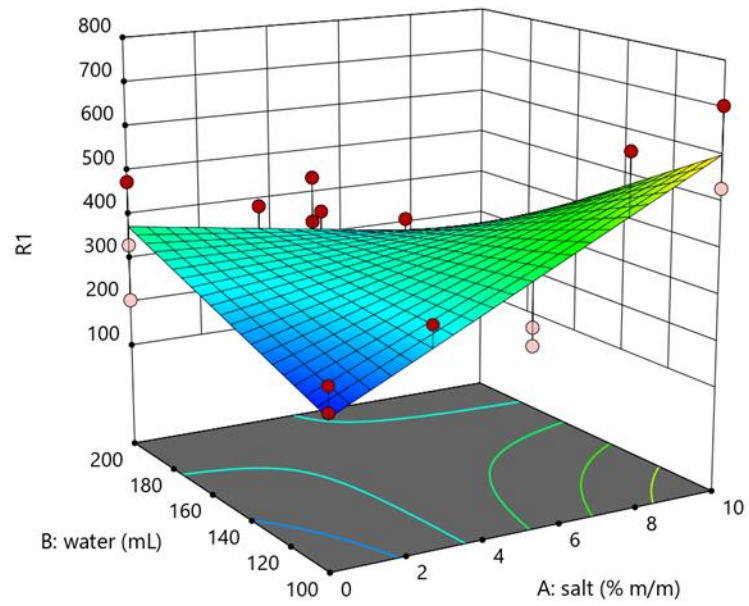
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα Box-Cox για τα δεδομένα που προέκυψαν με την μέθοδο της HPLC

Εφόσον, η επιλογή του μοντέλου φάνηκε η καταλληλότερη για την ανάλυση των δεδομένων της HPLC, εξετάστηκε η επιφάνεια απόκρισης (response surface) προκειμένου να βρεθούν οι πειραματικές συνθήκες που παρείχαν την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο κατά τη διάρκεια της μάλαξης όταν μεταβάλλονται οι παράγοντες Αλάτι και Νερό. Είναι εμφανές (Διάγραμμα 6) ότι το μέγιστο στην αποκριτική επιφάνεια παρατηρείται όταν ο παράγοντας Αλάτι (salt % m/m) λάβει τη μέγιστη τιμή του (= 10 % m/m) και ταυτόχρονα, ο παράγοντας Νερό (water, mL) λάβει τη μικρότερη τιμή (= 100 mL) από αυτές που μελετήθηκαν. Τα ανωτέρω επιβεβαιώθηκαν με την βελτιστοποίηση του μοντέλου από την οποία προέκυψε τιμή επιθυμητότητας (desirability value) ίση με 0,805. Επομένως, η μέγιστη δυνατή περιεκτικότητα φαινολικών συστατικών (= 530 mg/kg) παρατηρήθηκε όταν κατά τη μάλαξη του ελαιολάδου προστέθηκε αλάτι σε συγκέντρωση 10% m/m και όγκος νερού ίσος με 100 mL.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
175.538 704.642

X1 = A: salt
X2 = B: water



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την απόδοση της εκχύλισης ως συνάρτηση του παράγοντα αλάτι (A) και νερό (B) για την αύξηση της απόδοσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο της HPLC

Ανάλυση δεδομένων για την επίδραση των δύο παραγόντων στο φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου με τη μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu Σύμφωνα με το Desing Expert, το ιδανικό στατιστικό μοντέλο για την ανάδειξη της κατάλληλης ποσότητας των παραγόντων Αλάτι - Νερό για την αύξηση των ολικών φαινολικών ενώσεων από τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από την μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu, φάνηκε να είναι το γραμμικό μοντέλο. (Πίνακας 10)

Πίνακας 10: Ανάδειξη του κατάλληλου στατιστικού μοντέλου για την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τη μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu

Source	Model p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Design Model	0,2985	0,9866	0,1123	-0,5805	
Linear	0,0412	0,9932	0,2448	-0,2053	Suggested
2FI	0,9494	0,9884	0,1947	-0,3971	
Quadratic	0,9062	0,9804	0,1381	-0,5805	Aliased

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ANOVA για την καταλληλότητα του γραμμικού μοντέλου. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τιμές p-value μικρότερες του 0,05 προσδίδουν στατιστική σημαντικότητα σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Από τον πίνακα 11 επομένως προκύπτει ότι το γραμμικό στατιστικό μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό ($p = 0,04$) και ότι ο παράγοντας A (αλάτι) είναι επίσης σημαντικός ($p < 0,05$). Η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit) βρέθηκε στατιστικώς μη σημαντική ($p = 0,17$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Επομένως το επιλεγμένο μοντέλο (γραμμικό) μπορεί να θεωρηθεί κατάλληλο για την περιγραφή των δεδομένων.

Πίνακας 11: Έλεγχος ANOVA για την καταλληλότητα του γραμμικού μοντέλου για την επεξεργασία των δεδομένων από τη μέθοδο με το αντιδραστήριο F-C

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	8418,30	2	4209,15		
Model	35230,99	2	17615,49	3,92	0,0412 significant
A-salt	34205,11	1	34205,11	7,61	0,0140
B-water	877,15	1	877,15	0,1951	0,6646
Residual	71935,53	16	4495,97		
Lack of Fit	19476,01	11	1770,55	0,1688	0,9932 not significant
Pure Error	52459,52	5	10491,90		
Cor Total	1,156E+05	20			

Η αρνητική τιμή του προβλεπόμενου συντελεστή προσδιορισμού R^2 (Predicted R^2) υποδηλώνει ότι ο συνολικός μέσος όρος μπορεί να είναι καλύτερος προγνωστικός δείκτης της απόκρισης από το τρέχον μοντέλο.

Σύμφωνα με το διάγραμμα κανονικής κατανομής των υπολοίπων (Normal Plot of Residuals) (Διάγραμμα 7) καθώς και από το διάγραμμα κατανομής υπολοίπων σε σχέση με τα προβλεπόμενα υπόλοιπα (Διάγραμμα 8) παρατηρείται μία ομοιόμορφη κατανομή κοντά στην ευθεία και εντός των ορίων αντίστοιχα, γεγονός που επιβεβαιώνει την καταλληλότητα του στατιστικού μοντέλου που επιλέχθηκε.

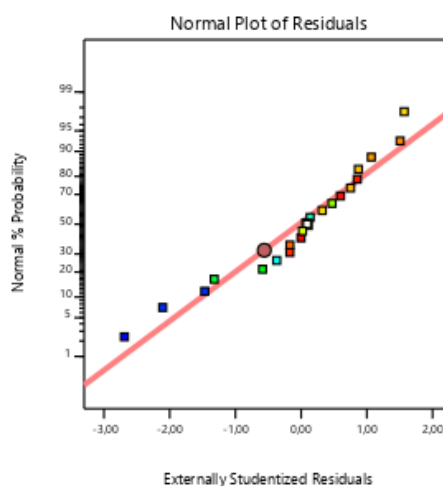
Design-Expert® Software

R1

Color points by value of

R1:

199,853  429,951



Διάγραμμα 6: Διάγραμμα Κανονικότητας Υπολοίπων από τη μέθοδο με αντιδραστήριο FC

Σύμφωνα με το διάγραμμα Box-Cox, (Διάγραμμα 9) η τιμή του λ η οποία παράγει το σύνολο δεδομένων με μικρότερη διασπορά υπολειμμάτων ισούται με 1. Από την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας μεθόδου, το λ ισούται με 3, οπότε δεν χρειάζεται μετατροπή του στατικού μοντέλου.

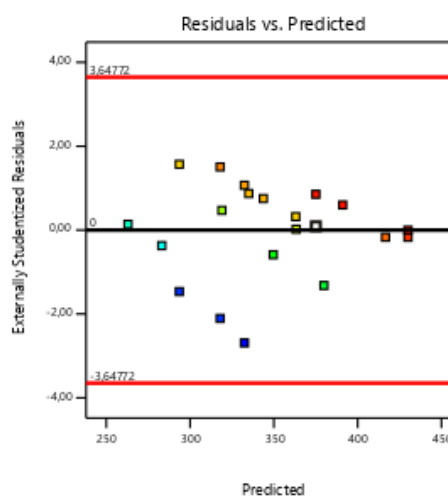
Design-Expert® Software

R1

Color points by value of

R1:

199,853  429,951



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα Κατανομής Υπολοίπων προς τις Προβλεπόμενες τιμές από τα δεδομένα που προέκυψαν από την μέθοδο με αντιδραστήριο FC

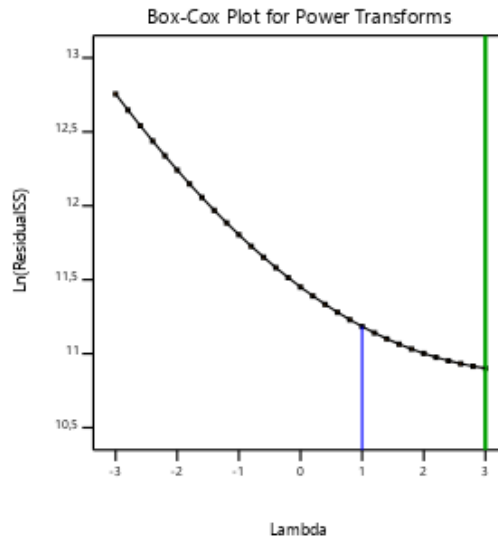
Design-Expert® Software

R1

Current transform:
None

Current Lambda = 1
Best Lambda = 3

Recommended transform:
None
(Lambda = 1)



Διάγραμμα 8: Διάγραμμα Box-Cox από τα δεδομένα της μεθόδου με αντιδραστήριο FC

Όπως διαπιστώνεται και παρακάτω με την βοήθεια των διαστημάτων εμπιστοσύνης, τα άκρα των διαστημάτων εμπιστοσύνης είναι αρκετά κοντά στην γραμμική ευθεία, ένδειξη καλή για την καταλληλότητα του μοντέλου.

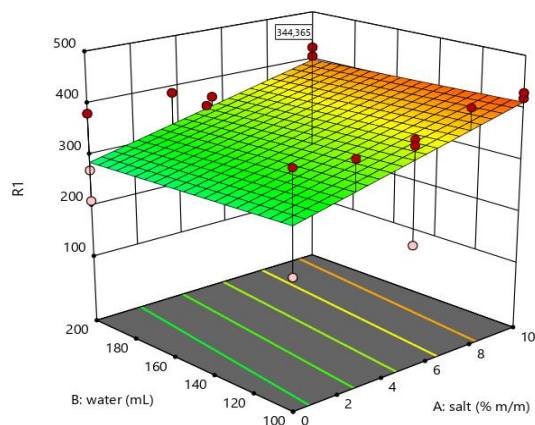
Αφού επιβεβαιώθηκε η στατιστική σημαντικότητα του γραμμικού μοντέλου, ακολούθησε ο εντοπισμός των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών για την επίτευξη υψηλής απόδοσης εκχύλισης των φαινολικών συστατικών κατά την μάλαξη της ελαιόπαστας. Από το Διάγραμμα 10 της επιφάνειας απόκρισης προκύπτει ότι η μέγιστη περιεκτικότητα σε φαινολικά συστατικά παρατηρείται όταν ο παράγοντας Αλάτι λάβει τη μέγιστη τιμή (10 % m/m), ανεξαρτήτως της τιμής του παράγοντα Νερό, ο οποίος βρέθηκε μη σημαντικός.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1

- Design points above predicted value
 - Design points below predicted value
- 199,853 429,951

X1 = A: salt
X2 = B: water



Διάγραμμα 9: Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την απόδοση της εκχύλισης ως συνάρτηση του παράγοντα αλάτι (A) και νερό (B) για την αύξηση της απόδοσης του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο ελαιόλαδο με τη μέθοδο με αντιδραστήριο FC

Συζήτηση- Συμπεράσματα

Το ελαιόλαδο αποτελεί σπουδαίο πεδίο μελέτης χάρις του πλούσιου χημικού προφίλ του. Η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου του ελαιόλαδου έχει αναφερθεί επανειλημμένα στη βιβλιογραφία, ωστόσο παρατηρούνται ασυνέπειες στις συγκεντρώσεις. Οι δύο συνηθέστερες χρωματομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φαινολών στα έλαια αναφέρονται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η οποία αποτελεί και την πιο εφαρμοσμένη μέθοδο και η μέθοδος με αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu (Servili κ.ά. 2004).

Από τις δύο αυτές μέθοδοι φαίνονται να προκύπτουν ποικίλες τιμές ως προς το φαινολικό περιεχόμενο του ελαιολάδου, γεγονός το οποίο ενδέχεται να οφείλεται στην μη ακρίβεια των μεθόδων για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας. Μελέτες υποστηρίζουν πως σε περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιείται για την επεξεργασία του ελαίου υπεριώδη ακτινοβολία και έπειτα εκχύλιση, η μέθοδος με αντιδραστήριο Folin- Ciocalteu δεν καθίσταται ικανοποιητική για τον υπολογισμό των φαινολικών ενώσεων. Επιπρόσθετα η ανάλυση με τη μέθοδο HPLC αναφέρεται πως περιορίζεται από τη διαδικασία εκχύλισης και την πολυπλοκότητα του φαινολικού κλάσματος (Tuck και Hayball 2002).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού του ολικού φαινολικού περιεχομένου στο ελαιόλαδο, διέφεραν ως προς την τιμή της συγκέντρωσης, (HPLC 530mg/kg ενώ FC 430mg/kg) .Ωστόσο προέκυψε τόσο από την μέθοδο με HPLC όσο και από την μέθοδο με αντιδραστήριο με FC πως η κατάλληλη πειραματική συνθήκη για την συγκέντρωση των παραγόντων Άλατος και Νερού για την επίτευξη της υψηλότερης απόδοσης εκχύλισης φαινολών στο ελαιόλαδο ήταν Αλάτι 10% , Νερό 100mL σε 500g ελαιόπαστας με προσθήκη 5g MNT κατά τη διάρκεια της μάλαξης σε θερμοκρασία 30°C για χρονικό διάστημα 30min.

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, οι παράμετροι «χρόνος» και «θερμοκρασία» μάλαξης φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τα χαρακτηριστικά ποιότητας του ελαιολάδου ενώ οι παράμετροι «προσθήκη talc, άλατος και νερού» να επηρεάζουν την περιεκτικότητα των φαινολών. Πολλές έρευνες σχετικά με αυτούς τους παράγοντες έχουν πραγματοποιηθεί χωρίς να έχουν καταλήξει σε κάποια ακριβή όρια προσθήκης αυτών για την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης των φαινολικών ενώσεων. Στη παρούσα μελέτη, ο παράγοντας αλάτι προτείνεται σε ποσότητα 10% ενώ οι Sergio Cruz και συνεργάτες του(Cruz κ.ά. 2007) είχαν καταλήξει ότι μία ποσότητα μεγαλύτερης του 1,2% άλατος δεν επέφερε αποτελέσματα (Pérez κ.ά. 2008). Ως προς την προσθήκη νερού, η βιβλιογραφία αναφέρει πως η χρήση μαλακτήρα δύο φάσεων για την μάλαξη της

ελαιόπαστας με προσθήκη έως 0,2L/kg χλιαρό νερό, θα έχει θετικά αποτελέσματα στο φαινολικό περιεχόμενο του ελαιόλαδου (Gimeno κ.ά. 2002; Sadkaoui κ.ά. 2016). Πράγματι από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, η ποσότητα του νερού που προτάθηκε τόσο από την HPLC όσο και από την ανάλυση με το αντιδραστήριο FC φαίνεται να συμφωνεί με την βιβλιογραφία καθώς 100 mL στα 500 g ελαιόπαστας δεν υπερβαίνει το όριο των 0,2L/kg.

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν ύψιστης σημασίας συστατικά του ελαιόλαδου διότι αυξάνουν τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά, τις οργανοληπτικές του ιδιότητες και προσδίδουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Στην ανταγωνιστική αυτή περίοδο των βιομηχανιών, η αύξηση του φαινολικού περιεχομένου καθίσταται ιδιαίτερα σημαντική διότι με την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων τέτοιου είδους μελετών μπορεί να διαμορφώσουν μία πιο γρήγορη, οικονομική και πρωτίστως αξιόπιστη παραγωγική διαδικασία για τα προϊόντα τους.

Βιβλιογραφία

- Απόστολος Κ. Κυριτσάκης. 2007a. *Ελαιόλαδο, Συμβατικό και Βιολογικό-Βρώσιμη Ελιά-Πάστας Ελιάς*. Τέταρτη Έκδοση. Θεσσαλονίκη.
- Απόστολος Κ. Κυριτσάκης. 2007b. *Τεχνολογία και Έλεγχος Ποιότητας Ελαιολάδου-Λιπαρών Υλών*. Θεσσαλονίκη.
- Γεώργιος Δ. Μπαλατσούρας. 2004. *Σύγχρονη Ελαιοκομία, η επιτραπέζια ελιά*. τ. 3. Αθήνα.
- Δημήτριος Παπαναστασίου. 1966. *Σύγχρονη ελαιουργία – Η τεχνολογία των ελαίων*. Αθήνα.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. 2009. *Ελαιόλαδο*.
- Νικόλας Δ. Λύχνος. 1949. *Το δένδρον της ελαίας και η καλλιέργειά του*. Αθήνα.
- Πάνος Θ. Αναγνωστόπουλος. 1940. *Η Ελληνική Δενδροκομία*.
- Al-Khalid, Taghreed, και Muftah H. El-Naas. 2012. 'Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review'. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42(16):1631–90. doi: 10.1080/10643389.2011.569872.
- Alves, Eliana, Maria do Rosário Domingues, και Pedro Domingues. 2023. 'Chapter 4 - Olive oil'. Σσ. 97–129 στο *Functional Foods and Their Implications for Health Promotion*, επιμέλεια I. Zabetakis, A. Tsoupras, R. Lordan, και D. Ramji. Academic Press.
- Ambra, Roberto, Fausta Natella, Sabrina Lucchetti, Valentina Forte, και Gianni Pastore. 2017. 'α-Tocopherol, β-Carotene, Lutein, Squalene and Secoiridoids in Seven Monocultivar Italian Extra-Virgin Olive Oils'. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68(5):538–45. doi: 10.1080/09637486.2016.1265099.
- Ayesha Mushtaq, Muhammad Adnan Ayub, Muhammad Asif Hanif, Muhammad Adnan Ayub, Mehrez Romdhane, και Ijaz Ahmad Bhatti. 2019. 'Chapter 40 - Olive'. Σσ. 542–52 στο *Medicinal Plants of South Asia*. Susan Dennis.
- Ben Brahim, Samia, Fatma Marrakchi, Boutheina Gargouri, και Mohamed Bouaziz. 2015. 'Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali'. *LWT - Food Science and Technology* 63(1):243–52. doi: 10.1016/j.lwt.2015.03.013.
- Borges, Thays H., José Alberto Pereira, Carmen Cabrera-Vique, Luis Lara, Adelson F. Oliveira, και Isabel Seiquer. 2017. 'Characterization of Arbequina Virgin Olive Oils Produced in Different Regions of Brazil and Spain: Physicochemical Properties, Oxidative Stability and Fatty Acid Profile'. *Food Chemistry* 215:454–62. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.162.
- Boskou, Dimitrios, Georgios Blekas, και Maria Tsimidou. 2006. '4 - Olive Oil Composition'. Σσ. 41–72 στο *Olive Oil (Second Edition)*, επιμέλεια D. Boskou. AOCS Press.
- Bouhia, Youness, Mohamed Hafidi, Yedir Ouhdouch, και Karim Lyamlouli. 2023. 'Olive mill waste sludge: From permanent pollution to a highly beneficial organic biofertilizer: A critical review and future perspectives'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 259:114997. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114997.

- Caponio, Francesco, Vincenzo Alloggio, και Tommaso Gomes. 1999. 'Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques'. *Food Chemistry* 64(2):203–9. doi: 10.1016/S0308-8146(98)00146-0.
- Caponio, Francesco, Giacomo Squeo, Graziana Difonzo, Antonella Pasqualone, Carmine Summo, και Vito Michele Paradiso. 2016. 'Has the Use of Talc an Effect on Yield and Extra Virgin Olive Oil Quality?' *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(10):3292–99. doi: 10.1002/jsfa.7658.
- Clodoveo, Maria Lisa. 2012. 'Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future – An overview'. *Trends in Food Science & Technology* 25(1):13–23. doi: 10.1016/j.tifs.2011.11.004.
- Cruz, Sergio, Khaled Yousfi, Ana G. Pérez, Cristina Mariscal, και José M. Garcia. 2007. 'Salt Improves Physical Extraction of Olive Oil'. *European Food Research and Technology* 225(3):359–65. doi: 10.1007/s00217-006-0423-9.
- De Faveri, Danilo, Bahar Aliakbarian, Milvio Avogadro, Patrizia Perego, και Attilio Converti. 2008. 'Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: Effect of different enzyme activities and levels'. *Biochemical Engineering Journal* 41(2):149–56. doi: 10.1016/j.bej.2008.04.007.
- Diamantakos, Panagiotis, Triada Giannara, Maria Skarkou, Eleni Melliou, και Prokopios Magiatis. 2020. 'Influence of Harvest Time and Malaxation Conditions on the Concentration of Individual Phenols in Extra Virgin Olive Oil Related to Its Healthy Properties'. *Molecules* 25(10):2449. doi: 10.3390/molecules25102449.
- Dimitrios Boskou. 2006. 'Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit'. Σσ. 13–19 στο *Olive Oil*. Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Esti, Marco, Luciano Cinquanta, και Ennio La Notte. 1998. 'Phenolic Compounds in Different Olive Varieties'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(1):32–35. doi: 10.1021/jf970391+.
- Frank D. Gunstone, Dimitrios Boskou. 2002. 'Olive oil'. στο *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. Canada: Blackwell.
- Gimeno, E., A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M. C. De la Torre, και M. C. López-Sabater. 2002. 'The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil'. *Food Chemistry* 78(2):207–11. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00399-5.
- H. Ouazzane, F.Laajin, M.El Yamani, J. El Hilaly, Y. Rharrabti, M-Y. Amarouch, και D. Mazouzi. 2017. 'Olive Mill Solid Waste Characterization and Recycling opportunities : A review'. 8(8):2632–50.
- Hashmi, Muhammad Ali, Afsar Khan, Muhammad Hanif, Umar Farooq, και Shagufta Perveen. 2015. 'Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea Europaea* (Olive)'. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015:e541591. doi: 10.1155/2015/541591.
- International Olive Oil Council. 2000. *World Catalogue of Olive Varieties*. Spain.

- International Olive Oil Council. 2022. 'Document to declare the use of IOC methods for phenolic compounds determination'.
- International Olive Oil Council. χ.χ.-a. *Olive Word, Table Olives*.
- International Olive Oil Council. χ.χ.-b. *The Olive Tree*.
- Ioannis Nikolaos Therios. 2009. *Olives*.
- Jimenez-Lopez, Cecilia, Maria Carpena, Catarina Lourenço-Lopes, Maria Gallardo-Gomez, Jose M. Lorenzo, Francisco J. Barba, Miguel A. Prieto, και Jesus Simal-Gandara. 2020. 'Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil'. *Foods* 9(8):1014. doi: 10.3390/foods9081014.
- Kiritsakis, A., και P. Markakis. 1988. 'Olive Oil: A Review'. Σσ. 453–82 στο *Advances in Food Research*. τ. 31, επιμέλεια C. O. Chichester, E. M. Mrak, και B. S. Schweigert. Academic Press.
- Kosma, Ioanna, Kornilia Vatavali, Stavros Kontakos, Michael Kontominas, Apostolos Kiritsakis, και Anastasia 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):1373–84. doi: 10.1007/s11746-017-3036-5.
- Ma, Yiwei, Xinyue Ding, Jie Gu, Shengmin Zhou, και Yuanrong Jiang. 2023. 'Effects of olive oil on hepatic steatosis and liver enzymes: A systematic review'. *Journal of Functional Foods* 109:105815. doi: 10.1016/j.jff.2023.105815.
- Malheiro, Ricardo, Nuno Rodrigues, και José Pereira. 2015. 'Olive Oil Phenolic Composition as Affected by Geographic Origin, Olive Cultivar, and Cultivation Systems'.
- Marx, Ítala M. G., Susana Casal, Nuno Rodrigues, Teresa Pinho, Ana C. A. Veloso, José A. Pereira, και António M. Peres. 2021. 'Impact of the malaxation temperature on the phenolic profile of cv. Cobrançosa olive oils and assessment of the related health claim'. *Food Chemistry* 337:127726. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127726.
- Otero, Paz, P. Garcia-Oliveira, M. Carpena, M. Barral-Martinez, F. Chamorro, J. Echave, P. Garcia-Perez, Hui Cao, Jianbo Xiao, J. Simal-Gandara, και M. A. Prieto. 2021. 'Applications of by-products from the olive oil processing: Revalorization strategies based on target molecules and green extraction technologies'. *Trends in Food Science & Technology* 116:1084–1104. doi: 10.1016/j.tifs.2021.09.007.
- Ozturk, Munir, Volkan Altay, Tuba Mert Gönenç, Bengu Turkyilmaz Unal, Recep Efe, Eren Akçiçek, και Andleeb Bukhari. 2021. 'An Overview of Olive Cultivation in Turkey: Botanical Features, Eco-Physiology and Phytochemical Aspects'. *Agronomy* 11(2):295. doi: 10.3390/agronomy11020295.
- Pedan, Vasilisa, Martin Popp, Sascha Rohn, Matthias Nyfeler, και Annette Bongartz. 2019. 'Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil'. *Molecules* 24(11):2041. doi: 10.3390/molecules24112041.
- Pérez, Ana G., Carmen Romero, Khaled Yousfi, και José M. García. 2008. 'Modulation of Olive Oil Quality Using NaCl as Extraction Coadjuvant'. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85(7):685–91. doi: 10.1007/s11746-008-1252-8.

- Petrakis, Christos. 2006. '9 - Olive Oil Extraction'. Σσ. 191–223 στο *Olive Oil (Second Edition)*, επιμέλεια D. Boskou. AOCS Press.
- Phelps, C. D., και L. Y. Young. 1997. 'Microbial Metabolism of the Plant Phenolic Compounds Ferulic and Syringic Acids under Three Anaerobic Conditions'. *Microbial Ecology* 33(3):206–15. doi: 10.1007/s002489900023.
- Polymerou-Kamilakis, Aikaterini. 2006. 'The Culture of the Olive Tree (Mediterranean World)'. Σσ. 1–12 στο *Olive Oil (Second Edition)*, επιμέλεια D. Boskou. AOCS Press.
- Sadkaoui, Abir, Antonio Jiménez, Rafael Pacheco, και Gabriel Beltrán. 2016. 'Micronized Natural Talc with a Low Particle Size and a High Carbonate Rate Is More Effective at Breaking down Oil-in-Water Emulsion'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118(4):545–52. doi: 10.1002/ejlt.201500112.
- Safarzadeh Markhali, Fereshteh. 2021. 'Effect of Processing on Phenolic Composition of Olive Oil Products and Olive Mill By-Products and Possibilities for Enhancement of Sustainable Processes'. *Processes* 9(6):953. doi: 10.3390/pr9060953.
- Salvador, M. Desamparados, και Giuseppe Fregapane. 2010. 'Chapter 26 - Major and Minor Lipid Constituents of Cornicabra Virgin Olive Oil and the Influence of Crop Season Changes'. Σσ. 239–47 στο *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, επιμέλεια V. R. Preedy και R. R. Watson. San Diego: Academic Press.
- Sánchez, Antonio-Higinio, José Luis Ruiz-Barba, Antonio López-López, και Alfredo Montaña. 2021. 'Chapter 1 - Table olives: types and trade preparations'. Σσ. 5–14 στο *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention (Second Edition)*, επιμέλεια V. R. Preedy και R. R. Watson. San Diego: Academic Press.
- Sánchez, Sebastián, Inmaculada Olivares, Juan G. Puentes, Rafael Órpez, M. Dolores La Rubia, Rafael Pacheco, και Juan F. García Martín. 2022. 'Use of Natural Microtals during the Virgin Olive Oil Production Process to Increase Its Content in Antioxidant Compounds'. *Processes* 10(5):950. doi: 10.3390/pr10050950.
- Schmidt, Luana, Osmar Damian Prestes, Paula Rossini Augusti, και José Cláudio Fonseca Moreira. 2023. 'Phenolic compounds and contaminants in olive oil and pomace – A narrative review of their biological and toxic effects'. *Food Bioscience* 53:102626. doi: 10.1016/j.fbio.2023.102626.
- Servili, Maurizio, και GianFrancesco Montedoro. 2002. 'Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(9–10):602–13. doi: 10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X.
- Servili, Maurizio, Roberto Selvaggini, Sonia Esposito, Agnese Taticchi, GianFrancesco Montedoro, και Guido Morozzi. 2004. 'Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil'. *Journal of Chromatography A* 1054(1):113–27. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.070.
- Squeo, Giacomo, Graziana Difonzo, Carmine Summo, Carmine Crecchio, και Francesco Caponio. 2020. 'Study of the influence of technological coadjuvants on enzyme

- activities and phenolic and volatile compounds in virgin olive oil by a response surface methodology approach'. *LWT* 133:109887. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109887.
- Suvarna, Vasanti, και Dhvani Sharma. 2021. 'Chapter 14 - Overview of olive oil in vascular dysfunction'. Σσ. 165–74 στο *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention (Second Edition)*, επιμέλεια V. R. Preedy και R. R. Watson. San Diego: Academic Press.
- Tarabanis, Constantine, Clarine Long, Bianca Scolaro, και Sean P. Heffron. 2023. 'Reviewing the cardiovascular and other health effects of olive oil: Limitations and future directions of current supplement formulations'. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 33(12):2326–33. doi: 10.1016/j.numecd.2023.08.014.
- Tovar, M. J., M. J. Motilva, και M. P. Romero. 2001. 'Changes in the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil from Young Trees (*Olea Europaea* L. Cv. Arbequina) Grown under Linear Irrigation Strategies'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11):5502–8. doi: 10.1021/jf0102416.
- Tsimidou, Maria. 2013. 'Analytical Methodologies: Phenolic Compounds Related to Olive Oil Taste Issues'. Σσ. 311–33 στο *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*.
- Tuck, Kellie L., και Peter J. Hayball. 2002. 'Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects'. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(11):636–44. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00229-2.
- Umaru, Isaac John, Moses Adondua Abah, και Kerenhappuch Isaac Umaru. 2024. 'Chapter 13 - Enzyme-assisted extraction of virgin olive oil'. Σσ. 235–61 στο *Enzymes in Oil Processing*, επιμέλεια S. A. Bhawani, A. Khan, A. A. S. Awang Husaini, και M. R. Asaruddin. Elsevier.
- Velasco, Joaquín, και Carmen Dobarganes. 2002. 'Oxidative Stability of Virgin Olive Oil'. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(9–10):661–76. doi: 10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<661::AID-EJLT661>3.0.CO;2-D.
- Zeb, Alam, και Michael Murkovic. 2011. 'Olive (*Olea europaea* L.) Seeds, From Chemistry to Health Benefits'. Σσ. 847–53 στο *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*.