



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ
ΚΑΙ ΤΟ ΜΑΓΕΙΡΕΜΑ

ΚΑΛΗ ΚΩΤΣΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ
ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ
ΚΑΙ ΤΟ ΜΑΓΕΙΡΕΜΑ

ΚΑΛΗ ΚΩΤΣΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ: 735^Α/06-03-09

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Τασιούλα Μάργαρη Μαρία

Μέλη:

Κωμαΐτης Μιχαήλ

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 08-04-2009

Θέμα: «ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟ ΜΑΓΕΙΡΕΜΑ»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ: 913^Α/10-07-2015

1. Τασιούλα Μάργαρη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια
2. Κωμαΐτης Μιχαήλ, Ομότιμος Καθηγητής
3. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής
4. Κοντομηνάς Μιχαήλ, Καθηγητής
5. Προδρομίδης Μάμαντος, Επίκουρος Καθηγητής
6. Σακκάς Βασίλειος, Λέκτορας
7. Μαλλούχος Αθανάσιος, Λέκτορας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα 10» στις 15-07-2015

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία – Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ελένη Αδαμαντίου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η διεκπεραίωση μεγάλου τμήματος της έρευνας έγινε με χρηματοδότηση μέσω του Προγράμματος Ευρωπαϊκής Εδαφικής Συνεργασίας «Ελλάδα – Ιταλία 2007-2013» στα πλαίσια του έργου «*Utilization of biophenols from Olea Europea products - Olives, virgin olive oil and olive mill wastewater (Bio olea)*» καθώς και του Προγράμματος «*Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Πρωτοκόλλου με τη μορφή απαιτήσεων και Συστάσεων για την Ιχνηλασιμότητα, Πιστοποίηση, Προστασία και Βελτίωση των Ποιοτικών Χαρακτηριστικών του ελαιόλαδου Πρέβεζας*» (Προγραμματική Σύμβαση μεταξύ της Περιφέρειας Ηπείρου/ Π. Ε. Πρέβεζας και του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων). Τέλος, τα δείγματα της ελαιοκομικής περιόδου 2007-2008, συλλέχτηκαν μέσω του προγράμματος Interreg IIIA Ελλάδα-Ιταλία (2000-2006), στα πλαίσια του έργου «*Πρωτοποριακές ενέργειες για την προστασία και την ανάδειξη της υποστήριξη της τοπικής παραγωγής ελαιολάδου, χαρακτηριστικά ποιότητας και προσδιορισμός γεωγραφικής προέλευσης ελαιολάδου, Locelaion*».

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Τασιούλα-Μάργαρη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και τις συμβουλές της σε όλη την διάρκεια της έρευνας. Επίσης την ευχαριστώ γιατί μου μετέδωσε το μοναδικό της πάθος για το αντικείμενο του ελαιολάδου που έγινε και το δικό μου πάθος.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας οργανοληπτικής αξιολόγησης ελαιολάδου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη θέλησή τους και το χρόνο που αφιέρωσαν στις οργανοληπτικές δοκιμές των δειγμάτων. Τη Δρα. Βασιλική Κοντογιάννη θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθειά της στην ανάλυση των φαινολικών ενώσεων με LC-MS. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ειρήνη Ανδρέου για την πολύτιμη βοήθεια της στη συλλογή δεδομένων που αφορούσαν το κομμάτι της οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Θερμές ευχαριστίες, θα ήθελα επίσης να εκφράσω στους κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και στον κ. Μιχαήλ

Ε. Κωμαΐτη, Ομότιμο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και τους: κ. Μ. Κοντομηνά, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Μ. Προδρομίδα, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Βασίλειο Σακκά, Λέκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Α. Μαλούχο, Λέκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου από το Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων όπου δούλεψα, για τη βοήθεια και την καλή μας συνεργασία. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και κυρίως την αδερφή μου για την ηθική στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Καλή Κώτσιου

Ιωάννινα 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	11
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή	17
Κεφάλαιο 2 Παραλαβή και αποθήκευση του ελαιολάδου	21
2.1 Διαδικασία παραλαβής ελαιολάδου	21
2.1.1 Συγκομιδή του καρπού	21
2.1.2 Αποφύλλωση-Πλύσιμο-Σπάσιμο	23
2.1.3 Μάλαξη.....	23
2.1.4 Διαχωρισμός ελαιολάδου.....	24
2.2 Αποθήκευση του ελαιολάδου σε δεξαμενές	25
2.3 Συσκευασία ελαιολάδου	26
Κεφάλαιο 3 Σύσταση του ελαιολάδου	29
3.1 Σαπωνοποιήσιμα συστατικά του ελαιολάδου.....	29
3.2 Κυριότερα ασαπνοποιήτα συστατικά του ελαιολάδου	31
Κεφάλαιο 4 Φαινολικές ενώσεις	35
4.1 Βιοσύνθεση απλών φαινολικών ενώσεων και σεκοϊριδοειδών στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς.....	36
4.2 Φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου	37
4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις.....	42
4.4 Μεταβολές των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση και τις οικιακές θερμικές επεξεργασίες.....	46
4.5 Αναλυτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου	48
4.5.1 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από το ελαιολάδο	49
4.5.2 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων χωρίς διαχωρισμό	50
4.5.3 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων.....	51
4.5.3.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	51
4.5.3.2 Αέρια χρωματογραφία.....	53
4.5.3.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση	53
4.5.4 Ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων	54
Κεφάλαιο 5 Πτητικές ενώσεις	55
5.1 Βιοσύνθεση των αρωματικών ενώσεων – Η δράση των ενζύμων	55
5.2 Σύσταση του πτητικού κλάσματος του ελαιολάδου και συνεισφορά στο άρωμα.....	59
5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό και τα επίπεδα των πτητικών συστατικών	64
5.4 Μεταβολές της σύστασης του πτητικού κλάσματος κατά την αποθήκευση	66
5.5 Αναλυτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου	69
5.5.1 Παραλαβή των πτητικών ενώσεων από το δείγμα	69
5.5.2 Αέρια Χρωματογραφία– Φασματομετρία Μάζας (GC– MS).....	71
Κεφάλαιο 6 Αλλοιώσεις του ελαιολάδου	75

6.1 Υδρόλυση	75
6.2 Οξείδωση.....	76
6.2.1 Ενζυματική οξείδωση.....	78
6.2.2 Αυτοοξείδωση.....	78
6.2.3 Φωτοοξείδωση	80
6.3 Παράγοντες που επιδρούν στην οξείδωση.....	81
6.3.1 Εξωτερικοί παράγοντες	81
6.3.2 Παράγοντες που αφορούν τη σύσταση του ελαιολάδου.....	82
Κεφάλαιο 7 Κριτήρια ποιότητας και ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου	85
7.1 Κριτήρια ποιότητας.....	87
7.2 Κριτήρια γνησιότητας	87
Κεφάλαιο 8 Οργανοληπτική αξιολόγηση ελαιολάδου	89
8.1 Η γεύση και το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου	89
8.2 Αποδοχή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων από τους καταναλωτές	90
8.3 Μεθοδολογία για την οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαιολάδου	91
8.4 Μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση.....	98
ΣΤΟΧΟΙ.....	101
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	103
Κεφάλαιο 9 Μελέτη της επίδρασης οικιακών θερμικών επεξεργασιών στις φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου	105
9.1 Εισαγωγή.....	105
9.2 Μέθοδοι και υλικά.....	106
9.2.1 Δείγματα ελαιολάδου	106
9.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες	106
9.2.3 Θερμικές επεξεργασίες.....	106
9.2.4 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας.....	107
9.2.4.1 Αριθμός υπεροξειδίων	107
9.2.4.2 Ελεύθερη οξύτητα	107
9.2.4.3 Ειδικοί συντελεστές απόσβεσης (K_{232} , K_{270})	108
9.2.4.4 Μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων	108
9.2.5 Εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων.....	109
9.2.6 HPLC-UV και LC-DAD-MS	110
9.2.7 Στατιστική επεξεργασία.....	111
9.3 Αποτελέσματα και συζήτηση	112
9.3.2 Μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών των ελαιολάδων κατά τις θερμικές επεξεργασίες	113
9.3.3 Μεταβολές στη φαινολική σύσταση των ελαιολάδων κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος στους 180 °C	115
9.3.4 Μεταβολές στη φαινολική σύσταση των παρθένων ελαιολάδων κατά τη διάρκεια του βρασμού	117
9.3.5 Ταυτοποίηση των οξειδωμένων φαινολικών προϊόντων	118
9.4 Συμπεράσματα.....	122

Κεφάλαιο 10 Μεταβολές στη φαινολική σύσταση ελαιολάδων από διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες κατά την αποθήκευση 123

10.1 Εισαγωγή.....	123
10.2 Μέθοδοι και υλικά.....	124
10.2.1 Δείγματα ελαιολάδου και συνθήκες αποθήκευσης.....	124
10.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες.....	125
10.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας.....	125
10.2.4 Εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων.....	125
10.2.5 HPLC-UV and LC-DAD-MS analysis.....	125
10.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	126
10.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	127
10.3.1 Σύσταση δειγμάτων ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις.....	127
10.3.2 Μεταβολές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και στο συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις των ελαιολάδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.....	133
10.3.3 Μεταβολές στη συγκέντρωση των επιμέρους φαινολικών ενώσεων και σχηματισμός φαινολικών προϊόντων οξείδωσης.....	136
10.3.4 Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.....	139
10.4 Συμπεράσματα.....	140

Κεφάλαιο 11 Μεταβολές στη σύσταση του πτητικού κλάσματος ελαιολάδων από διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες κατά την αποθήκευση 143

11.1 Εισαγωγή.....	143
11.2 Μέθοδοι και Υλικά.....	145
11.2.1 Δείγματα ελαιολάδου.....	145
11.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες.....	145
11.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας.....	146
11.2.4 Εκχύλιση και χρωματομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών και των ortho-διφαινολών.....	146
11.2.5 Εκχύλιση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων με SPME–GC–MS.....	147
11.2.6 Στατιστική ανάλυση.....	148
11.3 Αποτελέσματα και συζήτηση.....	148
11.3.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά των φρέσκων δειγμάτων και μεταβολές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για 18 μήνες.....	148
11.3.2 Σύσταση των φρέσκων δειγμάτων ελαιολάδου σε πτητικές ενώσεις.....	151
11.3.3 Μεταβολές στη σύσταση των πτητικών ενώσεων στους 18 μήνες αποθήκευσης.....	154
11.3.3.1 Μεταβολές στα προϊόντα με 6 άτομα άνθρακα που σχηματίζονται μέσω της οδού της λιποξυγενάσης.....	155
11.3.3.2 Μεταβολές στα βασικά δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.....	156
11.3.4 Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης.....	160
11.4 Συμπεράσματα.....	161

Κεφάλαιο 12 Μεταβολή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση 163

12.1 Εισαγωγή.....	163
12.2 Μέθοδοι και υλικά.....	165
12.2.1 Δείγματα.....	165
12.2.2 Οργανοληπτική αξιολόγησης ελαιολάδου.....	166
12.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας.....	166
12.2.4 Εκχύλιση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων με SPME–GC–MS.....	166
12.2.5 Στατιστική επεξεργασία.....	166

12.3 Αποτελέσματα και συζήτηση	166
12.3.1 Περιγραφή των φρέσκων δειγμάτων	166
12.3.2 Μεταβολές στην οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την αποθήκευση	168
12.3.3 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών	170
12.4 Συμπεράσματα	174
Γενικά Συμπεράσματα – Προοπτικές	177
Συντμήσεις - Abbreviations	179
Παράρτημα I	181
Παράρτημα II	183
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	185

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν οι μεταβολές στη φαινολική σύσταση παρθένων ελαιολάδων κατά την εφαρμογή οικιακών θερμικών επεξεργασιών. Επίσης, συγκεντρώθηκαν τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν κατά την αποθήκευση παρθένων ελαιολάδων, δίνοντας έμφαση στις πτητικές και φαινολικές ενώσεις καθώς και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Παρθένα ελαιόλαδα υποβλήθηκαν σε θέρμανση υπό συνθήκες που προσομοίωναν οικιακές θερμικές επεξεργασίες, όπως το τηγάνισμα και ο βρασμός. Αυτές οι επεξεργασίες είναι δυνατό να επηρεάσουν το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις σε έναν ορισμένο βαθμό. Η θερμική οξείδωση των ελαίων στους 180 °C (τηγάνισμα) προκάλεσε μια σημαντική μείωση ($p < 0,05$) στα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (60% μετά από 30 λεπτά και 90% μετά από 60 λεπτά), ενώ είχε μικρότερη επίδραση στα παράγωγα της τυροσόλης και στις λιγνάνες. Όσον αφορά τη θερμική οξείδωση των ελαίων στους 100 °C (βρασμός) για 2 ώρες, παρατηρήθηκαν μειώσεις μικρότερες από 20% σε όλες τις κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων. Κατά την εφαρμογή αυτών των επεξεργασιών, παρατηρήθηκε η δημιουργία οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν με HPLC-MS.

Επιπλέον, δείγματα παρθένου ελαιολάδου πέντε ελληνικών ποικιλιών ελιάς μεταφέρθηκαν σε γυάλινα μπουκάλια (με κενό 0,5%), σφραγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό υπόγειο χώρο χωρίς κεντρική θέρμανση. Μετά από 24 μήνες αποθήκευσης, τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως η ελεύθερη οξύτητα, οι ειδικοί συντελεστές απόσβεσης (K_{232} και K_{270}) και ο αριθμός υπεροξειδίων, δεν ξεπέρασαν τα ανώτατα όρια που καθορίζονται από τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το παρθένο ελαιόλαδο.

Οι μεταβολές στη σύσταση του πτητικού κλάσματος των παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση, μελετήθηκαν για 18 μήνες. Όσον αφορά τα προϊόντα της οδού της λιποξυγενάσης, τα οποία είναι υπεύθυνα για τις θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, το σύνολό τους παρέμεινε σταθερό κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης, ωστόσο παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά σχηματισμού πτητικών προϊόντων οξείδωσης, τα

οποία είναι υπεύθυνα για τα οργανοληπτικά ελαττώματα. Μεταξύ των πτητικών προϊόντων οξείδωσης, τα υψηλότερα ποσοστά σχηματισμού καταγράφηκαν για την επτανάλη, την (E)-2-επτενάλη και την πεντανάλη ενώ ακολουθούσαν η εξανάλη και η εννεανάλη. Ο ρυθμός σχηματισμού πτητικών προϊόντων οξείδωσης ήταν υψηλότερος στα ελαιόλαδα των ποικιλιών Λιανολιά και Ασπρολιά σε σχέση με αυτά των ποικιλιών Κορωνέικη, Ντόπια Ζακύνθου και Θιακή. Τέλος, με χρήση σταδιακής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (Stepwise Linear Regression Analysis-SLRA) βρέθηκε ότι το λινελαϊκό οξύ και η αναλογία ολικών φαινόλικών/ορθο-διφαινολών έχουν τη μεγαλύτερη συσχέτιση με το ρυθμό σχηματισμού της (E)-2-επτενάλης.

Οι μεταβολές στη σύσταση του φαινολικού κλάσματος παρακολούθηθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για 24 μήνες. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων στην αρχική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων (η οποία κυμάνθηκε μεταξύ 250-930 mg/kg) επιβεβαίωσαν την επίδραση του συστήματος εξαγωγής, της ποικιλία της ελιάς και του σταδίου ωρίμανσης του καρπού. Τα παρθένα ελαιόλαδα βρέθηκε να περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, όταν η παραλαβή τους έγινε σε φυγοκεντρικά συστήματα δύο φάσεων σε σχέση με τα τριφασικά. Κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης, ακόμη και μετά από 24 μήνες, το ποσοστό της συνολικής μείωσης των φαινολικών ενώσεων δεν υπερέβη το 31%. Η μείωση ήταν μεγαλύτερη στη διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης (DAFOA) και στη διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη (DAFLA), αποδεικνύοντας μια πιο ενεργή συμμετοχή των πολικών σεκοϊριδοειδών στις διαδικασίες υδρόλυσης ή/και οξείδωσης. Η αρχική συγκέντρωση των δειγμάτων σε φαινολικές ενώσεις ήταν ο κύριος παράγοντας που συσχετίστηκε με το ρυθμό αποδόμησης των ενώσεων αυτών, ενώ η αρχική οξειδωτική κατάσταση και η ελεύθερη οξύτητα συσχετίστηκαν σε πολύ μικρότερο βαθμό. Η μείωση των παραγώγων των σεκοϊριδοειδών, οδήγησε στην αύξηση των απλών φαινολών (υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη) και στο σχηματισμό τεσσάρων οξειδωμένων προϊόντων.

Τέλος, το πείραμα επαναλήφθηκε, κάτω από τις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης, σε ελαιόλαδα από δύο ελληνικές ποικιλίες με σκοπό να εκτιμηθούν οι μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια 18 μηνών, που αντιστοιχεί συνήθως στο μέγιστο διάστημα του χρόνου ζωής ενός ελαιολάδου από την εμφιάλωση ως την

κατανάλωση. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για αποθήκευση ανήκαν στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Όπως φάνηκε από την οργανοληπτική αξιολόγηση, μέρος των δειγμάτων εμφάνισε οργανοληπτικό ελάττωμα με αποτέλεσμα μέχρι το τέλος της αποθήκευσης, να μη πληρούν όλα τα δείγματα τις προϋποθέσεις ώστε να ανήκουν στην κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Τα ελαιόλαδα της ποικιλίας Λιανολιά έδειξαν μία μεγαλύτερη τάση για αλλοίωση σε σχέση με αυτά της Κορωνέικης. Συγκεκριμένα, στους 12 μήνες αποθήκευσης 1 από τα 6 δείγματα Λιανολιάς παρουσίασε ελάττωμα σε αντίθεση με τα δείγματα της Κορωνέικης στα οποία δεν έγινε αντιληπτό κάποιο ελάττωμα κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Στους 18 μήνες αποθήκευσης 2 από τα 6 δείγματα της Λιανολιάς και 1 από τα 6 δείγματα της Κορωνέικης είχαν μεταβεί στη κατηγορία του παρθένου ελαιολάδου. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) έδειξε ότι τα δείγματα ελαιολάδου μπορούν να διαχωριστούν στις κατηγορίες του εξαιρετικού παρθένου και παρθένου με βάση το προφίλ τους σε αρωματικές ενώσεις. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν δύο κύριες συνιστώσες, που εξηγούν το 74,5% της διακύμανσης, και οι οποίες έδειξαν υψηλό βαθμό συσχέτισης με τα εκατοστιαία ποσοστά του συνόλου των ακόρεστων και κορεσμένων αλδευδών με C7-C10, με την ολική συγκέντρωση των προϊόντων της οδού της λιποξυγενάσης, με το εκατοστιαίο ποσοστό των κορεσμένων αλκοολών με C7-C9 καθώς και με την αναλογία εννεανάλη/εξανάλη.

ABSTRACT

In the present study, the changes in the phenolic fraction of virgin olive oil (VOO) during domestic thermal treatments, were studied. Moreover, results obtained during VOO storage, focusing on volatile and phenolic compounds as well as organoleptic attributes, were evaluated.

VOO samples were subjected to thermal treatments, simulating common domestic processing, including boiling and frying. These processes can affect the phenolic compounds content of VOO to a certain degree, depending on each treatment. Thermal oxidation of oils at 180 °C (frying) caused a significant decrease ($p < 0.05$) in hydroxytyrosol derivatives (reduction of 60% after 30 min and 90% after 60 min) and, to a lower degree, in tyrosol derivatives and lignans. On the other hand, thermal oxidation of oils at 100 °C (boiling) for 2 hours caused a decrease of less than 20% in all classes of phenolic compounds. During thermal treatment, the evolution of oxidized phenolic compounds was observed. The structures of these oxidized products were characterized by HPLC-MS.

Furthermore, VOO samples, of five Greek olive varieties, were stored in dark glass bottles (headspace 0.5%) in a basement without central heating. Even after 24 months of storage, the basic quality characteristics of the samples, such as free acidity, K_{232} , K_{270} and peroxide values did not exceed the upper limits set by European Community Regulation 2568/91 for VOO.

Changes in the volatile composition of VOO were monitored during 18 months of storage. Regarding the Lipoxygenase (LOX) pathway products, responsible for the positive sensory notes, it was shown that their total concentration remained stable during the entire storage period. Even though the physicochemical characteristics did not exceed the upper limits, high rates of formation of volatile oxidation products, which are responsible for the off-flavours, were observed. Among the volatile oxidation products, the highest rates of formation were recorded for heptanal, (E)-2-heptenal and pentanal followed by hexanal and nonanal. The formation rate of volatile oxidation products was higher in VOO from Lianolia and Asprolia compared to VOO from

Koroneiki, Native from Zakynthos and Thiaki varieties. Finally, stepwise linear regression analysis (SLRA) selected linoleic acid and total phenol/ortho-diphenols ratio as having the maximum correlation with the formation rate of (E)-2-heptenal.

Quantitative variations of the phenolic compounds and their degradation products were monitored over 24 months of storage using high-performance liquid chromatography (HPLC). The differences observed in the initial total phenolic compounds concentration (ranging between 250-930 mg/kg) confirmed the influence of extraction system, olive variety, and maturity stage. VOO were found to contain higher phenolic concentration when obtained in a two-phase decanter compared to a three-phase. Under the selected storage conditions, even after 24 months, the degree of reduction in total phenolic compounds did not exceed 31%. The reduction was more pronounced in dialdehydic form of oleuropein aglycone (DAFOA) and dialdehydic form of ligstroside aglycone (DAFLA), indicating a more active participation in the hydrolysis and oxidation processes of the more polar secoiridoids. The initial total phenolic content was the main factor correlated to the degradation rate of the phenolic compounds, while initial oxidation status and free acidity were correlated to a much smaller extent. The decrease in secoiridoid derivatives, gave rise to the simple phenols (hydroxytyrosol and tyrosol) content and to the formation of four oxidized products.

Finally, changes in the organoleptic attributes of VOO during storage, were evaluated. The selected samples belonged to Lianolia and Koroneiki varieties and were all of extra virgin olive oil (EVOO) quality. As shown by the organoleptic evaluation, some of the samples developed organoleptic defects, thus, by the end of storage, not all of the samples were able to meet the requirements of the “extra virgin olive oil” category. Samples from Lianolia variety were more susceptible to degradation in relation to samples from Koroneiki variety. More specifically, after 12 months of storage 1 out of 6 samples from Lianolia variety developed a defect. After 18 months of storage 2 out of 6 samples from Lianolia variety and 1 out of 6 from Koroneiki variety developed the rancid defect and were classified as virgin olive oils. Moreover, principal component analysis (PCA) was applied in order to classify the samples in virgin and extra virgin olive oil categories according to their volatile profile. PCA extracted two principal components which explained 74.5% of the variance which were highly correlated to the percentage of unsaturated and saturated aldehydes (C7-C10), the percentage of

saturated alcohols (C7-C9), the total concentration of the lipoxygenase pathway products as well as the ratio of nonanal/hexanal.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Το ελαιόλαδο είναι μία από τις πρώτες λιπαρές ύλες που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος σε καθαρή μορφή για την διατροφή του και αποτελεί την κύρια πηγή λίπους στη μεσογειακή διατροφή. Αν και υπάρχουν διαιτητικές παραλλαγές μεταξύ των μεσογειακών χωρών, ένα κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, είτε προστιθέμενο σε σαλάτες ωμό, σε όσπρια και σε άλλα τρόφιμα είτε ως κύρια πηγή μαγειρικού ελαίου. Σχεδόν το μισό από την ολική ποσότητα λιπαρής ύλης που καταναλώνεται στη μεσογειακή διατροφή προέρχεται από την κατανάλωση ελαιολάδου (Byrd-Bredbenner, Lagiou, & Trichopoulou, 2000; Visioli, Poli, & Gall, 2002; Wahrburg, Kratz, & Cullen, 2002; Waterman & Lockwood, 2007), ενώ η Ελλάδα παρουσιάζει τη μεγαλύτερη κατανάλωση ελαιολάδου σε διεθνές επίπεδο, που είναι 16,3 kg κατά άτομο με βάση τα στοιχεία του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (ΔΣΕ) για το έτος 2013 (IOC, 2015).

Η κατανάλωση ελαιολάδου, σύμφωνα με πολλές μελέτες ευθύνεται για τη χαμηλή συχνότητα διάφορων χρόνιων νοσημάτων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι στις χώρες της Μεσογείου υπάρχουν μειωμένα περιστατικά εκδήλωσης της στεφανιαίας νόσου, γεγονός που συσχετίστηκε με την μεσογειακή διατροφή και την κατανάλωση ελαιολάδου (Covas, 2007). Σε πολλές έρευνες αποδεικνύονται τα οφέλη της κατανάλωσης ελαιολάδου στην υγεία τα οποία περιλαμβάνουν: προστασία της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) από την οξείδωση, (Covas et al., 2006a; de la Torre-Carbot et al., 2010; Visioli & Galli, 1994), αντιμικροβιακές ιδιότητες (Karaosmanoglu, Soyer, Ozen, & Tokatli, 2010; Romero, Medina, Vargas, Brenes, & De Castro, 2007), αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Corona, Spencer, & Dessì, 2009), μείωση του κινδύνου εκδήλωσης συγκεκριμένων τύπων καρκίνου (Elnagar, Sylvester, & El Sayed, 2011; Trichopoulou, Lagiou, Kuper, & Trichopoulos, 2000) κ.α.

Λόγω των παραπάνω, το ελαιόλαδο έχει χαρακτηριστεί ως λειτουργικό τρόφιμο με πολλά από τα συστατικά του να συμβάλουν στη συνολική βιολογική του δράση (Stark & Madar, 2002). Οι ευεργετικές ιδιότητες του παρθένου ελαιολάδου έχουν αποδοθεί στην υψηλή αναλογία σε ακόρεστα/κορεσμένα λιπαρά οξέα, το σημαντικότερο από τα

οποία είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ, αλλά και σε ορισμένα από τα δευτερεύοντα συστατικά του όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις, οι τοκοφερόλες, το σκουαλένιο κ.α (Covas, 2007; Covas et al., 2006b; Pérez-Jiménez, Ruano, Perez-Martinez, Lopez-Segura, & Lopez-Miranda, 2007; Waterman & Lockwood, 2007).

Το 2011, η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA), βασισμένη σε καλά τεκμηριωμένες μελέτες (Covas et al., 2006a; de la Torre-Carbot et al., 2010) ενέκρινε τον «ισχυρισμό υγείας» ότι η διατροφική πρόσληψη των πολυφαινόλων του ελαιολάδου προλαμβάνει την οξείδωση της LDL (EFSA, 2011). Τον Δεκέμβριο του 2012 ξεκίνησε η εφαρμογή του Κανονισμού (ΕΕ) 432/2012 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, ο οποίος θέσπισε κατάλογο επιτρεπόμενων «ισχυρισμών υγείας» που διατυπώνονται για τα τρόφιμα, μεταξύ των οποίων βρίσκεται και το ελαιόλαδο. Στον κατάλογο αυτό ορίζεται ότι μπορεί να αναγράφεται στις ετικέτες των ελαιολάδων ο εξής ισχυρισμός υγείας: *«οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες»* (EC, 2012). Ωστόσο, ο ισχυρισμός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για ελαιόλαδα τα οποία περιέχουν τουλάχιστον 5 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων αυτής ανά 20 g ελαιόλαδου, δεδομένου ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα εξασφαλίζονται με την ημερήσια πρόσληψη 20 g ελαιολάδου.

Τα τελευταία χρόνια, καθώς αποκαλύπτονται νέα στοιχεία για τη σύσταση και τη βιολογική αξία του ελαιολάδου, το προϊόν αυτό έχει καταστεί ελκυστικό και σε πολλές μη ελαιοπαραγωγικές χώρες. Η μεγάλη αύξηση στη ζήτηση ελαιολάδου υψηλής ποιότητας δεν φαίνεται να συνδέεται ωστόσο μόνο με τις βιολογικές του ιδιότητες, αλλά και με τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, που οφείλονται στις πτητικές και φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση αντίστοιχα (Bendini et al., 2007; Cerretani, Salvador, Bendini, & Fregapane, 2008). Όταν το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται σε κατάλληλες συνθήκες και από φρέσκους καρπούς καλής ποιότητας, χαρακτηρίζεται από ένα εκλεπτυσμένο και μοναδικό άρωμα και μία ιδιαίτερη γεύση, χαρακτηριστικά τα οποία το διαφοροποιούν από τα υπόλοιπα εδάδια έλαια (Alonso, Aparicio, Calvente, & Morales, 1994; Angerosa, Mostallino, Basti, & Vito, 2001).

Στα πλεονεκτήματα του ελαιολάδου προστίθεται και η σταθερότητα του στη οξείδωση, η οποία οφείλεται στη σύστασή του και πιο συγκεκριμένα στο μονοακόρεστο ελαϊκό

οξύ και στην παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών (Velasco & Dobarganes, 2002). Η διάρκεια ζωής του παρθένου ελαιολάδου είναι 18 μήνες από την ημερομηνία εμφιάλωσής του. Η σημαντικότερη αιτία της αλλοίωσης του ελαιολάδου και γενικά των λιπαρών υλών, κατά την αποθήκευση, είναι η οξείδωση και οι συνθήκες που την επηρεάζουν είναι η θερμοκρασία, το φως και η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο (Gutiérrez & Fernández, 2002; Kalua, Bedgood, Bishop, & Prenzler, 2006a). Έτσι, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιολάδου, οι συνθήκες θα πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να διατηρούνται τόσο τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά όσο και οι βιολογικές του ιδιότητες.

Κεφάλαιο 2

Παραλαβή και αποθήκευση του ελαιολάδου

2.1 Διαδικασία παραλαβής ελαιολάδου

Σύμφωνα με τον *Codex Alimentarius*, το ΔΣΕ και τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Κοινότητας: «*Παρθένα ελαιόλαδα είναι το ελαιόλαδα που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο, μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες με συνθήκες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου, και τα οποία δεν έχουν υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης· εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιοχημική δράση, ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμειξης με έλαια άλλης φύσης*».

Η παραλαβή του ελαιολάδου πραγματοποιείται μετά την έκθλιψη των καρπών με μηχανικά μέσα. Τα βασικά στάδια της μεθόδου εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, είναι το σπάσιμο του καρπού, η μάλαξη της ελαιοζύμης και τέλος ο διαχωρισμός του ελαιολάδου. Η διαδικασία για τη παραλαβή του ελαιολάδου συμπεριλαμβάνει τα εξής στάδια:

2.1.1 Συγκομιδή του καρπού

Η διαδικασία ξεκινάει με τη συγκομιδή της ελιάς η οποία πρέπει να γίνεται στο βέλτιστο στάδιο της ωρίμανσής της (γνωστό και ως στάδιο βιομηχανικής ωρίμανσης) ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλότερη δυνατή ελαιοπεριεκτικότητα αλλά και η παραγωγή ελαιολάδου υψηλής ποιότητας (Salvador, Aranda, & Fregapane, 2001; Κυριτσάκης, 2007; Μπαλατσούρας, 1997). Σύμφωνα με έρευνες το στάδιο ωρίμανσης του καρπού επηρεάζει την παρουσία κάποιων μικροσυστατικών στο ελαιόλαδο μεταξύ των οποίων είναι οι φαινολικές και οι πτητικές ενώσεις, που συνεισφέρουν στη γεύση και στο άρωμα (Aparicio & Morales, 1998; Kalua, Allen, Bedgood, Bishop, & Prenzler, 2005; Morelló, Romero, & Motilva, 2004b).

Αν και το ΔΣΕ έχει προτείνει έναν απλό μαθηματικό τύπο για το καθορισμό του βαθμού ωρίμανσης, ο οποίος δίνει αποτελέσματα σε μια κλίμακα από 0-7 (IOOC,

1984), συνήθως, οι ελαιοκαλλιεργητές κρίνουν εμπειρικά, βασιζόμενοι στην αλλαγή του χρώματος του ελαιόκαρπου από πρασινοκίτρινο σε μελανοϊώδες (Di Giovanacchino, 1996; Κυριτσάκης, 2007). Όταν η συγκομιδή του ελαιοκάρπου γίνει πολύ νωρίς (άγουρος καρπός), τότε η απόδοση σε ελαιόλαδο είναι μικρή, ενώ η καθυστέρηση συγκομιδής (υπερώριμος καρπός) συντελεί στην παραλαβή ελαιολάδου κατώτερης ποιότητας (Dag et al., 2011; García, Sellar, & Pérez-Camino, 1996; Salvador et al., 2001).

Σύμφωνα με τη μέθοδο του ΔΣΕ, ο βαθμός ωρίμανσης (Maturation Index) υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Maturation} = \frac{(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + \dots + (7 \times n_7)}{100}$$

όπου $n_0, n_1, n_2, n_3, n_4, n_5, n_6$ και n_7 είναι ο αριθμός των καρπών που αντιστοιχούν σε μία από τις παρακάτω κατηγορίες:

0: Καρποί που η επιδερμίδα τους έχει βαθύ ή σκούρο πράσινο χρώμα, 1: καρποί που η επιδερμίδα τους έχει κίτρινο ή κιτρινοπράσινο χρώμα, 2: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι υποκίτρινη με κοκκινωπές κηλίδες, 3: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι υποκίτρινη ή έχει ανοιχτό μοβ χρώμα, 4: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι μαύρη και η σάρκα τους είναι εντελώς πράσινη, 5: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι μαύρη και η σάρκα τους έχει κατά το ήμισυ ιώδες χρώμα, 6: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι μαύρη και η σάρκα τους έχει ιώδες χρώμα και 7: καρποί που η επιδερμίδα τους είναι μαύρη και το χρώμα της σάρκας τους είναι εντελώς σκούρο.

Η συγκομιδή γίνεται με τα χέρια ή με χρήση μηχανικών μέσων (πχ ράβδους, δονητικά μηχανήματα). Ο ελαιόκαρπος, μετά τη συγκομιδή του μεταφέρεται στο ελαιοτριβείο, ζυγίζεται και ετοιμάζεται για μία διαδοχική σειρά επεξεργασιών. Για την εξασφάλιση της καλύτερης ποιότητας του τελικού προϊόντος θα πρέπει κατά τη μεταφορά του να περιορίζονται στο ελάχιστο δυνατό οι τραυματισμοί του και να γίνεται επαρκής αερισμός. Ο καρπός ενδείκνυται να υποστεί την επεξεργασία άμεσα, εντός 48 ωρών, σε αντίθετη περίπτωση η αποθήκευσή του πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που να καθιστούν αδύνατη την έναρξη αλλοιώσεων εξαιτίας χημικών και βιοχημικών αντιδράσεων (Clodoveo, Delcuratolo, Gomes, & Colelli, 2007; Kiritsakis, Nanos, Polymenopoulos, Thomai, & Sfakiotakis, 1998; Petrakis, 2006).

2.1.2 Αποφύλλωση-Πλύσιμο-Σπάσιμο

Ο ελαιόκαρπος τοποθετείται στην λεκάνη τροφοδοσίας του ελαιοτριβείου και οδηγείται στο αποφυλλωτήριο με τη βοήθεια μεταφορικής ταινίας ή αναβατόριου με ατέρμονα κοχλία. Η απομάκρυνση των φύλλων είναι απαραίτητη, γιατί σε περίπτωση παραμονής τους έχουμε την παραλαβή ελαιολάδου με μεγάλη ποσότητα χλωροφύλλης η οποία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής και παρουσία φωτός, επιδρά αρνητικά στη διατήρηση της ποιότητας, επιταχύνοντας την οξείδωση του ελαιολάδου (Giuliani, Cerretani, & Cichelli, 2011). Επίσης, η ενισχυμένη γεύση «πράσινων φύλλων» και η έντονα πικρή γεύση, λόγω της παρουσίας φύλλων, δεν είναι αποδεκτή από όλους τους καταναλωτές και κυρίως από αυτούς που προέρχονται από χώρες όπου δεν καλλιεργείται η ελιά (Di Gionacchino, Angerosa, & Di Giacinto, 1996; Κυριτσάκης, 2007). Στη συνέχεια ακολουθεί το πλύσιμο του καρπού για την απομάκρυνση ξένων υλών όπως σκόνη ή χώμα. Μετά το πλύσιμο ο ελαιόκαρπος μεταφέρεται, με τη βοήθεια κοχλία, στον σπαστήρα. Οι σπαστήρες είναι μικρών διαστάσεων, λειτουργούν με μεγάλο αριθμό στροφών και προκαλούν το σπάσιμο του ελαιοκάρπου (Μπαλατσούρας, 1997).

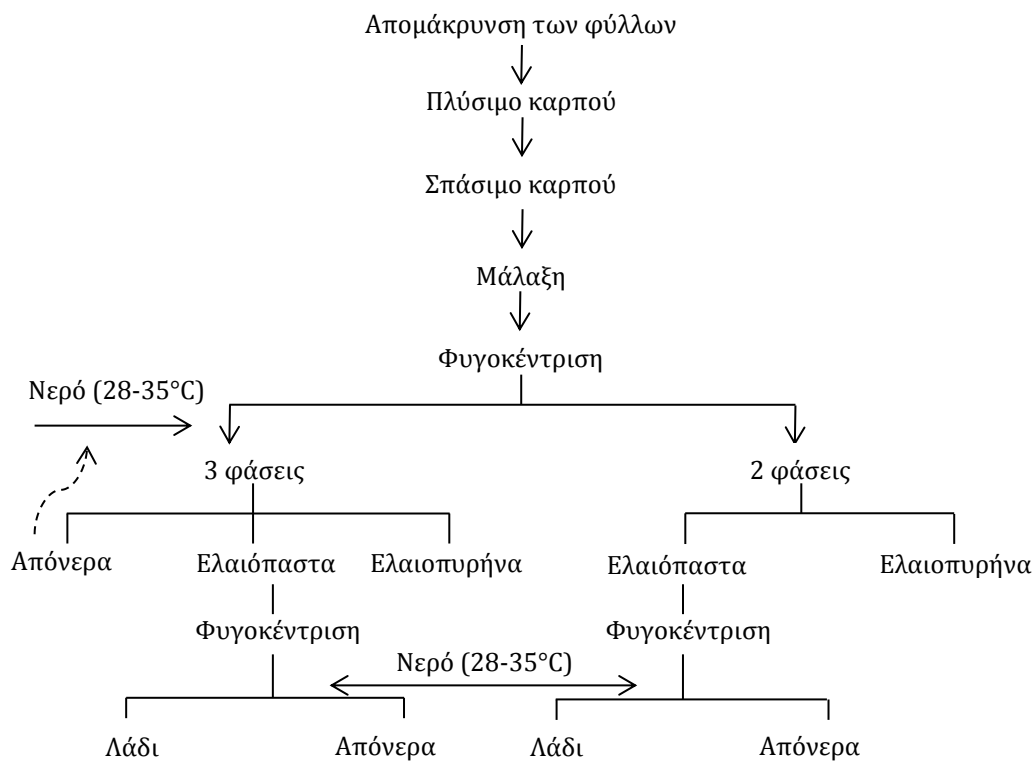
2.1.3 Μάλαξη

Η μάλαξη της ελαιοζύμης, η οποία πραγματοποιείται σε ειδικούς μαλακτήρες, αποτελεί το πιο σημαντικό στάδιο της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου καθώς συντελεί στη συνένωση των μικρών σταγονιδίων του ελαίου σε μεγαλύτερες σταγόνες, ώστε να διαχωριστεί πιο εύκολα από την υδατική φάση. Η αύξηση της θερμοκρασίας της ελαιοζύμης επιτυγχάνεται μέσω της κυκλοφορίας νερού, υψηλής θερμοκρασίας, μεταξύ των διπλών τοιχωμάτων του μαλακτήρα και είναι απαραίτητη ώστε να επιτευχθεί η έξοδος του ελαιολάδου από τα φυτικά κύτταρα. Η ανάμειξη της ελαιοζύμης επιτυγχάνεται με περιστρεφόμενο έλικα, ο οποίος φέρει μικρό αριθμό πτερυγίων και κινείται με πολύ αργό ρυθμό (Κυριτσάκης, 2007; Μπαλατσούρας, 1997). Κατά τη διάρκεια της μάλαξης θα πρέπει να αποφεύγεται, όσο είναι δυνατόν, η επαφή της ελαιοζύμης με τον ατμοσφαιρικό αέρα καθώς και οι υψηλές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία της ελαιοζύμης πρέπει να μην είναι μεγαλύτερη από 30 °C και η διάρκεια της μάλαξης να μη ξεπερνά τα 90 λεπτά (Alonso et al., 1994). Υψηλή θερμοκρασία καθώς και παρατεταμένη έκθεση της ελαιοζύμης στον ατμοσφαιρικό αέρα είναι παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του ελαιολάδου, καθώς

ευθύνονται για την απώλεια των πτητικών συστατικών (Pastore et al., 2014) και ευνοούν την έναρξη της οξειδωτικής τάγγισης (Kanavouras, Cert, & Hernandez, 2005a).

2.1.4 Διαχωρισμός ελαιολάδου

Μετά τη μάλαξη ακολουθεί ο διαχωρισμός του ελαιολάδου από την ελαιοζύμη. Παραδοσιακά, ο διαχωρισμός του ελαιολάδου επιτυγχάνονταν με τη χρήση υδραυλικών πιεστηρίων, ενώ ταυτόχρονα υπήρχε παραγωγή τόσο υγρών (απόνερα ή κατσίγαρος) όσο και στερεών (ελαιοπυρήνα) αποβλήτων. Η μέθοδος αυτή, είναι μια ασυνεχής διαδικασία, αφού ο διαχωρισμός της υγρής φάσης (μίγμα νερού/λαδιού), προκειμένου να παραληφθεί το ελαιόλαδο, πραγματοποιείται σε επόμενο στάδιο με φυγοκέντριση σε κατακόρυφο διαχωριστήρα (Κυριτσάκης, 2007; Μπαλατσούρας, 1997). Ο διαχωρισμός του ελαιολάδου στις μέρες μας γίνεται με χρήση φυγοκεντρικών συστημάτων διαχωρισμού δύο ή τριών φάσεων τα οποία έχουν αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Τα συστήματα αυτά διαφέρουν ως προς την ποσότητα και τη σύνθεση των αποβλήτων που παράγουν (**σχήμα 2.1**).



Σχήμα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση της παραγωγής ελαιολάδου σε φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού δύο και τριών φάσεων.

Στα φυγοκεντρικά συστήματα διαχωρισμού τριών φάσεων, ο διαχωρισμός του λαδιού από την ελαιοζύμη γίνεται μέσω φυγοκέντρισης σε οριζόντιους τριφασικούς φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες, γνωστούς ως decanters. Για την παραγωγή ελαιολάδου (1^η φάση) καταναλώνονται σημαντικές ποσότητες νερού και ως συνέπεια προκύπτουν σημαντικές ποσότητες υγρών αποβλήτων (2^η φάση). Επιπλέον, παράγεται η ελαιοπυρήνα (3^η φάση), η οποία αντιστοιχεί στα στερεά συστατικά του ελαιοκάρπου και επεξεργάζεται περαιτέρω στα πυρηνελαιουργεία για την παραγωγή πυρηνελαίου και πυρηνόξυλου (Petrakis, 2006; Μπαλατσούρας, 1986, 1997). Η τριφασική διαδικασία είναι συνεχής και το κύριο μειονέκτημά αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλη ποσότητα νερού που απαιτείται και συνεπώς η παραγωγή υγρών αποβλήτων που προκαλούν σοβαρή ρύπανση (Mechri et al., 2007).

Τα φυγοκεντρικά ελαιουργικά συγκροτήματα δύο φάσεων, αποκαλούμενα και ως οικολογικά συστήματα, χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και αποτελούν παραλλαγή του συστήματος τριών φάσεων. Τα συστατικά του ελαιοκάρπου τροφοδοτούνται στον φυγοκεντρικό διαχωριστήρα δύο φάσεων και διαχωρίζονται στο ελαιολάδο (1^η φάση) και στα υπόλοιπα συστατικά της ελιάς (πούλπα, φυτικά υγρά), που στο σύνολο τους αντιστοιχούν στη διφασική ελαιοπυρήνα (2^η φάση). Το σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η μηδενική κατανάλωση νερού και η μηδενική παραγωγή υγρών αποβλήτων (Petrakis, 2006; Μπαλατσούρας, 1986, 1997). Επιπλέον, λόγω της μείωσης του νερού τα ελαιολάδα που παραλαμβάνονται σε συστήματα δύο φάσεων έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση στις υδατοδιαλυτές φαινολικές ενώσεις (Di Giovacchino, Costantini, Serraiocco, Surricchio, & Basti, 2001; Gimeno, Castellote, Lamuela-Raventós, De la Torre, & López-Sabater, 2002; Kalogeropoulos, Kaliora, Artemiou, & Giogios, 2014).

2.2 Αποθήκευση του ελαιολάδου σε δεξαμενές

Μετά την παραλαβή, το ελαιολάδο μπορεί να χρειαστεί να παραμείνει στις δεξαμενές για μερικούς μήνες. Το ελαιολάδο αλλοιώνεται προοδευτικά κατά το χρόνο της αποθήκευσής του και ο βαθμός αλλοίωσης εξαρτάται από τις συνθήκες αποθήκευσης (Boskou, 2006; Κυριτσάκης, 2007).

Η κύρια αλλοίωση του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση είναι η οξείδωση. Εκτός από την οξείδωση, κατά το χρόνο της αποθήκευσης λαμβάνουν χώρα ζυμώσεις στις ουσίες,

που δεν απομακρύνθηκαν στους διαχωριστήρες ή κατά τη διήθηση και οι οποίες καθιζάνουν στον πυθμένα των μέσων αποθήκευσης. Τα κατάλοιπα αυτά (γνωστά ως μούργα), περιέχουν μεγάλες ποσότητες ζυμώσιμων σακχάρων και πρωτεϊνών, συστατικά τα οποία προέρχονται από τον ελαιόκαρπο. Κατά τη ζύμωση των συστατικών αυτών αναδύονται δυσάρεστες οσμές, οι οποίες μεταβάλλουν τα αρωματικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Απομάκρυνση της μούργας από το ελαιόλαδο συμβάλλει στη προστασία της ποιότητάς του (Boskou, 2006; Di Giovacchino, 2013).

Η αποθήκευση του ελαιολάδου γίνεται σε δεξαμενές, το εσωτερικό των οποίων πρέπει να είναι κατασκευασμένο από αδρανές υλικό, έτσι ώστε ο καθαρισμός να μπορεί να γίνει εύκολα και να αποφεύγεται η απορρόφηση των οσμών ή άλλων ουσιών (π.χ. ίχνη μετάλλων) που επιταχύνουν την οξειδωση. Οι δεξαμενές θα πρέπει να βρίσκονται σε εσωτερικό χώρο και το ελαιόλαδο θα πρέπει να προστατεύεται από τον αέρα και το φως και να διατηρείται σε θερμοκρασίες κάτω από 18 °C (Petraakis, 2006). Οι δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα με κωνικό πάτο, που επιτρέπουν την απομάκρυνση του κατακαθιού, θεωρούνται οι πιο ιδανικές για την αποθήκευση (Boskou, 2006).

2.3 Συσκευασία ελαιολάδου

Όπως συμβαίνει με όλα τα συσκευασμένα τρόφιμα έτσι και με το παρθένο ελαιόλαδο, το υλικό συσκευασίας, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και η διάρκεια της αποθήκευσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ποιότητας. Η τυποποίηση του ελαιολάδου σε κατάλληλα δοχεία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την καλύτερη διατήρηση, εμπορία και διακίνησή του. Εκτός από την πρόοδο της οξειδωσης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλες παράμετροι που σχετίζονται με τις ιδιότητες διαπερατότητας των υλικών, της αποσύνθεσης κατά την επαφή με το λάδι, της μεταφοράς ενώσεων κ.α. ώστε να εκτιμηθούν καλύτερα οι αλληλεπιδράσεις ελαιόλαδου-συσκευασίας που θα επιτρέψουν την εκτίμηση της διάρκειας ζωής του. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στη συσκευασία του ελαιολάδου είναι ο λευκοσίδηρος, το πλαστικό (PET), το γυαλί καθώς και κάποιες πολυστρωματικές συσκευασίες (Boskou, 2006).

Το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) έχει καλές μηχανικές αντοχές, άριστη διαφάνεια, σκληρότητα, ελάχιστη διαπερατότητα σε υδρατμούς και αέρια, αντοχή σε οξέα, βάσεις, λιπαρά και διαλύτες και σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (Kirwan, Plant, &

Strawbridge, 2011). Γενικά, οι συσκευασίες PET είναι κατάλληλες και υπερτερούν των άλλων πλαστικών συσκευασιών για την συσκευασία ελαιολάδου (Pristouri, Badeka, & Kontominas, 2010), ωστόσο τα δείγματα που αποθηκεύονται σε αυτές αλλοιώνονται ταχύτερα σε σχέση με αυτά που αποθηκεύονται σε γυάλινη συσκευασία (Cecchi, De Marco, Passamonti, & Pucciarelli, 2006; Kaya, Tekin, & Öner, 1993).

Τα γυάλινα δοχεία είναι από τα σημαντικότερα μέσα συσκευασίας και χρησιμοποιούνται ευρέως στη συσκευασία ελαιολάδου. Το γυαλί είναι αδρανές υλικό και αποτελεί εξαιρετικό φραγμό για στερεά, υγρά και αέρια και επομένως προσφέρει πολύ καλή προστασία σε όλα τα τρόφιμα. Επιπλέον θετικά χαρακτηριστικά της γυάλινης συσκευασίας αποτελούν: η διαφάνεια, η δυνατότητα κατασκευής περιεκτών διαφόρων σχημάτων, η δυνατότητα ανακύκλωσης και επαναπλήρωσης, η δυνατότητα θερμικής κατεργασίας και η ευκολία στο καθάρισμα. Τα κυριότερα μειονεκτήματα των γυάλινων δοχείων είναι η ευθραυστότητα, το μεγάλο βάρος ανά επιφάνεια και το μεγάλο κόστος (Grayhurst & Girling, 2011). Αν και το διαφανές γυαλί χρησιμοποιείται ευρέως για την εμφιάλωση του ελαιολάδου, αυτή η πρακτική ευνοεί τη φωτοξείδωση και κατά συνέπεια τη μείωση της διάρκειας ζωής του (Méndez & Falqué, 2007). Για το λόγο αυτό προτείνεται η χρήση των έγχρωμων γυάλινων φιαλών, όπως είναι οι πράσινες φιάλες που προστατεύουν το ελαιολάδο από τις ακτίνες του φωτός με μήκος κύματος από 300 ως 500 nm (Mastrobattista, 1999).

Ο λευκοσίδηρος ως υλικό συσκευασίας χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων. Ο λευκοσίδηρος αποτελείται από ένα φύλλο από μαλακό χάλυβα επικαλυμμένο και στις δύο πλευρές με οξειδία του κασσίτερου. Η επικασσιτέρωση των φύλλων του χάλυβα αυξάνει την αντοχή σε διάβρωση. Η πλευρά που προορίζεται να έρθει σε επαφή με το τρόφιμο είναι επικαλυμμένη και με κάποια συνθετική οργανική λάκα, ενώ η μέθοδος συγκόλλησης εξασφαλίζει μια ασφαλή πλευρική ραφή, η οποία αποτρέπει τη διάλυση του μετάλλου στο τρόφιμο (Tsimis & Karakasides, 2002). Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει ο λευκοσίδηρος είναι η μεγάλη μηχανική αντοχή, η αντοχή στη διάβρωση και στις θερμικές επεξεργασίες, το χαμηλό κόστος, η ικανοποιητική εμφάνιση, η ελατότητα που προσφέρει τη δυνατότητα κατασκευής κουτιών διαφόρων σχημάτων και μεγεθών ενώ η μεγάλη ελαστικότητα προδίδει αντοχή σε εξωτερικές και εσωτερικές πιέσεις. Επίσης είναι αδιαπέραστος από αέρια, υδρατμούς και φως (Page, Edwards, & May, 2011). Με βάση τα παραπάνω, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα δοχεία από λευκοσίδηρο, λόγω των βασικών τους

πλεονεκτημάτων δεν επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιολάδου όταν αποθηκεύονται υπό κανονικές συνθήκες για μια περίοδο έως και 12 μήνες (Tsimis & Karakasides, 2002).

Οι πολυστρωματικές συσκευασίες αποτελούνται από συνδυασμούς υλικών όπως πλαστικό, χαρτί, φύλλα αλουμινίου και μετάλλου, αλλά και διαφορετικών πλαστικών. Οι πιο συνηθισμένες από αυτές είναι εμπορικά γνωστές με το όνομα Tetra Brik και Tetra Prisma και αποτελούνται συνήθως από ένα πενταπλό φύλλο με τη σύνθεση LDPE/χαρτί/LDPE/Alu/LDPE ενώ το σχήμα τους είναι συνήθως παραλληλεπίπεδο με ορθογωνική διατομή. Οι συσκευασίες αυτές είναι ιδανικές τόσο για τους διανομείς όσο και για τους καταναλωτές. Εκτός από τη διατήρηση της ποιότητας, η συσκευασία Tetra Prisma μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί εξωτερικά, προσφέροντας έτσι σημαντική διαφοροποίηση, είναι ελαφριά, είναι οικονομική, αποθηκεύεται και μεταφέρεται εύκολα και είναι 100% ανακυκλώσιμη συσκευασία. Αν και η συγκεκριμένη συσκευασία δεν είναι ευρέως διαδομένη για το ελαιόλαδο, κυρίως για το λόγο ότι δεν είναι τόσο αποδεκτή από τους καταναλωτές που έχουν συνηθίσει να κρίνουν το ελαιόλαδο από το χρώμα (Moyano, Heredia, & Meléndez-Martínez, 2010), χρησιμοποιείται σε μικρή κλίμα σε ορισμένες χώρες της Μεσογείου, όπως στην Ισπανία και στην Ελλάδα για τη συσκευασία φυτικών ελαίων. Ερευνητές υποστηρίζουν ότι η Tetra-brik εγγυάται μια αρκετά αποτελεσματική προστασία των χημικών και φυσικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου (Méndez & Falqué, 2007).

Η ημερομηνία λήξης του ελαιολάδου κυμαίνεται μεταξύ των 12 και 18 μηνών από την στιγμή της εμφιάλωσης. Στο διάστημα αυτό τα συστατικά, το άρωμα, το χρώμα και η γεύση του ελαιολάδου θα πρέπει να παραμένουν αναλλοίωτα εφόσον οι συνθήκες αποθήκευσης είναι οι προβλεπόμενες. Η έκθεση στον φως, στη ζέστη, στην υγρασία καθώς η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο μπορούν να επιφέρουν πολύ γρήγορα σημαντικές αλλοιώσεις (Gutiérrez & Fernández, 2002; Kalua et al., 2006a). Έρευνες έχουν δείξει ότι όταν το ελαιόλαδο αποθηκεύεται σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία κάτω των 15 °C, η διάρκεια ζωής του μπορεί να επεκταθεί σε σχεδόν 2 χρόνια, ειδικά όταν το δοχείο παραμένει κλειστό (Boskou, 2006). Έχει υποστηριχθεί ότι η πιθανότητα αλλοίωσης ενός ελαιολάδου πριν τη λήξη της περιόδου αποθήκευσης μπορεί να υπολογιστεί (P_{safe}) και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (Kanavouras, Kiritsakis, & Hernandez, 2005b).

Κεφάλαιο 3

Σύσταση του ελαιολάδου

Τα ελαιόλαδα διαφέρουν ως προς τη σύσταση, η οποία επηρεάζεται από παράγοντες όπως είναι η ποικιλία της ελιάς, οι καλλιεργητικές πρακτικές, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες καθώς και από τη διαδικασία παραλαβής τους στο ελαιοτριβείο (Inglese et al., 2010). Το κύριο συστατικό του ελαιολάδου, όπως και κάθε λιπαρής ύλης, είναι οι τριακυλογλυκερόλες. Εκτός από τις τριακυλογλυκερόλες, το ελαιόλαδο περιέχει μικρές ποσότητες και από άλλα συστατικά που προέρχονται είτε από τον ελαιόκαρπο είτε σχηματίζονται κατά την παραλαβή του στο ελαιοτριβείο. Σε αυτά τα συστατικά ανήκουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (προϊόντα υδρόλυσης των τριακυλογλυκερολών), οι μονο- και διακυλογλυκερόλες, οι στερόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, τα φωσφολιπίδια, οι χρωστικές, οι τοκοφερόλες, οι φαινολικές και οι πτητικές ενώσεις, διάφορες ρητινοειδείς και ζελατινοειδείς ουσίες, κ.λ.π. (Boskou, Blekas, & Tsimidou, 2006).

Τα συστατικά του ελαιολάδου διακρίνονται σε σαπωνοποιήσιμα (ακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κ.α) και μη σαπωνοποιήσιμα (υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, στερόλες, φαινόλες, κ.α). Το 98,0-99,5% περίπου των συστατικών είναι σαπωνοποιήσιμα και το υπόλοιπο μη σαπωνοποιήσιμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι το μη σαπωνοποιήσιμο κλάσμα είναι ποσοτικά πολύ μικρότερο, τα συστατικά που περιλαμβάνονται σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό διατροφικό και βιολογικό ρόλο (Boskou et al., 2006).

3.1 Σαπωνοποιήσιμα συστατικά του ελαιολάδου

Λιπαρά οξέα. Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα εξαρτάται κυρίως από την ποικιλία της ελιάς και κατά δεύτερο λόγο από τις κλιματολογικές συνθήκες, το υψόμετρο και το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Aparicio, Ferreiro, & Alonso, 1994; Gómez-Rico et al., 2007; Gutiérrez, Jiménez, Ruíz, & Albi, 1998).

Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στο ελαιόλαδο σε μεγαλύτερη αναλογία, κατά αύξοντα αριθμό ατόμων άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας, είναι: το παλμιτικό (C16:0), το παλμιτελαϊκό (C16:1), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), το λινελαϊκό (C18:2)

και το λινολενικό (C18:3). Η εκατοστιαία διακύμανση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου δίνεται στον **πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1: Εκατοστιαία διακύμανση της περιεκτικότητας του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίζεται με αέρια χρωματογραφία (% m/m μεθυλεστέρες)* (IOC, 2013c).

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα %
Μυριστικό (C14:0)	<0,03
Παλμιτικό (C16:0)	7,50 – 20,00
Παλμιτελαϊκό (C16:0)	0,03 – 3,50
Δεκαεπτανικό (C17:0)	< 0,30
Δεκαεπτενικό(C17:1)	< 0,30
Στεατικό (C18:0)	0,05 – 5,00
Ελαϊκό (C18:1)	55,00 – 83,00
Λινελαϊκό (C18:2)	3,50 – 21,00
Λινολενικό (C18:3)	< 1,00
Αραχιδικό (C20:0)	< 0,60
Εικοσενικό (C20:1)	< 0,40
Βεχενικό (C22:0)	< 0,20**
Λιγνοκηρικό (C24:0)	< 0,20

* Τα όρια περιλαμβάνουν και την ακρίβεια της προτεινομένης μεθόδου.

** < 0,3 για τα πυρηνέλαια.

Τριακυλογλυκερόλες. Στη σύνθεση των διαφόρων τριακυλογλυκερολών χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά λιπαρά οξέα. Επειδή σε κάθε μόριο τριακυλογλυκερόλης είναι δυνατό να περιέχονται τρία μόρια του ίδιου λιπαρού οξέος, είτε και δύο ή τρία μόρια διαφορετικών λιπαρών οξέων, οι δυνατοί συνδυασμοί είναι πάρα πολλοί, και συνεπώς και τα είδη των τριακυλογλυκερολών είναι πάρα πολλά. (Boskou et al., 2006).

Στο ελαιόλαδο οι διαφορές που παρατηρούνται στη σύνθεση των τριακυλογλυκερολών εξαρτώνται κυρίως από τις ποσότητες του ελαϊκού, του παλμιτικού και του λινελαϊκού οξέος. Οι τριακυλογλυκερόλες που βρίσκονται σε σημαντική ποσότητα στο ελαιόλαδο είναι οι OOO (40–59 %), POO (12-20 %), OOL (12.5-20 %), POL (5,5-7 %) και SOO (3-7 %) ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση απαντώνται και οι POP, POS, OLnL, LOL,

OLnO, PLL, PLnO and LLL όπου O = ελαϊκό οξύ, P = παλμιτικό οξύ, S = στεατικό οξύ, L = λινελαϊκό οξύ και Ln = λινολενικό οξύ (Boskou et al., 2006). Γενικά, πλήρως κορεσμένες τριακυλογλυκερόλες καθώς και τριακυλογλυκερόλες που περιέχουν και στις 3 θέσεις λινολενικό οξύ δεν έχουν αναφερθεί. Επίσης, το στεατικό και το παλμιτικό οξύ δεν παρατηρούνται στη δεύτερη θέση των ακόρεστων τριακυλογλυκερολών (τρι- και τετρ-ακόρεστες) ή σε μόρια όπου υπάρχουν περισσότεροι από 5 διπλοί δεσμοί (Boskou et al., 2006)

Μονο- και διακυλογλυκερόλες. Οι μονοακυλογλυκερόλες και διακυλογλυκερόλες που απαντώνται στο ελαιόλαδο προκύπτουν από την μη ολοκληρωμένη βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών ή από αντιδράσεις υδρόλυσης που συμβαίνουν κατά τη συλλογή του ελαιόκαρπου, την παραγωγή ή την αποθήκευση του ελαίου (Amelotti, Daghetta, & Ferrario, 1989; Kiosseoglou & Kouzounas, 1993).

Φωσφολιπίδια. Το ελαιόλαδο περιέχει μία πολύ μικρή ποσότητα φωσφολιπιδίων τα οποία προέρχονται από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου. Με χρήση διαφόρων αναλυτικών μεθόδων έχουν ταυτοποιηθεί οι: φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (κεφαλίνη), σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη (Hatzakis, Koidis, Boskou, & Dais, 2008; Jiménez, Velarte, & Castillo, 2007; Koidis & Boskou, 2006). Τα φωσφολιπίδια, έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση της σταθερότητας ενός ελαίου. Επίσης, έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν συνεργιστική δράση με τις τοκοφερόλες (Hudson & Lewis, 1983; Kashima, Cha, Isoda, Hirano, & Miyazawa, 1991).

3.2 Κυριότερα ασαπωνοποιήτα συστατικά του ελαιολάδου

Υδρογονάνθρακες. Οι σημαντικότεροι υδρογονάνθρακες στο ασαπωνοποίητο μέρος του ελαιολάδου είναι το σκουαλένιο και το β-καροτένιο (το δεύτερο περιγράφεται στις χρωστικές). Το σκουαλένιο, το οποίο απαντάται σε επίπεδα μέχρι και 12,5 g/kg και αποτελεί περισσότερο από 90% του κλάσματος των υδρογονανθράκων (Lanzón, Albi, Cert, & Gracián, 1994; Nenadis & Tsimidou, 2002; Owen et al., 2000b; Psomiadou & Tsimidou, 1999), θεωρείται συστατικό με μεγάλη βιολογική αξία λόγω της προληπτικής δράσης του ως προς κάποια είδη καρκίνου (Newmark, 1997). Τα επίπεδά

του σκουαλενίου στο παρθένο ελαιόλαδο σχετίζονται με την ποικιλία (Guinda, Lanzón, & Albi, 1996).

Τοκοφερόλες. Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και συναντώνται σε όλα τα φυτικά λάδια. Οι τοκοφερόλες διακρίνονται ως προς τη θέση και τον αριθμό των μεθυλικών ομάδων σε α -, β -, γ - και δ -, ενώ στο σύνολό τους είναι γνωστές και ως βιταμίνη Ε. Στο ελαιόλαδο απαντάται κυρίως η α -τοκοφερόλη (μέχρι και 90% επί των συνολικών). Όλες οι τοκοφερόλες αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά και συγκεκριμένα η σταθερότητα του ελαιολάδου στην οξείδωση, οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στην παρουσία αυτών των ενώσεων. Η διακύμανση που παρατηρείται στη βιβλιογραφία, όσον αφορά τη συγκέντρωση της α -τοκοφερόλης ανά κιλό ελαιολάδου, οφείλεται στη ποικιλία, σε τεχνολογικούς παράγοντες, στο στάδιο ωρίμανσης του καρπού κ.α (Beltrán, Aguilera, Rio, Sanchez, & Martinez, 2005; Psomiadou & Tsimidou, 1998). Επεξεργασίες όπως είναι ο εξευγενισμός και η υδρογόνωση προκαλούν μείωση στη συγκέντρωση των τοκοφερολών (Andrikopoulos, Hassapidou, & Manoukas, 1989). Η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες των ελληνικών ελαιολάδων κυμαίνεται από 98 έως 370 mg/kg ελαίου (Psomiadou, Tsimidou, & Boskou, 2000).

Χρωστικές. Το χρώμα του ελαιολάδου οφείλεται στη παρουσία των καροτενοειδών και των γλωροφυλλών (στις οποίες περιλαμβάνονται και οι φαιοφυτίνες). Από τις τελευταίες, αυτή που κυριαρχεί είναι η φαιοφυτίνη α (Minguez-Mosquera, Gandul-Rojas, Garrido-Fernandez, & Gallardo-Guerrero, 1990; Psomiadou & Tsimidou, 2001; Rahmani & Csallany, 1991). Στα καροτενοειδή ανήκουν η λουτεΐνη, που είναι το σημαντικότερο καροτενοειδές του ελαιολάδου, και το β -καροτένιο. Η περιεκτικότητα των ελληνικών ελαιολάδων σε καροτενοειδή κυμαίνεται από 1 έως 20 mg/kg (Psomiadou & Tsimidou, 2001). Η παρουσία των χρωστικών εξαρτάται από την ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, τους τεχνολογικούς παράγοντες και τις συνθήκες αποθήκευσης (Gandul-Rojas & Minguez-Mosquera, 1996; Psomiadou & Tsimidou, 2001; Schwartz & Lorenzo, 1990).

Αλειφατικές και διτερπενοειδείς αλκοόλες. Οι κυριότερες λιπαρές αλκοόλες ($C > 16$) που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι οι γραμμικές κορεσμένες αλκοόλες με 22, 24, 26 και 28 άτομα άνθρακα, ενώ τα επίπεδα τους στο παρθένο ελαιόλαδο, όπου βρίσκονται και με τη μορφή κηρών (εστέρες με λιπαρά οξέα), είναι χαμηλότερα από 360 mg/kg.

Από τις διτερπενοειδείς αλκοόλες, αυτές που εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η φυτόλη και η γερανυλ-γερανιόλη (<50 mg/kg) τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εστεροποιημένη μορφή (Aparicio & Luna, 2002; Grob, Lanfranchi, & Mariani, 1990; Reiter & Lorbeer, 2001).

Στερόλες. Οι στερόλες είναι ενώσεις που συσχετίζονται με τη ποιότητα του ελαιολάδου. Στο ελαιόλαδο απαντώνται τέσσερις τύποι στερολών: οι κοινές στερόλες (ή 4-απομεθυλοστερόλες), οι 4α-μεθυλοστερόλες, οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες (ή 4,4-διμεθυλοστερόλες) και οι τριτερπενοειδείς διαλκοόλες. Το κατώτατο όριο του ελαιολάδου σε στερόλες έχει θεσπιστεί στα 1000 mg/kg (EC, 1991). Οι κύριες ενώσεις που απαντώνται στο στερολικό κλάσμα του ελαιολάδου είναι η β-σιτοστερόλη, η Δ 5 -αβεναστερόλη και η καμπεστερόλη, ενώ ένα ποσοστό αυτών απαντάται με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (Verleyen et al., 2002). Η περιεκτικότητα ενός ελαιολάδου σε στερόλες καθώς και η σύσταση του στερολικού κλάσματος εξαρτώνται από την ποικιλία και το βαθμό ωρίμανσης του καρπού, ενώ κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης (Lukić, Lukić, Krapac, Sladonja, & Piližota, 2013).

Τριτερπενικά οξέα. Τα τριτερπενικά οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά του καρπού της ελιάς, ωστόσο στο ελαιόλαδο βρίσκονται σε ίχνη. Τα οξέα ολεανολικό και μασλινικό είναι τα κυριότερα τριτερπενικά οξέα του παρθένου ελαιολάδου καθώς είναι συστατικά του φλοιού της ελιάς που μεταφέρονται στο τελικό προϊόν κατά την παραλαβή του (Pérez-Camino & Cert, 1999).

Φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις, επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την σταθερότητα στην οξείδωση και είναι υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης παρθένου ελαιολάδου στην υγεία (Bendini et al., 2007; Servili et al., 2004; Tasioula-Margari, 2011). Οι σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί και ποσοτικοποιηθεί στο ελαιόλαδο μπορούν να χωριστούν σε πέντε κατηγορίες: φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνες, αλκοόλες και σεκοϊριδοειδή (Brenes et al., 2000b; Christophoridou, Dais, Tseng, & Spraul, 2005; Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang, & Glover, 1999; Servili & Montedoro, 2002). Από αυτές, τα σεκοϊριδοειδή (παράγωγα της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης), αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου (Servili et al.,

2004; Tasioula-Margari & Okogeri, 2001a). Στο **κεφάλαιο 4** γίνεται πιο εκτενής αναφορά στις φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου.

Πτητικά συστατικά. Το κλάσμα των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και σε αυτό έχουν ταυτοποιηθεί πλήθος πτητικών ενώσεων, οι οποίες έχουν από 5 έως 20 άτομα άνθρακα. Σε αυτό, περιλαμβάνονται κυρίως αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, εστέρες και υδρογονάνθρακες ενώ λιγότερο απαντώνται φαινόλες, λακτόνες και κάποια παράγωγα του φουρανίου (Aparicio, Morales, & Alonso, 1996; Aparicio, Morales, & Alonso, 1997; Bortolomeazzi, Berno, Pizzale, & Conte, 2001; Flath, Forrey, & Guadagni, 1973; Guth & Grosch, 1991; Morales, Alonso, Rios, & Aparicio, 1995; Pouliarekou et al., 2011; Reiners & Grosch, 1998; Servili, Conner, Piggott, Withers, & Paterson, 1995; Temime, Campeol, Cioni, Daoud, & Zarrouk, 2006; Vichi et al., 2003a; Vichi, Pizzale, Conte, Buxaderas, & López-Tamames, 2003b, 2005; Vichi, Romero, Tous, Tamames, & Buxaderas, 2008). Από αυτές τις ενώσεις το σημαντικότερο μέρος αποτελούν ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα, ειδικότερα, οι C6 γραμμικές κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, αλκοόλες και εστέρες οι οποίες συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό «πράσινο» άρωμα (Aparicio & Morales, 1998; Kalua et al., 2007). Στο **κεφάλαιο 5** περιγράφονται αναλυτικά οι πτητικές ενώσεις που απαντώνται στο ελαιόλαδο.

Κεφάλαιο 4

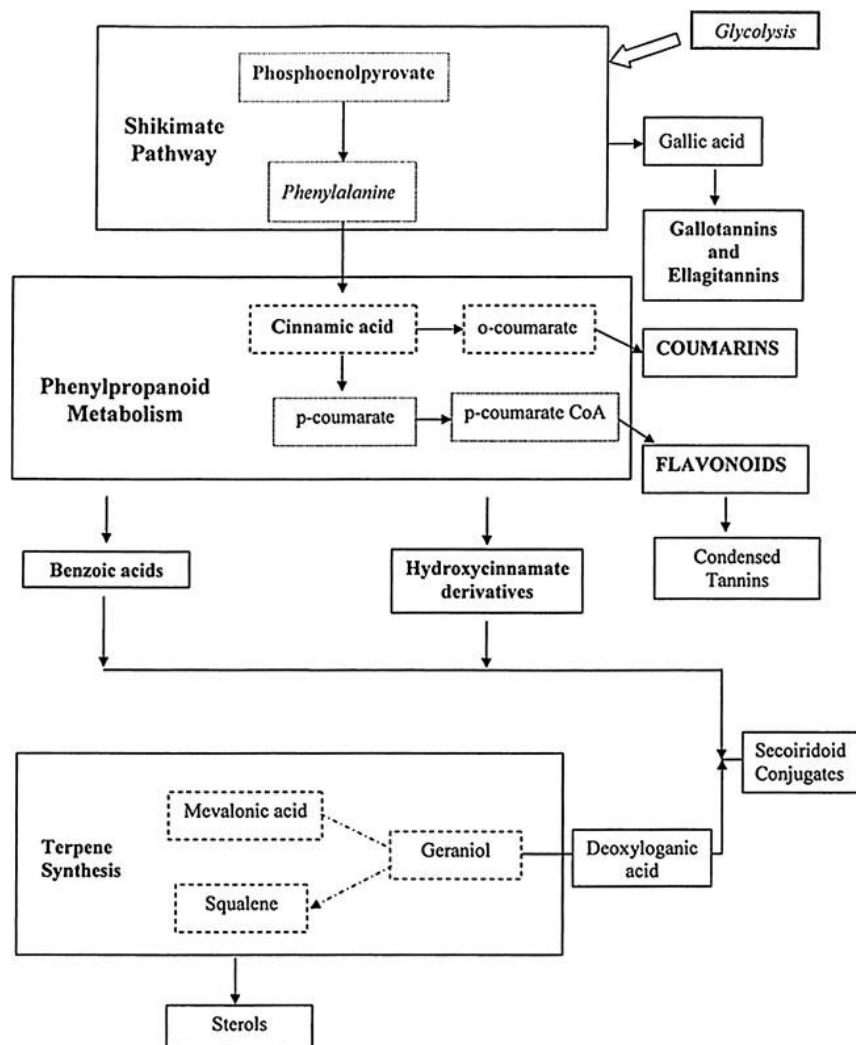
Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρωματικού δακτυλίου (C6) με ένα ή περισσότερα υδροξύλια και αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών. Οι φαινολικές ενώσεις του καρπού της ελιάς είναι κυρίως γλυκοζίτες σεκοϊριδοειδών ενώσεων (όπως η ελαιοευρωπαϊνή και ο λιγκστροζίτης), φλαβονών (γλυκοζίτης της λουτεολίνης), φλαβονολών (ρουτίνη), ελενολικού οξέος και του βερμπασκοζίτη (παράγωγο του καφεϊκού οξέος) (Amiot, Fleuriet, & Macheix, 1989; Ryan, Antolovich, Prenzler, Robards, & Lavee, 2002). Με την ωρίμανση του καρπού και την αύξηση της υδρολυτικής δράσης, αυξάνονται οι απλές φαινόλες (υδροξυτυροσώλη, τυροσώλη) καθώς και οι αγλυκόνες της ελαιοευρωπαϊνής και του βερμπασκοζίτη (Gómez-Rico, Fregapane, & Salvador, 2008).

Στο ελαιόλαδο, το φαινολικό κλάσμα αποτελείται από ένα μίγμα παραγώγων των προαναφερθέντων συστατικών. Οι φαινολικές ενώσεις είναι σημαντικοί παράγοντες στην εκτίμηση της ποιότητας του ελαιολάδου αφού, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνες για την σταθερότητά του στην οξείδωση (Baldioli, Servili, Perretti, & Montedoro, 1996; Papadopoulos & Boskou, 1991; Psomiadou & Tsimidou, 2002a; Tsimidou, Papadopoulos, & Boskou, 1992b), ενώ ταυτόχρονα συνεισφέρουν στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Andrewes, Busch, de Joode, Groenewegen, & Alexandre, 2003; Mateos, Cert, Pérez-Camino, & García, 2004). Επίσης, σε αυτές τις ενώσεις έχουν αποδοθεί πολλά από τα οφέλη της κατανάλωσης του παρθένου ελαιολάδου στην υγεία που περιλαμβάνουν: προστασία της LDL από την οξείδωση, (Covas et al., 2006a; de la Torre-Carbot et al., 2010; Visioli & Galli, 1994), αντιμικροβιακές ιδιότητες (Karaosmanoglu et al., 2010; Romero et al., 2007), αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Corona et al., 2009), προστασία από διάφορες μορφές καρκίνου (Elnagar et al., 2011) κ.α.

4.1 Βιοσύνθεση απλών φαινολικών ενώσεων και σεκοϊριδοειδών στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς

Οι απλές φαινολικές ενώσεις στον καρπό και στα φύλλα της ελιάς συντίθενται κυρίως μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού και του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών. Για τη σύνθεση των σεκοϊριδοειδών, το φαινολικό τμήμα προέρχεται από το μεταβολισμό των φαινυλοπροπανοειδών και το τμήμα του ελαιοζίτη προέρχεται από την οδό του μεβαλονικού οξέος, στην οποία πραγματοποιείται η σύνθεση των τερπενίων (σχήμα 4.1) (Obied et al., 2008).



Σχήμα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης των οδών του σικιμικού, του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και του μεβαλονικού οξέος (Obied et al., 2008).

Μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού (όπου μετατρέπονται απλά ενδιάμεσα μόρια υδατανθράκων της γλυκόλυσης και του κύκλου των φωσφοπεντοζών σε αρωματικά αμινοξέα) σχηματίζεται το αμινοξύ φαινυλαλανίνη που αποτελεί το αρχικό

υπόστρωμα για το σχηματισμό των φαινολικών ενώσεων (Herrmann & Weaver, 1999). Η βιοσύνθεση των περισσότερων φαινολικών οξέων, αρχίζει με την απαμίνωση της φαινυλαλανίνης η οποία σηματοδοτεί την είσοδο της μεταβολικής ακολουθίας στην οδό των φαινυλοπροπανοειδών με την παραγωγή του κινναμικού οξέος, σε μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο αμμωνιολυάση της φαινυλαλανίνης. Το ένζυμο αυτό επηρεάζεται από ερεθίσματα του περιβάλλοντος τα οποία σχετίζονται με παράγοντες καταπόνησης, όπως είναι οι μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας, οι τραυματισμοί, οι προσβολές από παθογόνα και η υπερϊώδης ακτινοβολία, επίσης η δραστηρότητά του μεταβάλλεται ανάλογα με το βαθμό ωρίμανσης του καρπού (Douglas et al., 1992; Ryan et al., 2002).

Αν και όπως φαίνεται οι βιοσυνθετικές πορείες του σχηματισμού των απλών φαινολικών ενώσεων είναι πλήρως διασαφηνισμένες, τα δεδομένα που υπάρχουν για το σχηματισμό των γλυκοζιτών των σεκοϊριδοειδών είναι περιορισμένα. Οι γλυκοζίτες των σεκοϊριδοειδών βρίσκονται αποκλειστικά στην *Olea Europaea* και ως αγλυκόνες αποτελούν το πιο σημαντικό κομμάτι του φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου. Οι γλυκοζίτες των σεκοϊριδοειδών αποτελούνται από ένα φαινολικό τμήμα που προέρχεται από την οδό του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών και έναν ελαιοζίτη που προέρχεται από την οδό του μεβαλονικού οξέος (Ryan et al., 2002).

Η συγκέντρωση της ελαιοευρωπαϊνης, η οποία είναι η σημαντικότερη ένωση στις περισσότερες ποικιλίες ελιάς, βρίσκεται σε μεγαλύτερα επίπεδα όταν ο καρπός είναι πράσινος και μειώνεται στη συνέχεια λόγω της δράσης υδρολυτικών ενζύμων (Amiot et al., 1989) ενώ η βιοσυνθετική πορεία αυτής και των παραγώγων της ξεκινά από την τυροσίνη (*p*-υδροξυ φαινυλαλανίνη) (Ryan et al., 2002).

4.2 Φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου

Στο ελαιόλαδο έχουν ανιχνευτεί περισσότερες από 30 φαινολικές ενώσεις (Servili et al., 2004) οι οποίες είτε προέρχονται από τον καρπό και τα φύλλα της ελιάς, είτε σχηματίζονται κατά την παραλαβή του ελαιολάδου στο ελαιοτριβείο. Η σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις καθορίζεται από τους φαινολικούς γλυκοζίτες που βρίσκονται στο καρπό της ελιάς και από τη δράση κάποιων υδρολυτικών ενζύμων (β -γλυκοσιδάση) πάνω σε αυτούς τους γλυκοζίτες. Επίσης, η ύπαρξη ενδογενών οξειδοαναγωγασών (πολυφαινολοξειδάση και υπεροξειδάση) ευνοεί την οξειδωση των

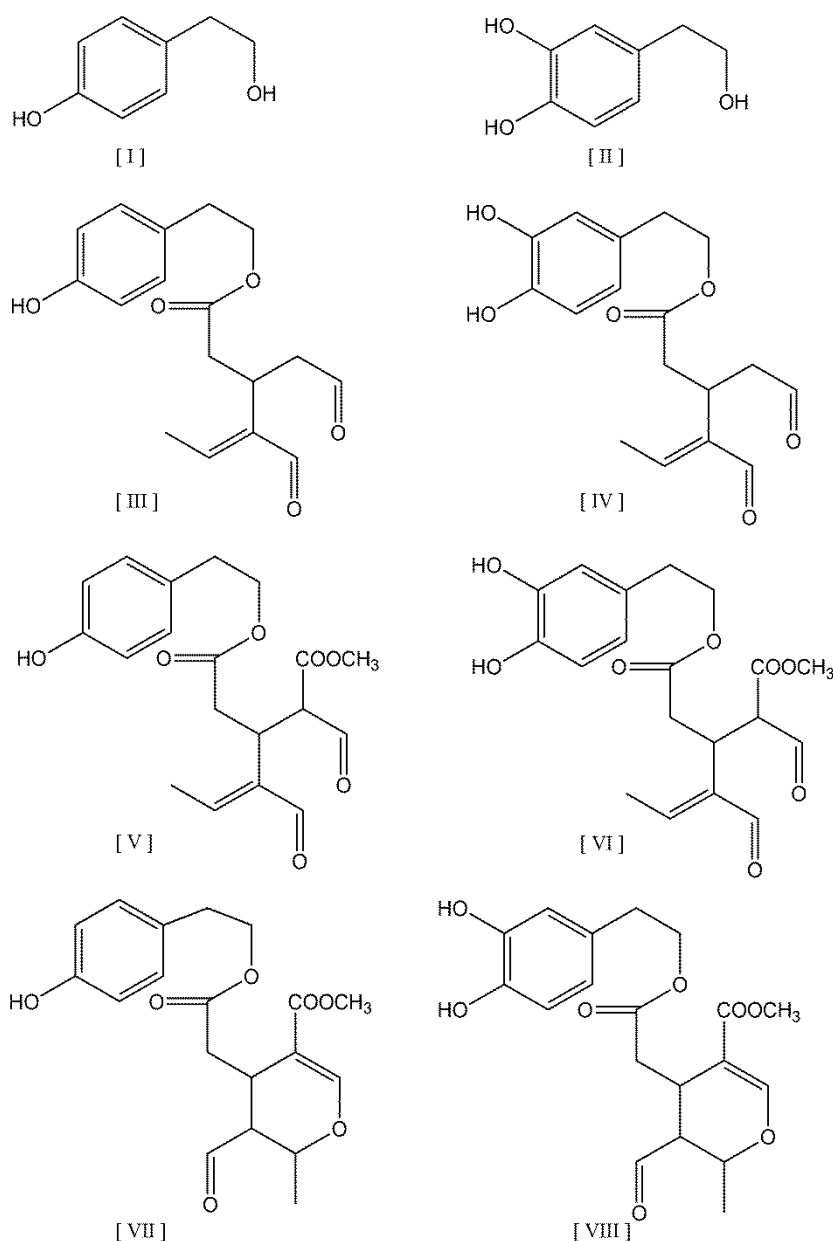
φαινολικών στα στάδια του σπασίματος και της μάλαξης του καρπού κατά τη διαδικασία της εξαγωγής του ελαιολάδου (García-Rodríguez, Romero-Segura, Sanz, Sánchez-Ortiz, & Pérez, 2011; Romero-Segura, Sanz, & Perez, 2009). Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου μπορούν να χωριστούν στις εξής ομάδες: σεκοϊριδοειδή (σχήμα 4.2), φαινολικές αλκοόλες (σχήμα 4.2), φαινολικά οξέα (σχήμα 4.3), λιγνάνες (σχήμα 4.4) και φλαβονοειδή (σχήμα 4.5).

Η διαλδεϋδική αποκαρβοξυλιωμένη μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με την υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA-EDA) ή με την τυροσόλη (p-HPEA-EDA), η αλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με την υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA-EA) και η αλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος συνδεδεμένο με την τυροσόλη (p-HPEA-EA), που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του φαινολικού κλάσματος του ελαιολάδου, παράγονται με ενζυμική και/ή χημική αποδόμηση των γλυκοζιτών των σεκοϊριδοειδών του καρπού της ελιάς (Angerosa, d'Alessandro, Corana, & Mellerio, 1996a; El Riachy, Priego-Capote, León, Rallo, & Luque de Castro, 2011). Η υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA) και η τυροσόλη (p-HPEA), προέρχονται επίσης από τους γλυκοζίτες της ελαιοευρωπαϊνης και του λιγκστροσιδίου (Montedoro et al., 1993). Αυτές οι δύο φαινολικές ενώσεις, εντοπίζονται ως εστέρες σε υψηλής ποιότητας φρέσκα ελαιόλαδα (Angerosa, d'Alessandro, Konstantinou, & Di Giacinto, 1995).

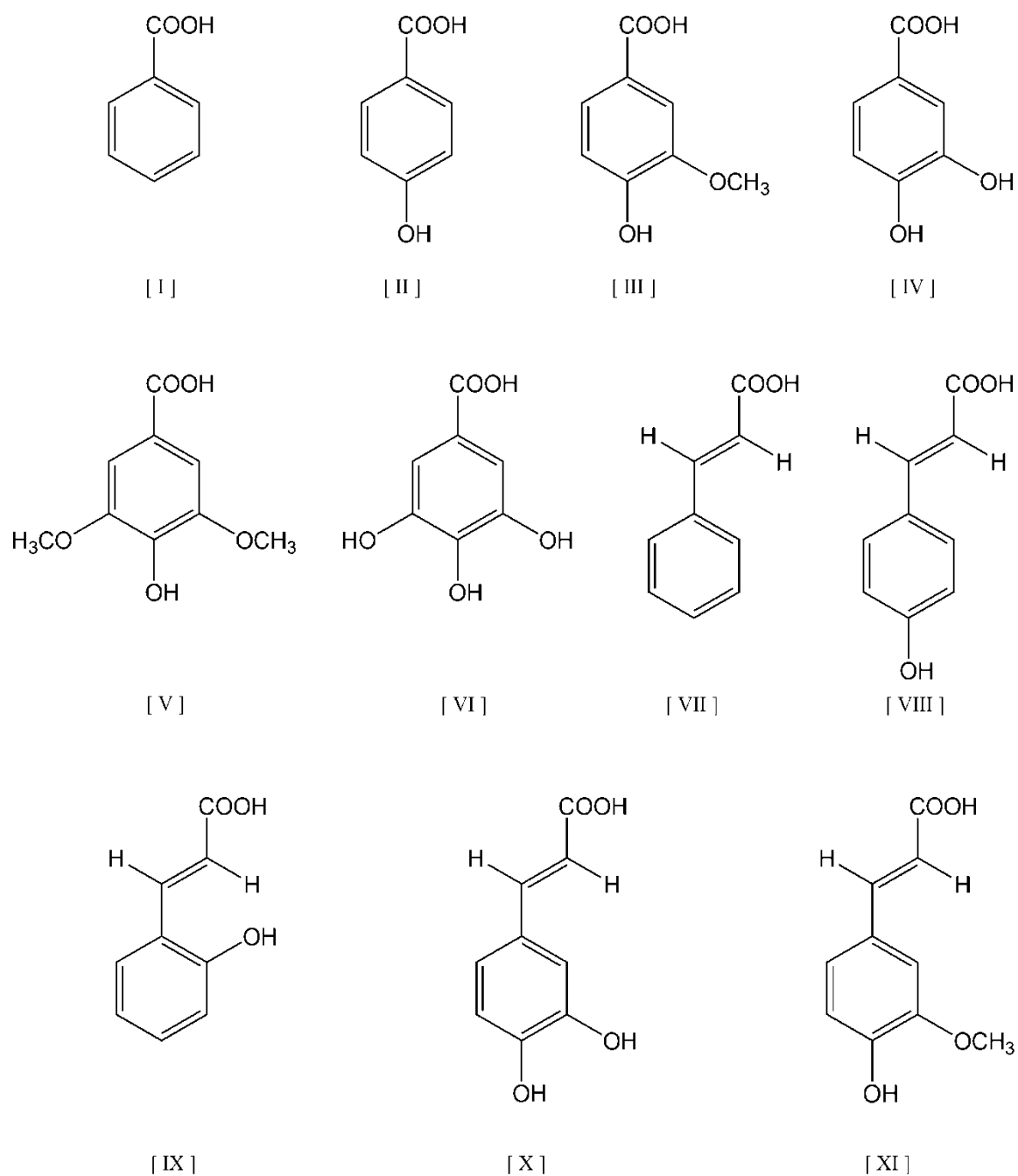
Η υδρόλυση των φαινολικών γλυκοζιτών κατά τη διαδικασία της εξαγωγής του ελαιολάδου, πραγματοποιείται κυρίως από το ένζυμο β-γλυκοσιδάση, το οποίο λόγω συγγένειας υποστρώματος, δρα κυρίως με την ελαιοευρωπαϊνή (Romero-Segura et al., 2009).

Οι οξειδοαναγωγάσες, όπως η πολυφαινολοξειδάση και η υπεροξειδάση, είναι τα κυριότερα οξειδωτικά ένζυμα στα φυτικά προϊόντα και δρουν συνεργιστικά. Η πολυφαινολοξειδάση είναι το σημαντικότερο ένζυμο στην οξείδωση των φαινολών κατά την ωρίμανση του καρπού αλλά και σε περίπτωση τραυματισμού του καρπού (Pourcel, Routaboul, Cheynier, Lepiniec, & Debeaujon, 2007). Έτσι, έχει βρεθεί αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της πολυφαινολοξειδάσης και αυτής της ελαιοευρωπαϊνης σε σχέση με το στάδιο ωρίμανσης του καρπού (Ortega-García, Blanco, Peinado, & Peragón, 2008). Από την άλλη πλευρά, οι υπεροξειδάσες, οξειδώνουν τις φαινολικές ενώσεις με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο τραυματισμός του καρπού μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του υπεροξειδίου του

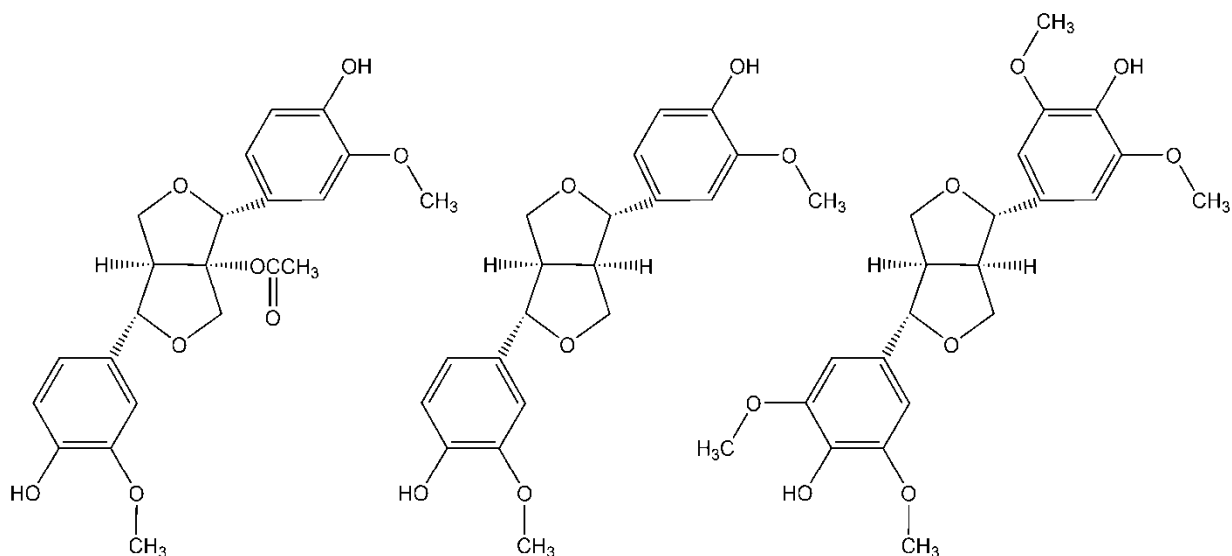
υδρογόνου και ως συνέπεια σε αύξηση της δράσης της υπεροξειδάσης (Takahama & Oniki, 2000). Τόσο η πολυφαινυλοξειδάση όσο και η υπεροξειδάση εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα με τα παράγωγα της ελαιοευρωπαϊνης σε σχέση με αυτά του λιγστροζίτη (Angerosa et al., 2001; Artajo, Romero, & Motilva, 2006b; Ranalli, Malfatti, Lucera, Contento, & Sotiriou, 2005; Servili & Montedoro, 2002; Servili et al., 2007a).



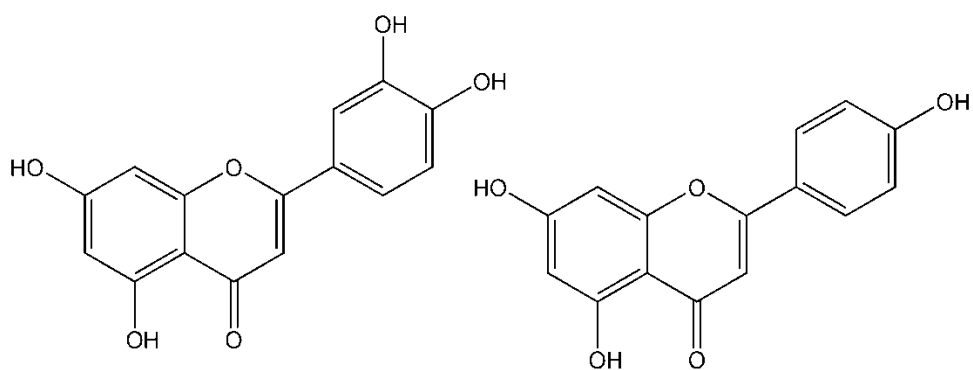
Σχήμα 4.2: Οι φαινολικές αλκοόλες και τα σεκοΐριδοειδή του ελαιολάδου: τυροσόλη (p-HPEA)[I], υδροξυτυροσόλη (3,4-DHPEA) [II], διαλδευδική μορφή της αγκυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης (p-HPEA-EDA) [III], διαλδευδική μορφή της αγκυκόνης του λιγστροζίτη (3,4-DHPEA-EDA) [IV], p-HPEA-EDA καρβοξυμεθυλιωμένη [V], 3,4-HPEA-EDA καρβοξυμεθυλιωμένη [VI], η αλδευδική μορφή της αγκυκόνης του λιγστροζίτη (p-HPEA-EA) [VII] και η αλδευδική μορφή της αγκυκόνης ελαιοευρωπαϊνης (3,4-DHPEA-EA) [VIII].



Σχήμα 4.3: Χημικές δομές των κυριότερων φαινολικών οξέων του ελαιολάδου: βενζοϊκό οξύ [I], p-υδροξυβενζοϊκό οξύ[II], βανιλλικό οξύ [III], πρωτοκατεχικό οξύ [IV], συριγγικό οξύ [V], γαλλικό οξύ [VI], κινναμικό οξύ [VII], p-κουμαρικό οξύ [VIII], o- κουμαρικό οξύ [IX], καφεϊκό οξύ [X] και φερουλικό οξύ[XI].



Σχήμα 4.4: Χημικές δομές των λιγνάνων του ελαιολάδου: 1-ακετοξυπινορεσινόλη [I], πινορεσινόλη [II] και συριγγαρεζινόλη [III].



Σχήμα 4.5: Χημικές δομές των φλαβονών του ελαιολάδου: λουτεολίνη [I] και απιγενίνη [II].

4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις

Μεταξύ των παρθένων ελαιολάδων υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση όσον αφορά τη σύνθεση και τη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις. Η ολική συγκέντρωση των παρθένων ελαιολάδων μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 1000 mg/kg. Οι διαφορές στη σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης της ποικιλίας και των αγρονομικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων καθώς και των τεχνολογικών παραμέτρων κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου (Servili et al., 2004). Συγκεκριμένα, ενώ η ποικιλία, οι αγρονομικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες καθορίζουν τη χημική και βιοχημική σύσταση του καρπού (Esti, Cinquanta, & La Notte, 1998; Vinha et al., 2005) οι τεχνολογικοί παράγοντες, κυρίως οι συνθήκες άλεσης και μάλαξης, είναι τα πιο κρίσιμα στάδια κατά τα οποία συμβαίνουν οι σημαντικότερες μεταβολές στη φαινολική σύσταση (Angerosa et al., 2001; Di Giovacchino, Solinas, & Miccoli, 1994).

1. Ποικιλία

Η σύσταση σε φαινολικές ενώσεις του ελαιοκάρπου, και κατά συνέπεια και του αντίστοιχου παρθένου ελαιολάδου, συσχετίζεται με την ποικιλία της ελιάς και παρουσιάζει πολύ μεγάλες διακυμάνσεις (Baccouri et al., 2007; Brenes, García, García, Rios, & Garrido, 1999; Esti et al., 1998; Issaoui et al., 2010; Romani, Mulinacci, Pinelli, Vincieri, & Cimato, 1999; Vinha et al., 2005).

Το φαινολικό προφίλ επιτρέπει τη διάκριση των διαφορετικών ποικιλιών ελιάς (Gómez-Alonso, Salvador, & Fregapane, 2002; Kalua et al., 2005; Lerma-García, Herrero-Martínez, Ramis-Ramos, & Simó-Alfonso, 2008; Ocakoglu, Tokatli, Ozen, & Korel, 2009). Μεταξύ των διαφόρων φαινολικών ενώσεων, τα σεκοϊριδοειδή οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης (3,4-DHPEA-AC), η *p*-HPEA-EDA, η αγλυκόνη του λιγκστροζίτη και η (+) 1-ακετοξυπινορεσινόλη βρέθηκαν να είναι οι καλύτεροι δείκτες διαχωρισμού των διάφορων Ισπανικών και Ιταλικών ποικιλιών (Gómez-Rico et al., 2008; Kalua et al., 2005; Vinha et al., 2005).

Οι δείκτες που διαχωρίζουν επιτυχώς παρθένα ελαιόλαδα από μερικές από τις πιο γνωστές ελληνικές ποικιλίες (Κορωνέικη, Τσουνάτη, Αδραμυτιανή και Θρουμπολιά) είναι το *p*-κουμαρικό οξύ, η πινορεσινόλη, η 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η

συριγγαρεζινόλη, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και τα προϊόντα υδρόλυσης της ελαιοευρωπαϊνης (Agiomyrgianaki, Petrakis, & Dais, 2012).

Όσον αφορά τις ισπανικές ποικιλίες, τα παράγωγα της τυροσόλης (κυρίως η p-HPEA-EDA) είναι οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις των ελαιολάδων των ποικιλιών 'Morisca' and 'Picudo'(Gómez-Alonso et al., 2002) ενώ υψηλή συγκέντρωση σε λιγνάνες (πινορεσινόλη και 1-ακετοξυπινορεσινόλη) έχει βρεθεί σε παρθένα ελαιόλαδα που προέρχονται από τις ισπανικές ποικιλίες Arbequina και Empeltre (Brenes et al., 2000b; Oliveras-López et al., 2007).

2. Βαθμός ωρίμανσης του καρπού

Η περίοδος της συγκομιδής παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις και έχει αποτελέσει το αντικείμενο πολυάριθμων ερευνών. Στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, όταν ο καρπός είναι ακόμη πράσινος, η ελαιοευρωπαϊνη είναι η βασική φαινολική ένωση με συγκέντρωση που μπορεί να φτάσει μέχρι και 14% του καθαρού βάρους του καρπού (Amiot, Fleuriet, & Macheix, 1986). Στη συνέχεια, κατά την ωρίμανση, η συγκέντρωση των σεκοϊριδοειδών μειώνεται και φτάνει στα χαμηλότερα επίπεδα όταν ο καρπός αποκτά σκούρο καφέ χρώμα (Amiot et al., 1989; Amiot et al., 1986; Morelló et al., 2004b). Η μείωση αυτή οφείλεται στη δραστικότητα των ενζύμων της εστεράσης (πχ β-γλυκοσιδάση) τα οποία αποδομούν τα σεκοϊριδοειδή προς σχηματισμό άλλων φαινολικών ενώσεων αλλά και μη φαινολικών παραγώγων (Gómez-Rico et al., 2008).

Η αποδόμηση της ελαιοευρωπαϊνης κατά την ωρίμανση συνοδεύεται με αύξηση της απομεθυλιωμένης ελαιοευρωπαϊνης και του γλυκοζίτη του ελενολικού οξέος από τα οποία μόνο το πρώτο είναι φαινολική ένωση (Amiot et al., 1989). Στους υπερβολικά ώριμους καρπούς η συγκέντρωση της απομεθυλιωμένης ελαιοευρωπαϊνης μειώνεται επίσης σημαντικά (Amiot et al., 1989).

Τέλος, με την ωρίμανση του καρπού παρατηρείται αύξηση των φαινολικών αλκοολών, υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, του βερμπασκοζίτη (το σημαντικότερο υδροξυκιναμικό παράγωγο του καρπού της ελιά) και των φλαβονοειδών (κυρίως της λουτεολίνης, του γλυκοζίτη της λουτεολίνης και της ρουτίνης) (Artajo et al., 2006b; Gómez-Rico et al., 2008) ενώ οι απλές φαινολικές ενώσεις, όπως είναι το βανιλλικό

οξύ, η βανιλίνη, το *p*-κουμαρικό οξύ και το φερουλικό οξύ, παραμένουν σταθερές (Amiot et al., 1989).

3. Γεωγραφική ζώνη

Η γεωγραφική ζώνη της καλλιέργειας, η οποία σχετίζεται με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες, συνεισφέρει επίσης σημαντικά στη χημική σύσταση του καρπού και κατά συνέπεια και σε αυτή του παρθένου ελαιολάδου (Arslan, Karabekir, & Schreiner, 2013; Issaoui et al., 2010).

Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στις φαινολικές ενώσεις, τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνών φαίνεται να έρχονται σε αντιπαράθεση, αφού ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι όσο υψηλότερες είναι οι θερμοκρασίες από την καρπόδεση μέχρι το μάζεμα του καρπού τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση σε φαινολικά ενώ σε κάποιες ποικιλίες έχει παρατηρηθεί και το αντίθετο (Ripa et al., 2008; Tura et al., 2008).

Επιπλέον, οι χαμηλές θερμοκρασίες (κοντά στους 0 °C) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης καταστρέφουν τον καρπό και το ελαιόλαδο που παράγεται έχει μικρότερη συγκέντρωση σε σεκοϊριδοειδή λόγω της ρήξης των κυτταρικών τοιχωμάτων που οδηγεί σε οξείδωση των φαινολικών ενώσεων (Morelló, Romero, & Motilva, 2006).

Η επίδραση του υψόμετρου στις φαινολικές ενώσεις δεν είναι διευκρινισμένη και οι διαφορές που παρατηρούνται στις έρευνες αποδίδονται σε γενετικούς, αγρονομικούς και κλιματικούς παράγοντες (Aguilera et al., 2005). Κάποιες έρευνες έχουν δείξει ότι οι καρποί που μεγαλώνουν σε χαμηλότερα υψόμετρα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις γεγονός που έχει συσχετιστεί με τις ευνοϊκότερες θερμοκρασίες και την ένταση του φωτός που οδηγεί σε αύξηση της βιοσύνθεσης των πρόδρομων μορίων των φαινολικών ενώσεων (Mohamed Mousa, Gerasopoulos, Metzidakis, & Kiritsakis, 1996). Σε αντίθεση ελαιόλαδα της τούρκικης ποικιλίας Sariulak που προήλθαν από περιοχές που βρίσκονται σε μεγαλύτερο υψόμετρο (400 m), φάνηκε να έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις σε σχέση με αυτά που προήλθαν από χαμηλό υψόμετρο γεγονός που και σε αυτή την περίπτωση συσχετίστηκε με τα χαμηλότερα επίπεδα βροχοπτώσεων στη τοποθεσία με το μεγαλύτερο υψόμετρο (Arslan et al., 2013)

4. Διαθεσιμότητα σε νερό

Γενικά, η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών και *ο*-διφαινολικών ενώσεων μειώνεται όσο αυξάνεται η διαθεσιμότητα σε νερό (Caruso et al., 2014). Σε συνθήκες έλλειψης νερού η δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των φαινολικών ενώσεων, όπως είναι η αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης, αυξάνεται (Gómez-Rico et al., 2007; Morelló, Romero, Ramo, & Motilva, 2005; Servili et al., 2007b) έχοντας ως αποτέλεσμα, αύξηση των σεκοϊριδοειδών (Artajo, Romero, Tovar, & Motilva, 2006a) και των άγλυκων παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης (Servili et al., 2007b). Παρόλα αυτά, κάποιοι ερευνητές ανέφεραν αμελητέα επίδραση ή ακόμα και αύξηση στις φαινολικές ενώσεις, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της ωρίμανσης του καρπού, σε δέντρα που ποτίζονται συστηματικά σε σχέση με αυτά που ποτίζονται μόνο από το νερό της βροχής, παρατήρηση που μπορεί να σχετίζεται με γενετική ή άλλη αγρονομική παράμετρο (Tovar, Motilva, & Romero, 2001).

5. Κατάσταση της υγείας του καρπού

Ο Δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) είναι το σοβαρότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η ελαιοπαραγωγή στις χώρες της Μεσογείου, όπου καλλιεργείται η ελιά. Η προσβολή των καρπών από Δάκο έχει ιδιαίτερα αρνητικές επιπτώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων είναι και η σύσταση σε φαινολικές ενώσεις, του παραγόμενου ελαιολάδου (Kyriakidis & Dourou, 2002). Έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση σε φαινόλες, *ο*-διφαινόλες και παράγωγα των σεκοϊριδοειδών μετά από έντονη δακοπροσβολή (Gómez-Caravaca et al., 2008).

6. Τεχνολογικοί παράγοντες

Η σύσταση του παρθένου ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις εξαρτάται από τη δράση των ενδογενών ενζύμων του καρπού τα οποία απελευθερώνονται στην ελαιοζύμη κατά το σπάσιμο του καρπού και τη μάλαξη. Έτσι, οι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία της εξαγωγής του ελαιολάδου (άλεση, χρόνος και θερμοκρασία μάλαξης, ποσότητα νερού που προστίθεται) είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στη διαμόρφωση του φαινολικού προφίλ του παραγόμενου ελαιολάδου (Di Giovacchino et al., 1994; Ranalli, Contento, Schiavone, & Simone, 2001; Torres & Maestri, 2006).

Κατά το σπάσιμο του καρπού, οι γλυκοζίτες της ελαιοευρωπαϊνης, του λιγκστροσιδίου και η απομεθυλιωμένη ελαιοευρωπαϊνη υδρολύονται από τις β-γλυκοσιδάσες και

σχηματίζονται οι αγλυκόνες των σεκοϊριδοειδών (Romero-Segura et al., 2009; Ryan et al., 2002). Μετά το σπάσιμο του καρπού και κατά τη διάρκεια της μάλαξης, παρατηρείται μείωση στις φαινολικές ενώσεις λόγω της ενεργοποίησης των ενζύμων πολυφαινολοξειδάση και υπεροξειδάση (Montedoro et al., 2002). Η μείωση είναι μεγαλύτερη με αύξηση του χρόνου και της θερμοκρασίας μάλαξης (Gómez-Rico, Inarejos-García, Salvador, & Fregapane, 2009).

Το σύστημα διαχωρισμού παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στη σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις και σχετίζεται με την ποσότητα του νερού που προστίθεται στην ελαιόπαστα καθώς αυτό βοηθά στην απομάκρυνση των φαινολών στην υδατική φάση. Το σύστημα φυγοκέντρισης δύο φάσεων, όπου δεν υπάρχει προσθήκη νερού και κατά δεύτερο λόγο η φυγοκέντριση τριών φάσεων αλλά με μικρή προσθήκη νερού και σύντομο χρόνο επεξεργασίας, αποτελούν τις καλύτερες επιλογές για βελτίωση της φαινολικής σύστασης των ελαιολάδων συγκριτικά με τα συστήματα πίεσης και το παραδοσιακό τριφασικό σύστημα (Di Giovacchino et al., 1994; Torres & Maestri, 2006).

4.4 Μεταβολές των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση και τις οικιακές θερμικές επεξεργασίες

Η συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι σημαντικό κριτήριο της ποιότητας του παρθένου ελαιολάδου αφού εκτός του ότι αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τη χαρακτηριστική πικρή του γεύση (Esti, Contini, Moneta, & Sinesio, 2009), του προσδίδουν αντοχή στην οξειδωση λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων με συνέπεια να συνδέονται με τη διάρκεια ζωής του ελαιολάδου (Velasco & Dobarganes, 2002). Στην περιοχή της Μεσογείου, το ελαιόλαδο παράγεται από τον Σεπτέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο και αποθηκεύεται σε μεγάλες δεξαμενές μέχρι να συσκευαστεί και να πουληθεί. Κατά τη διάρκεια αυτής της αποθήκευσης, η σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικά μπορεί να μεταβληθεί για διάφορους λόγους.

Οι μεταβολές των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση, έχουν αποτελέσει επανειλημμένα το αντικείμενο ερευνών, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις οι πειραματικές συνθήκες δεν αντιπροσωπεύουν τις πραγματικές συνθήκες αποθήκευσης. Επίσης, για οικονομία χρόνου, συχνά εφαρμόζεται επιταχυνόμενη οξειδωση, με

διάφορες μεθόδους, έτσι στη βιβλιογραφία εντοπίζονται πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα λόγω διαφορετικών πειραματικών συνθηκών (Frankel, 1993).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα σημαντικότερα φαινόμενα που συνδέονται με τη μεταβολή της φαινολικής σύστασης είναι η υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών και η οξειδωση κάποιων φαινολικών ενώσεων (Brenes, García, García, & Garrido, 2001). Το πόσο σημαντικές θα είναι οι μεταβολές στη σύσταση, εξαρτάται από τις συνθήκες αποθήκευσης, δηλαδή από τη θερμοκρασία, το φως, το διαθέσιμο οξυγόνο και από το αν το ελαιόλαδο διατηρείται σε βιομηχανική δεξαμενή ή σε εμπορική συσκευασία (Méndez & Falqué, 2007).

Γενικά, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, παρατηρείται μία σταδιακή μείωση στη συγκέντρωση των ολικών φαινολικών, ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται από τους εκάστοτε παράγοντες (Gutiérrez & Fernández, 2002). Σε συνθήκες αποθήκευσης που μοιάζουν με τις εμπορικές συνθήκες τα σεκοϊριδοειδή μειώνονται, με τα παράγωγα της ελαιουερωπαϊνής να είναι λιγότερο σταθερά σε σχέση με αυτά του λιγκτροζίτη (Lavelli, Fregapane, & Salvador, 2006; Okogeri & Tasioula-Margari, 2002). Λόγω της υδρόλυσης των σεκοϊριδοειδών, κατά την αποθήκευση παρθένων ελαιολάδων, τόσο οικιακά όσο και στις βιομηχανικές δεξαμενές παρατηρείται σημαντική αύξηση της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης (Brenes et al., 2001; Cinquanta, Esti, & Notte, 1997; Lozano-Sánchez et al., 2011). Από τις υπόλοιπες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων, οι λιγνάνες και τα φλαβονοειδή φαίνεται να είναι πιο σταθερά κατά την αποθήκευση (Brenes et al., 2001; Daskalaki, Kefi, Kotsiou, & Tasioula-Margari, 2009).

Το παρθένο ελαιόλαδο, χάρη στην ξεχωριστή του γεύση, είναι ιδανικό για να καταναλωθεί ωμό (π.χ. σε σαλάτες), ωστόσο στις ελαιοπαραγωγικές χώρες τις Μεσογείου, λόγω της αφθονίας, το ελαιόλαδο συχνά χρησιμοποιείται στο μαγείρεμα. Οι οικιακές θερμικές επεξεργασίες περιλαμβάνουν κυρίως βράσιμο, τηγάνισμα, ψήσιμο στο φούρνο και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων. Αυτές οι επεξεργασίες μειώνουν την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στο λάδι σε διαφορετικό βαθμό, που εξαρτάται από τη διαφορετική σύνθεση του παρθένου ελαιολάδου αλλά και από τα στάδια ή την ένταση της επεξεργασίας (Brenes, García, Dobarganes, Velasco, & Romero, 2002a; Daskalaki et al., 2009; Gutiérrez, Villafranca, & Castellano, 2002). Όπως και στην απλή αποθήκευση έτσι και κατά την θερμική οξείδωση, τα παράγωγα

της υδροξυτυροσόλης είναι λιγότερο σταθερά από αυτά της τυροσόλης (Nissiotis & Tasioula-Margari, 2002).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αλλά και των θερμικών επεξεργασιών, εκτός από τα προϊόντα της υδρόλυσης, έχουν βρεθεί και διάφορα προϊόντα οξειδωσης (Armaforte et al., 2007; Brenes et al., 2002a; Carrasco-Pancorbo et al., 2007b; Daskalaki et al., 2009; Ríos, Gil, & Gutiérrez-Rosales, 2005; Rovellini & Cortesi, 2002). Οξειδωμένα προϊόντα των σεκοϊριδοειδών έχουν παρατηρηθεί από διάφορους ερευνητές είτε μετά από έκθεση των ελαιολάδων στο φως για μεγάλο χρονικό διάστημα (Rovellini & Cortesi, 2002) είτε μετά από επιταχυνόμενη οξειδωση με συσκευή Rancimat (Lerma-García et al., 2009b; Ríos et al., 2005). Προϊόντα οξειδωσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης έχουν ανιχνευτεί σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Frantoio, Leccino και Coratina (Boselli, Di Lecce, Strabbioli, Pieralisi, & Frega, 2009), καθώς σε ελαιόλαδα από των ελληνικών ποικιλιών Λιανολιά και Κορωνέικη, μετά από αποθήκευση σε οικιακές συνθήκες (θερμοκρασία δωματίου, σκοτάδι) για 9 και 15 μήνες αντίστοιχα.

Έχει προταθεί, ότι η αναλογία μεταξύ των φαινολών και των παραγώγων που σχηματίζονται μέσω υδρόλυσης ή οξειδωσης, μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στον υπολογισμό της παλαιότητας του ελαιολάδου (Bendini, Cerretani, Salvador, Fregapane, & Lercker, 2009).

4.5 Αναλυτικός προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου

Οι αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων είναι πολλές και περιλαμβάνουν: χρωματομετρικές μεθόδους, βιοισθητήρες, χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography), χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), αέρια ή υγρή χρωματογραφία με διαφορετικούς ανιχνευτές (υπεριώδους, φθορισμού, μάζας κλπ), τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση αυτών των ενώσεων, τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) κ.α (Angerosa et al., 1996a; Brenes, García, García, & Garrido, 2000a; Christophoridou et al., 2005; de la Torre-Carbot et al., 2005; Rovellini & Cortesi, 2002; Ryan et al., 1999; Selvaggini et al., 2006; Tasioula-Margari & Okogeri, 2001a). Ωστόσο, μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε κάποια επίσημη μεθοδολογία και για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα, πολλές φορές δεν

είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους καθώς η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται έχει επίδραση πάνω στο αποτέλεσμα (Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Hrnčirik & Fritsche, 2004). Εκτός από τις διακυμάνσεις που προκύπτουν από τις διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές, σύγχυση προκαλούν και οι διαφορετικοί τρόποι έκφρασης των συγκεντρώσεων (Pirisi, Cabras, Cao, Migliorini, & Muggelli, 2000).

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιείται κυρίως με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ για τον ποιοτικό αλλά και ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους ενώσεων χρησιμοποιούνται κυρίως τεχνικές υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι χρωματομετρική και είναι η πρώτη αναγνωρισμένη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών (Gutfinger, 1981). Η μέθοδος αυτή είναι οικονομική αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν μπορεί να παρέχει ποσοτικοποίηση για τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις. Επίσης, είναι γνωστό ότι οι αποκρίσεις των επιμέρους φαινολικών στο αντιδραστήριο είναι πολύ διαφορετικές και ως συνέπεια η μέτρηση δεν είναι ακριβής. Από την άλλη πλευρά, η υγρή χρωματογραφία είναι πολύ ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος, αλλά χρονοβόρα και επίσης κρίνεται απαραίτητη η χρήση πρότυπων ενώσεων ή/και κάποιας τεχνική ταυτοποίησης, όπως είναι η φασματομετρία μάζας. Η αναλυτική διαδικασία για τον προσδιορισμό των επιμέρους φαινολικών ενώσεων στο παρθένο ελαιόλαδο περιλαμβάνει τα εξής βήματα: εκχύλιση του φαινολικού κλάσματος από το δείγμα, αναλυτικό διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση.

4.5.1 Εκχύλιση φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο

Για την απομόνωση του φαινολικού κλάσματος από το παρθένο ελαιόλαδο χρησιμοποιούνται δύο βασικές τεχνικές εκχύλισης, η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Οι μέθοδοι που αναφέρονται στη βιβλιογραφία διαφέρουν όσον αφορά τους διαλύτες και τον χρησιμοποιούμενο όγκο, το είδος των SPE μικροστηλών, την ποσότητα του δείγματος κ.α. Από αυτές τις τεχνικές η LLE υπερτερεί σε σχέση με την SPE όσον αφορά την ανάκτηση των ολικών φαινολικών (Bendini et al., 2003; Hrnčirik & Fritsche, 2004).

Στην LLE, η οποία είναι και η περισσότερο διαδεδομένη μέθοδος, ως διαλύτης χρησιμοποιείται η μεθανόλη ή μίγμα μεθανόλης/νερού (το νερό κυμαίνεται μεταξύ 0 και 40%) ενώ στη συνέχεια ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη και έκπλυση του

υπολείμματος συνήθως με εξάνιο (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). Η αναλογία μεθανόλη/νερό (80:20, v/v) φαίνεται να παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην εκχύλιση των απλών και υδατοδιαλυτών φαινολικών ενώσεων (Montedoro, Servili, Baldioli, & Miniati, 1992) και γι αυτό το λόγο προτείνεται και στην επίσημη μεθοδολογία (IOC, 2009). Ωστόσο, από ορισμένους ερευνητές έχει προταθεί η χρήση 100% μεθανόλης για την αποφυγή δημιουργίας γαλακτώματος (Angerosa et al., 1995). Λιγότερο συχνά χρησιμοποιούνται τα συστήματα: μίγμα ισοπροπανόλης/μεθανόλης (20:80, v/v) που παρέχει ικανοποιητική εκχύλιση των σύνθετων φαινολών (Tasioula-Margari & Okogeri, 2001b), διάλυση σε εξάνιο και εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης/νερού (Evangelisti et al., 1997; Tasioula-Margari & Okogeri, 2001b), καθώς και εκχύλιση με N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (Brenes et al., 2000b).

Η SPE έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για την απομόνωση των φαινολικών ενώσεων από το ελαιόλαδο όσο και για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Έχουν δοκιμαστεί διάφορα υλικά πλήρωσης μικροστηλών και υπάρχει μεγάλο εύρος όσον αφορά την ανάκτηση. Η εκχύλιση στερεάς φάσης με C₈-SPE παρουσιάζει ικανοποιητική ανάκτηση για τις απλές φαινολικές ενώσεις, ωστόσο, φτωχή ανάκτηση έχει παρατηρηθεί όσον αφορά τα σεκοϊριδοειδή και κυρίως τις αλδεϋδικές μορφές αυτών (Servili et al., 1999). Η diol-SPE σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματική καθώς έχει αναφερθεί ανάκτηση >90% για τις περισσότερες φαινολικές ενώσεις (Mateos et al., 2001). Οι Bendini et al. (2003) με τη χρήση C₁₈-SPE και diol-SPE βρήκαν παρόμοιες ανακτήσεις (74 και 72% αντίστοιχα) για το σύνολο των φαινολικών ενώσεων ενώ με τη χρήση C₈-SPE η ανάκτηση έφτασε το 63%.

4.5.2 Προσδιορισμός φαινολικών ενώσεων χωρίς διαχωρισμό

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο πραγματοποιείται κυρίως με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η οποία είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη λόγω της απλότητας και την ταχύτητας της ανάλυσης (Blekas, Psomiadou, Tsimidou, & Boskou, 2002). Η μέθοδος αυτή είναι χρωματομετρική και βασίζεται στην αντίδραση του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu με τις ομάδες υδροξυλίου των φαινολικών ενώσεων. Η μέθοδος περιλαμβάνει εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων και μέτρηση της απορρόφησης μετά την αντίδραση με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

στην ανηγμένη μορφή του έχει μπλε χρώμα και μπορεί να μετρηθεί από 500 μέχρι 750 nm (Folin & Ciocalteu, 1927).

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της χρωματομετρικής δοκιμής είναι η μικρή εξειδίκευση, καθώς η αντίδραση μπορεί να συμβεί με οποιαδήποτε υδροξυλική φαινολική ομάδα που είναι δυνατόν να οξειδωθεί. Επιπλέον, η μέθοδος δεν κάνει διάκριση μεταξύ μεμονωμένων ενώσεων που διαφέρουν ως προς τη μοριακή μάζα (άρα δεν μπορεί να παρέχει ποσοτικοποίηση για τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις) και δομή (δηλαδή τον αριθμό των ενεργών ομάδων υδροξυλίου) (Hrnčirik & Fritsche, 2004). Έτσι, δείγματα με συγκρίσιμο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, αλλά διαφορετικό προφίλ, μπορεί να δώσουν πολύ διαφορετικό αποτέλεσμα ή και το αντίθετο. Από την άλλη, δεδομένου ότι η απορρόφηση εξαρτάται κυρίως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου, η συγκεκριμένη μέτρηση μπορεί να παρέχει άμεσες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των αντιοξειδωτικών φαινολικών ομάδων και συνεπώς σχετίζεται με την οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιολάδου (Blekas et al., 2002).

4.5.3 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων

Η ανάγκη για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους φαινολικών ενώσεων οδήγησε στην αντικατάσταση των παραδοσιακών μεθόδων με χρωματογραφικές μεθόδους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται συνήθως με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συστήματα ανάστροφης φάσης και με χρήση πολικών κινητών φάσεων και σε λιγότερες περιπτώσεις με αέρια χρωματογραφία (GC). Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες, κυρίως με χρήση ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD), σε διάφορα μήκη κύματος, ενώ για τον ποιοτικό προσδιορισμό είναι απαραίτητη η χρήση και κάποιας μεθόδου ταυτοποίησης όπως είναι η φασματομετρία μάζας (MS).

4.5.3.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (HPLC-RP) αποτελεί σήμερα τη πιο δημοφιλή και αξιόπιστη τεχνική για την ανάλυση των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Η στατική φάση συνήθως αποτελείται από ένα πολικό υλικό, όπως το οκταδεκυλοσίλανιο (C18), ενώ η κινητή φάση είναι κάποιος πολικός διαλύτης. Στην RP-HPLC η βαθμωτή έκλυση συνήθως κρίνεται

υποχρεωτική λόγω της πολυπλοκότητας του φαινολικού προφίλ των περισσότερων δειγμάτων ελαιολάδου. Για τη βαθμωτή έκλυση χρησιμοποιούνται δυαδικά συστήματα που περιλαμβάνουν έναν υδατικό διαλύτη και ένα λιγότερο πολικό οργανικό διαλύτη όπως είναι το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη ή μίγμα αυτών (Mateos et al., 2001; Montedoro et al., 1992; Servili et al., 1999; Tasioula-Margari & Okogeri, 2001a; Tsimidou, Papadopoulos, & Boskou, 1992a). Η μείωση του pH με προσθήκη ενός οξέος (οξικό, μυρμηκικό ή φωσφορικό οξύ) στους διαλύτες συμβάλλει στο να αποφευχθεί η διάσπαση των φαινολικών ενώσεων, ενώ ταυτόχρονα βελτιώνει τη συμμετρία της κορυφής.

Η ανίχνευση των φαινολικών ενώσεων γίνεται με ανιχνευτή υπεριώδους, με μέτρηση της απορρόφησης στα 225, 240, 280 και 340 nm. Επειδή κάποιες φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν διάφορα μέγιστα απορρόφησης, συνιστάται η χρήση ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους με διάταξη διόδων (UV-vis DAD) για ταυτόχρονη μέτρηση των διαφορετικών μηκών κύματος (Esti et al., 1998; Montedoro et al., 1992; Pirisi et al., 1997), ωστόσο όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα, το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος είναι τα 280 nm, στο οποίο παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις (Montedoro et al., 1992). Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων στηρίζεται στη συσχέτιση του χρόνου κατακράτησής τους με τους χρόνους κατακράτησης των πρότυπων ενώσεων. Μειονέκτημα ωστόσο αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα για όλες τις ενώσεις, κάτι που μπορεί εν μέρει να ξεπεραστεί με την απομόνωση αυτών των ενώσεων με παρασκευαστική HPLC (Andrewes et al., 2003; Mateos et al., 2001; Owen et al., 2000a).

Στην υγρή χρωματογραφία, ο ανιχνευτής μάζας είναι επίσης ευρέως διαδεδομένος για την ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου. Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η HPLC-MS όπου ο χημικός ιονισμός επιτυγχάνεται υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI) ή με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (de la Torre-Carbot et al., 2005) και η τεχνική LC-ESI-TOF MS (Garcia-Villalba et al., 2010; Lozano-Sánchez et al., 2013). Οι φαινολικές ενώσεις δίνουν κορυφές μεγαλύτερης έντασης σε θετικό ιοντισμό, ωστόσο συνήθως επιλέγεται λειτουργία αρνητικού ιοντισμού γιατί έτσι λαμβάνονται καθαρότερα χρωματογραφήματα λόγω μειωμένου χημικού θορύβου

(Bianco et al., 2001). Η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων βασίζεται σε ψευδομοριακά [M-H] ιόντα, διμερή και θραύσματα (de la Torre-Carbot et al., 2005).

Στις περιπτώσεις όπου τα δεδομένα της φασματομετρίας μάζας δεν επαρκούν για να βγει συμπέρασμα για τη δομή της ένωσης, χρησιμοποιείται φασματοσκοπία NMR ή 2D NMR ως συμπληρωματική τεχνική. Ωστόσο, τα φάσματα NMR των φαινολικών ενώσεων είναι περίπλοκα και η ταυτοποίηση των ενώσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη όταν δεν υπάρχουν τα κατάλληλα πρότυπα. Από την άλλη πλευρά η 2D NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση της δομής χωρίς πρότυπες ενώσεις, αλλά η τεχνική αυτή απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες των ενώσεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις πάντως, ο συνδυασμός των UV, MS, και H-NMR παρέχει επαρκείς πληροφορίες για τη διευκρίνιση της δομής (Hrnčirik & Fritsche, 2004; Mateos et al., 2001; Owen et al., 2000a; Owen et al., 2000b).

4.5.3.2 Αέρια χρωματογραφία

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου μπορεί να επιτευχθεί και με αέρια χρωματογραφία (GC). Η χρήση της αέριας χρωματογραφίας προϋποθέτει ότι οι ενώσεις που εγχέονται είναι πτητικές στη θερμοκρασία ανάλυσης και ότι δεν αποσυντίθενται στην θερμοκρασία της έγχυσης ή της ανάλυσης. Στις τυποποιημένες αναλυτικές μεθόδους, ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος, ενώ η φασματομετρία μάζας επιτρέπει την απόκτηση δεδομένων για την ταυτοποίηση των ενώσεων. Οι Angerosa et al. (1996a) με τη χρήση GC-MS ταυτοποίησαν απλές και σύνθετες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου. Χρησιμοποιήθηκε επίσης συνδυασμός HPLC και GC-MS για την ταυτοποίηση των σεκοϊριδοειδών του ελαιολάδου (Tasioula-Margari & Okogeri, 2001a). Ωστόσο, η μικρή πτητικότητα των φαινολικών ενώσεων και η ανάγκη ενός βήματος παραγωγοποίησης καθιστούν περιορισμένη τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας στον προσδιορισμό αυτών.

4.5.3.3 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

Η ανάγκη για μία ταχύτερη τεχνική ανάλυσης ανέδειξε τη χρήση της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE), η οποία παρέχει ικανοποιητικό χαρακτηρισμό για ορισμένες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων στο παρθένο ελαιόλαδο. Οι ενώσεις που φαίνεται να ευνοούνται κατά τη φθορισμομετρική ανίχνευση των φαινολών είναι η τυροσόλη, οι

λιγνάνες (κυρίως η πινορεσινόλη) και η 3,4-DHPEA-EA (Brenes, García, Rios, García, & Garrido, 2002b; Selvaggini et al., 2006).

4.5.4 Ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων

Για την ποσοτικοποίηση των φαινολικών ενώσεων δεν υπάρχει ένας ενιαίος τρόπος έκφρασης και για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις που δίνονται στη βιβλιογραφία τις περισσότερες φορές δεν είναι συγκρίσιμες (Pirisi et al., 2000). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων, όταν αυτό είναι δυνατό, γίνεται με τη χρήση διαθέσιμων εμπορικών προτύπων. Ωστόσο, τα σεκοϊριδοειδή τα οποία αποτελούν και το σημαντικότερο μέρος του φαινολικού κλάσματος του παρθένου ελαιολάδου δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα και έτσι έχουν προταθεί εναλλακτικές μέθοδοι για την ποσοτικοποίησή τους.

Οι Mateos et al. (2001) υπολόγισαν τους συντελεστές απόκρισης αυτών των ενώσεων σε σχέση με εσωτερικά πρότυπα, όπως το *p*-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ και το *o*-κουμαρικό οξύ. Τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης έδειξαν παρόμοιους συντελεστές απόκρισης (mmol/kg). Οι de la Torre-Carbot et al. (2005) χρησιμοποίησαν πρότυπη τυροσόλη για την ποσοτική έκφραση της υδροξυτυροσόλης, ελαιοευρωπαϊνή για την έκφραση των σεκοϊριδοειδών και λουτεολίνη για την έκφραση των φλαβονοειδών. Επιπλέον, έχει προταθεί η χρήση των εμπορικά διαθέσιμων προτύπων, τυροσόλη, ελαιοευρωπαϊνή και πινορεσινόλη, για τον προσδιορισμό των παραγώγων της τυροσόλης, των παραγώγων της υδροξυτυροσόλης και των λιγνάνων αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη ότι έχουν παρόμοιους συντελεστές απόκρισης (Daskalaki et al., 2009).

Κεφάλαιο 5

Πτητικές ενώσεις

5.1 Βιοσύνθεση των αρωματικών ενώσεων – Η δράση των ενζύμων

Στο παρθένο ελαιόλαδο έχουν προσδιοριστεί πλήθος πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό του άρωμα. Οι ενώσεις αυτές είναι κυρίως, αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες, εστέρες και υδρογονάνθρακες (Aparicio et al., 1997; Flath et al., 1973). Από αυτές, οι ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα και κυρίως οι γραμμικές κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες αποτελούν το σημαντικότερο μέρος του πτητικού κλάσματος των παρθένων ελαιόλαδων υψηλής ποιότητας και συνεισφέρουν στο χαρακτηριστικό «πράσινο» άρωμα (Aparicio & Morales, 1998; Kalua et al., 2007). Οι αλδεΐδες απαντώνται στο ελαιόλαδο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα άλλα πτητικά συστατικά του και αποτελούν περίπου το 50-75% του συνόλου των πτητικών συστατικών (Montedoro, Bertuccioli, & Anichini, 1978).

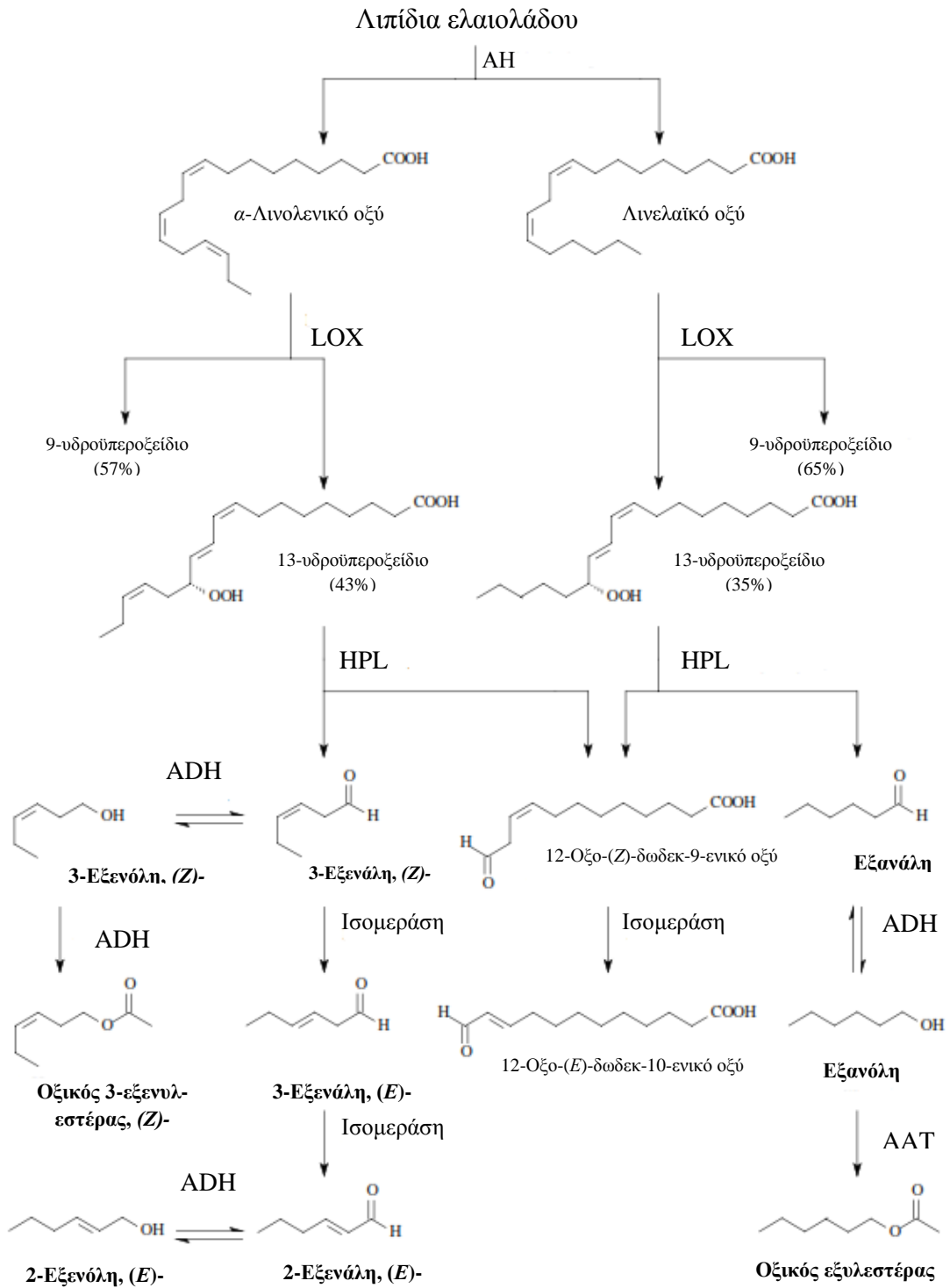
Ο σχηματισμός των C5 και C6 πτητικών συστατικών, που συνεισφέρουν στη διαμόρφωση του χαρακτηριστικού αρώματος του ελαιολάδου, ξεκινά από τον ελαιόκαρπο και οφείλεται σε μία αλληλουχία ενζυμικών αντιδράσεων, γνωστή και ως ‘βιοσυνθετική οδός της λιποξυγενάσης’ (Hatanaka, 1993; Olias, Perez, Rios, & Sanz, 1993).

Η ανάπτυξη αυτών των ενώσεων, σε πρώτη φάση, εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης και την κατάσταση υγείας του καρπού (Aparicio & Luna, 2002; Salas, Williams, Harwood, & Sánchez, 1999). Στην συνέχεια, η σύσταση σε πτητικές ενώσεις επηρεάζεται από τις συνθήκες αποθήκευσης του καρπού πριν την εξαγωγή του ελαιολάδου καθώς και από τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της μάλαξης (Angerosa et al., 2001; Koprivnjak, Procida, & Zelinotti, 2000; Salas & Sánchez, 1998). Τέλος, μετά την εξαγωγή του ελαιολάδου, το αρωματικό προφίλ διαμορφώνεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης καθώς ξεκινάει η οξείδωση των λιπαρών οξέων

(Kalua, Bedgood, Bishop, & Prenzler, 2008; Kanavouras, Hernandez-Münoz, & Coutelieris, 2004; Morales, Rios, & Aparicio, 1997).

Η βιοσύνθεση των πτητικών ενώσεων που έχουν σημαντική συνεισφορά στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου οφείλεται πρωτίστως στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης και δευτερευόντως στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στη βιοσύνθεση και τον μεταβολισμό των αμινοξέων. Η αντίδραση της λιποξυγενάσης αρχίζει με την απελευθέρωση των ενζύμων κατά την άλεση του ελαιοκάρπου. Η πορεία της αντίδρασης περιλαμβάνει μια σειρά ενζύμων που οξειδώνουν (λιποξυγενάση) και διασπούν (υδροϋπεροξειδική λυάση) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προς αλδεΐδες. Οι αλδεΐδες στη συνέχεια ανάγονται σε αλκοόλες (από την αλκοολική αφυδρογονάση) και εστεροποιούνται (από την ακυλοτρανσφεράση). Στο **σχήμα 5.1** φαίνεται η πορεία σχηματισμού των βασικών πτητικών συστατικών του ελαιολάδου.

Στο πρώτο βήμα του σχηματισμού των πτητικών ενώσεων, η άκυλο-υδρολάση (AH) υδρολύει τα τριγλυκερίδια και τα φωσφολιπίδια προς σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων (Salas & Sánchez, 1998). Η AH παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε pH 8,5 (Olias et al., 1993). Στη συνέχεια, τα λιπαρά οξέα οξειδώνονται από τη λιποξυγενάση (LOX) προς σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων. Η LOX δείχνει εκλεκτικότητα για τη Δ-13 θέση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος και παρουσιάζει διπλάσια δραστηριότητα με το λινολενικό οξύ σε σχέση με το λινελαϊκό οξύ. Λόγω αυτής της εκλεκτικότητας υποστηρίζεται η βιοσύνθεση ακόρεστων πτητικών ενώσεων κυρίως με έξι άτομα άνθρακα τα οποία και αποτελούν τα κυριότερα συστατικά του αρώματος του παρθένου ελαιολάδου (Salas et al., 1999). Η LOX παρουσιάζει τη μέγιστη δράση της στον ελαιοκάρπο 15 εβδομάδες μετά την άνθιση και αυτή η δράση μειώνεται κατά την περίοδο της ωρίμανσης (Salas et al., 1999). Αν και η πιο συνηθισμένη δραστηριότητα της LOX έχει παρατηρηθεί σε όξινες συνθήκες, όπως είναι το περιβάλλον της ελαιοζύμης κατά την εκχύλιση του λαδιού, η μέγιστη δράση της έχει παρατηρηθεί σε αλκαλικά διαλύματα γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ισομερών μορφών της (Williams, Salas, Sanchez, & Harwood, 2000).



Σχήμα 5.1: Σχηματισμός των βασικών πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου από το 13-υδροϋπεροξειδίο του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος (AH: ακυλο-υδρολάση, LOX: λιποξυγενάση, HPL: υδροϋπεροξειδική λυάση, ADH: αλκοολική αφυδρογονάση, AAT: αλκοολική ακετυλο-τρανσφεράση) (Cavalli, Fernandez, Lizzani-Cuvelier, & Loiseau, 2004).

Στη συνέχεια, η υδροϋπεροξειδική λύση (HPL) καταλύει τη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των λιπαρών οξέων παράγοντας πτητικές αλδεύδες και οξοοξέα. Η HPL μπορεί να παράγει C6-αλδεύδες και C12 ω -οξοοξέα από τα 13-υδροϋπεροξειδία του λινολενικού ή λινελαϊκού οξέος, ή C9-αλδεύδες και C9 ω -οξοοξέα από τα 9-παράγωγα υδροϋπεροξειδίων των ίδιων λιπαρών οξέων. Η ισομερής μορφή της HPL που διασπά αυστηρά τα 9-υδροϋπεροξειδία είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική, σαν αγγούρι, οσμή ορισμένων φρούτων και λαχανικών, ενώ η ισομερής μορφή που διασπά τα 13-υδροϋπεροξειδία και παράγει C6-αλδεύδες είναι υπεύθυνη για το «πράσινο» άρωμα (Olias et al., 1993; Salas & Sánchez, 1999; Sanchez & Salas, 2000). Με τη διάσπαση των 13-υδροϋπεροξειδίων σχηματίζονται C6-αλδεύδες, όπως η κορεσμένη αλδεύδη εξανάλη από το λινελαϊκό οξύ και η ακόρεστη αλδεύδη, (Z)-3-εξενάλη, από το λινολενικό οξύ. Η (Z)-3-εξενάλη, είναι ασταθής και μετατρέπεται αμέσως με ισομερισμό στη σταθερή ένωση την (E)-2-εξενάλη με τη βοήθεια μιας ισομεράσης (Williams et al., 2000).

Αν και η πιο έντονη δράση της HPL παρατηρείται στις πράσινες ελιές, που συλλέγονται στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, ένα υψηλό επίπεδο δραστηριότητας διατηρείται σε όλη την διαδικασία της ωρίμανσης. Κατά συνέπεια, η μείωση της συγκέντρωσης των C6 πτητικών ενώσεων στα ελαιόλαδα που προέρχονται από ώριμες ελιές δεν αποδίδεται στη δραστηριότητα της HPL αλλά στην έλλειψη υποστρωμάτων (Salas & Sánchez, 1999). Η δράση της HPL είναι μέγιστη σε ελαφρώς όξινες συνθήκες και μπορεί να μειωθεί πολύ σε υψηλές θερμοκρασίες (Olias et al., 1993). Η μεγαλύτερη δράση της παρατηρείται στους 15 °C (Anthon & Barrett, 2003).

Μετά την HPL επιδρά η αλκοολική αφυδρογονάση (ADH) η οποία καταλύει την αντιστρεπτή αναγωγή των αλειφατικών αλδευδών σε αλκοόλες. Η ADH είναι ευρέως διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των πτητικών αλκοολών που συμβάλλουν στο άρωμα των φυτικών προϊόντων (Salas & Sánchez, 1998). Η δραστηριότητα της ADH ελαττώνεται όταν το χρώμα της ελιάς γίνεται μωβ κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ωρίμανσης. Ως επακόλουθο, όσο πιο ώριμος είναι ο καρπός τόσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση των C6-αλκοολών στο άρωμα του ελαιολάδου (Salas & Sánchez, 1998). Το εύρος του pH στο οποίο είναι δραστική η ADH είναι μεταξύ 5,0 και 8,5 με βέλτιστη τιμή 6,8 (Olias et al., 1993).

Τέλος, οι αλκοόλες, που παράγονται από τη δράση της ADH, μπορούν να σχηματίσουν πτητικούς εστέρες. Η αλκοολική ακετυλο-τρανσφεράση (AAT) καταλύει το σχηματισμό των οξικών εστέρων μέσω ακετυλο-CoA παραγώγων. Οι οξικοί εστέρες και οι εστέρες αλκοολών με άλλα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά συστατικά πολλών φρούτων. Στο ελαιόλαδο ο οξικός (Z)-3-εξενυλεστέρας και ο οξικός εξυλεστέρας είναι οι σημαντικότεροι εστέρες και χαρακτηρίζονται από γλυκές και φρουτώδεις νότες (Sanchez & Salas, 2000; Williams, Morales, Aparicio, & Harwood, 1998). Η AAT δεν είναι καθόλου δραστική με τις μικρής αλυσίδας αλκοόλες, όπως είναι η μεθανόλη και η αιθανόλη, ενώ παρουσιάζει μικρή δραστικότητα ως προς τη βουτανόλη και τη 3-μεθυλο-βουτανόλη (Sanchez & Salas, 2000). Αυτή η έλλειψη της δραστικότητας με τις αλκοόλες μικρής αλυσίδας εξηγεί την μικρή συγκέντρωση του οξικού εξενυλεστέρα στο ελαιόλαδο αν και οι πρόδρομες ενώσεις, (Z)-3-εξενόλη και (E)-2-εξενόλη, εντοπίζονται σε σημαντική αναλογία μεταξύ των πτητικών αλκοολών και υποδεικνύει ότι ο οξικός αιθυλεστέρας, εστέρας που συνήθως ανιχνεύεται στο ελαιόλαδο, μπορεί να συντεθεί μέσω μιας διαφορετικής πορείας (Salas, 2004). Η AAT στις ελιές είναι περισσότερο δραστική με την εξανόλη και τη (Z)-3-εξενόλη και λιγότερο με τη (E)-2-εξενόλη (Salas, 2004). Το βέλτιστο pH για τη δράση της AAT είναι ουδέτερο προς βασικό (pH=8) και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 35 °C (Perez, Sanz, & Olias, 1993).

5.2 Σύσταση του πτητικού κλάσματος του ελαιολάδου και συνεισφορά στο άρωμα

Στο πτητικό κλάσμα των ελαιολάδων έχουν προσδιοριστεί, με χρήση αέριας χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (GC/MS), πλήθος πτητικών ενώσεων, ωστόσο, από αυτές τις ενώσεις δεν συνεισφέρουν όλες στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Angerosa et al., 2004). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πτητικές ενώσεις με την υψηλότερη συγκέντρωση δεν είναι απαραίτητα οι κύριοι συντελεστές στην οσμή, καθώς καθοριστικό ρόλο παίζει και το κατώφλι οσμής αυτών των πτητικών συστατικών. Το κατώφλι οσμής είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία μπορεί να γίνει αντιληπτή οργανοληπτικά μια ένωση. Επίσης, η αντιληπτή οσμή είναι συνήθως αποτέλεσμα της συνεισφοράς και των αλληλεπιδράσεων πολλών ενώσεων και όχι μεμονωμένων.

Οι πιο κοινές πτητικές ενώσεις του ελαιολάδου έχουν 5 έως 20 άτομα άνθρακα και περιλαμβάνουν αλκοόλες, αλδεΐδες, εστέρες, κετόνες, φαινόλες, λακτόνες,

τερπενοειδή και κάποια παράγωγα του φουρανίου (Aparicio et al., 1996; Aparicio et al., 1997; Bortolomeazzi et al., 2001; Flath et al., 1973; Guth & Grosch, 1991; Morales et al., 1995; Pouliarekou et al., 2011; Reiners & Grosch, 1998; Servili et al., 1995; Temime et al., 2006; Vichi et al., 2003a; Vichi et al., 2003b, 2005; Vichi et al., 2008). Ωστόσο, το σύνολο των πτητικών ενώσεων με 5 και 6 άτομα άνθρακα είναι αυτές που κυρίως συνεισφέρουν στα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα στο συνολικό «πράσινο» άρωμα (Aparicio & Morales, 1998; Kalua et al., 2007).

Από τις πτητικές ενώσεις, με 5 και 6 άτομα άνθρακα, αυτή που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι η (*E*)-2-εξενάλη, η οποία χαρακτηρίζεται από νότες «πράσινου», «κομμένου γρασιδιού», «μήλου» και «πικραμύγδαλου». Η εξανάλη και η (*Z*)-3-εξενάλη, που συνήθως είναι οι επόμενες σε συγκέντρωση αλδεύδες συνδέονται με το «φρέσκο πράσινο» άρωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εξανάλη, είναι ένωση που αυξάνεται κατά την αποθήκευση και αν ξεπεράσει κάποια συγκέντρωση προσδίδει αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες των C6-αλκοολών όπως είναι η 1-εξανόλη, η (*E*)-2-εξεν-1-όλη και η (*Z*)-3-εξεν-1-όλη έχουν συσχετιστεί με το «ώριμο φρουτώδες», «πικρό» και «απαλό πράσινο», ωστόσο η συνεισφορά τους στο συνολικό άρωμα δεν είναι σημαντική λόγω των υψηλών κατωφλιών οσμής τους. Οι C6-εστέρες, (*Z*)-3-οξικός εξενυλεστέρας και ο οξικός εξυλεστέρας, περιγράφονται ως «φρουτώδες», «πράσινη μπανάνα», «πράσινο», «πράσινα φύλλα», «λουλουδάτο» και «γλυκό». Τέλος οι ενώσεις με 5 άτομα άνθρακα που προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι της LOX, επίσης συνεισφέρουν στα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και οι νότες τους έχουν χαρακτηριστεί ως «πράσινες», «ευχάριστες», «γλυκές» και «φράουλας» (Aparicio & Luna, 2002; Luna, Morales, & Aparicio, 2006; Morales, Luna, & Aparicio, 2005; Reiners & Grosch, 1998).

Στον **πίνακα 5.1** δίνονται κατηγοριοποιημένες οι πιο κοινές πτητικές ενώσεις του ελαιολάδου μαζί με τη χαρακτηριστική τους οσμή και το κατώφλι οσμής. Η σύγκριση των κατωφλιών οσμής των ενώσεων είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς πολλές φορές για την ίδια ένωση δίνονται διαφορετικές τιμές στη βιβλιογραφία. Οι διακυμάνσεις στα κατώφλια οσμής, οφείλονται κυρίως στις πειραματικές συνθήκες και αφορούν τη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων για το προσδιορισμό τους, όπως είναι το αποσμημένο εξευγενισμένο ηλιέλαιο (Aparicio & Morales, 1998; Reiners & Grosch,

1998), εξευγενισμένα φυτικά έλαια (Aparicio & Luna, 2002) ή αποσμημένο εξευγενισμένο ελαιόλαδο (Morales et al., 2005). Το γεγονός ότι κάθε ένωση εμφανίζει διαφορετικό κατώφλι οσμής οφείλεται στην αλληλεπίδραση του μορίου με τους οσφρητικούς υποδοχείς και εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας, την στερεοχημεία και την επίδραση του υποστρώματος (Angerosa, 2002; Kiritsakis, 1998).

Όπως φαίνεται στον **πίνακα 5.1**, τα cis-ισομερή των πτητικών ενώσεων παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερα κατώφλια οσμής σε σχέση με τα trans-ισομερή. Το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αντίληψη της οσμής. Οι ενώσεις που έχουν από 7 ως 12 άτομα άνθρακα είναι χαρακτηριστικές για το άρωμα κατά την παλαίωση του ελαιολάδου (Angerosa, 2002). Όσον αφορά την ακορεστότητα, όπως φαίνεται στον πίνακα, οι ακόρεστες αλδεΐδες εμφανίζουν χαμηλότερο κατώφλι οσμής. Τέλος, για τις ενώσεις με λιγότερα από 4 άτομα άνθρακα δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα στη βιβλιογραφία για την συνεισφορά τους στο άρωμα. Γενικά οι αλκοόλες και οι αλδεΐδες με λίγα άτομα άνθρακα, σχετίζονται με αντιδράσεις ζύμωσης, οπότε εντοπίζονται κυρίως σε ελαιόλαδα με αρνητικές οργανοληπτικές ιδιότητες όπως μουχλιασμένα ή κρασώδη (Morales et al., 2005).

Πίνακας 5.1: Αλδεΐδες που απαντώνται στο πτητικό κλάσμα του ελαιολάδου.

Πτητικές Ενώσεις	Κατώφλι οσμής (μg/kg)	Οργανοληπτική περιγραφή	Αναφορά
Αλδεΐδες			
Ακεταλδεΐδη	0,22	Πικάντικο, γλυκό	Reiners and Grosch (1998)
3-Μεθυλ-βουτανάλη	5,4	Βύνη	Reiners and Grosch (1998)
2-Μεθυλ-βουτανάλη	5,2	Βύνη	Reiners and Grosch (1998)
Πεντανάλη	240	Ξύλο, πικρό, ελαιώδες	Morales et al. (2005)
(E)-2-Πεντενάλη	300	Πράσινο, μήλο	Aparicio and Luna (2002)
	300	Πράσινο, πικραμύδαλο	
Εξανάλη	75	Πράσινο-γλυκό	Aparicio and Luna (2002)
	80	Πράσινο μήλο, χόρτο	Morales et al. (2005)
(Z)-3-Εξενάλη	300	Πράσινο	Reiners and Grosch (1998)
	3	Πράσινο	Aparicio and Luna (2002)
(E)-2-Εξενάλη	1,7	Πράσινα φύλλα	Reiners and Grosch (1998)
	424	Πράσινο, μήλο	Reiners and Grosch (1998)
	420	Πικραμύδαλο, πράσινο	Morales et al. (2005)
Επτανάλη	1125	Πράσινο-στυφό	Aparicio and Luna (2002)
	500	Ελαιώδες, λιπαρό, ξύλο	Morales et al. (2005)
(E)-2-Επτενάλη	5	Οξειδωμένο, λιπαρό, πικάντικο	Morales et al. (2005)

2,4-Επταδιενάλη	3620	Λιπαρό, ταγγό	Morales et al. (2005)
Οκτανάλη	320	Λιπαρό, έντονο	Morales et al. (2005)
(E)-2-Οκτενάλη	56	Κίτρο	Reiners and Grosch (1998)
(E)-2-Οκτενάλη	4	Βότανα, μπαχαρικά	Morales et al. (2005)
Εννεανάλη	150	Λιπαρό, κηρώδες, πικάντικο	Morales et al. (2005)
(E,E)-2,4-εννεαδιενάλη	2500	Σαπουνώδης, διαπεραστικό;	Morales et al. (2005)
(Z)-2-εννενάλη	2500	Πολύ-τηγανισμένο	Reiners and Grosch (1998)
(E)-2-εννενάλη	4,5	Πράσινο, λιπαρό	Reiners and Grosch (1998)
(E)-2-εννενάλη	900	Σαν χαρτί, λιπαρό	Reiners and Grosch (1998)
Δεκανάλη	650	Διαπεραστικό, γλυκό, κερώδες	Morales et al. (2005)
(E)-2-Δεκενάλη	10	Βαφή, ψάρι, λιπαρό	Morales et al. (2005)
2,4-Δεκαδιενάλη	2150	Δυνατό, λιπαρό	Morales et al. (2005)
(E,E)-2,4-Δεκαδιενάλη	180	Πολυτηγανισμένο	Reiners and Grosch (1998)
(E,Z)-2,4-Δεκαδιενάλη	10	Πολυτηγανισμένο	Reiners and Grosch (1998)

Αλκοόλες

Αιθανόλη	30000	Αλκοόλη	Morales et al. (2005)
Βουταν-2-όλη	150	Κρασώδες	Morales et al. (2005)
2-Μεθυλ-βουταν-1-όλη	480	Κρασώδες, πικάντικο	Morales et al. (2005)
3-Μεθυλ-βουταν-1-όλη	100	Ξύλο, κριθάρι, γλυκό	Morales et al. (2005)
Πεντανόλη	470	Φρουτώδες	Aparicio and Luna (2002)
	3000	Έντονο, κολλώδες, βαλσάμικο	Morales et al. (2005)
3-Πεντεν-2-όλη	400	Αρωματικό, ξύλο	Morales et al. (2005)
Εξανόλη	400	Φρουτώδες, μπανάνα, απαλό	Aparicio and Morales (1998)
	400	Ανεπιθύμητο	Aparicio and Luna (2002)
(E)-2-Εξεν-1-όλη	5000	Πράσινο χόρτο, φύλλα	Morales et al. (2005)
	8000	Πράσινο, χορτώδες, γλυκό	Aparicio and Morales (1998)
(E)-3-Εξεν-1-όλη	1500	Πράσινο	Aparicio and Morales (1998)
(Z)-3-Εξενόλη	6000	Πράσινο	Aparicio and Luna (2002)
	1100	Φύλλα	Reiners and Grosch (1998)
Επταν-2-όλη	10	Χωματίλα	Morales et al. (2005)
6-Μεθυλ-5-επτεν-3-όλη	2000	Αρωματικό, ξηροί καρποί	Morales et al. (2005)
Οκταν-2-όλη	100	Χωματίλα, παχύ	Morales et al. (2005)
Οκτεν-3-όλη	1	Μούχλα, χωματίλα	Morales et al. (2005)
Εννεανάλη	280	Παχύ	Morales et al. (2005)
	13500	Ταγγό	Aparicio and Luna (2002)

Εστέρες

Οξικός αιθυλεστέρας	940	Κόλλώδες, γλυκό	Morales et al. (2005)
Οξικός βουτυλεστέρας	300	Πράσινο, φρουτώδες, πικάντικο	Morales et al. (2005)
Οξικός εξυλεστέρας	1040	Πράσινο, φρουτώδες, γλυκό	Aparicio and Luna (2002)
			Baeten et al. (1998)

Οξικός (Z)-3-εξενυλεστέρας	750	Πράσινο	Aparicio and Luna (2002)
	200	Μπανάνα	Reiners and Grosch (1998)
Προπανικός αιθυλεστέρας	100	Φρουτώδες, έντονο	Morales et al. (2005)
Βουτανικός αιθυλεστέρας	30	Γλυκό, φρουτώδες	Morales et al. (2005)
	28	Τυρώδες, φρουτώδες	Reiners and Grosch (1998)
Ισοβουτανικός αιθυλεστέρας	1.2	Φρουτώδες	Reiners and Grosch (1998)
Βουτανικός προπυλεστέρας	150	Ανανάς, διαπεραστικό	Morales et al. (2005)
Βουτανικός 2- μεθυλοπροπυλεστέρας	100	Δυσάρεστο, κρασώδες, ατροχάδο	Morales et al. (2005)
2-Μεθυλο-βουτανικός αιθυλεστέρας	0,72	Φρουτώδες	Reiners and Grosch (1998)
3-Μεθυλο-βουτανικός αιθυλεστέρας	0,62	Φρουτώδες	Reiners and Grosch (1998)
Κυκλοεξυκαρβολικός αιθυλεστέρας	0,16	Αρωματικό, φρουτώδες	Reiners and Grosch (1998)
Κετόνες			
Βουταν-2-όνη	40000	Αιθέρας, φρουτώδες	Morales et al. (2005)
1-Πεντεν-3-όνη	50	Πράσινο	Aparicio and Luna (2002)
	0,73	Πράσινο, πικάντικο	Reiners and Grosch (1998)
Επταν-2-όνη	300	Γλυκό, φρουτώδες	Morales et al. (2005)
6-Μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	1000	Πικάντικο, πράσινο	Morales et al. (2005)
Οκταν-2-όνη	510	Μούχλα, πράσινο	Morales et al. (2005)
1-Οκτεν-3-όνη	10	Μανιτάρι, μούχλα	Morales et al. (2005)
	10	Μανιτάρι	Reiners and Grosch (1998)
(Z)-1,5-Οκταδιεν-3-όνη	0,45	Λουλούδι, γεράνι	Reiners and Grosch (1998)
Καρβοξυλικά οξέα			
Οξικό οξύ	500	Ξινό, ξυδάτο	Morales et al. (2005)
	124	Ξυδάτο	Reiners and Grosch (1998)
Προπανικό οξύ	720	Πικάντικο, ξινό	Morales et al. (2005)
Βουτανικό οξύ	650	Ταγγό, τυρί	Morales et al. (2005)
3-Μεθυλ βουτανικό οξύ	22	Γλυκό	Reiners and Grosch (1998)
Πεντανικό οξύ	600	Πικάντικο, όχι ευχάριστο	Morales et al. (2005)
Εξανικό οξύ	700	Πικάντικο, ταγγό	Morales et al. (2005)
Επτανικό οξύ	100	Ταγγό, λιπαρό	Morales et al. (2005)
Οκτανικό οξύ	3000	Ελαιώδες, λιπαρό	Morales et al. (2005)

5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό και τα επίπεδα των πτητικών συστατικών

Ο σχηματισμός και η συγκέντρωση των πτητικών συστατικών στο ελαιόλαδο σχετίζονται με πολλούς παράγοντες οι οποίοι περιλαμβάνουν την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης του καρπού, τις συνθήκες αποθήκευσης του καρπού πριν την εξαγωγή του λαδιού και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διάρκεια της μάλαξης (Angerosa et al., 2001; Benincasa et al., 2003; Kalua et al., 2008; Morales, Aparicio, & Calvente, 1996).

1. Ποικιλία

Η ποικιλία είναι ο κυριότερος παράγοντας στον σχηματισμό του αρώματος ενός ελαιολάδου. Η επίδραση της ποικιλίας στη συγκέντρωση των C6 ενώσεων αποδεικνύεται με τη σύγκριση του πτητικού κλάσματος ελαιολάδων που παραλαμβάνονται από ελιές που βρισκόταν στο ίδιο στάδιο ωρίμανσης και με τις ίδιες συνθήκες εξαγωγής. Οι διαφορές στη σύσταση οφείλονται στις διαφορές στη συγκέντρωση υποστρωμάτων, τόσο λιπαρών οξέων όσο και ενζύμων (Aparicio & Luna, 2002).

2. Στάδιο ωρίμανσης

Η υψηλότερη συγκέντρωση των πτητικών συστατικών στο ελαιόλαδο παρατηρείται κατά την περίοδο που ο ελαιόκαρπος έχει αρχίσει να αλλάζει χρώμα από πρασινοκίτρινο σε μελανοϊώδες. Στη συνέχεια και καθώς προχωρεί η ωρίμανση παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών αυτών. Η μείωση είναι πιο έντονη κατά την αποθήκευση του καρπού πριν την επεξεργασία παραλαβής του ελαιολάδου, εξαιτίας διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων (Montedoro et al., 1978). Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων άλλων πτητικών συστατικών όπως είναι οι αλκοόλες και οι υδρογονάνθρακες.

Η δραστηριότητα των περισσότερων ενζύμων (όπως η ADH και η LOX), που εμπλέκονται στο σχηματισμό των πτητικών ουσιών μέσω της πορείας της λιποξυγενάσης, μειώνεται καθώς ωριμάζει ο καρπός, με αποτέλεσμα η περιεκτικότητα σε C6 πτητικές ενώσεις να είναι μειωμένη στα ελαιόλαδα που προέρχονται από ώριμες ελιές (Salas et al., 1999; Salas & Sánchez, 1998). Οι περισσότερες από τις C6-αλδεύδες

παρουσιάζουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση όταν η ελιά από πράσινη αρχίζει να μετατρέπεται σε μωβ, ενώ στα πρώιμα στάδια ωρίμανσης, τα ποσά των C6-αλδευδών είναι συγκρίσιμα με εκείνα των αλκοολών (Angerosa & Basti, 2001). Η (E)-2-εξενάλη, η κυριότερη πτητική ένωση στα ευρωπαϊκά εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα, στις περισσότερες ποικιλίες μειώνεται με την ωρίμανση του ελαιοκάρπου. Μείωση παρατηρείται για τις περισσότερες από τις αλδεύδες που παράγονται μέσω της αντίδρασης της λιποξυγενάσης εκτός από τη (Z)-3-εξενάλη, η οποία αυξάνει με την ωρίμανση (Aparicio & Morales, 1998). Οι κυριότεροι δείκτες ωρίμανσης του ελαιοκάρπου είναι η (E)-3-εξεν-1-όλη, η (Z)-3-εξεν-1-όλη, η (E)-2-εξεν-1-όλη, η εξενάλη και ο οξικός εξυλεστέρας (Aparicio & Morales, 1998).

3. Γεωγραφική ζώνη και κλιματολογικές συνθήκες

Η διακύμανση των επιπέδων των C6-αλδευδών και αλκοολών σε δείγματα από διάφορες περιοχές δείχνει ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα της ADH. Ωστόσο δεν παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα των εστέρων γεγονός που υποδηλώνει μικρότερη εξάρτηση της δραστηριότητας της AAT από τις κλιματικές συνθήκες (Vichi et al., 2003b). Γενικά, η συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων συσχετίζεται με την ποικιλία, ενώ οι περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν πιθανώς μια έμμεση επίπτωση λόγω του ότι επηρεάζουν τον βαθμό ωρίμανσης (Angerosa, Basti, & Vito, 1999).

4. Αποθήκευση του καρπού

Η αποθήκευση των ελιών πριν από την επεξεργασία τους για τη παραγωγή ελαιολάδου δεν ενδείκνυται, αντίθετα οι ελιές θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία το συντομότερο δυνατόν μετά τη συγκομιδή (Di Giovacchino, 2013). Κατά την αποθήκευση του καρπού, πριν την επεξεργασία παραλαβής του ελαιολάδου, παρατηρείται μείωση στις πτητικές ενώσεις, που είναι υπεύθυνες για τα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, εξαιτίας διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων (Montedoro et al., 1978). Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης ορισμένων άλλων πτητικών συστατικών, λόγω της δράσης μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα το ελαιόλαδο να έχει χαρακτηριστικά ανεπιθύμητη οσμή (García et al., 1996). Οι οσμές που αναδεικνύονται λόγω της δράσης των μικροοργανισμών μπορεί να

είναι η μούχλα και το κρασώδες-ξιδάτο (Angerosa, Lanza, & Marsilio, 1996b; Morales et al., 2005; Schnürer, Olsson, & Börjesson, 1999).

5. Τεχνολογικοί παράγοντες

Κατά την μάλαξη της ελαιοζύμης, η LOX που έχει απελευθερωθεί από τα κυτταρικά τοιχώματα, μετατρέπει τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, λινολενικό και λινελαϊκό, σε C6 και C5 πτητικές ενώσεις οι οποίες συμβάλλουν στο «πράσινο» άρωμα και συσσωρεύονται καθώς προχωρεί η διαδικασία της μάλαξης (Angerosa et al., 2001). Αύξηση παρατηρείται κυρίως στις αλκοόλες και στις καρβονυλικές ενώσεις, όπως η (E)-2-εξενάλη και η εξανάλη, ενώ οι εστέρες και κυρίως ο (Z)-3-οξικός εξενυλεστέρας μειώνονται με την αύξηση του χρόνου μάλαξης (Angerosa et al., 2001).

Όσον αφορά τη θερμοκρασία μάλαξης, έχει ήδη αναφερθεί ότι θερμοκρασίες υψηλότερες από 25 °C μειώνουν τη δραστηριότητα των δύο βασικών ενζύμων που εμπλέκονται στην οδό της LOX, δηλαδή της ίδιας της LOX και της HPL (Salas et al., 1999; Salas & Sánchez, 1999). Η μερική αναστολή των ενζύμων αυτών μειώνει το σχηματισμό των C6 κορεσμένων και ακόρεστων αλδευδών, αλκοολών και εστέρων που είναι υπεύθυνες για τις «πράσινες», «φρουτώδεις» και «λουλουδάτες» νότες (Angerosa et al., 2001).

5.4 Μεταβολές της σύστασης του πτητικού κλάσματος κατά την αποθήκευση

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η οξείδωση των τριγλυκεριδίων και των παραγώγων τους προκαλεί αλλαγές οι οποίες μεταβάλλουν το άρωμα και τη γεύση του ελαιολάδου και μειώνουν την υψηλή διατροφική του αξία (Morales et al., 1997; Velasco & Dobarganes, 2002). Οι πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το ευχάριστο άρωμα μειώνονται και ταυτόχρονα αναδεικνύονται ανεπιθύμητες ενώσεις.

Οι πιο σημαντικοί εξωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την οξείδωση του ελαιολάδου είναι η θερμοκρασία, το φως και η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Σε υψηλές θερμοκρασίες, υπάρχει μια αύξηση στο ρυθμό της οξείδωσης αλλά ταυτόχρονα και μείωση της διαλυτότητας του οξυγόνου στο ελαιολάδο. Σε χαμηλές ή μέτριες θερμοκρασίες, ο ρυθμός της οξείδωσης είναι αργός. Τα υδροϋπεροξειδία είναι οι κυριότερες ενώσεις που σχηματίζονται και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται μέχρι τα

προχωρημένα στάδια της οξείδωσης, όπου αποσυντίθενται σε πτητικές ενώσεις, κυρίως καρβονυλικές, οι οποίες μπορεί να μεταβάλουν το άρωμα του ελαιόλαδου (Velasco & Dobarganes, 2002).

Η υψηλή συγκέντρωση οξυγόνου κατά την αποθήκευση του ελαιόλαδου, λόγω μεγάλης εκτεθειμένης επιφάνειας στον αέρα ή λόγω συχνού ανοίγματος των δοχείων, οδηγεί σε σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων με μεγαλύτερο ρυθμό από τον ρυθμό αποσύνθεσής τους κάτι που οδηγεί στην παραγωγή καρβοξυλικών οξέων (Velasco & Dobarganes, 2002). Από τα παραπάνω, μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι οι κετόνες και οι αλδεΐδες κυριαρχούν στα ελαιόλαδα που αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα καρβοξυλικά οξέα κυριαρχούν στα ελαιόλαδα που αποθηκεύονται σε περιβάλλον πλούσιο σε οξυγόνο, ενώ τα πολυμερή παράγονται σε υψηλές θερμοκρασίες.

Τα αποθηκευμένα ελαιόλαδα χαρακτηρίζονται από χαμηλές συγκεντρώσεις στις C6 ενώσεις της οδού της LOX και από παρουσία πολλών C7-C12 κορεσμένων και ακόρεστων αλδεϋδών οι οποίες συνεισφέρουν στη ταγγή οσμή (Angerosa, 2002). Το ταγγό είναι το κυριότερο μειονέκτημα που αναπτύσσεται κατά την αποθήκευση του ελαιόλαδου και εκτός από τις προαναφερθείσες αλδεΐδες, οι C6- C9 διενάλες και τα καρβοξυλικά οξέα συνεισφέρουν επίσης στην αντίληψη αυτού (πίνακας 5.2). Οι ακόρεστες αλδεΐδες 2-οκτενάλη, 2-επτενάλη και 2-δεκενάλη θεωρούνται οι περισσότερο υπεύθυνες για το ελάττωμα του ταγγού λόγω του πολύ χαμηλού κατωφλιού οσμής (Morales et al., 2005). Άλλες πτητικές ενώσεις που ανιχνεύονται στα πιο προχωρημένα στάδια της οξείδωσης είναι το 2-πεντυλ-φουράνιο (Vichi et al., 2003b).

Πίνακας 5.2: Οι κύριες πτητικές ενώσεις που απαντώνται σε δείγμα που χαρακτηρίζεται ως «ταγγό» (Morales et al., 2005) .

A/A	Πτητική ένωση	Συγκέντρωση (mg/kg)	Κατώφλι οσμής (mg/kg)	Ιδιότητα
1	Οκτάνιο	3,83	0,94	Γλυκό, αλκάνιο
2	Πεντανάλη	2,63	0,24	Ξύλο, πικρό, ελαιώδες
3	Εξανάλη	33,8	0,32	Λιπαρό, έντονο, πράσινο
4	Επτανάλη	3,76	0,50	Λιπαρό, ξύλο
5	2-Εξενάλη, (E)-	0,85	0,42	Πικρό αμύγδαλο, πράσινο
6	2-Επτενάλη, (E)-	1,18	0,005	Οξειδωμένο, ζωικό λίπος, πικάντικο
7	Οκτανάλη	8,44	0,32	Λιπαρό, οξύ
8	6-Μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	2,54	1,00	Ελαιώδες, πικάντικο
9	Εννεανάλη	7,12	0,15	Λιπαρό, κεριό, πικάντικο
10	2-Οκτενάλη, (E)-	1,10	0,004	Βότανα, πικάντικο
11	Οξικό οξύ	3,20	0,50	Πικάντικο, ξινό
12	2,4-Επταδιενάλη	0,68	3,62	Λιπαρό, ταγγό
13	Δεκανάλη	0,58	0,65	Διαπεραστικό, γλυκό, κεριό
14	2-Δεκενάλη, (E)-	1,54	0,01	Βαφή, ψάρι, λιπαρό
15	Εννεανόλη	0,76	0,28	Λιπαρό
16	Βουτανικό οξύ	1,86	0,14	Ταγγό
17	2,4-Νοναδιενάλη	1,17	2,50	Σαπούνι, διαπεραστικό
18	2,4-Δεκαδιενάλη	1,72	2,15	Έντονο, λιπαρό
19	Εξανικό οξύ	6,47	0,70	Ταγγό, πικάντικο
20	Επτανικό οξύ	0,22	0,10	Ταγγό

Από διάφορους ερευνητές έχει γίνει προσπάθεια ώστε να προταθούν ενώσεις ως δείκτες της οξείδωσης/παλαιότητας του ελαιολάδου, ωστόσο δεν υπάρχει πάντα ταύτιση και αυτό οφείλεται στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες που περιλαμβάνουν αυτοοξείδωση, επιταχυνόμενη οξείδωση, φωτοοξείδωση κλπ.

Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης έχει παρατηρηθεί αύξηση του ρυθμού σχηματισμού των πτητικών ενώσεων εννεανάλη, εξανάλη και οκτάνιο, αλλά και σε μικρότερο βαθμό των 2-πεντυλ-φουράνιο, (E)-2-προπενάλη και 2,4-επταδιενάλη. Όλες αυτές οι ενώσεις μπορούν να θεωρηθούν ως δείκτες της οξείδωσης εκτός από την εξανάλη (Vichi et al., 2003b). Η συγκέντρωση της εξανάλης δεν διακρίνει οξειδωμένα από τα παρθένα ελαιόλαδα καθώς αυτή η ένωση προέρχεται τόσο από χημικές όσο και από ενζυματικές πορείες οξείδωσης (Morales et al., 1997; Vichi et al., 2003b). Άλλοι προτεινόμενοι δείκτες οξείδωσης είναι οι C6 αλκοόλες και C5 κετόνες (Cavalli et al., 2004) καθώς και

η αναλογία εξανάλη/εννεανάλη (Morales et al., 1997). Όταν η διάρκεια διατήρησης του παρθένου είναι πολύ μεγάλη και γίνεται σε φιάλες ή, κυρίως σε λευκοσιδηρά δοχεία, όπου το λάδι είναι ερμητικά κλειστό, είναι δυνατόν να αναδειχθεί μια δυσάρεστη οσμή που θυμίζει αγγούρι και η οποία έχει αποδοθεί στην ένωση 2,6-εννεαδιενάλη (IOC, 2013b).

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι είναι δυνατή η ανίχνευση της οξειδωσης του ελαιολάδου πριν αυτή γίνει αντιληπτή από τις άλλες παραμέτρους και αυτό τονίζει τη σημασία του οργανοληπτικού ελέγχου στην ανίχνευση του αρχικού σταδίου της οξειδωσης (Vichi et al., 2003b).

5.5 Αναλυτικός προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου

5.5.1 Παραλαβή των πτητικών ενώσεων από το δείγμα

Οι τεχνικές παραλαβής των πτητικών συστατικών από το δείγμα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν περιλαμβάνουν στάδιο εμπλουτισμού ή όχι (Morales & Tsimidou, 2000). Στις τεχνικές που δεν περιλαμβάνουν στάδιο εμπλουτισμού, ανήκουν η τεχνική της απ' ευθείας έγχυσης του δείγματος (Direct injection, DI) και η τεχνική της κατανομής στην υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος ή Static Headspace (SHS). Στις δυο αυτές τεχνικές το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι ότι δεν επιτρέπουν την ανίχνευση ενώσεων που βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (Morales & Tsimidou, 2000). Στις τεχνικές που περιλαμβάνουν στάδιο εμπλουτισμού ανήκουν οι τεχνικές απόσταξης και παράλληλης εκχύλισης του αποστάγματος (SDE), θερμικής εκρόφησης μετά από εκδίωξη με διαβίβαση αδρανούς αερίου και προσρόφηση σε ειδικό πολυμερικό υλικό (DHS), μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME), εκχύλισης με ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση (SCE) και εκχύλισης με διαλύτη (Headspace sorptive extraction-HSSE). Οι πιο συνήθεις μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου περιλαμβάνουν τεχνικές με ένα στάδιο εμπλουτισμού.

Η τεχνική της θερμικής εκρόφησης μετά από εκδίωξη με διαβίβαση αδρανούς αερίου και προσρόφηση σε ειδικό πολυμερικό υλικό (dynamic headspace-DHS) είναι αυτή που εφαρμόζεται συχνότερα. Κατά την εφαρμογή αυτής της τεχνικής, τα πτητικά συστατικά εκδιώκονται από το δείγμα με διαβίβαση αδρανούς αερίου (άζωτο ή ήλιο).

Το αέριο μαζί με τα πτητικά συστατικά διέρχεται από μια διάταξη εφοδιασμένη με κατάλληλο προσροφητικό υλικό (παγίδα), όπως Tenax, ενεργό άνθρακα, κ.τ.λ, στην οποία προσροφούνται τα πτητικά συστατικά. Η παγίδα εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο και οι ουσίες εκροφούνται θερμικά. Στα πλεονεκτήματά της τεχνικής συμπεριλαμβάνεται ο προσδιορισμός πτητικών συστατικών που βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωσή στο εξεταζόμενο δείγμα, γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί κάποιες από αυτές τις ενώσεις μπορεί να έχουν πολύ χαμηλό κατώφλι αναγνώρισης της οσμής με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν σημαντικά στο άρωμα (Morales, Aparicio, & Rios, 1994; Morales & Tsimidou, 2000). Στη τεχνική αυτή, η θερμοκρασία, το μέγεθος του δείγματος, η ποσότητα του αερίου που χρησιμοποιείται για την εκδίωξη, η γεωμετρία της παγίδας και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων που πρόκειται να αναλυθούν αποτελούν πολύ σημαντικούς παράγοντες που επιδρούν στο αποτέλεσμα (Angerosa et al., 2001; Morales et al., 1994; Werkhoff & Bretschneider, 1987).

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου είναι το Tenax (Aparicio et al., 1996; Morales et al., 1995; Morales et al., 1996) και ο άνθρακας (Angerosa et al., 2001; Olias et al., 1993). Το Tenax έχει πολύ καλή προσροφητική ικανότητα σε ενώσεις μεσαίου και υψηλού σημείου ζέσεως, είναι θερμικά σταθερό, έχει πολύ μικρή χημική συγγένεια με το νερό και είναι εύκολο στο καθάρισμα. Από την άλλη ο άνθρακας αν και έχει καλή συγγένεια με το νερό, χρησιμοποιείται με επιτυχία στον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου λόγω της χαμηλής υγρασίας του υποστρώματος και σε αντίθεση με το Tenax έχει πολύ καλή προσροφητική ικανότητα με όλες τις χημικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων και αυτών με μικρό μοριακό βάρος (Angerosa, 2000; Michel & Buszewski, 2009; Morales & Tsimidou, 2000).

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αποτελεί μια πολύ απλή και αρκετά αποτελεσματική τεχνική παραλαβής των πτητικών συστατικών από τα τρόφιμα. Για την εκχύλιση των πτητικών συστατικών του δείγματος χρησιμοποιείται μια ίνα κατασκευασμένη από διοξείδιο του πυριτίου η οποία έχει καλυφθεί με ένα ειδικό πολυμερικό υλικό που αποτελεί τη στατική φάση. Τα πτητικά συστατικά του δείγματος ή της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος αλληλεπιδρούν με το πολυμερικό υλικό και συγκρατούνται με προσρόφηση στην ίνα. Η μέθοδος είναι γρήγορη,

οικονομική και δεν απαιτεί τη χρήση διαλυτών. Παράμετροι όπως ο τρόπος ανάδευσης του δείγματος, η θερμοκρασία της δειγματοληψίας, η τιμή του pH του δείγματος και ο όγκος του δείγματος, καθώς και οι συνθήκες προσρόφησης και εκρόφησης των πτητικών συστατικών παίζουν σημαντικό ρόλο και πρέπει να διατηρούνται σταθερές προκειμένου να εξασφαλισθεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων (Vas & Vékely, 2004).

Η τεχνική SPME έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές στη διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος δειγμάτων παρθένου ελαιολάδου (Baccouri et al., 2007; Cavalli et al., 2004; Cecchi & Alfei, 2013; Jeleń, Obuchowska, Zawirska-Wojtasiak, & Wąsowicz, 2000; Kanavouras et al., 2005b; Kandyliis et al., 2011; Vichi et al., 2005). Στο εμπόριο είναι διαθέσιμες διάφορες SPME ίνες, που διαφοροποιούνται ως προς το πολυμερικό υλικό που φέρουν και ως προς το πάχος του υμενίου του υλικού αυτού. Οι ίνες που χρησιμοποιούνται είναι οι: 65μm Carbowax / divinylbenzene (CW/DVB) (Jeleń et al., 2000; Vichi, Guadayol, Caixach, López-Tamames, & Buxaderas, 2006; Vichi et al., 2008) 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS) (Jeleń et al., 2000; Temime et al., 2006; Tura, Prenzler, Bedgood Jr, Antolovich, & Robards, 2004; Vichi et al., 2003a), 85μm polyacrylate (PA) (Jeleń et al., 2000), 75μm Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Vichi et al., 2003a), 65μm polydimethylsiloxane /divinylbenzene (PDMS/DVB) (Vichi et al., 2003a) και 50/30 μm divinylbenzene /Carboxen /polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Cecchi & Alfei, 2013; Jeleń et al., 2000; Kandyliis et al., 2011; Koprivnjak et al., 2000; Pouliarekou et al., 2011; Vichi et al., 2003a; Vichi et al., 2003b; Vichi et al., 2008). Ωστόσο, η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη δειγματοληψία των πτητικών ενώσεων των παρθένων ελαιολάδων επιτυγχάνεται με τη χρήση DVB/CAR/PDMS ίνας (Cavalli, Fernandez, Lizzani-Cuvelier, & Loiseau, 2003; Jeleń et al., 2000; Vichi et al., 2003a).

5.5.2 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας (GC- MS)

Η τεχνική GC-MS θεωρείται ότι είναι μια από τις καταλληλότερες ενόργανες αναλυτικές τεχνικές για τη διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος των τροφίμων. Η αέρια χρωματογραφία διακρίνεται για την εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα της και τη υψηλή ευαισθησία, ενώ με τη χρήση ενός φασματομέτρου μαζών είναι δυνατή η λήψη πολλών πληροφοριών για την δομή, που επιτρέπουν μια πιο αξιόπιστη ταυτοποίησή κάθε διαχωριζόμενου συστατικού. Έτσι η τεχνική GC-MS

λόγω της εκλεκτικότητας, της υψηλής ευαισθησίας και της ταχύτητας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου (Escuderos, 2011). Τα πτητικά συστατικά μετά την εκρόφησή τους από την ίνα, διαχωρίζονται σε τριχοειδή στήλη. Τα διαχωρισθέντα συστατικά μεταφέρονται από τον αέριο χρωματογράφο στο φασματόμετρο μάζας, με τη βοήθεια ενός φέροντος αερίου (συνήθως ήλιο), μέσω μια γραμμής μεταφοράς, η οποία είναι θερμαινόμενη και τα διατηρεί στην αέρια φάση. Στο φασματόμετρο μαζών, κάθε συστατικό ιονίζεται, κυρίως με πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων ορισμένης ενέργειας. Τα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μάζας, όπου και διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο ή m/z .

Η ταυτοποίηση των πτητικών ενώσεων γίνεται με τρεις τρόπους: (α) με χρήση πρότυπων ενώσεων, συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και τα θραύσματα, (β) με υπολογισμό του δείκτη κατακράτησης, γνωστού και ως Kovats Index ή Retention Index (KI ή RI) ο οποίος συσχετίζει τον χρόνο κατακράτησης του αναλύτη με τους χρόνους κατακράτησης μιας ομόλογης σειράς κανονικών αλκανίων και (γ) με χρήση έτοιμων βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών (πχ Wiley ή Nist).

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση ενός εσωτερικού προτύπου, με αυτόν τον τρόπο υποθέτεται ότι όλες οι αποκρίσεις για όλες τις ενώσεις είναι ίσες με ένα. Ωστόσο επειδή αυτό δεν ισχύει στη πράξη, ο προσδιορισμός χαρακτηρίζεται ημιποσοτικός. Έχει βρεθεί ότι η ανάκτηση των πτητικών ενώσεων που παγιδεύονται μέσω DHS, αλλά και μέσω SPME από ποσοτικής άποψης, είναι διαφορετική και σχετίζεται με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και το είδος και τη θέση της χαρακτηριστικής ομάδας (Angerosa, Di Giacinto, & d'Alessandro, 1997). Επιπλέον, προβλήματα προκύπτουν όταν η SPME πρέπει να εφαρμοστεί σε έρευνες που διαρκούν για μεγάλο χρονικό διάστημα και όπου πρέπει να εξασφαλιστεί ότι η ίνα θα διατηρήσει μία σταθερή απόκριση ή δεν θα χαλάσει. Έχει βρεθεί ότι στις πολυστρωματικές ίνες τέτοιου είδους προβλήματα είναι πολύ πιθανό να προκύψουν δεδομένου ότι οι διάφορες επικαλύψεις μπορεί να αποτύχουν στην ανάκτηση. Πιο συγκεκριμένα για την DVB-CAR-PDMS έχει βρεθεί μείωση στην ευαισθησία με αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας στις αλκοόλες και στα αλκάνια (Kalua, Bedgood Jr, & Prenzler, 2006b).

Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα, που σχετίζονται με τη συμπεριφορά της κάθε πτητικής ένωσης και με τις απώλειες κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του δείγματος,

ώστε να γίνει ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός τους, θα πρέπει να κατασκευαστούν μία σειρά από πρότυπες καμπύλες. Η βαθμονόμηση μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους: με τη χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων μιας ένωσης παρόμοιων χαρακτηριστικών με αυτές του δείγματος, με χρήση μίγματος ενώσεων μιας ομόλογης σειράς (π.χ., αλδεΐδες, αλκοόλες κλπ) ή με χρήση μίγματος ενώσεων διαφόρων ομόλογων σειρών η οποία και προτιμάται (Kalua et al., 2006b). Τέλος, για τη λύση των προβλημάτων, που προκύπτουν λόγω ανάκτησης καθώς και της χρωματογραφικής συμπεριφοράς, έχει προταθεί και η τεχνική προσθήκης σταθερών ισοτόπων των αναλυόμενων ενώσεων (Guth & Grosch, 1991).

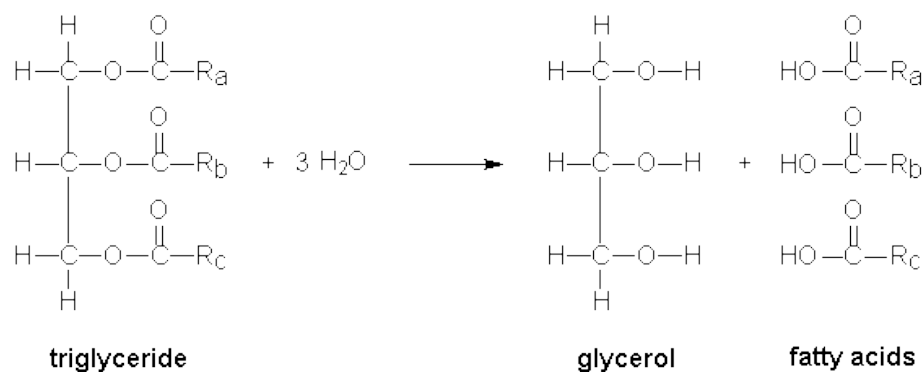
Κεφάλαιο 6

Αλλοιώσεις του ελαιολάδου

Η τελική σύσταση ενός ελαιολάδου είναι αποτέλεσμα ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων που επηρεάζουν όλα τα στάδια από τον σχηματισμό της ελιάς στο δέντρο μέχρι και την κατανάλωσή του. Οι κυριότερες αλλοιώσεις που υφίσταται το ελαιόλαδο είναι η υδρόλυση και η οξείδωση. Η υδρόλυση (ή λιπόλυση) λαμβάνει χώρα κυρίως κατά το χρόνο πριν από την παραλαβή του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, ενώ η οξείδωση παρατηρείται κυρίως κατά την παραλαβή του και ιδιαίτερα κατά την διάρκεια της αποθήκευσης όταν αυτή γίνεται σε ακατάλληλες συνθήκες. Η οξείδωση του ελαιολάδου συμβαίνει τόσο απουσία φωτός, οπότε έχουμε τη λεγόμενη αυτοοξείδωση, όσο και παρουσία φωτός, με τη συμμετοχή χρωστικών ουσιών, οπότε έχουμε τη λεγόμενη φωτοοξείδωση (Κυριτσάκης, 2007). Η οξείδωση έχει αρνητική επίδραση τόσο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όσο και στη διατροφική αξία του ελαιολάδου (Velasco & Dobarganes, 2002).

6.1 Υδρόλυση

Η υδρόλυση (**σχήμα 6.1**) είναι μία από τις βασικότερες αλλοιώσεις του ελαιολάδου, οφείλεται στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων από τα τριγλυκερίδια και πραγματοποιείται στα φρέσκα ελαιόλαδα που είναι ακόμη θολά. Η αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα (συγκεκριμένα τη λιπάση) που υπάρχουν στο νερό που δεν έχει απομακρυνθεί, ενώ η απελευθέρωση λιπαρών οξέων οδηγεί στη αύξηση της οξύτητας και αλλαγή της γεύσης, μειονεκτήματα τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας και της εμπορικής του αξίας. Η υδρόλυση του ελαιολάδου επηρεάζεται επίσης από την θερμοκρασία και ευνοείται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 18-20 °C. Η αντίδραση περιλαμβάνει την υδρόλυση των εστερικών δεσμών του τριγλυκεριδίου, δίνοντας γλυκερίνη και μείγμα λιπαρών οξέων. Η υδρόλυση διακρίνεται σε μικροβιακή λιπόλυση και ενζυμική λιπόλυση (Κυριτσάκης, 2007).



Σχήμα 6.1: Αντίδραση υδρόλυσης τριγλυκεριδίων. R_a , R_b , και R_c : αλκυλομάδες διαφορετικών οξέων.

Η μικροβιακή λιπόλυση των γλυκεριδίων συντελείται με την δράση των μικροοργανισμών, οι οποίοι αναπτύσσονται στη σάρκα της ελιάς. Από τους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στη σάρκα της ελιάς το 70% περίπου παρουσιάζει λιπολυτική δράση. Η δράση ορισμένων από αυτούς τους μικροοργανισμούς είναι τόσο μεγάλη, ώστε ο χρόνος που μεσολαβεί από το σπάσιμο του ελαιοκάρπου μέχρι το διαχωρισμό του λαδιού από τα φυτικά υγρά, είναι αρκετός για την έναρξη της υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων. Η ακατάλληλη αποθήκευση του ελαιοκάρπου πριν από την άλεση και η μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία, μπορεί να προκαλέσει σημαντική υδρολυτική αλλοίωση (Κυριτσάκης, 2007).

Η ενζυμική λιπόλυση προκαλείται τόσο από τα φυσικά ένζυμα (λιπάσες) του ελαιοκάρπου, όσο και από αυτά που ελευθερώνονται από τα διάφορα είδη μικροοργανισμών, οι οποίοι αναπτύσσονται κατά την αποθήκευση του καρπού σε ακατάλληλες συνθήκες. Η δράση των φυσικών ενζύμων στον άγουρο ελαιοκάρπο, είναι ασήμαντη και η οξύτητα του περιεχόμενου ελαιολάδου είναι πολύ μικρή. Αντίθετα στον ώριμο ελαιοκάρπο η δραστηριότητα των ενζύμων είναι σημαντική και η οξύτητα του λαδιού σχετικά μεγάλη. Σε τραυματισμένο καρπό η δράση των μικροοργανισμών και κατά συνέπεια η μικροβιακή λιπόλυση, είναι εντονότερη σε σχέση με τον υγιή (Κυριτσάκης, 2007).

6.2 Οξείδωση

Το ελαιόλαδο θεωρείται ανθεκτικό στην οξείδωση λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αλλά και της παρουσίας φυσικών αντιοξειδωτικών όπως η α -τοκοφερόλη και οι φαινολικές ενώσεις (Aparicio, Roda, Albi, & Gutiérrez, 1999). Ωστόσο, η παρουσία μικρής ποσότητας λινελαϊκού και λινολενικού οξέος καθιστά το

ελαιόλαδο επιρρεπές στην οξείδωση. Η οξείδωση, συμβαίνει όταν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έρθουν σε επαφή με το οξυγόνο, το οποίο αντιδρά είτε σε άτομο άνθρακα διπλού δεσμού, είτε στη μεθυλενική ομάδα σε α- θέση ως προς τον διπλό δεσμό. Η οξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων με δυσάρεστη οσμή και γεύση, τα οποία υποβαθμίζουν την ποιότητα των λιπαρών υλών, ενώ σε προχωρημένο βαθμό οξείδωσης και σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να θεωρηθούν τοξικά (Matthäus, 2010; Sanders, 1983). Επίσης, επιφέρει μεταβολές στις φυσικές ιδιότητες όπως είναι το ιξώδες (Κυριτσάκης, 2007). Η οξειδωτική αποδόμηση μπορεί να συμβεί τόσο με ενζυματικές όσο και με χημικές πορείες. Κατά την οξείδωση, σχηματίζονται υπεροξειδία (πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης), τα οποία υπόκεινται σε περαιτέρω οξείδωση ή αποδόμηση, προς αλδεΐδες, κετόνες, οξέα και αλκοόλες (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης). Αυτά τα προϊόντα είναι υπεύθυνα για τις αρνητικές μεταβολές στη γεύση, στο άρωμα, στη θρεπτική αξία και τελικά στη συνολική ποιότητα του ελαιολάδου (Matthäus, 2010; Vercellotti, Angelo, & Spanier, 1992; Κυριτσάκης, 2007).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ελαιολάδο, αν και είναι ανθεκτικό στην οξείδωση (αυτοοξείδωση), εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τις παρουσίας φυσικών αντιοξειδωτικών, δεν παύει να παρουσιάζει ευαισθησία στην φωτοοξείδωση (Κυριτσάκης, 2007).

Οι παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση εκείνων των συστατικών που σχετίζονται με τη σταθερότητα στην οξείδωση μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής (Velasco & Dobarganes, 2002):

1. Παράγοντες που δρουν πριν την εξαγωγή του ελαιολάδου, όπως η ποικιλία, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, οι αγρονομικές πρακτικές, η ηλικία του δέντρου, το στάδιο ωριμότητας και η υγεία του καρπού κ.α.
2. Παράγοντες που δρουν κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του ελαιολάδου, όπως οι συνθήκες της μάλαξης, το σύστημα φυγοκέντρισης, το φιλτράρισμα κλπ.
3. Παράγοντες που δρουν μετά την εξαγωγή του ελαιολάδου και κυρίως αφορούν τις συνθήκες αποθήκευσης και διακίνησης (φως, οξυγόνο, θερμοκρασία, υλικό συσκευασίας κλπ). Σε αυτούς του παράγοντες προστίθενται και οι οικιακές θερμικές επεξεργασίες (ψήσιμο, τηγάνισμα, βράσιμο) οι οποίες συμβάλλουν στη θερμική αποδόμηση.

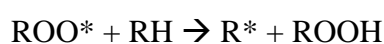
6.2.1 Ενζυματική οξείδωση

Η ενζυματική οξείδωση οφείλεται στην δράση των λιποξειδασών, ενζύμων που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο. Οι αντιδράσεις ξεκινούν με την υδρόλυση των ακυλογλυκερολών από τις λιπάσες, τις λιπολυτικές ακυλο-υδρολάσες και τις φωσφολιπάσες και την απελευθέρωση ελεύθερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια ειδικές λιποξυγενάσες μετατρέπουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα σε 9 και 13 υπεροξειδία, τα οποία έχουν μικρή σταθερότητα. Στο τελευταίο στάδιο της αλληλουχίας των αντιδράσεων, οι λυάσες, οι ισομεράσες και οι αφυδρογονάσες αποδομούν τα υδροϋπεροξειδία σε ένα πλήθος πτητικών και μη πτητικών προϊόντων. Οι πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται μέσω αυτής της διαδικασίας είναι υπεύθυνες για δυσάρεστες οσμές. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι ίδιες ενζυματικές διαδικασίες στις ελιές, είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό εκείνων των πτητικών ενώσεων στις οποίες αποδίδεται το ιδιαίτερο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Aparicio & Morales, 1998; Morales et al., 1996). Για να πραγματοποιηθεί ενζυματική οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, είναι απαραίτητη η παρουσία οξυγόνου (Siedow, 1991). Όταν το ελαιόλαδο διαχωρίζεται από τα απόνερα στο ελαιοτριβείο, αυτά τα ένζυμα απομακρύνονται με τα απόνερα, οπότε οι αντιδράσεις ενζυματικής οξείδωσης σταματούν.

6.2.2 Αυτοοξείδωση

Ο μηχανισμός της οξείδωσης διαδίδεται αυτοκαταλυτικά με το οξυγόνο να προσβάλει τη μεθυλενική ομάδα σε θέση α- ως προς το διπλό δεσμό. Με βάση τα σχηματιζόμενα υπεροξειδία έχει βρεθεί ότι η σχετική αναλογία της οξείδωσης για τα οξέα ελαϊκό:λινελαϊκό:λινολενικό είναι 1:12:25 και σχετίζεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών (Frankel, 1983). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία στάδια, την εισαγωγή, τη διάδοση και τον τερματισμό (Ingold, 1969).

Οι αντιδράσεις της αυτοοξείδωσης μπορούν να περιγραφούν ως εξής:



Τερματισμός: $R^* + R^* \rightarrow RR$

$R^* + ROO^* \rightarrow ROOR$

$ROO^* + ROO^* \rightarrow ROOR + O_2$

όπου, RH:μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος, R^* ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέος, ROO^* : ρίζα υπεροξειδίου, ROOR και RR: αδρανή προϊόντα.

Εισαγωγή (Initiation). Σαν στάδιο εισαγωγής ή έναρξης ορίζεται η χρονική περίοδος πριν την εμφάνιση της ανεπιθύμητης οσμής και γεύσης, όπου η κατανάλωση ατμοσφαιρικού οξυγόνου είναι σχετικά μικρή. Η οξείδωση αρχίζει με την απόσπαση ενός υδρογόνου από ένα μόριο ακόρεστου λιπαρού οξέος (RH), οπότε σχηματίζεται μία ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέος (R^*). Η θερμοκρασία, το φως, άλλες ελεύθερες ρίζες και κάποια βαριά μέταλλα παίζουν το ρόλο των εκκινητών.

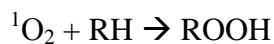
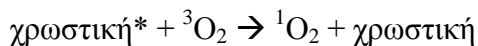
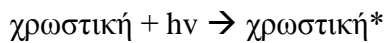
Διάδοση (Propagation). Στο στάδιο αυτό, η αντίδραση προχωράει με μεγαλύτερο ρυθμό, ενώ οργανοληπτικά το δείγμα αρχίζει να αποκτά την γεύση ταγγισμένου προϊόντος. Η σχηματιζόμενη ρίζα από το στάδιο έναρξης, αντιδρά με ένα μόριο οξυγόνου και δημιουργείται μία ρίζα υπεροξειδίου (ROO^*). Στη συνέχεια η ρίζα του υπεροξειδίου αντιδρά με άλλο μόριο λιπαρού οξέος (RH) το οποίο δεν είχε οξειδωθεί μέχρι εκείνη τη στιγμή. Έτσι δημιουργούνται υπεροξειδία και νέες ελεύθερες ρίζες. Τα υπεροξειδία είναι ασταθείς ενώσεις, διασπώνται εύκολα και έτσι παρέχουν ελεύθερες ρίζες για την δημιουργία νέων αλυσιδωτών αντιδράσεων. Από την διάσπαση των υπεροξειδίων, τα οποία δεν είναι σταθερά, παράγονται ένα πλήθος πτητικών οργανικών ενώσεων (δευτερογενή προϊόντα) με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την δυσάρεστη γεύση και οσμή που παρουσιάζουν οι οξειδωμένες λιπαρές ύλες. Επομένως τα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά των ταγγισμένων ελαιολάδων οφείλονται στα δευτερογενή προϊόντα και όχι στα υπεροξειδία τα οποία είναι μεγαλομοριακές ενώσεις και είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευτούν από τα αισθητήρια όργανα του ανθρώπου.

Τερματισμός (Termination). Στο στάδιο του τερματισμού οι δύο ρίζες των λιπαρών οξέων αντιδρούν μεταξύ τους, τα προϊόντα που σχηματίζονται είναι αδρανή και έτσι τερματίζεται η διάδοση. Οποιαδήποτε αντίδραση εμποδίζει το στάδιο της διάδοσης ή απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες από το σύστημα παίζει βασικό ρόλο στον τερματισμό.

Τα αντιοξειδωτικά, όπως οι τοκοφερόλες και οι φαινολικές ενώσεις, παίζουν αυτό το ρόλο, αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες των λιπαρών οξέων και σχηματίζοντας μη δραστικές ρίζες (Simic, Slobodan, & Etsuo, 1992).

6.2.3 Φωτοξείδωση

Οι περισσότερες λιπαρές ύλες περιέχουν κάποιες φυσικές φωτοευαισθητοποιές ενώσεις οι οποίες ενεργοποιούνται κατά την έκθεση στο φως (Carlsson, Suprunchuk, & Wiles, 1976). Στο ελαιόλαδο, χρωστικές ενώσεις όπως είναι η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη, παίζουν το ρόλο των ευαισθητοποιών ουσιών (Bradley & Min, 1992). Η έκθεση της λιπαρής ύλης στο φως, μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων εφόσον υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο και φωτοευαισθητοποιές ενώσεις. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την φωτοξείδωση του ελαιολάδου φαίνονται παρακάτω (Foote, 1968):



όπου, $h\nu$: ηλιακή ενέργεια, χρωστική^* : ενεργοποιημένη χρωστική, ${}^3\text{O}_2$: οξυγόνο τριπλής κατάστασης, ${}^1\text{O}_2$: ενεργοποιημένο οξυγόνο απλής κατάστασης, RH : λιπαρό οξύ και ROOH : υπεροξείδιο.

Ο μηχανισμός της φωτοξείδωσης συνδέεται με το σχηματισμό της απλής διεγερμένης μορφής οξυγόνου (singlet). (Rawls & Van Santen, 1970) Για να αρχίσει η φωτοξείδωση θα πρέπει οι χρωστικές, που περιέχει η λιπαρή ύλη, να έλθουν σε επαφή με φως. Η επαφή αυτή έχει σαν συνέπεια την απορρόφηση ενέργειας και στην συνέχεια απόδοση αυτής της ενέργειας στο οξυγόνο, που υπάρχει στον ελεύθερο χώρο των δοχείων συσκευασίας είτε διαλυμένο μέσα στο λάδι. Η ενέργεια που απορροφάται οδηγεί στο σχηματισμό της απλής διεγερμένης μορφής οξυγόνου. Έπειτα το οξυγόνο αντιδρά απευθείας με το λιπίδιο και σχηματίζονται τα υπεροξείδια. Η ενεργοποιημένη μορφή οξυγόνου αντιδρά με το λινελαϊκό οξύ περίπου 1500 φορές γρηγορότερα σε σχέση με το κανονικό οξυγόνο (Rawls & Van Santen, 1970). Τα υδροϋπεροξείδια που σχηματίζονται από το ενεργοποιημένο οξυγόνο αποσυντίθενται γρήγορα προς σχηματισμό αλκοξυ- και υπεροξυ- ριζών τα οποία με τη σειρά τους επιταχύνουν την

οξειδωση. Η χρωστική, αφού αποδώσει την ενέργεια στο οξυγόνο, επανέρχεται στην αρχική της μορφή. Κατά την φωτοοξείδωση επέρχεται πλήρης καταστροφή της χλωροφύλλης που υπάρχει στο ελαιόλαδο. Σε δείγματα αποθηκευμένα στο σκοτάδι, η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη δρουν περισσότερο ως αντιοξειδωτικά παρά ως καταλύτες της οξειδωσης (Endo, Usuki, & Kaneda, 1985).

Η οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω της ενεργοποιημένης μορφής οξυγόνου μπορεί να ανασταλεί όταν υπάρχουν ενώσεις που αντιδρούν πιο γρήγορα με τον εκκινητή ή από καταστολείς (quenchers) που απενεργοποιούν την ενεργοποιημένη μορφή του οξυγόνου. Στα ελαιόλαδα μεταξύ των πιο αποτελεσματικών καταστολέων βρίσκεται η α -τοκοφερόλη και το β -καροτένιο (Bradley & Min, 1992; Psomiadou & Tsimidou, 2002b).

6.3 Παράγοντες που επιδρούν στην οξείδωση

Οι παράγοντες που επιδρούν στην οξείδωση του ελαιολάδου μπορεί να είναι είτε εξωτερικοί, να αφορούν δηλαδή συνθήκες αποθήκευσης, είτε να σχετίζονται με τα επιμέρους συστατικά του.

6.3.1 Εξωτερικοί παράγοντες

Οξυγόνο

Η οξείδωση της λιπαρής ύλης απαιτεί την παρουσία οξυγόνου, το οποίο έρχεται σε επαφή με την διαχωριστική επιφάνεια αέρα-λαδιού ή βρίσκεται διαλυμένο στο εσωτερικό του ελαιολάδου. Η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου εξαρτάται από την επαφή του ελαιολάδου με τον αέρα κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στο εαλιοτριβείο, κατά τις μεταγγίσεις του στις δεξαμενές και κατά τη διάρκεια της συσκευασίας του. Όσο μεγαλύτερη είναι η επαφή, σε χρόνο και επιφάνεια, τόσο πιο εύκολη γίνεται η διαδικασία της οξείδωσης. Η επαφή του οξυγόνου με το ελαιόλαδο είναι δυνατό να αποφευχθεί με την συσκευασία του υπό κενό ή με την παρουσία ενός αδρανούς αερίου όπως άζωτο ή αργό (Κυριτσάκης, 2007).

Θερμοκρασία

Το τάγγισμα, ως χημική αντίδραση υποβοηθείται σε υψηλή θερμοκρασία. Σε χαμηλές ή μέτριες θερμοκρασίες, ο σχηματισμός των προϊόντων οξείδωσης κατά τη διάρκεια της περιόδου επαγωγής πραγματοποιείται με αργό ρυθμό. Η συγκέντρωση των υπεροξειδίων, κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, συνεχώς αυξάνεται αλλά τα

προϊόντα πολυμερισμού σχηματίζονται πολύ αργότερα. Σε υψηλές θερμοκρασίες ο σχηματισμός των προϊόντων οξειδωσης προχωρεί με πολύ πιο γρήγορο ρυθμό. Οι επιπτώσεις της θερμοκρασίας στην οξείδωση του ελαιολάδου είναι ακόμη πιο σημαντικές στην περίπτωση που έχουμε συνδυασμό αυξημένης θερμοκρασίας με παρουσία οξυγόνου (Velasco & Dobarganes, 2002).

Μέταλλα

Η παρουσία μετάλλων ενισχύει την οξείδωση καθώς αυτά αντιδρούν και συμβάλουν στην αποδόμηση των υπεροξειδίων. Στο παρθένο ελαιόλαδο, ίχνη σιδήρου και χαλκού μπορεί να προέρχονται από το έδαφος και τα λιπάσματα ή από την επαφή του με τα μηχανήματα επεξεργασίας και τα δοχεία αποθήκευσης. Άλλα μέταλλα που έχουν ανιχνευτεί στο ελαιόλαδο αλλά σε πολύ μικρότερες ποσότητες είναι το χρώμιο, το μαγγάνιο, ο κασσίτερος, το νικέλιο και ο μόλυβδος (Velasco & Dobarganes, 2002). Ο σίδηρος συναντάται συνήθως σε μεγαλύτερη αναλογία καθώς προέρχεται από τις μεταλλικές επιφάνειες των μηχανημάτων των ελαιοτριβείων με τις οποίες, το ελαιόλαδο έρχεται σε επαφή σε όλες τις φάσεις επεξεργασίας του (Brlkjača, Giljanović, & Prkić, 2013; Κυριτσάκης, 2007).

6.3.2 Παράγοντες που αφορούν τη σύσταση του ελαιολάδου

Λιπαρά οξέα

Η οξειδωτική τάγγιση επιταχύνεται με την παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα ελαιόλαδα με υψηλή οξύτητα έχουν βρεθεί να είναι λιγότερο ανθεκτικά στην οξείδωση (Frega, Mozzon, & Lercker, 1999). Η προοξειδωτική δράση των λιπαρών οξέων αποδίδεται στη καρβοξυλική ομάδα η οποία καταλύει τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια την διάσπαση μέρους των υπεροξειδίων που σχηματίζονται στο αρχικό στάδιο της αυτοοξειδωσης (Miyashita & Takagi, 1986).

Φωσφολιπίδια

Ορισμένα φωσφολιπίδια βρέθηκε να έχουν αντιοξειδωτικές ικανότητες οι οποίες αποδίδονται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν τα μέταλλα και αδρανοποιώντας έτσι την προοξειδωτική τους δράση (Pokorný, 1991). Έχει βρεθεί ότι τα φωσφολιπίδια μπορούν να λειτουργήσουν συνεργιστικά με τις φαινολικές ενώσεις και τις τοκοφερόλες (Hudson & Lewis, 1983).

Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις δρουν ως αντιοξειδωτικά παρεμποδίζοντας έτσι την οξείδωση του ελαιολάδου (Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992). Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ιδιότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, παρέχοντας ένα άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες λιπαρών οξέων που σχηματίζονται στο στάδιο της διάδοσης της αντίδρασης (Shahidi et al., 1992; Velasco & Dobarganes, 2002). Οι υδρόφιλες φαινολικές ενώσεις παρέχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση στο ελαιόλαδο σε σχέση με τις λιπόφιλες (Bendini et al., 2007). Η μεγάλη αντιοξειδωτική δράση των υδρόφιλων φαινολικών ενώσεων οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι ενώσεις εντοπίζονται στην επιφάνεια αέρα-λαδιού και έτσι παρέχουν πιο αποτελεσματική προστασία (Frankel, 1996).

Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι γνωστές για την αποτελεσματική αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων σε όλα τα φυτικά έλαια, αντιδρώντας με την ενεργοποιημένη μορφή του οξυγόνου. Στο ελαιόλαδο, ωστόσο, δρουν συνεργιστικά με τις φαινολικές ενώσεις στα αρχικά στάδια της οξείδωσης και η συνεισφορά τους στη σταθερότητα του ελαιολάδου έχει βρεθεί να είναι μικρότερη από αυτή των φαινολών (Velasco & Dobarganes, 2002).

Χλωροφύλλη

Η χλωροφύλλη και η φαιοφυτίνη, παρουσία φωτός, ασκούν προοξειδωτική δράση δρώντας ως καταλύτες στο σχηματισμό της ενεργοποιημένης μορφής οξυγόνου (Giuliani et al., 2011). Έχει επίσης αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης απουσία φωτός, μερικά παράγωγα χλωροφύλλης παρουσιάζουν μικρή αντιοξειδωτική δράση παρέχοντας υδρογόνο και σταματώντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών (Endo et al., 1985; Gutiérrez-Rosales, Garrido-Fernández, Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, & Mínguez-Mosquera, 1992).

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή ασκούν μεγάλη προστασία των λιπιδίων στη φωτοοξείδωση, δεσμεύοντας το μονήρες οξυγόνο ωστόσο απουσία φωτός μπορεί να δρουν και ως προοξειδωτικοί παράγοντες (Bradley & Min, 1992; Choe & Min, 2009).

Στερόλες

Οι στερόλες, φαίνεται να μην επιδρούν στη διαδικασία της οξείδωσης, κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου σε χαμηλές θερμοκρασίες ή κατά την επιταχυνόμενη οξείδωση, ωστόσο συμβάλουν στη σταθερότητα του ελαιολάδου σε υψηλές θερμοκρασίες, όπου δρουν ως αναστολείς των αντιδράσεων πολυμερισμού (Gordon & Magos, 1983; Velasco & Dobarganes, 2002).

Κεφάλαιο 7

Κριτήρια ποιότητας και ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου

Οι καταναλωτές τα τελευταία χρόνια, λόγω της ενημέρωσης για τα πιθανά οφέλη που προσφέρει η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου στην υγεία, έχουν στραφεί προς το ελαιόλαδο υψηλής ποιότητας. Η απαίτηση ποιότητας από την πλευρά των καταναλωτών είχε ως αποτέλεσμα την εφαρμογή συγκεκριμένων διαδικασιών που καλύπτουν όλη τη ελαιοπαραγωγική διαδικασία, δηλαδή από τη συλλογή και επεξεργασία του ελαιοκάρπου μέχρι την τυποποίηση του ελαιολάδου και τη διανομή του. Το τελικό προϊόν θα πρέπει να συμμορφώνεται με τα επίσημα χαρακτηριστικά που δίνονται στον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαμόρφωση της ποιότητας του ελαιολάδου αρχίζει από τη περίοδο που αυτό σχηματίζεται στον ελαιοκάρπο και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν μεταβολές στη χημική του σύσταση. Επίσης, επισημάνθηκε το γεγονός ότι η παραλαβή του ελαιολάδου είναι μία περίπλοκη διαδικασία και απαιτείται προσοχή σε κάθε στάδιό της, καθώς κάθε ένα από αυτά θα επηρεάσει τη τελική ποιότητα του προϊόντος. Τα σημεία που χρειάζονται προσοχή θα μπορούσαν να παρουσιαστούν συνοπτικά ως εξής (Alonso et al., 1994):

1. Συλλογή του καρπού

- ✓ Οι ελιές πρέπει να είναι υγιείς, να έχουν απομακρυνθεί οι προσμίξεις (χώμα, φύλλα κλπ) και να επεξεργάζονται μέσα 24 ως 48 ώρες μετά τη συλλογή τους.

2. Επεξεργασία του καρπού

- ✓ Το σπάσιμο του καρπού πρέπει να έχει μικρή διάρκεια ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση, η δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών και ο σχηματισμός γαλακτώματος.
- ✓ Η μάλαξη πρέπει να ελέγχεται όσον αφορά τη θερμοκρασία και το χρόνο.
- ✓ Η μέση διάρκεια της μάλαξης πρέπει να είναι στα 60 λεπτά, ωστόσο η διακύμανση που παρατηρείται (30-90 λεπτά) εξαρτάται από τις ρεολογικές ιδιότητες της ελαιοζύμης.

- ✓ Η θερμοκρασία της ελαιοζύμης πρέπει να μην ξεπερνάει τους 30 °C. Θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 35-40 °C έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα.
- ✓ Προτείνεται η χρήση δύο-τριών ή και παραπάνω μαλακτήρων.
- ✓ Κατά τη μάλαξη στο ελαιοτριβείο για την εξαγωγή του ελαιολάδου από τον καρπό, εφόσον το απαιτούν τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του ελαιοπολλτού, επιτρέπεται να προστίθεται μια μικρή ποσότητα ταλκ ώστε να αποφευχθεί η περίσσεια κολλοειδών ενώσεων.

3. Διαχωρισμός των φάσεων με φυγοκέντριση

- ✓ Η συνολική διάρκεια της διαδικασίας πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη.
- ✓ Το νερό που προστίθεται θα πρέπει να είναι πόσιμο, καλής ποιότητας και να βρίσκεται σε μία θερμοκρασία μεταξύ 25 °C και 30 °C.
- ✓ Η θερμοκρασία του ελαιολάδου δεν πρέπει να ξεπερνά τους 30 °C.

4. Αποθήκευση ελαιολάδου

- ✓ Το ελαιόλαδο θα πρέπει να αποθηκεύεται σε ανοξειδωτες ή σε υπόγειες δεξαμενές.
- ✓ Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης δεν πρέπει να ξεπερνά τους 18 °C.
- ✓ Τα διαφορετικά ελαιόλαδα δεν πρέπει να αναμιγνύονται μεταξύ τους.

Από τα προϊόντα του καρπού της ελιάς, τα προϊόντα που είναι κατάλληλα προς βρώση, μπορούν να καταταγούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Βρώσιμο παρθένο ελαιόλαδο, που περιλαμβάνει τα:
 - Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο
 - Παρθένο ελαιόλαδο
 - Κοινό παρθένο ελαιόλαδο
2. Ελαιόλαδο, το οποίο είναι μίγμα ραφινέ ελαιολάδου και βρώσιμου παρθένου ελαιολάδου. Το ραφινέ ελαιόλαδο παραλαμβάνεται με εξευγενισμό (εξουδετέρωση, απόσμιση, αποχρωματισμό) του παρθένου ελαιολάδου.
3. Πυρηνέλαιο, το οποίο είναι το μίγμα ραφινέ πυρηνελαίου και βρώσιμου παρθένου ελαιολάδου. Το ραφινέ πυρηνέλαιο παραλαμβάνεται με εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου.

7.1 Κριτήρια ποιότητας

Τα κριτήρια ποιότητας για το ελαιόλαδο, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και σύμφωνα με το Εμπορικό Πρότυπο του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου αναφέρονται στον **πίνακα 7.1**. Τα κριτήρια ποιότητας αποτελούν η ελεύθερη οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων, η απορρόφηση στο υπεριώδες και η οργανοληπτική αξιολόγηση. Από αυτά, η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί κριτήριο ποιότητας μόνο για το παρθένο ελαιόλαδο.

Πίνακας 7.1: Κριτήρια ποιότητας σύμφωνα με τον κανονισμό 2568/91 και το εμπορικό πρότυπο του ΔΣΕ (IOC, 2013c).

	<i>Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο</i>	<i>Παρθένο ελαιόλαδο</i>	<i>Κοινό*</i>	<i>Μειονεκτικό ελαιόλαδο (Lampante)</i>	<i>Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο</i>	<i>Ελαιόλαδο</i>
<i>Οξύτητα (% ελαϊκό οξύ)</i>	≤0,8	≤2,0	≤ 3,3	>2 (>3,3)**	≤ 0,3	≤ 1,0
<i>K₂₇₀</i>	≤0,22	≤0,25	0,25	-	≤ 1,10	≤ 0,90
<i>K₂₃₂</i>	≤2,50	≤2,50	≤2,60	-	-	-
<i>ΔK</i>	≤0,01	≤0,01	≤0,01	-	≤0,16	≤ 0,15
<i>Αριθμός Υπεροξειδίων (meq/kg)</i>	≤20	≤20	≤20	-	≤ 5	≤ 15
<i>Μέση τιμή φρουτώδους</i>	Me>0	Me>0	-	-	-	-
<i>Μέση τιμή Ελαττώματος</i>	Me=0	Me≤3,5	3,5<Me≤6,0***	> 3,5 (> 6,0)**	-	-

* Η κατηγορία «κοινό» έχει καταργηθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

** Οι τιμές αντιστοιχούν στα όρια της κατηγορίας «μειονεκτικό ελαιόλαδο» πριν τη κατάργηση της κατηγορίας «κοινό».

*** Η όταν η μέση τιμή του ελαττώματος είναι μικρότερη ή ίση με 3,5 και η μέση τιμή του φρουτώδους είναι ίση με 0.

7.2 Κριτήρια γνησιότητας

Εκτός από τα κριτήρια ποιότητας, για το ελαιόλαδο έχουν θεσπιστεί και κριτήρια γνησιότητας. Τα κριτήρια γνησιότητας αποτελούν όλες εκείνες τις χημικές αναλύσεις που απαιτούνται για την ανίχνευση της νοθείας του ελαιολάδου με πυρηνέλαιο, με ραφίναρισμένα έλαια ή με άλλα φυτικά έλαια. Τα όρια που έχουν ορισθεί για κάθε

κριτήριο περιλαμβάνουν τις ακριβείς τιμές της επίσημης μεθόδου σύμφωνα με τον Κανονισμό 2568/91 και εφαρμόζονται στα ελαιόλαδα και τα πυρηνέλαια:

1. Ανίχνευση νοθείας ελαιολάδου με πυρηνέλαιο:
 - Προσδιορισμός αλειφατικών αλκοολών.
 - Προσδιορισμός ερυθροδιόλης και ουβαόλης.
 - Προσδιορισμός κηρών.
2. Ανίχνευση νοθείας παρθένου ελαιολάδου με ραφιναρισμένα έλαια με:
 - Φασματοφωτομετρική εξέταση στο υπεριώδες.
 - Προσδιορισμός trans λιπαρών οξέων.
 - Προσδιορισμός στιγμασταδιενίων.
3. Ανίχνευση νοθείας ελαιολάδου ή πυρηνελαίου με άλλα φυτικά έλαια με:
 - Ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων.
 - Προσδιορισμός ΔECN42.
 - Προσδιορισμός λιπαρών οξέων στην 2 θέση τριγλυκεριδίων.
 - Προσδιορισμός trans λιπαρών οξέων.
 - Προσδιορισμός στερολών.

Κεφάλαιο 8

Οργανοληπτική αξιολόγηση ελαιολάδου

8.1 Η γεύση και το άρωμα του παρθένου ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, εκτός των άλλων ιδιοτήτων του, διακρίνεται μεταξύ των υπόλοιπων βρώσιμων λιπών και ελαίων για την ιδιαίτερα χαρακτηριστική του γεύση και το άρωμά του. Τόσο οι θετικές όσο και οι αρνητικές οργανοληπτικές ιδιότητες του παρθένου ελαιολάδου έχουν συσχετιστεί με τις πτητικές και φαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση αντίστοιχα (Bendini et al., 2007; Cerretani et al., 2008).

Η χαρακτηριστική γεύση του παρθένου ελαιολάδου και ειδικότερα οι θετικές ιδιότητες του «πικρού» και του «πικάντικου», συσχετίζονται με τη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις και ειδικότερα με τα σεκοϊριδοειδή. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση αυτών των ενώσεων στις αντίστοιχες ιδιότητες και πρότειναν διάφορες συσχετίσεις. Οι Garcia, Yousfi, Mateos, Olmo, & Cert (2001) πρότειναν ότι η ή 3,4-DHPEA-EDA και η 3,4-DHPEA-EA είναι οι κύριες ενώσεις που ευθύνονται για την πικρή γεύση, οι Tovar et al. (2001) απέδωσαν τόσο την πικρή όσο και την πικάντικη γεύση σε παράγωγα του λιγκστροζίτη όπως είναι η *p*-HPEA-EDA. Οι Gutiérrez-Rosales, Ríos, & Gómez-Rey (2003) βρήκαν μία γραμμική σχέση μεταξύ της πικρής γεύσης και των παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης και του λιγκστροζίτη, οι Mateos et al. (2004) βρήκαν σημαντική συσχέτιση της πικρής γεύσης με την 3,4-DHPEA-EA σε συγκεντρώσεις από 0,03 ως 0,5 mmol/kg και οι Andrewes et al. (2003) πρότειναν την *p*-HPEA-EDA ως υπεύθυνη ένωση για την αίσθηση του καψίματος στο πίσω μέρος της γλώσσας.

Όσον αφορά, το μοναδικό άρωμα του παρθένου ελαιολάδου, αυτό αποδίδεται στις πτητικές ενώσεις που αναπτύσσονται από την οξείδωση του λινολενικού και λινελαϊκού οξέος μέσω μιας αλυσίδας ενζυμικών αντιδράσεων γνωστή ως πορεία της λιποξυγενάσης (Hatanaka, 1993; Olias et al., 1993). Οι ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα, που προέρχονται από την οδό της λιποξυγενάσης, ειδικότερα, οι C6 γραμμικές κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, αλκοόλες και εστέρες, αποτελούν το

σημαντικότερο κλάσμα και είναι υπεύθυνες για το φρουτώδες άρωμα του ελαιολάδου. Ωστόσο, στο ελαιόλαδο εκτός από αυτές τις ενώσεις έχουν εντοπιστεί και πλήθος άλλων πτητικών ενώσεων (αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, οξέα) που συνεισφέρουν τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Από υγιείς ελιές, στον κατάλληλο βαθμό ωρίμανσης που επεξεργάζονται σωστά υπάρχει πάντα η δυνατότητα για παραλαβή εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου ανεξαρτήτως της ποικιλίας της ελιάς (Alonso et al., 1994). Ωστόσο, όταν οι ελιές δεν είναι υγιείς ή μαζεύονται από το έδαφος ή αποθηκεύονται και επεξεργάζονται σε μη κατάλληλες συνθήκες, η παραγωγή ελαιολάδου με οργανοληπτικά ελαττώματα είναι αναπόφευκτη. Τα οργανοληπτικά μειονεκτήματα οφείλονται σε ενζυματικές αντιδράσεις, δράσεις μικροοργανισμών καθώς και σε αντιδράσεις αυτοξειδωσης (Angerosa, 2002).

8.2 Αποδοχή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των παρθένων ελαιολάδων από τους καταναλωτές

Γενικά, οι καταναλωτές εκτιμούν και αποδέχονται ό,τι τους είναι οικείο, δηλαδή προϊόντα που συνδέονται με την παράδοση και τις συνήθειες τους (Costell, Tárrega, & Bayarri, 2010), γεγονός που καθορίζει την αποδοχή του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου περισσότερο από τη γεύση. Για παράδειγμα, οι κάτοικοι των βόρειων χωρών της Ευρώπης, προτιμούν έλαια με ήπια, ισορροπημένα και φρουτώδη χαρακτηριστικά, σε αντίθεση με τους καταναλωτές της Νότιας Ευρώπης που προτιμούν έλαια με δυνατό άρωμα και έντονα πικρή και πικάντικη γεύση (Morales & Tsimidou, 2000). Στην περίπτωση του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, οι καταναλωτές θα πρέπει να μάθουν να εκτιμούν τη φρουτώδη γεύση και τις πικρές και πικάντικες ιδιότητες ως δείκτες ποιότητας που συνδέονται με δευτερεύοντα αλλά σημαντικά συστατικά του ελαιολάδου (Carluccio et al, 2003).

Ειδικά για τις φαινολικές ενώσεις του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, οι οποίες συνδέονται με τις πικρές και πικάντικες ιδιότητές του, είναι επιστημονικά τεκμηριωμένο ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία, λόγω της αντιοξειδωτικής, αντικαρκινικής, αντιφλεγμονώδους δράσης τους κλπ (Servili et al., 2004). Ωστόσο, η απόρριψη των ιδιοτήτων «πικρό» και «πικάντικο» αποτελεί μία

αναμενόμενη και μια φυσική αντίδραση των καταναλωτών, οι οποίοι υποσυνείδητα αποδίδουν τέτοια χαρακτηριστικά σε δηλητηριώδεις ή τοξικές ουσίες (Delgado & Guinard, 2011). Μόνο οι καταναλωτές που είναι εξοικειωμένοι με πικρά ή/και πικάντικα ελαιόλαδα αποδέχονται αυτές τις ιδιότητες ως θετικά χαρακτηριστικά (Caporale, Policastro, Carlucci, & Monteleone, 2006).

Συνεπώς, πρόκληση για το μέλλον αποτελεί η εκπαίδευση των καταναλωτών όσον αφορά την εκτίμηση της φρουτώδους ιδιότητας σε συνδυασμό με τις ιδιότητες του πικρού και του πικάντικου.

8.3 Μεθοδολογία για την οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαιολάδου

Με την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι βαθμολόγησης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αρκετών τροφίμων, όπως του κρέατος, του ψαριού, του κρασιού, του τσαγιού, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Όσον αφορά το ελαιόλαδο, στις αρχές του 1980 το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου ξεκίνησε μία προσπάθεια για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, με στόχο τη βελτίωση και τη προώθηση της ποιότητας του παρθένου ελαιολάδου. Η οργανοληπτική αξιολόγηση του παρθένου ελαιολάδου είναι αναλυτική παράμετρος και αποτελεί σήμερα ένα από τα τέσσερα κριτήρια ποιότητας του ελαιολάδου (EC, 1991).

Η οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαιολάδου γίνεται σύμφωνα με το διεθνές πρότυπο COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 6 και έχει συγκεκριμένη δομή (IOC, 2013b). Σκοπός της είναι η εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του παρθένου ελαιολάδου και η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την κατηγοριοποίησή του σύμφωνα με αυτά τα χαρακτηριστικά. Η ταξινόμηση των παρθένων ελαιολάδων, πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντιλαμβανόμενη ένταση των ελαττωμάτων και του φρουτώδους όπως προσδιορίζονται από μια ομάδα επιλεγμένων και εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Για την περιγραφή των ιδιοτήτων υπάρχει ειδικό βασικό αλλά και προαιρετικό λεξιλόγιο (πίνακες 8.1-8.3) (IOC, 2007a).

Πίνακας 8.1: Ειδικό λεξιλόγιο για την αξιολόγηση των αρνητικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου.

Βασικές αρνητικές ιδιότητες

Ατροχάδο/μούργα Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαίου που έχει ληφθεί από ελιές αποθηκευμένες σε σωρούς ή σε τέτοιες συνθήκες ώστε να έχουν υποστεί ένα προχωρημένο στάδιο αναερόβιας ζύμωσης, ή ελαίου που έχει αφεθεί σε επαφή με το ίζημα/κατακάθι.

Μουχλιασμένο/νοτισμένο/χωματίλα Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαίου που έχει ληφθεί από ελιές που έχουν προσβληθεί από μύκητες και ζυμομύκητες μετά από παραμονή των καρπών σε υγρό μέρος για πολλές ημέρες ή ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές που έχουν μαζευτεί με χώμα ή λάσπες και οι οποίες δεν έχουν πλυθεί.

Κρασώδες-ξυδάτο-όξινο-ξινό Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που θυμίζει κρασί ή ξύδι. Η γεύση αυτή οφείλεται κυρίως σε αερόβια ζύμωση μέσω της οποίας σχηματίζεται οξικό οξύ, οξικός αιθυλεστέρας και αιθανόλη.

Παγόπληκτες ελιές (υγρό ξύλο) Χαρακτηριστική γεύση ελαίου που προέρχεται από ελιές που έχουν τραυματιστεί από τον παγετό πριν συλλεχθούν.

Ταγγό Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που έχει υποστεί μια διαδικασία οξείδωσης οφειλόμενη σε παρατεταμένη επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Άλλες αρνητικές ιδιότητες

Ψημένο ή καμμένο Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από υπερβολική ή/και παρατεταμένη θέρμανση κατά την παραγωγή του, κυρίως κατά την

	μάλαξη της ελαιόπαστας
Άχυρο	Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ορισμένων λαδιών που προέρχονται από ελιές που έχουν ξεραθεί.
Τραχύ	Χαρακτηριστική αίσθηση σε ορισμένα ελαιόλαδα των οποίων η πρόγευση προκαλεί μια αίσθηση πηχτή και ζυμώδη.
Γράσο	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που θυμίζει πετρέλαιο, λιπαντικά ή ορυκτέλαιο και συνήθως οφείλεται στην ελλιπή απομάκρυνση υπολειμμάτων των ανωτέρω ουσιών από τον εξοπλισμό έκθλιψης στα ελαιοτριβεία.
Φυτικά υγρά	Οσμή-γεύση που προσδίδεται στο ελαιόλαδο μετά από παρατεταμένη επαφή του με τα απόνερα και στα οποία έχει ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης.
Άλμη	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές διατηρημένες σε αλατούχα διαλύματα
Μεταλλικό	Χαρακτηριστική γεύση που μας θυμίζει μέταλλα. Είναι χαρακτηριστικό ελαιολάδου που έχει έλθει σε παρατεταμένη επαφή με μεταλλικές επιφάνειες κατά την διάρκεια της θραύσης των ελαιοκάρπων, της μάλαξης, της πίεσης ή της αποθήκευσης
Σπάρτο	Χαρακτηριστική οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές που έχουν υποστεί έκθλιψη μέσα σε καινούργιους σάκους από σπάρτο. Η γεύση αυτή διαφοροποιείται ανάλογα αν πρόκειται για σάκους που έχουν κατασκευαστεί από πράσινο ή ξηρό σπάρτο.
Σκουληκιασμένο	Οσμή-γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από ελιές που έχουν προσβληθεί έντονα από νύμφες του δάκου (<i>Bactrocera oleae</i>).

Αγγουρώδες Οσμή-γεύση ελαιολάδου που δημιουργείται όταν είναι συσκευασμένο σε ερμητικά κλειστά δοχεία, κυρίως από λευκοσίδηρο, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η γεύση αυτή αποδίδεται στον σχηματισμό της 2,6-εννεανοδιενάλης.

Πίνακας 8.2: Ειδικό λεξιλόγιο για την αξιολόγηση των θετικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του ελαιολάδου.

Θετικές ιδιότητες

Φρουτώδες Συνδυασμός γευστικο-οσφραντικών αισθήσεων που προέρχονται από υγιείς, φρέσκες ελιές ώριμες ή άγουρες και εξαρτάται από τη ποικιλία της ελιάς. Το φρουτώδες γίνεται αντιληπτό είτε απευθείας από τη μύτη είτε από το πίσω μέρος αυτής. (Η ιδιότητα αυτή είναι η πλέον σημαντική στην οργανοληπτική αξιολόγηση διότι εάν δεν γίνει αντιληπτή το δοκιμαζόμενο ελαιόλαδο δεν θα ταξινομηθεί ως εξαιρετικό ή παρθένο.)

Πικρό Χαρακτηριστική γεύση ελαιολάδου που προέρχεται από πράσινες ελιές ή από ελιές που αρχίζουν να αλλάζουν χρώμα.

Πικάντικο Είναι η αίσθηση της ενόχλησης στο λαιμό, το πιπεράτο που προέρχεται από λάδια παραγόμενα στην αρχή της ελαιοκομικής περιόδου κυρίως από άγουρες ελιές. Η αίσθηση αυτή προκαλείται από την δράση φαινολικών ουσιών πάνω στην άκρη του τριδύμου νεύρου και εξαλείφεται λίγα δευτερόλεπτα μετά την δοκιμή.

Πίνακας 8.3: Ειδικό προαιρετικό λεξιλόγιο για λόγους επισήμανσης του προϊόντος.

Ιδιότητα-Χαρακτηρισμός	
Έντονο, μεσαίας ή ελαφριάς έντασης ως προς τις θετικές ιδιότητες (φρουτώδες, πικρό και πικάντικο):	Σύμφωνα με την ένταση της αντίληψης: Έντονο: Όταν η μέση τιμή της ιδιότητας είναι μεγαλύτερη από 6 Μεσαίας έντασης: Όταν η μέση τιμή της ιδιότητας είναι μεταξύ 3 και 6 Ελαφριάς έντασης: Όταν η μέση τιμή της ιδιότητας είναι μικρότερη από 3
Πράσινο φρουτώδες	Συνδυασμός γευστικο-οσφραντικών χαρακτηριστικών ελαίου που θυμίζει πράσινο φρούτο, εξαρτάται από τη ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από υγιείς, φρέσκες ελιές. Γίνεται αντιληπτό είτε απευθείας από τη μύτη είτε από το πίσω μέρος αυτής.
Ωριμο φρουτώδες	Συνδυασμός γευστικο-οσφραντικών χαρακτηριστικών ελαίου που θυμίζει ώριμο φρούτο, εξαρτάται από τη ποικιλία της ελιάς και προέρχεται από υγιείς, φρέσκες ελιές. Γίνεται αντιληπτό είτε απευθείας από τη μύτη είτε από το πίσω μέρος αυτής.
Καλά ισορροπημένο	Έλαιο το οποίο δεν εμφανίζει έλλειψη ισορροπίας. Μη ισορροπημένο θεωρείται δείγμα στο οποίο οι μέσες τιμές των γευστικο-οσφραντικών χαρακτηριστικών του πικρού και/ή του πικάντικου είναι κατά δύο μονάδες υψηλότερα από την αίσθηση του φρουτώδους.
Απαλό λάδι	Έλαιο το οποίο οι μέσες τιμές του πικρού και του πικάντικου είναι ίσες ή χαμηλότερες του 2.

Η οργανοληπτική δοκιμή γίνεται στις καμπίνες δοκιμών σε ειδική αίθουσα, η οποία πρέπει να είναι άνετη, κατάλληλα φωτισμένη και απομονωμένη από το θόρυβο. Επιπλέον, θα πρέπει να αερίζεται και να έχει μία σταθερή θερμοκρασία 20°-24°C (IOC, 2007c). Όλες αυτές οι συνθήκες έχουν σκοπό να διευκολύνουν την εργασία των δοκιμαστών και να βελτιώσουν την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων τους. Το ποτήρια που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές έχουν επίσης συγκεκριμένες προδιαγραφές (IOC, 2007b) όπως βάση κατάλληλη για την θερμαντική μονάδα, στενό στόμιο που βοηθά την συγκέντρωση των πτητικών ουσιών και είναι κατασκευασμένα από σκουρόχρωμο γυαλί. Το ποτήρι, κατά τη δοκιμή, θα πρέπει να περιέχει 14–16 ml ελαίου (12,8 – 14,6 g) και να είναι καλυμμένο με ύαλο ωρολογίου.

Ο υπεύθυνος της ομάδας δοκιμαστών πρέπει να είναι κατάλληλα εκπαιδευμένος με εξειδικευμένη γνώση πάνω στα είδη των ελαίων τα οποία θα συναντήσει στη πορεία. Ο υπεύθυνος της ομάδας είναι αρμόδιος για την επιλογή, την εκπαίδευση και τη παρακολούθηση/αξιολόγηση των δοκιμαστών η οποία γίνεται σύμφωνα με συγκεκριμένο πρότυπο (IOC, 2013a). Επίσης, είναι αρμόδιος για την τήρηση του αρχείου της ομάδας, τη παραλαβή και αποθήκευση των δειγμάτων, τη διασφάλιση της ανωνυμίας των δειγμάτων και τη κωδικοποίησή τους, τη συγκέντρωση και τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, την καταγραφή των συσκευών και του εξοπλισμού και εξασφάλιση ότι συμμορφώνονται με τις προδιαγραφές της μεθόδου, καθαρίζονται και συντηρούνται. Τέλος, θα πρέπει να εξασφαλίζει ότι η ομάδα λειτουργεί σωστά.

Οι δοκιμαστές θα πρέπει να επιλέγονται, εκπαιδεύονται και παρακολουθούνται από τον υπεύθυνο του πάνελ, σύμφωνα με τις ικανότητές τους να διακρίνουν διαφορές μεταξύ παρόμοιων δειγμάτων. Οι δοκιμαστές πρέπει να αξιολογούν τα δείγματα ανεξάρτητα από τις προσωπικές τους προτιμήσεις, μόνο με τις αισθήσεις που αντιλαμβάνονται.

Τα δείγματα που προορίζονται για οργανοληπτική αξιολόγηση πρέπει να διατηρούνται μέσα στα ποτήρια σε θερμοκρασία 28 ± 2 °C σε όλη την δοκιμή. Σε αυτή τη θερμοκρασία είναι πιο εύκολο να παρατηρηθούν οι οργανοληπτικές διαφορές σε σχέση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες οι αρωματικές ενώσεις εξατμίζονται ελάχιστα ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες σχηματίζονται πτητικές ενώσεις χαρακτηριστικές των θερμαινόμενων ελαίων.

Η γευσιγνωσία συνιστάται να πραγματοποιείται μεταξύ 10 το πρωί και 12 το μεσημέρι. Οι δοκιμαστές, δεν πρέπει να καπνίσουν ή να πιουν καφέ για τουλάχιστον 30 λεπτά πριν τη δοκιμή και θα πρέπει να έχουν φάει το λιγότερο μία ώρα πριν. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούν κανένα άρωμα, καλλυντικό ή σαπούνι, των οποίων η οσμή θα μπορούσε να διαρκεί μέχρι τη στιγμή της δοκιμής. Επίσης, πρέπει να απέχουν από την γευσιγνωσία και να ενημερώνουν σχετικά τον επικεφαλής του πάνελ σε περίπτωση που αισθάνονται αδιαθεσία και ειδικά όταν επηρεάζονται η αίσθηση της όσφρησης και της γεύσης ή αν αντιμετωπίζουν οποιαδήποτε ψυχολογική κατάσταση που τους αποτρέπει από το να συγκεντρωθούν στην εργασία τους.

Αφού τελειώσει την δοκιμή ο δοκιμαστής θα επιβεβαιώσει τις οσφραντικο-γευστικο-κιναισθητικές αντιλήψεις χρησιμοποιώντας το ειδικό φύλλο χαρακτηριστικών (**παράρτημα Ι**) και σημειώνοντας την ένταση της κάθε αντιλαμβανόμενης αρνητικής και θετικής ιδιότητας σε κλίμακα των 10 cm. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν ο δοκιμαστής αντιληφθεί μια πολύ έντονη αρνητική ιδιότητα με την όσφρηση, τότε μπορεί να αποφύγει τη γευστική δοκιμή. Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση του παρθένου ελαιολάδου, συνιστάται να αξιολογούνται μέχρι τέσσερα δείγματα σε κάθε συνεδρία με ένα ανώτατο όριο τρεις συνεδρίες την ημέρα, ενώ για την εξάλειψη μιας γεύσης ο δοκιμαστής μπορεί να χρησιμοποιήσει μια φέτα μήλου ή ψωμί και να ξεπλύνει το στόμα του με νερό.

Το έλαιο κατατάσσεται σε κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και τη διάμεση τιμή για το φρουτώδες. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων ορίζεται ως η διάμεση τιμή του ελαττώματος που γίνεται αντιληπτό με τη μεγαλύτερη ένταση. Η διάμεση τιμή των ελαττωμάτων και η διάμεση τιμή του φρουτώδους εκφράζονται με ένα δεκαδικό ψηφίο.

Η κατάταξη του ελαιολάδου πραγματοποιείται συγκρίνοντας τη μέση τιμή των ελαττωμάτων και τη μέση τιμή για το φρουτώδες με τα όρια αναφοράς που δίνονται παρακάτω (**πίνακας 8.4**). Για τον καθορισμό των ορίων αυτών, έχει ληφθεί υπόψη το σφάλμα της μεθόδου.

Πίνακας 8.4: Κατάταξη ενός ελαιολάδου σε κατηγορία με βάση το αποτέλεσμα της οργανοληπτικής δοκιμής.

Κατηγορία	Προϋποθέσεις
Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο	Όταν η διάμεσος τιμή των ελαττωμάτων είναι 0 και η διάμεσος του φρουτώδους είναι μεγαλύτερη από 0
Παρθένο ελαιόλαδο	Όταν η διάμεσος τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη από 0 και μικρότερη ή ίση με 3,5 και η διάμεσος τιμή του φρουτώδους είναι μεγαλύτερη από 0
Κοινό παρθένο ελαιόλαδο*	Όταν η διάμεσος τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη από 2,5 και μικρότερη ή ίση με 6 ή όταν η διάμεσος των ελαττωμάτων είναι μικρότερη ή ίση με 2,5 και η διάμεσος του φρουτώδους είναι 0.
Μειονεκτικό	Όταν η διάμεσος τιμή των ελαττωμάτων είναι μεγαλύτερη από 3,5.

*Η κατηγορία «κοινό» έχει καταργηθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

8.4 Μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση

Στον τρέχοντα κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το ελαιόλαδο οι πιο συχνές αρνητικές ιδιότητες κατατάσσονται σε πέντε ομάδες: ατροχάδο/μούργα, μουχλιασμένο/νοτισμένο/χωματίλα, κρασώδες-ξυδάτο, ταγγό και παγοπληγμένες ελιές (EU, 2013). Τα ελαττώματα αυτά, οφείλονται κυρίως σε κακή υγεία και/ή συντήρηση του καρπού πριν την επεξεργασία του, εκτός από το ταγγό που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιολάδου.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, τα λιπίδια οξειδώνονται προς υδροϋπεροξειδία, τα οποία είναι άοσμα και χωρίς γεύση και δεν ευθύνονται για τις οργανοληπτικές

μεταβολές (Frankel, 1983). Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις είναι επιρρεπείς σε περαιτέρω οξειδωση ή σε αποσύνθεση προς δευτερεύοντα προϊόντα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τα τυπικά δυσάρεστο οργανοληπτικό χαρακτηριστικό του ταγγού. Από την άλλη πλευρά, οι θετικές ιδιότητες φρουτώδεις, πικρό και πικάντικο μειώνονται. Στα παρθένα ελαιόλαδα, αυτές οι αισθήσεις σχετίζονται με την παρουσία των πτητικών και των φαινολικών ενώσεων αντίστοιχα (Bendini et al., 2007; Cerretani et al., 2008), οι οποίες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης υποβάλλονται σε ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές λόγω αποσύνθεσης ή οξειδωτικών αντιδράσεων (Brenes et al., 2001; Morales et al., 1997).

Καθώς η αρνητική ιδιότητα του ταγγού αυξάνεται και οι θετικές ιδιότητες του φρουτώδους, του πικρού και του πικάντικου μειώνονται, η ποιότητα του ελαιολάδου υποβαθμίζεται. Μετά από κάποιο διάστημα το ελαιόλαδο δεν καλύπτει πια τις προϋποθέσεις για την κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και μπορεί να καταταγεί στην κατηγορία του παρθένου ή και του μειονεκτικού ελαιολάδου.

Αν και δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία όπου περιγράφονται οι μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση, το πόσο γρήγορα θα συμβούν αυτές εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι, οι συνθήκες της αποθήκευσης (θερμοκρασία, φως και υλικό συσκευασίας), η ποικιλία της ελιάς και τα αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά (Ben-Hassine et al., 2013). Για παράδειγμα, σε εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα που αποθηκεύονται στο φως, ένας μήνας είναι αρκετός ώστε να αρχίσει να γίνεται αντιληπτή η αρνητική ιδιότητα του ταγγού, ενώ στους 10 μήνες ξεπερνιέται και το όριο του 3,5 για την κατηγορία του παρθένου. Παράλληλα, στην ίδια έρευνα, το φρουτώδες φάνηκε να μειώνεται από 50 ως και 70% μέχρι το τέλος της αποθήκευσης που διήρκεσε 12 μήνες (Savarese, De Marco, Caporaso, & Sacchi, 2013).

ΣΤΟΧΟΙ

Όπως είναι γνωστό το ελαιόλαδο συνήθως καταναλώνεται σε ένα διάστημα που μπορεί να φτάσει μέχρι τους 18 μήνες. Για τη διατήρηση της ποιότητας του ελαιολάδου, εκτός από τις συνθήκες αποθήκευσης, βασικό ρόλο παίζει και η σύστασή του, έτσι ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά ελαιολάδων που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες. Οι μεταβολές στη σύσταση σε πτητικές και φαινολικές ενώσεις στα παρθένα ελαιόλαδα κάτω από συνήθεις συνθήκες αποθήκευσης, που εφαρμόζονται στο εμπόριο αλλά και οικιακά, δεν έχουν μελετηθεί πλήρως, κυρίως για το λόγο ότι τέτοιου είδους έρευνες είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες (9–24 μήνες συνήθως). Ωστόσο, τα αποτελέσματα μιας έρευνας, η οποία διεξάγεται σε πραγματικό χρόνο είναι ιδιαίτερα χρήσιμα, αφού μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση της διαδικασίας της αυτοξειδωσης, στον ακριβή ρόλο των βασικών και ήσσονων συστατικών και τελικά στην πρόβλεψη του χρόνου ζωής του ελαιολάδου. Για το λόγο αυτό, δείγματα παρθένου ελαιολάδου από πέντε ελληνικές ποικιλίες ελιάς μεταφέρθηκαν σε γυάλινα μπουκάλια (με κενό 0,5%), τα οποία σφραγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό υπόγειο χώρο χωρίς κεντρική θέρμανση. Κατά την αποθήκευση μελετήθηκαν οι μεταβολές στη σύσταση του πτητικού και φαινολικού κλάσματος. Επιπλέον σε δύο ποικιλίες έγινε μελέτη των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Τέλος, δεδομένης της υψηλής βιολογικής αξίας που έχουν για την υγεία οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου και για το λόγο ότι σε πολλές χώρες το παρθένο ελαιόλαδο χρησιμοποιείται στο μαγείρεμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των μεταβολών στο φαινολικό κλάσμα μετά από θερμική επεξεργασία.

Με βάση τα παραπάνω στόχοι τις διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν:

- ✓ Η εκτίμηση των μεταβολών που πραγματοποιούνται στη σύσταση του πτητικού κλάσματος κατά την αποθήκευση.
- ✓ Η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της αρχικής σύστασης των ελαιολάδων σε λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις και του ρυθμού σχηματισμού των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το οργανοληπτικό μειονέκτημα του ταγγού.

- ✓ Η καταγραφή των αλλαγών στη φαινολική σύσταση των ελαιολάδων κατά την αποθήκευση.
- ✓ Η διερεύνηση των παραγόντων που επιδρούν στην αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση.
- ✓ Οι μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση σε σχέση με την ποικιλία.
- ✓ Η κατάταξη των δειγμάτων σε κατηγορίες εξαιρετικού παρθένου και παρθένου ελαιολάδου με βάση το προφίλ τους σε πτητικές ενώσεις.
- ✓ Η μελέτη των αλλαγών στην φαινολική σύσταση ελαιολάδων μετά από οικιακές θερμικές επεξεργασίες.
- ✓ Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων που σχηματίζονται κατά τις θερμικές επεξεργασίες και την αποθήκευση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 9

Μελέτη της επίδρασης οικιακών θερμικών επεξεργασιών στις φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου

9.1 Εισαγωγή

Το παρθένο ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από μεγάλη βιολογική αξία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας στο μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ, καθώς και στην ύπαρξη φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα κύρια αντιοξειδωτικά του παρθένου ελαιολάδου είναι οι φαινολικές ενώσεις και η α -τοκοφερόλη.

Σε πολλές χώρες το παρθένο ελαιόλαδο καταναλώνεται και μετά από οικιακές θερμικές επεξεργασίες, όπως είναι το τηγάνισμα, το βράσιμο και το ψήσιμο σε φούρνο. Αυτές οι επεξεργασίες μειώνουν την ποσότητα των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο σε διαφορετικό βαθμό, που εξαρτάται τόσο από τα στάδια και την ένταση της επεξεργασίας όσο και από τις διαφορές στη σύσταση των παρθένων ελαιολάδων (Brenes et al., 2002a; Carrasco-Pancorbo et al., 2007a; Gutiérrez et al., 2002; Nissiotis & Tasioula-Margari, 2002).

Κατά τη θερμική οξείδωση τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης είναι λιγότερο σταθερά από τα παράγωγα της τυροσόλης (Nissiotis & Tasioula-Margari, 2002). Επιπλέον, σε θερμικώς επεξεργασμένα παρθένα ελαιόλαδα έχουν βρεθεί προϊόντα οξείδωσης των φαινολικών ενώσεων (Armaforte et al., 2007; Boselli et al., 2009; Brenes et al., 2002a; Carrasco-Pancorbo et al., 2007b; Ríos et al., 2005).

Ο σκοπός του συγκεκριμένου τμήματος της έρευνας είναι η μελέτη της επίδρασης των οικιακών θερμικών επεξεργασιών, του τηγανίσματος και του βρασμού, στις διάφορες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων παρθένων ελαιολάδων από τις ποικιλίες Λιανολιά και Κορωνέικη. Οι ποικιλίες αυτές επιλέχθηκαν λόγω της μεταξύ τους διαφοράς σε σύσταση σε λιπαρά οξέα. Η Λιανολιά είναι ποικιλία που χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ, ενώ η Κορωνέικη είναι λιγότερο

πολυακόρεστη ποικιλία. Επίσης, η καλλιέργεια και των δύο ποικιλιών είναι διαδεδομένη, η Κορωνέικη καλλιεργείται σε πολλές περιοχές της Ελλάδα και ειδικά σε νότιες περιοχές ενώ η Λιανολιά είναι ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στη Κέρκυρα και στην περιοχή της Πρέβεζας.

9.2 Μέθοδοι και υλικά

9.2.1 Δείγματα ελαιολάδου

Χρησιμοποιήθηκαν 2 παρθένα ελαιόλαδα των ποικιλιών Λιανολιά και Κορωνέικη. Αυτές οι ποικιλίες επιλέχθηκαν λόγω της διαφορετική σύνθεσης σε λιπαρά οξέα. Πριν την ανάλυση τα δείγματα διηθήθηκαν και διατηρήθηκαν με άζωτο σε θερμοκρασία κάτω από 20 °C. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις.

9.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες

Η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το εξάνιο και το νερό που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων αλλά και για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό ήταν HPLC καθαρότητας από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων ήταν: η τυροσόλη (για την ποσοτικοποίηση των παραγώγων τυροσόλης) από Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία), ελαιοευρωπαϊνή (για την ποσοτικοποίηση των παραγώγων υδροξυτυροσόλης) από την Extrasynthese (Genay, Γαλλία), βανιλλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, λουτεολίνη και απιγενίνη από την Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Γερμανία) και η πινορεσινόλη (για την ποσοτικοποίηση της 1-ακετοξυπινορεσινόλης) από την Separation Research (Turku, Φινλανδία). Τέλος, το *p*-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

9.2.3 Θερμικές επεξεργασίες

Για την θερμική επεξεργασία του βρασμού, δείγμα ελαιολάδου (50 g) μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως (250 ml) και θερμάνθηκε στους 100 °C σε υδατόλουτρο για διάφορες χρονικές περιόδους από 1 ως 4 ώρες. Για την θερμική επεξεργασία του τηγανίσματος, δείγμα ελαιολάδου (50 g) μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως (250 ml) και θερμάνθηκε σε θερμαντική πλάκα στους 180 °C για περιόδους από 10 ως 60 λεπτά. Για να φθάσει η θερμοκρασία στους 180 °C χρειάστηκαν 10 λεπτά. Τα πειράματα διεξήχθησαν εις

τριπλούν. Τέλος, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση οξειδωμένων προϊόντων, ώστε να γίνει ταυτοποίηση με HPLC-MS, δείγματα ελαιολάδου θερμάνθηκαν σε φούρνο στους 100 °C για 24 και 72 ώρες.

9.2.4 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας

Οι προσδιορισμοί του αριθμού υπεροξειδίων, της ελεύθερης οξύτητας και των ειδικών συντελεστών απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του Κανονισμού της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC, 1991) όπως περιγράφονται στη συνέχεια.

9.2.4.1 Αριθμός υπεροξειδίων

Σε εσφυρισμένη φιάλη με πάμα, χωρητικότητας 250 ml, ζυγίζονται 1,000 g ελαιολάδου. Προστίθενται 10 ml χλωροφόρμιου και το δείγμα διαλύεται γρήγορα με ανάδευση. Προστίθενται 15 ml οξικού οξέος και κατόπιν 1 ml κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Η φιάλη πωματίζεται γρήγορα, γίνεται ανάδευση για ένα λεπτό, και αφήνεται για 5 λεπτά ακριβώς σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία 15 έως 25 °C. Προστίθενται 75 ml απεσταγμένου νερού. Το ιώδιο που απελευθερώνεται ογκομετρείται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,002 N με ζωηρή ανάδευση, χρησιμοποιώντας για δείκτη διάλυμα αμύλου (1%). Εκτελείται ταυτόχρονα λευκός προσδιορισμός.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως meq O_2 /kg ελαιολάδου με τη χρήση του τύπου:

$$AY = \frac{V \times T \times 1000}{m}$$

όπου V είναι ο αριθμός των ml του προτύπου διαλύματος θειοθειικού νατρίου μετά την αφαίρεση του λευκού, T είναι η ακριβής κανονικότητα του διαλύματος θειοθειικού νατρίου που χρησιμοποιείται και m είναι το βάρος του δείγματος σε γραμμάρια.

9.2.4.2 Ελεύθερη οξύτητα

5,00 g δείγματος διαλύονται σε 25 ml μείγματος διαιθυλαιθέρα/αιθανόλης 1:1 (V/V). Γίνεται ογκομέτρηση με υδατικό διάλυμα 0,1N υδροξειδίου του νατρίου. Ως δείκτης χρησιμοποιείται η φαινολοφθαλεΐνη (διάλυμα 1% σε αιθανόλη). Το ρόδινο χρώμα της φαινολοφθαλεΐνης θα πρέπει να διατηρηθεί για τουλάχιστον 10 δευτερόλεπτα.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως g ελαϊκού οξέος/100 g ελαιολάδου με τη χρήση του τύπου:

$$\text{Οξύτητα (\%)} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

όπου V είναι ο όγκος (σε ml) του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου που έχει χρησιμοποιηθεί, c είναι η ακριβής συγκέντρωση, σε moles ανά λίτρο, του τιτλοδοτημένου διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου που έχει χρησιμοποιηθεί, M είναι το γραμμομοριακό βάρος, σε γραμμάρια ανά mole, του οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση του αποτελέσματος (= 282), m είναι το βάρος, σε γραμμάρια, του δείγματος δοκιμής.

9.2.4.3 Ειδικοί συντελεστές απόσβεσης (K_{232} , K_{270})

0,100 g του δείγματος ελαιολάδου ζυγίζονται με σχετική ακρίβεια σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml, ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή με ισοοκτάνιο και ομογενοποιείται. Το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να είναι εντελώς διαυγές. Αν υπάρχει αδιαφάνεια ή θολότητα διηθείται με διηθητικό χαρτί. Μετράται η απορρόφηση στα 270 nm λαμβάνοντας το χρησιμοποιούμενο διαλύτη ως αναφορά. Ακολουθεί αραιώση 1 ml διαλύματος στα 5 ml και μετράται η απορρόφηση στα 232 nm. Οι καταγραφόμενες τιμές απόσβεσης πρέπει να βρίσκονται μέσα στη περιοχή 0,1-0,8. Εάν όχι, οι μετρήσεις πρέπει να επαναληφθούν, χρησιμοποιώντας, κατά περίπτωση, πυκνότερα ή αραιότερα διαλύματα.

Τα αποτελέσματα υπολογίζονται ως εξής:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s}$$

όπου, K_{λ} είναι η ειδική απόσβεση σε μήκος κύματος λ , E_{λ} είναι η απόσβεση που μετρήθηκε σε μήκος κύματος λ , c είναι η συγκέντρωση του διαλύματος σε g/100 ml και s είναι το πάχος της κυψελίδας σε cm.

9.2.4.4 Μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα των 5 ml, ζυγίζονται περίπου 0,1 g δείγματος ελαίου. Προστίθενται 2 ml επτανίου και αναδεύονται. Προστίθενται 0,2 ml μεθανολικού διαλύματος 2 N υδροξειδίου του καλίου, ο σωλήνας και αναδεύεται ισχυρά για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε

1350 rpm. Με τη βοήθεια της σύριγγας, λαμβάνεται 1 μL από το διάλυμα μεθυλεστέρων που έχει παρασκευαστεί (υπερκείμενη στοιβάδα) και εγχέεται στη στήλη. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η carbowax της Altech Associates (Inc. Deerfield, IL). Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συνθήκες: Θερμοκρασία εγχυτή: 250 $^{\circ}\text{C}$, Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID): 270 $^{\circ}\text{C}$, Φέρον αέριο (He): 1,9 ml/sec.

Το πρόγραμμα μεταβολής της θερμοκρασίας κατά το διαχωρισμό στη στήλη είχε ως εξής:

- Αρχική θερμοκρασία του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ίση με 180 $^{\circ}\text{C}$.
- Διατήρηση του φούρνου στη θερμοκρασία των 180 $^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά.
- Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 2 $^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ στους 210 $^{\circ}\text{C}$.
- Παραμονή στη θερμοκρασία των 210 $^{\circ}\text{C}$ για 10 λεπτά.
- Επαναφορά στους 180 $^{\circ}\text{C}$.

Η περιεκτικότητα σε δεδομένο συστατικό εκφράζεται σε κατά μάζα εκατοστιαία αναλογία σύμφωνα με τον τύπο:

$$i (\%) = \frac{A_i}{\sum_a} \times 100$$

όπου i είναι το δεδομένο συστατικό, A_i είναι το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο i και \sum_a είναι το άθροισμά των εμβαδών όλων των κορυφών.

9.2.5 Εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων

Στο δοχείο ζύγισης (γυάλινος σωλήνας με βιδωτό καπάκι) του δείγματος προστέθηκαν 0,5 ml εσωτερικού προτύπου, 4-υδροξυφαινολοξικό οξύ (100 ppm σε μεθανόλη) και εξατμίστηκαν με διαβίβαση ρεύματος αζώτου. Στη συνέχεια, στο ίδιο δοχείο, ζυγίστηκαν 5,00 g δείγματος. Έγινε εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων με μεθανόλη (3 x 5 ml) με ανατάραξη στο Vortex για 1 λεπτό κάθε φορά. Η μεθανολική φάση συγκεντρώθηκε σε σφαιρική φιάλη και η εξάτμιση του διαλύτη έγινε σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40 $^{\circ}\text{C}$. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε έκπλυση με εξάνιο (3 x 5 ml) για απομάκρυνση του ελαιολάδου που τυχόν είχε απομείνει. Η φάση του ακετονιτρίλιου μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη και τοποθετήθηκε εκ νέου σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40 $^{\circ}\text{C}$ για εξάτμιση του διαλύτη. Τέλος το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 2 ml μίγματος μεθανόλης:νερού

(1:1 v/v) και διηθήθηκε με φίλτρο (φίλτρο Acrodisc 13 mm Syringe filter με 0.45 μm Nylon membrane).

9.2.6 HPLC-UV και LC-DAD-MS

Ο διαχωρισμός των φαινολικών ενώσεων έγινε σε χρωματογράφο υψηλής απόδοσης JASCO MODEL (Tokyo, Ιαπωνία) με μία μονάδα μίξης και διανομής των διαλυτών LG-980-02 και αντλία PU-980, συνδεδεμένα με ανιχνευτή UV/vis, UV-970. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε με βαλβίδα εισαγωγής Rheodyne, χωρητικότητας 20 μL. Χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες Lichrospher 100RP18 (4.0 mm id X 250 mm, particle size = 5 μm; Merck) και Luna RP-C18 (4.6 mm id X 250 mm, particle size = 5 μm; Phenomenex, Macclesfield). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2,5% οξικό οξύ σε νερό (A) και μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 1/1 v/v (B). Ο ρυθμός ροής των διαλυτών ήταν 1 ml/min, η ανάλυση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και ο όγκος δείγματος που εισήχθη ήταν 20μL. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης διαμορφώθηκε ως εξής:

- Αρχικές συνθήκες: 95% A και 5% B,
- 70% A και 30% B στα 25 λεπτά,
- 65% A και 35% B στα 50 λεπτά,
- 30% A και 70% B στα 65 λεπτά,
- 0% A και 100% B στα 70
- επιστροφή στις αρχικές συνθήκες στα 75 λεπτά.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικών προτύπων. Στις περιπτώσεις ενώσεων όπου δεν υπήρχαν τα αντίστοιχα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα της ίδιας ομάδας και έγινε προσαρμογή των προτύπων εξισώσεων πολλαπλασιάζοντας με την αναλογία των μοριακών βαρών των ενώσεων ως εξής: Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τυροσόλης και των παραγώγων αυτής, διαλδεϋδική (DAFLA) και αλδεϋδική (AFLA) μορφή του λιγκστροζίτη, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη τυροσόλη, ο γλυκοζίτης της ελαιοευρωπαϊνης χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης, διαλδεϋδική (DAFOA) και αλδεϋδική (AFOA) μορφή της ελαιοευρωπαϊνης και της υδροξυτυροσόλης. Η πρότυπη πινορεσινόλη χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 1-ακετοξυπινορεσινόλης. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των απλών φαινολών (βανιλικό, κουμαρικό και

φερουλικό οξύ) και των φλαβονοειδών (λουτεολίνη και απιγενίνη) χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα.

Η ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων λυχνιών LC/DAD/ESI-MSⁿ πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Agilent 1100 Technologies LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) αποτελούμενο από αντλία Agilent G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1313A, απαερωτή Agilent G1379A και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B. Το φασματόμετρο μαζών ήταν τύπου παγίδευσης ιόντων Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer- απλό τετράπολο) εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003. Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Zorbax Eclipse XDB-C18, 25 cm x 4.6 mm i.d., 5 μm της Agilent (Agilent, USA). Χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο N₂ ως εκνεφωτής σε πίεση 50 psi και η ροή ρυθμίστηκε στα 11 L/min. Η θερμοκρασία και το δυναμικό του τριχοειδούς ρυθμίστηκαν στους 350°C και 3,5 kV, αντίστοιχα.

Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,1% οξικό οξύ σε νερό (A) και μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 1/1 v/v (B) με ροή 0,5 ml/min. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης των δειγμάτων ήταν ίδιο με αυτό του HPLC-UV. Ο όγκος δείγματος που εισήχθη ήταν 10μL. Η καταγραφή του φάσματος έγινε μεταξύ 200 και 700 nm. Τα μήκη κύματος που επιλέχθηκαν για την παρακολούθηση των χρωματογραφικών προφίλ ήταν τα 240, 280 και 340 nm. Η λήψη φάσματος μάζας MS, του πρόδρομου ιόντος πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος τιμών 50 έως 1000 *m/z* σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Ο μέγιστος χρόνος συλλογής της παγίδευσης ιόντος και του αριθμού επαναλήψεων MS, ώστε να ληφθεί ένας μέσος όρος φάσματος, τέθηκαν στα 30 και 3 ms, αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων βασίστηκε σε ψευδομοριακά ιόντα [M-H]⁻, διμερή και θραύσματα.

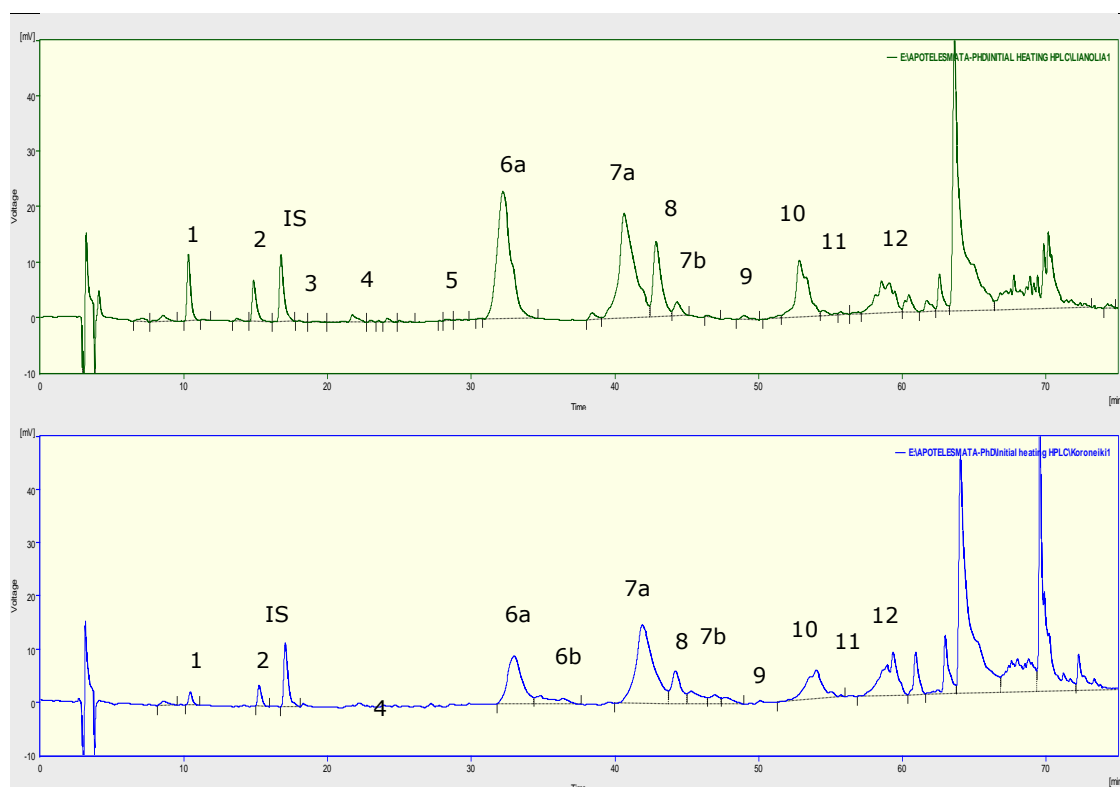
9.2.7 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, έγινε με εφαρμογή t-test σε 95 % όρια εμπιστοσύνης.

9.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

9.3.1 Σύσταση σε φαινολικές ενώσεις των αρχικών δειγμάτων ελαιολάδου

Στο **σχήμα 9.1** παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα HPLC του φαινολικού εκχυλίσματος των ελαιολάδων που χρησιμοποιήθηκαν. Οι φαινολικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν ποσοτικά ήταν: η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το βανιλλικό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ, η αλδεϋδική και διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαΐνης (AFOA και DAFOA), η αλδεϋδική και διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη (AFLA και DAFLA), η 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η λουτεολίνη και η απιγενίνη.



Σχήμα 9.1: Χρωματογράφημα HPLC-UV (280nm) του δείγματος Λιανολιάς (α) και Κορωνέικης (β). 1:Υδροξυτυροσόλη, 2:Τυροσόλη, IS: εσωτερικό πρότυπο (*p*-υδροξυφαινυλ-οξικό οξύ), 3: Βανιλλικό οξύ, 4: *p*-Κουμαρικό οξύ, 5: Φερουλικό οξύ, 6a: DAFOA, 6b: DAFOA καρβοξυμεθυλιωμένη, 7a: DAFLA + Πινορεσινόλη, 7b: DAFLA καρβοξυμεθυλιωμένη, 8: 1-Ακετοξυπινορεσινόλη, 9: Λουτεολίνη, 10: AFOA, 11: Απιγενίνη, 12: AFLA.

Παρόμοια προφίλ σε φαινολικές ενώσεις έχουν αναφερθεί για τις κυριότερες ισπανικές ποικιλίες όπως είναι η Picual, η Picudo, η Cornicabra, η Arbequina, η Empeltre και η Hojiblanca (Brenes et al., 1999). Σε ισπανικές και ιταλικές ποικιλίες έχει αναφερθεί υψηλή περιεκτικότητα σε πινορεσινόλη (Oliveras-Lopez et al., 2007), ωστόσο στην παρούσα εργασία η πινορεσινόλη συνεκλύεται με την DAFLA και έτσι δεν προσδιορίστηκε μεμονωμένα. Το δείγμα της ποικιλίας Κορωνέικη περιείχε μεγαλύτερη ποσότητα λιγνανών (δηλαδή 1-ακετοξυπινορεσινόλη), σε σύγκριση με το δείγμα της Λιανολιάς, ενώ και τα δύο δείγματα περιείχαν μικρές ποσότητες απλών φαινολών και φλαβονοειδών.

9.3.2 Μεταβολές των ποιοτικών χαρακτηριστικών των ελαιολάδων κατά τις θερμικές επεξεργασίες

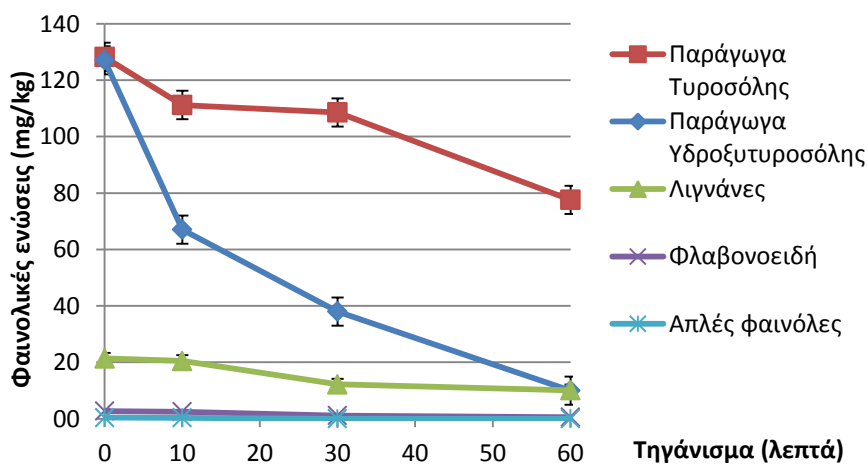
Στον **πίνακα 9.1** δίνονται τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ελαιολάδου κατά τη διάρκεια των οικιακών θερμικών επεξεργασιών, σε συνθήκες τηγανίσματος (180 °C) και βρασμού (100 °C). Τα αρχικά δείγματα κατατάσσονται στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου με βάση τη οξύτητα, τους συντελεστές απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) και τον αριθμό υπεροξειδίων. Σε γενικές γραμμές, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις τιμές της οξύτητας. Όσον αφορά τα υπεροξείδια, οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν για τα δείγματα που θερμάνθηκαν στους 180 °C. Ωστόσο, όλες οι τιμές που καταγράφηκαν και στις δύο θερμικές επεξεργασίες ήταν κάτω από 20 meq/kg. Από την άλλη πλευρά, ο συντελεστής απόσβεσης K_{232} βρέθηκε υψηλότερος από το ανώτατο όριο του 2,60, τόσο στο τηγάνισμα όσο και στο βρασμό, γεγονός που οφείλεται στη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων και στη σταδιακή συσσώρευση των συζυγών διενίων. Ο συντελεστής απόσβεσης K_{270} , επίσης ξεπέρασε κατά πολύ το όριο γεγονός που οφείλεται στην αύξηση των καρβονυλίων. Για τον συντελεστή K_{270} καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές στο τηγάνισμα παρά στο βρασμό λόγω της μεγαλύτερης αποδόμησης των υδροϋπεροξειδίων στην υψηλότερη θερμοκρασία.

Πίνακας 9.1: Χαρακτηριστικά ποιότητας των δειγμάτων ελαιολάδου πριν και μετά την εφαρμογή θερμικών επεξεργασιών.

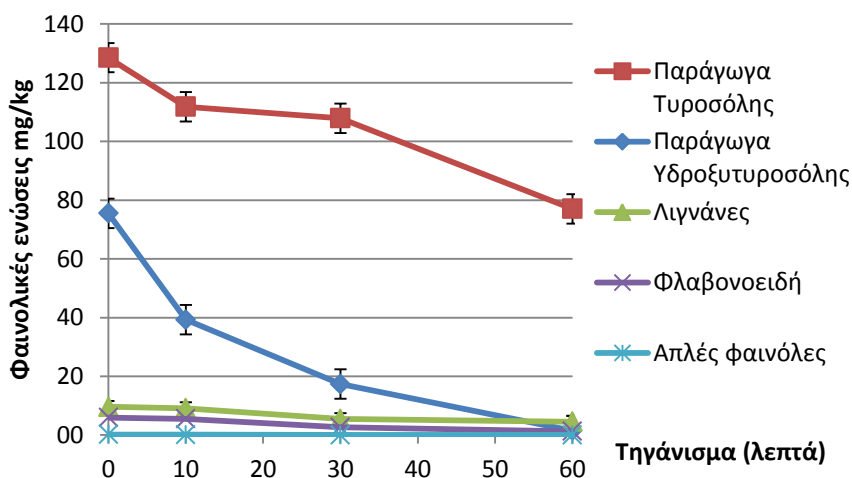
	Χρόνος (λεπτά)	Οξύτητα g ελαϊκού οξέος/100 g ελαιολάδου	Αριθμός Υπεροξειδίων meq/kg	K ₂₃₂	K ₂₇₀
Λιανολιά					
Αρχικά	0	0,33 ± 0,01	9,7 ± 0,2	1,81 ± 0,03	0,18 ± 0,02
Τηγάνισμα 180 °C	10	0,33 ± 0,01	12,1 ± 0,3	2,13 ± 0,03	0,50 ± 0,02
	30	0,33 ± 0,01	11,9 ± 0,3	3,34 ± 0,05	1,03 ± 0,03
	60	0,66 ± 0,01	15,3 ± 0,3	6,35 ± 0,08	1,38 ± 0,04
Βρασμός					
100 °C	120	0,35 ± 0,01	10,0 ± 0,3	2,40 ± 0,03	0,28 ± 0,02
	240	0,35 ± 0,01	11,3 ± 0,3	4,01 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Κορωνέικη					
Αρχικά	0	0,65 ± 0,01	7,9 ± 0,2	1,85 ± 0,03	0,12 ± 0,02
Τηγάνισμα 180 °C	10	0,65 ± 0,01	9,3 ± 0,3	2,15 ± 0,03	0,42 ± 0,02
	30	0,70 ± 0,01	12,4 ± 0,3	4,65 ± 0,06	0,81 ± 0,02
	60	0,70 ± 0,01	16,2 ± 0,3	6,39 ± 0,08	1,04 ± 0,03
Βρασμός 100 °C	120	0,70 ± 0,01	9,0 ± 0,2	2,22 ± 0,03	0,20 ± 0,02
	240	0,70 ± 0,01	10,3 ± 0,3	3,76 ± 0,03	0,34 ± 0,02

9.3.3 Μεταβολές στη φαινολική σύσταση των ελαιολάδων κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος στους 180 °C

Για τη μελέτη των μεταβολών στη φαινολική σύσταση, οι φαινολικές ενώσεις ταξινομήθηκαν ως απλές φαινόλες (βανιλλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ), παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (υδροξυτυροσόλη, DAFOA, AFOA), παράγωγα της τυροσόλης (τυροσόλη, AFOA, AFLA), λιγνάνες (1-ακετοξυπινορεσινόλη) και φλαβονοειδή (λουτεολίνη, απιγενίνη). Στα **σχήματα 9.2-9.3** απεικονίζονται τα προφίλ αποδόμησης των φαινολικών ενώσεων κατά το τηγάνισμα για τις ποικιλίες Λιανολιά και Κορωνέικη αντίστοιχα.



Σχήμα 9.2: Μεταβολές στη φαινολική σύσταση παρθένων ελαιολάδων της ποικιλίας Λιανολιά κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος στους 180 °C.



Σχήμα 9.3: Μεταβολές στη φαινολική σύσταση παρθένων ελαιολάδων της ποικιλίας Κορωνέικη κατά τη διάρκεια του τηγανίσματος στους 180 °C.

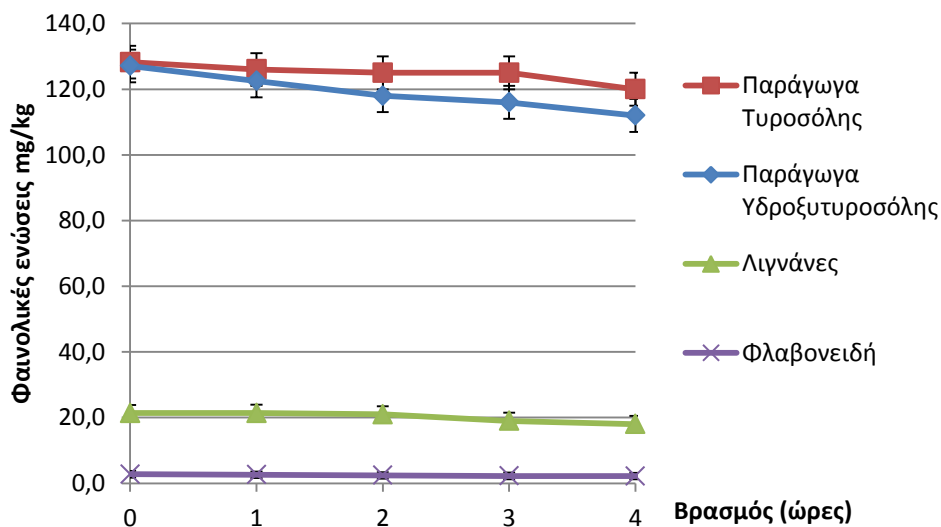
Οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων ήταν μικρότερες από 10%. Οι φαινολικές ενώσεις, όπως ήταν αναμενόμενο, μειώθηκαν κατά το τηγάνισμα ωστόσο η μείωση που παρατηρήθηκε ήταν διαφορετική για τις επιμέρους κατηγορίες των ενώσεων αυτών. Μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης. Συγκεκριμένα, μετά από 30 λεπτά τηγανίσματος τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης μειώθηκαν κατά 60%. Αντίθετα, στον ίδιο χρόνο, τα παράγωγα τυροσόλης φαίνεται να παρουσιάζουν μείωση 15%, η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0,05$). Μετά από 60 λεπτά τηγανίσματος, τόσο στα παράγωγα υδροξυτυροσόλης όσο και στα παράγωγα τυροσόλης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p<0,05$) που έφτασε το 90% και 40% αντίστοιχα. Οι λιγνάνες, επίσης παρουσίασαν ελάττωση η οποία έφτασε μέχρι και 40% στα 60 λεπτά στα δείγματα της Λιανολιάς. Ο ρυθμός αποδόμησης των παραγώγων της υδροξυτυροσόλης ήταν μεγαλύτερος στα δείγματα της Λιανολιάς (τα οποία είχαν και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αυτά τα παράγωγα) σε σχέση με αυτά της Κορωνέικης.

Παρόμοια συμπεριφορά στη μείωση των φαινολικών ενώσεων έχει παρατηρηθεί και σε άλλες έρευνες. Συγκεκριμένα, μετά από θερμική επεξεργασία εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου από την Ιταλία (της ποικιλίας Bertolli), σε φούρνο στους 180 °C για 2 ώρες, παρατηρήθηκε ολική μείωση των παραγώγων υδροξυτυροσόλης, ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζονται οι λιγνάνες (Carrasco-Pancorbo et al., 2007b).

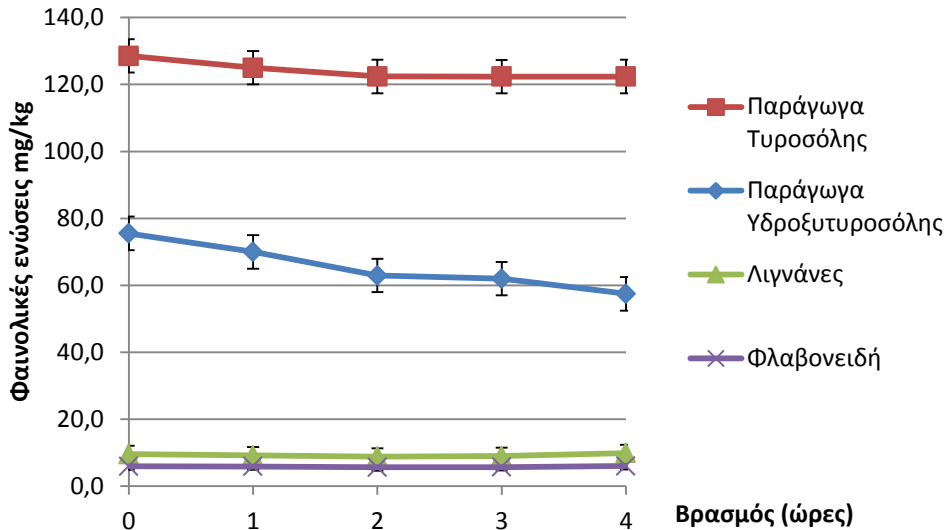
Αντίθετα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ελαιόλαδα των διαδεδομένων ποικιλιών της Ισπανίας, Arbequina και Picual, η απώλεια των φαινολικών ενώσεων φάνηκε να προχωρά με πολύ μικρότερο ρυθμό (Brenes et al., 2002a). Συγκεκριμένα, οι *ο*-διφαινόλες αποδομήθηκαν πλήρως σε διάστημα μεταξύ 5-15 ωρών. Η Picual χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη αναλογία ελαϊκού/λινολενικού οξέος (ελαϊκό/λινολενικό οξύ: 24) σε σχέση με τη Κορωνέικη (ελαϊκό/λινολενικό οξύ: 12). Πρέπει να τονιστεί επίσης ότι στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε διαφορετική ποσότητα ελαιολάδου (διαφορά στην αναλογία επιφάνεια/όγκος) και η θερμική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε Rancimat στους 180 °C. Επιπλέον, στην προαναφερθείσα εργασία, η συγκέντρωση των παραγώγων υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά κατά την διάρκεια των πρώτων 5 ωρών θέρμανσης γεγονός που στηρίζει την υπόθεση ότι τα οξειδωμένα προϊόντα που σχηματίζονται κατά τη θέρμανση συνεκλύστηκαν και προσδιορίστηκαν μαζί με την DAFOA και την DAFLA.

9.3.4 Μεταβολές στη φαινολική σύσταση των παρθένων ελαιολάδων κατά τη διάρκεια του βρασμού

Κατά τη θέρμανση των ελαιολάδων στους 100 °C (συνθήκες βρασμού) οι φαινολικές ενώσεις φάνηκε να παραμένουν αρκετά σταθερές **σχήματα 9.4-9.5**. Ακόμη και μετά από 4 ώρες βρασμού, μόνο τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης μειώθηκαν κατά 20% (στατιστικώς σημαντική μείωση, $p < 0,05$) και στις δύο ποικιλίες, ενώ όλες οι άλλες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων παρέμειναν στα αρχικά τους επίπεδα. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με παλαιότερες παρατηρήσεις, όπου παρθένο ελαιόλαδο είχε θερμανθεί σε φούρνο για διάστημα μεγαλύτερο των 9 ωρών (Nissiotis & Tasioula-Margari, 2002). Στην βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ότι κατά τον βρασμό ενός μίγματος από παρθένο ελαιόλαδο και νερό σε χύτρα ταχύτητας για 30 λεπτά, όταν το pH είναι μικρότερο από 6, πραγματοποιείται υδρόλυση των παραγώγων της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης χωρίς όμως περαιτέρω αποδόμηση των φαινολών ενώσεων που προκύπτουν (Brenes et al., 2002a). Το γεγονός, ότι κατά τη διάρκεια του βρασμού παρατηρούνται μικρές απώλειες σε φαινολικές ενώσεις, είναι μεγάλης σημασίας λόγω των ευεργετικών επιδράσεων των φαινολικών ενώσεων στην υγεία, που επανειλημμένα έχουν μελετηθεί τα τελευταία χρόνια (Covas et al., 2006a; Servili et al., 2004; Visioli et al., 2002)



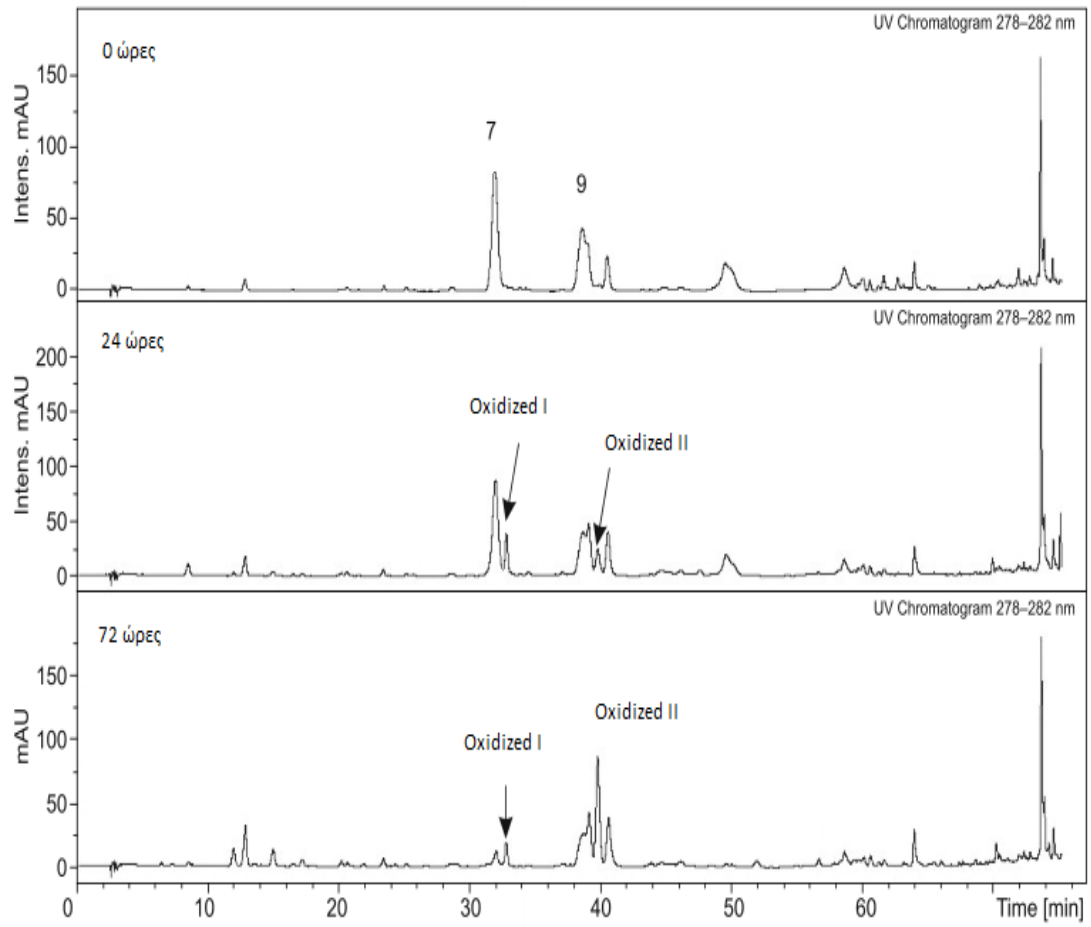
Σχήμα 9.4: Μεταβολές των φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου της ποικιλίας Λιανολιά κατά τη θέρμανση στους 100 °C.



Σχήμα 9.5: Μεταβολές των φαινολικών ενώσεων ελαιολάδου της ποικιλίας Κορωνέικη κατά τη θέρμανση στους 100 °C.

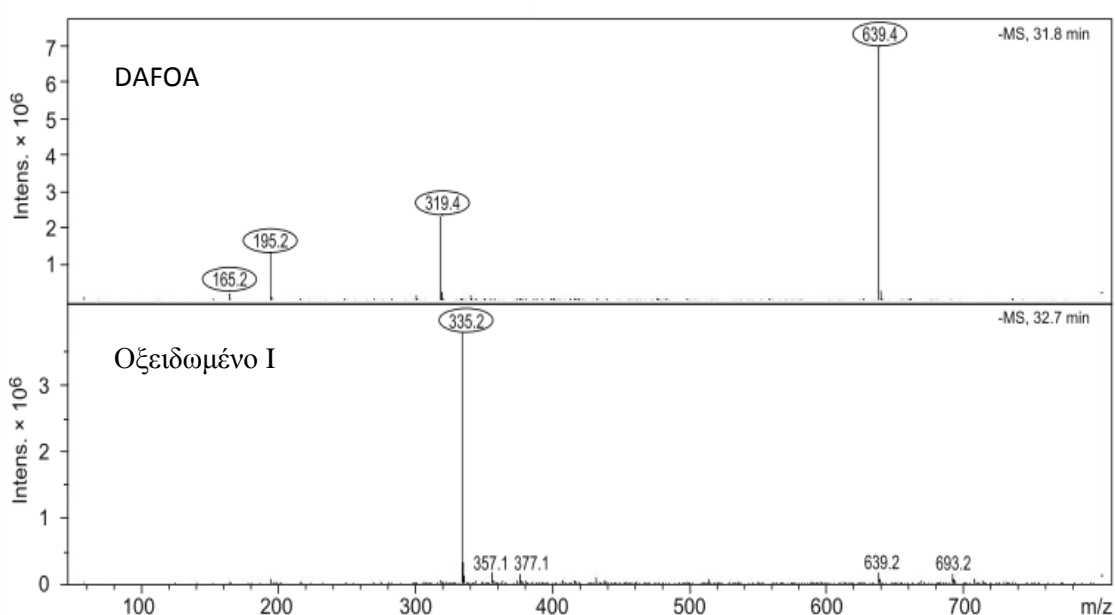
9.3.5 Ταυτοποίηση των οξειδωμένων φαινολικών προϊόντων

Με στόχο τη ταυτοποίηση των οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων, ένα δείγμα θερμάνθηκε στον φούρνο στους 100°C για 72 ώρες. Στο **σχήμα 9.6** απεικονίζεται ο σχηματισμός των οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η δομή των προϊόντων οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε HPLC-MS σε συνθήκες αρνητικού ιονισμού. Οι φαινολικές ενώσεις δίνουν κορυφές μικρότερης έντασης σε αρνητικό ιονισμό σε σχέση με θετικό ιονισμό, παρόλα αυτά, τα φάσματα που λαμβάνονται είναι πιο καθαρά. Η ταυτοποίηση των φαινολικών ενώσεων βασίζεται σε ψευδομοριακά ιόντα [M-H]⁻, διμερή και θραύσματα (de la Torre-Carbot et al., 2005).



Σχήμα 9.6: Εμφάνιση των οξειδωμένων προϊόντων κατά τη διάρκεια θέρμανσης στους 100 °C.

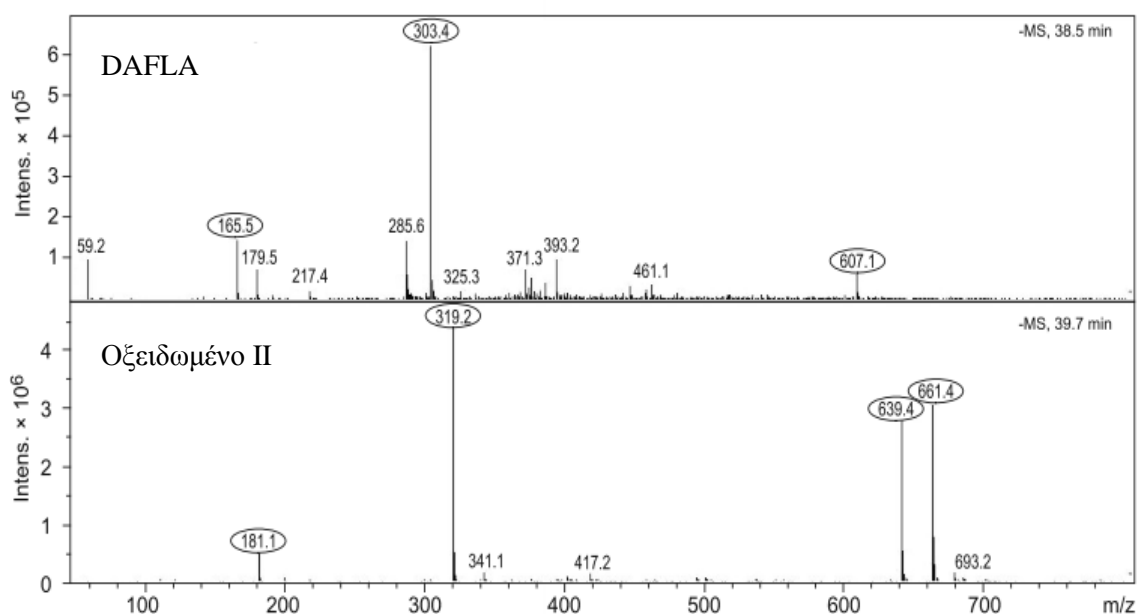
Το παράγωγο της ελαιοευρωπαϊνης που βρέθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (κορυφή 7, σχήμα 9.1) είχε ένα αποπρωτονιωμένο μόριο με 319 m/z , το οποίο αντιστοιχεί στην DAFOA (σχήμα 9.7). Το ιόν που παρατηρείται με 639 m/z είναι διμερές της πρώτης ένωσης. Το ιόν με 195 m/z μπορεί να ερμηνευτεί ως το θραύσμα οξικού εστέρα της υδροξυτυροσόλης και το ιόν με 165 m/z ως εναπομείναν θραύσμα της DAFOA μετά από απομάκρυνση της υδροξυτυροσόλης (MB: 154). Το φάσμα μάζας του πρώτου οξειδωμένου προϊόντος (σχήμα 9.7) έδειξε ένα χαρακτηριστικό ιόν με 335 m/z , το οποίο μπορεί να εξηγηθεί ως το ιόν με 319 m/z + οξυγόνο, ενώ δεν παρατηρήθηκαν άλλα θραύσματα.



Σχήμα 9.7: Φάσματα μάζας της διαλδευδικής μορφής της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης (DAFOA) και του οξειδωμένου προϊόντος της.

Το παράγωγο του λιγκστροζίτη, που βρέθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (κορυφή 9, σχήμα 9.1), είχε ένα αποπρωτονιωμένο μόριο με 303 m/z , το οποίο αντιστοιχεί στην DAFLA (σχήμα 9.8). Το ιόν που παρατηρείται με 607 m/z είναι διμερές της DAFLA. Το ιόν με 165 m/z είναι το εναπομείναν θραύσμα της DAFLA μετά από απομάκρυνση της τυροσόλης (MB: 138). Το φάσμα μάζας του δεύτερου οξειδωμένου προϊόντος (σχήμα 9.8) έδειξε ένα χαρακτηριστικό ιόν με 319 m/z (το ιόν με 303 m/z + οξυγόνο), με περαιτέρω θραυσματοποίηση 181 m/z το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο αποκαρβοξυλιωμένο ελενολικό οξύ. Το διμερές με 639 m/z προέρχεται από το ιόν με 319 m/z . Αυτές οι παρατηρήσεις συμφωνούν με τα δεδομένα που δίνονται στη

βιβλιογραφία για τα συγκεκριμένα οξειδωμένα προϊόντα (Ríos et al., 2005; Rovellini & Cortesi, 2002).



Σχήμα 9.8: Φάσματα μάζας της διαλδευδικής μορφής της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη (DAFLA) και του οξειδωμένου προϊόντος της.

Πρέπει να τονιστεί ότι το οξειδωμένο προϊόν II έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με την πινορεσινόλη και στις δύο στήλες που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό. Συνεπώς, οι μεγάλες διαφορές που έχουν εντοπιστεί, σε παλιότερες εργασίες με τη χρήση NMR και HPLC-UV, στη συγκέντρωση των λιγνάνων, μπορεί να οφείλονται στην εσφαλμένη εκτίμηση του οξειδωμένου προϊόντος II ως πινορεσινόλη (Dais et al., 2007).

Ο σχηματισμός των οξειδωμένων προϊόντων και η εκτίμηση τους, μαζί με την μη οξειδωμένη DAFOA μπορεί να είναι ο λόγος για διάφορες άλλες αποκλίσεις που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών των φαινολικών ενώσεων, οι *o*-διφαινόλες εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντοχή στη θέρμανσης με μικροκύματα (εφαρμογή για διάστημα 15 λεπτών), ωστόσο το ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν ήταν παρθένο ελαιόλαδο, όπως διαπιστώνεται και από τον αριθμό υπεροξειδίων που ήταν μεγαλύτερος από 20 meq/kg. Επιπλέον, η διευρυμένη κορυφή της DAFOA και οι μικρές συγκεντρώσεις των παραγώγων της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

υποδεικνύουν προχωρημένο βαθμό οξείδωσης (Cerretani, Bendini, Rodriguez-Estrada, Vittadini, & Chiavaro, 2009).

9.4 Συμπεράσματα

Δείγματα παρθένου ελαιολάδου από τις ποικιλίες Λιανολιά και Κορωνέικη επεξεργάστηκαν θερμικά ώστε να καταγραφούν οι μεταβολές στη φαινολική σύσταση.

Τα συμπεράσματα της μελέτης ήταν τα ακόλουθα:

- Κατά το τηγάνισμα (180 °C, 1 ώρα), το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο μειώθηκε σημαντικά. Στα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης η μείωση έφτασε το 90%, ενώ τα παράγωγα της τυροσόλης και οι λιγνάνες μειώθηκαν κατά 40%. Η συγκέντρωση των φλαβονοειδών δεν μεταβλήθηκε.
- Κατά τη διάρκεια του βρασμού (100 °C, 4 ώρες), οι φαινολικές ενώσεις έδειξαν μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με το τηγάνισμα. Σε αυτή τη περίπτωση, τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης εμφάνισαν επίσης τη μεγαλύτερη μείωση η οποία έφτασε το 20%. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα παράγωγα της τυροσόλης, στις λιγνάνες και στα φλαβονοειδή δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.
- Κατά τη θερμική επεξεργασία των παρθένων ελαιολάδων ταυτοποιήθηκαν 2 οξειδωμένες μορφές των σεκοϊριδοειδών.
- Προτείνεται κυρίως η ωμή κατανάλωση του παρθένου ελαιολάδου για την διατροφική λήψη της μέγιστης ποσότητας φαινολικών συστατικών. Ωστόσο, από όσα προκύπτουν, κατά τη διάρκεια του βρασμού η απώλεια σε φαινολικές ενώσεις δεν είναι σημαντική, έτσι ένα παρθένο ελαιόλαδο με υψηλή αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις είναι ικανό να διατηρεί μεγάλο μέρος της βιολογικής του αξίας ακόμη και μετά από 4 ώρες βρασμού.

Κεφάλαιο 10

Μεταβολές στη φαινολική σύσταση ελαιολάδων από διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες κατά την αποθήκευση

10.1 Εισαγωγή

Το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) υψηλής ποιότητας αποτελεί σημαντικό συστατικό της μεσογειακής διατροφής, όχι μόνο λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων του για την υγεία αλλά και λόγω των ιδιαίτερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Τόσο οι βιολογικές όσο και οι οργανοληπτικές ιδιότητες σχετίζονται με κάποιες ενώσεις οι οποίες βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση. Μεταξύ αυτών, οι τοκοφερόλες (βιταμίνη E), οι οποίες είναι λιπόφιλες λόγω της παρουσίας μιας υδρόφοβης πλευρικής αλυσίδας στο μόριό τους, είναι σημαντικές για τις θρεπτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ οι υδρόφιλες φαινόλες συμβάλλουν όχι μόνο στις βιολογικές ιδιότητες και στην οξειδωτική σταθερότητα του παρθένου ελαιολάδου, αλλά και στη γεύση (πικρά και πικάντικα χαρακτηριστικά) (Bendini et al., 2007; Esti et al., 2009; Servili et al., 2004; Tasioula-Margari, 2011).

Το 2011, η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA), βασισμένη σε πολλές επιστημονικές μελέτες (Covas et al., 2006a; de la Torre-Carbot et al., 2010), ενέκρινε έναν ισχυρισμό υγείας, σύμφωνα με τον οποίο η διατροφική πρόσληψη των πολυφαινολών του παρθένου ελαιολάδου μπορεί να εμποδίσει την οξείδωση της LDL (EFSA, 2011). Η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά της είναι οι κύριες ενώσεις με αυτή τη δράση και έτσι προκειμένου κάποιο παρθένο ελαιόλαδο να μπορεί να υποστηρίξει τον ισχυρισμό, θα πρέπει να περιέχει ποσότητα ικανή να παρέχει 5mg αυτών των ενώσεων ημερησίως.

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των παρθένων ελαιολάδων οι φαινολικές ενώσεις υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές, που οφείλονται σε οξειδωτικές και υδρολυτικές αντιδράσεις (Brenes et al., 2001; Daskalaki et al., 2009). Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη φαινολική σύσταση των αποθηκευμένων ελαίων είναι

η θερμοκρασία, το φως, η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο, η συσκευασία και η διάρκεια αποθήκευσης (Cinquanta et al., 1997; Kanavouras, Hernandez-Munoz, & Coutelieris, 2006; Okogeri & Tasioula-Margari, 2002; Pristouri et al., 2010). Η αναλογία μεταξύ των απλών φαινολών και συγκεκριμένων παραγώγων, που σχηματίζονται με υδρόλυση ή οξείδωση, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό της ηλικίας του παρθένου ελαιολάδου (Bendini et al., 2009). Κατά τη διάρκεια της αυτοοξείδωσης και θερμοοξείδωσης έχει επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός διάφορων οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων (Daskalaki et al., 2009; Ríos et al., 2005). Η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγα αυτής είναι πιο επιρρεπή στην οξειδωτική αποδόμηση από τα παράγωγα της τυροσόλης σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης (Nissiotis & Tasioula-Margari, 2002). Η διαδικασία της οξείδωσης και της υδρόλυσης των φαινολικών ενώσεων του παρθένου ελαιολάδου σε συνθήκες εμπορικής αποθήκευσης διαφέρει από αυτή που παρατηρείται σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης (Lavelli et al., 2006).

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία του φαινολικού κλάσματος, όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, τις οργανοληπτικές ιδιότητες και τα οφέλη στην υγεία, οι μεταβολές αυτών των ενώσεων συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, αποτελούν σημαντικό κριτήριο ποιότητας του παρθένου ελαιολάδου. Αντικείμενο της έρευνας ήταν η καταγραφή των μεταβολών στη φαινολική σύσταση ελαιολάδων διαφορετικών ελληνικών ποικιλιών κατά την αποθήκευση.

10.2 Μέθοδοι και υλικά

10.2.1 Δείγματα ελαιολάδου και συνθήκες αποθήκευσης

Τα δείγματα ελαιολάδου συλλέχτηκαν από περιοχές της δυτικής Ελλάδας κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2007-2008 και 2010-2011: Κορωνέικη από Ζάκυνθο και Κεφαλονιά (n=14), Λιανολιά από Κέρκυρα και Πρέβεζα (n=8), Ασπρολιά από Λευκάδα (n=8), Θιακή από Κεφαλονιά (n=6) και Ντόπια ποικιλία Ζακύνθου (n=6). Η παραλαβή του ελαιολάδου έγινε σε φυγοκεντρικά συστήματα δύο και τριών φάσεων. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από Νοέμβριο ως τέλος Ιανουαρίου. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα που ανήκαν στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Τα αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων δίνονται στο **παράρτημα 2**. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια (κενό 0,5%) και αποθηκεύτηκαν σε υπόγειο χωρίς θέρμανση για 18 μήνες. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης οι θερμοκρασίες ήταν γενικά χαμηλότερες από 18 °C (12 ±

6 °C), εκτός από την περίοδο του καλοκαιριού όπου η θερμοκρασία έφτασε τους 25 °C (20 ± 5 °C). Αυτές οι συνθήκες αντιπροσωπεύουν ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης.

10.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες

Η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το εξάνιο και το νερό που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων αλλά και για τον χρωματογραφικό προσδιορισμό ήταν HPLC καθαρότητας από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για τη ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων ήταν: υδροξυτυροσόλη από την Extrasynthese (Genay, Γαλλία), τυροσόλη (για την ποσοτικοποίηση των παραγώγων τυροσόλης) από τη Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία), ελαιοευρωπαϊνή (για την ποσοτικοποίηση των παραγώγων υδροξυτυροσόλης) από την Extrasynthese (Genay, Γαλλία), βανιλικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, λουτεολίνη και απιγενίνη από την Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Γερμανία) και πινορεσινόλη (για την ποσοτικοποίηση της 1-ακετοξυπινορεσινόλης και της συριγγαρεζινόλης) από την Separation Research (Turku, Φιλανδία). Τέλος, το *p*-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο.

10.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας

Οι προσδιορισμοί του αριθμού υπεροξειδίων, της ελεύθερης οξύτητας και των ειδικών συντελεστών απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του Κανονισμού της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC, 1991) όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.4).

10.2.4 Εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων

Η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.5).

10.2.5 HPLC-UV and LC-DAD-MS analysis

Η οργανολογία, ο ποσοτικός και ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.6). Διαφορά υπήρξε στο πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης το οποίο διαμορφώθηκε ως εξής:

- Αρχικές συνθήκες: 95% A και 5% B,

- 70% A και 30% B στα 20 λεπτά,
- 65% A και 35% B στα 25 λεπτά,
- 60% A και 40% B στα 45 λεπτά,
- 30% A και 70% B στα 60 λεπτά,
- 0% A και 100% B στα 65 λεπτά και διατήρηση μέχρι τα 75 λεπτά και τέλος
- επιστροφή στις αρχικές συνθήκες στα 80 λεπτά.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικών προτύπων, όπως περιγράφεται στο **κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.6)**, με κάποιες προσθήκες και τροποποιήσεις. Στις περιπτώσεις ενώσεων όπου δεν υπήρχαν τα αντίστοιχα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα της ίδιας ομάδας και έγινε προσαρμογή των προτύπων εξισώσεων πολλαπλασιάζοντας με την αναλογία των μοριακών βαρών των ενώσεων ως εξής: Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τυροσόλης και των παραγώγων αυτής, διαλδεϋδική (DAFLA) και αλδεϋδική (AFLA) μορφή του λιγκστροζίτη και των οξειδωμένων προϊόντων αυτών, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη τυροσόλη. Η πρότυπη υδροξυτυροσόλη χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροξυτυροσόλης και του οξικού εστέρα της υδροξυτυροσόλης. Ο γλυκοζίτης της ελαιοευρωπαϊνης χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγώγων της ελαιοευρωπαϊνης, διαλδεϋδική (DAFOA) και αλδεϋδική (AFOA) μορφή της ελαιοευρωπαϊνης και των οξειδωμένων προϊόντων αυτών. Η πρότυπη πινορεσινόλη χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 1-ακετοξυπινορεσινόλης και της συριγγαρεζινόλης. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών οξέων (βανιλικό, κουμαρικό και φερουλικό οξύ) και των φλαβονοειδών (λουτεολίνη και απιγενίνη) χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα.

10.2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) και ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (LRA), χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 19.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, έγινε με εφαρμογή one-way ANOVA με έλεγχο της πραγματικής σημαντικής διαφοράς του Tukey, σε 95 % όρια εμπιστοσύνης.

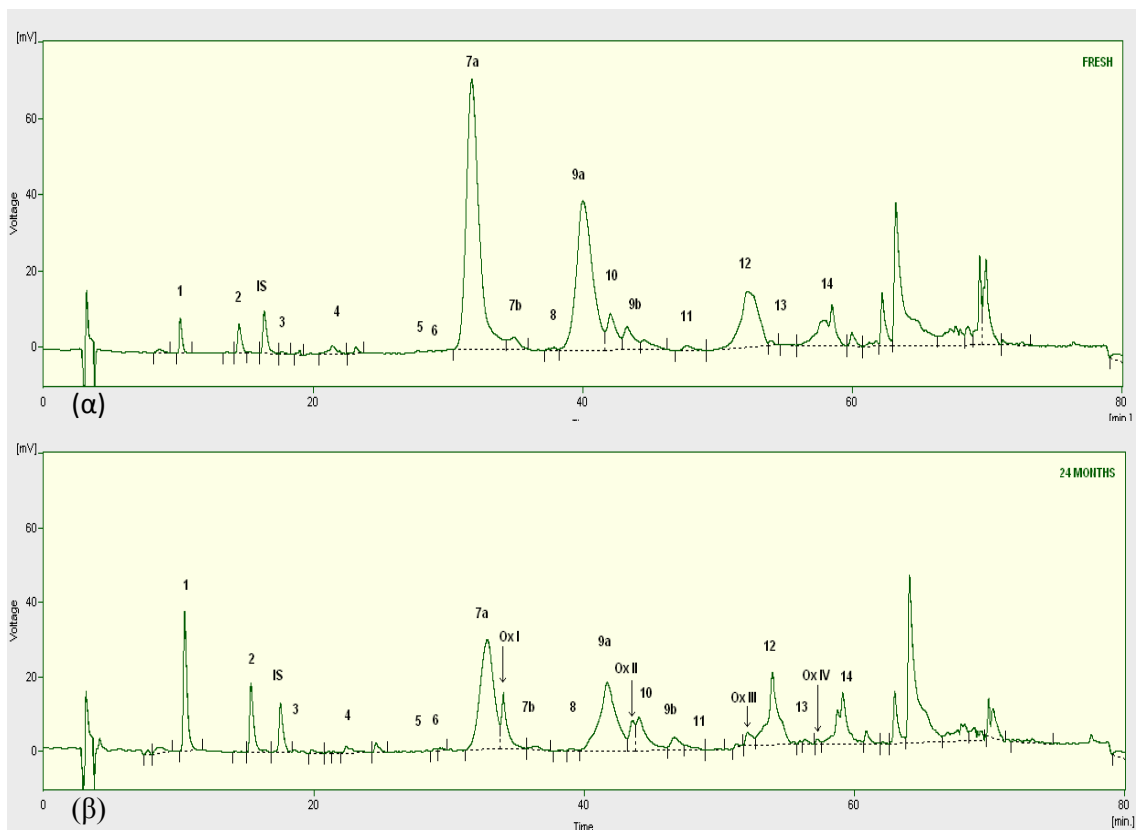
10.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

10.3.1 Σύσταση δειγμάτων ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθούν οι αλλαγές στη σύσταση σε φαινολικές ενώσεις κατά την αποθήκευση ανήκαν σε πέντε ελληνικές ποικιλίες ελιάς και ήταν όλα κατηγορίας εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου σύμφωνα με τα όρια που έχουν καθοριστεί από τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC, 1991).

Στο **σχήμα 10.1** απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα (στα 280 nm) παρθένου ελαιολάδου πριν και μετά την αποθήκευση. Οι φαινολικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά στα δείγματα ήταν: η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη, το βανιλικό οξύ, το *p*-κουμαρικό οξύ, ο οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης, η DAFOA, η AFOA, η DAFLA, η AFLA, η συριγγαρεζινόλη, η πινορεσινόλη, 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η λουτεολίνη και η απιγενίνη.

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στα δείγματα, παρατίθενται στον **πίνακα 10.1**. Τα κύρια παράγωγα της ελαιοευρωπαϊνης είχαν αποπρωτονιωμένα μόρια με 319 και 377 *m/z*, που αντιστοιχούν στις ενώσεις DAFOA (κορυφή 7a) και AFOA (κορυφή 12), αντίστοιχα. Τα κύρια παράγωγα του λιγκστροζίτη είχαν αποπρωτονιωμένα μοριακά ιόντα με 303 και 361 *m/z*, που αντιστοιχούν στις ενώσεις DAFLA (κορυφή 9a) και AFLA (κορυφή 14), αντίστοιχα. Επίσης, βρέθηκε η καρβοξυμεθυλιωμένη μορφή της DAFOA (κορυφή 7b) με ένα αποπρωτονιωμένο μόριο με 377 *m/z*, καθώς και η καρβοξυμεθυλιωμένη μορφή της DAFLA (κορυφή 9b) με ένα αποπρωτονιωμένο μόριο με 361 *m/z*. Τα παραπάνω σεκοϊριδοειδή έχουν περιγραφεί ευρέως στη βιβλιογραφία (Daskalaki et al., 2009; de la Torre-Carbot et al., 2005; Garcia-Villalba et al., 2010; Lozano-Sánchez et al., 2013).



Σχήμα 10.1: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC-UV (280nm) ενός φρέσκου δείγματος (α) και το αντίστοιχο μετά από 24 μήνες αποθήκευσης (β). Η αρίθμηση των κορυφών αντιστοιχεί στις ενώσεις του πίνακα 10.1.

Η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγα αυτής (διακύμανση 35,19-579,02 mg/kg και 114,06-402,07 mg/kg αντίστοιχα), ανήκουν στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών και είναι χαρακτηριστικές ενώσεις του ελαιολάδου (**πίνακας 10.1**). Όσον αφορά τις λιγνάνες, η 1-ακετοξυπινορεσινόλη κυμάνθηκε μεταξύ των 6-20 mg/kg, ενώ η πινορεσινόλη (κορυφή 9a, 357 m/z) είχε τον ίδιο χρόνο έκλουσης με την DAFLA και στις δύο στήλες (Lichrospher and Luna) που χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό και έτσι δεν ποσοτικοποιήθηκε μεμονωμένα. Η συριγγαρεζινόλη, βρέθηκε σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 1,4 mg/kg. Τα φλαβονοειδή, λουτεολίνη και απιγενίνη, βρέθηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις, οι οποίες κυμάνθηκαν μεταξύ 0,11-1,69 mg/kg and 0-1,49 mg/kg αντίστοιχα. Τέλος, τα απλά φαινολικά οξέα (βανιλλικό, *p*-κουμαρικό και φερούλικό οξύ) και ο οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης βρέθηκαν επίσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (μικρότερες από 0,90 mg/kg).

Πίνακας 10.1: Σύσταση ελαιολάδων σε φαινολικές ενώσεις εκφρασμένες ως mg/kg.

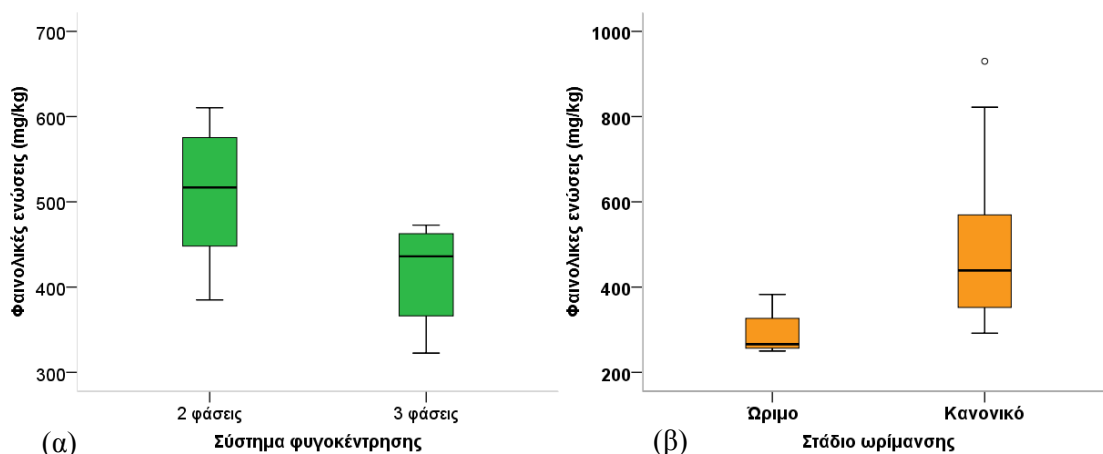
Αρίθμηση	Φαινολικές ενώσεις	m/z	Ντόπια Ζακίνθου (n=6) 2P ^a		Κορωνέικη (n=8) 2P		Κορωνέικη (n=6) 3P ^b		Λιανολιά (n=8) 3P		Ασπρολιά (n=8) 3P		Θιακή (n=6) 3P	
			Κανονικό	Μ.Ο	Εύρος	Κανονικό	Μ.Ο	Εύρος	Κανονικό	Μ.Ο	Εύρος	Κανονικό	Μ.Ο	Εύρος
1	Υδροξυτυροσόλη	153	2,50	0,64-5,98	2,60	0,76-3,67	1,50	0,60-2,81	4,58	0,39-8,86	4,75	2,02-8,40	0,26	0,05 – 0,38
2	Τυροσόλη	137	6,40	3,66-11,32	5,50	3,32-9,74	3,43	0,05-5,11	8,00	2,05-18,70	8,62	3,39-14,13	1,67	0,94 – 2,26
IS	p-υδροξυφαινυλ-οξικό οξύ	151												
3	Βανιλικό οξύ	167	0,14	0,00-0,34	0,20	0,07-0,39	0,13	0,00-0,32	0,35	0,10-0,88	0,10	0,00-0,23	0,06	0,00 – 0,08
4	p-Κουμαρικό οξύ	163	0,09	0,00-0,19	0,10	0,06-0,14	0,05	0,00-0,15	0,12	0,00-0,21	0,09	0,00-0,29	0,01	0,00 – 0,02
5	Φερουλικό οξύ	193	0,04	0,00-0,09	0,02	0,00-0,10	0,00		0,06	0,00-0,12	0,04	0,00-0,10	nd	
6	Οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης	195	0,16	0,00-0,56	0,19	0,00-0,54	0,02	0,00-0,10	0,06	0,00-0,15	0,14	0,00-0,25	0,03	0,00 – 0,06
7a	DAFOA ^c	319	169,06	46,06-319,02	111,74	49,09-171,58	103,03	42,13-171,58	81,87	7,86-119,21	86,23	68,68-146,01	35,72	15,78 – 77,35
7b	DAFOA (καρβοξυμεθυλωμένη)	377												
OX I	Οξειδωμένη μορφή της DAFOA	335	0,00		0,00				0,00		0,00		0,00	
8	Συριγγαρεζινόλη	417	0,30	0,00-0,77	0,14	0,00-0,58	0,13	0,00-0,52	0,65	0,25-1,43	0,41	0,00-0,78	0,66	0,15 – 1,16
9a	DAFLA ^d + Πινορεσινόλη	303, 357	151,45	77,51-244,87	141,74	104,89-174,83	145,31	107,15-203,30	110,89	41,72-151,34	143,65	99,53-151,34	100,63	66,73 – 149,69
9b	DAFLA (καρβοξυμεθυλωμένη)	361												
OX II	Οξειδωμένη μορφή της DAFLA	319	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
10	1-Ακετοξυπινορεσινόλη	415	14,54	9,35-20,08	12,71	9,70-18,24	12,40	7,60-14,97	16,23	11,26-20,53	9,90	7,23-12,32	18,24	12,16 – 24,79
11	Λουτεολίνη	285	0,89	0,21-1,69	0,73	0,51-1,04	0,70	0,36-0,96	0,42	0,11-0,74	0,71	0,42-1,00	0,56	0,34 – 0,83
OX III	Οξειδωμένη μορφή της AFOA ^e	393	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
12	AFOA	377	124,67	61,59-260,61	109,87	79,40-151,00	80,39	51,74-110,00	63,26	46,710-84,50	144,68	110,00-201,50	46,41	19,86 – 60,07
13	Απιγενίνη	269	0,26	0,15-0,48	0,24	0,00-0,81	0,30	0,20-0,41	0,35	0,00-1,24	0,44	0,30-0,62	0,57	0,00 – 1,49
OX IV	Οξειδωμένη μορφή της AFLA ^f	377	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
14	AFLA	361	90,13	71,56-120,65	123,12	88,29-160,00	105,00	85,00-130,00	60,12	48,25-69,44	165,34	110,00-213,24	88,94	70,00 – 109,71
1, 6, 7a, 7b, 12	Παράγωγα υδροξυτυροσόλης		259,82	109,58-579,02	223,92	144,85-299,04	145,45	110,86-213,84	163,61	117,37-209,12	235,65	186-355,91	82,40	35,68 – 132,72
2, 9a, 9b, 14	Παράγωγα τυροσόλης		247,98	176,19-364,89	270,36	224,21-298,28	253,74	197,20-293,18	194,03	161,94-216,45	317,61	218,96-402,07	191,24	153,99 – 231,50
	Σύνολο φαινολικών ενώσεων		559,88	299,05 – 929,75	481,33	384,96-610,33	412,76	322,57-472,72	376,33	324,27-447,01	564,65	414,62-769,49	293,11	250,77-382,80

^a 2P, φυγοκεντρικό σύστημα 2 φάσεων. ^b 3P, φυγοκεντρικό σύστημα 3 φάσεων

^c DAFOA, Διαλδευδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊκής. ^d DAFLA, Διαλδευδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη. ^e AFOA, Αλδευδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊκής.

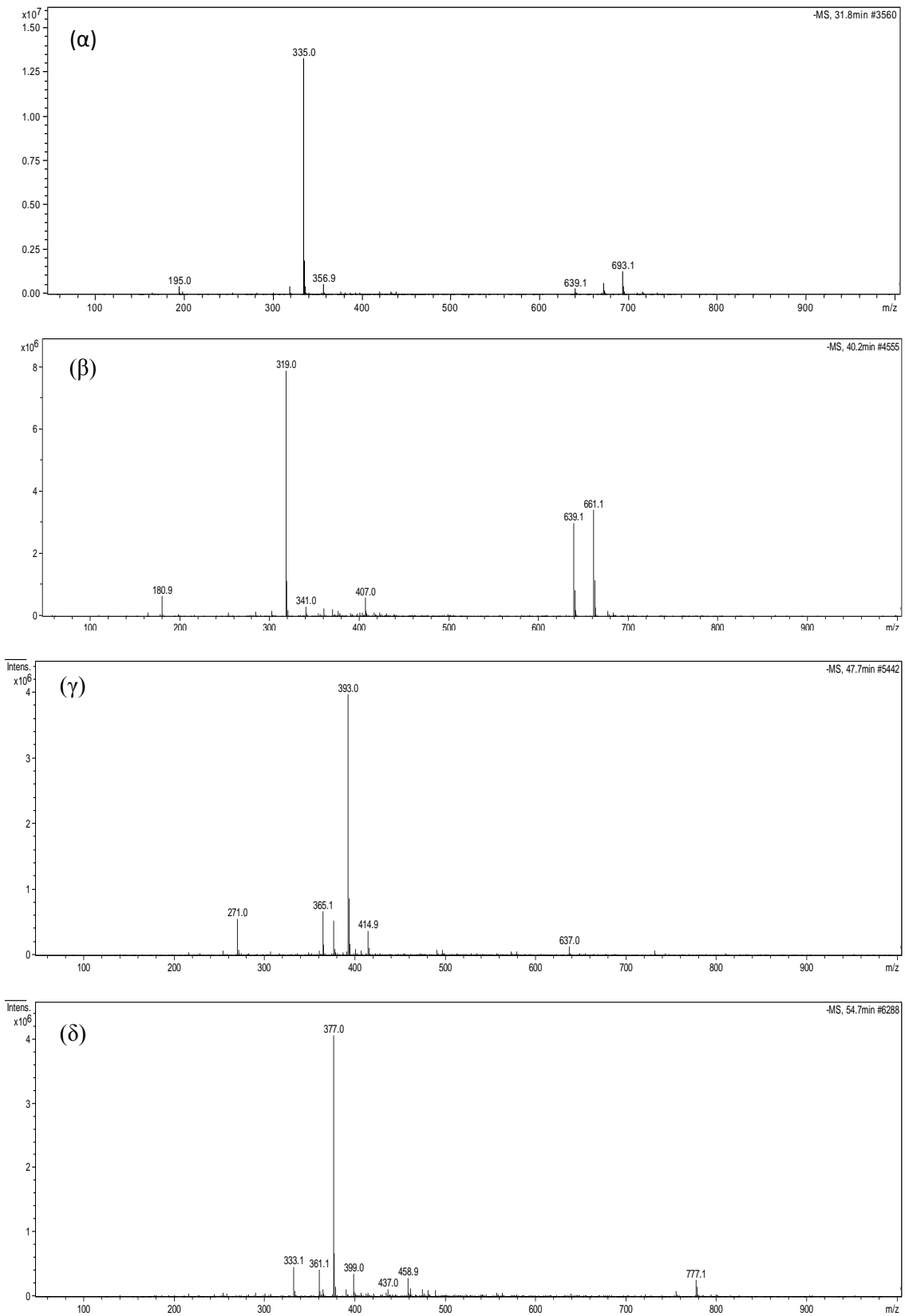
^f AFLA Διαλδευδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη

Τα δείγματα που αναλύθηκαν κάλυπταν ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων σε ολικές φαινολικές ενώσεις (250-930 mg/kg). Τα ελαιόλαδα της Ντόπιας Ζακύνθου και της Ασπρολιάς περιείχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε φαινολικές ενώσεις (μέσες τιμές 559,88 και 564,65 mg/kg), ενώ ακολουθούσαν τα ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη (2 και 3^{ov} φάσεων) και Λιανολιά (481,33, 412,76 και 376,33 mg/kg αντίστοιχα). Τέλος, τα ελαιόλαδα της ποικιλίας Θιακής περιείχαν τις χαμηλότερες ποσότητες φαινολικών ενώσεων (μέση τιμή 293,11 mg/kg). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην ολική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων επιβεβαιώνουν την επίδραση του συστήματος εξαγωγής, της ποικιλία της ελιάς και του σταδίου ωρίμανσης. Συγκρίνοντας τη ποσότητα σε φαινολικές ενώσεις των ελαιολάδων της ποικιλίας Κορωνέικη παρατηρήθηκε ότι τα ελαιόλαδα με υψηλότερες περιεκτικότητες ελήφθησαν σε φυγοκεντρικά συστήματα δύο φάσεων (**σχήμα 10.2α**). Οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων που λαμβάνονται στο ίδιο σύστημα εκχύλισης (σύστημα 2 φάσεων: Ντόπια Ζακύνθου και Κορωνέικη, σύστημα 3^{ov} φάσεων: Ασπρολιά, Λιανολιά και Κορωνέικη) επιβεβαιώνουν την επίδραση του γονότυπου. Τέλος, η χαμηλή περιεκτικότητα της ποικιλίας Θιακή σε φαινολικές ενώσεις μπορεί να αποδοθεί τόσο στο στάδιο ωρίμανσης του καρπού όσο και στο σύστημα εκχύλισης (**σχήμα 10.2β**).



Σχήμα 10.2: Διακύμανση του συνόλου σε φαινολικές ενώσεις ελαιολάδων που παρελήφθησαν διαφορετικά συστήματα φυγοκέντρισης (α) και σε διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης (β).

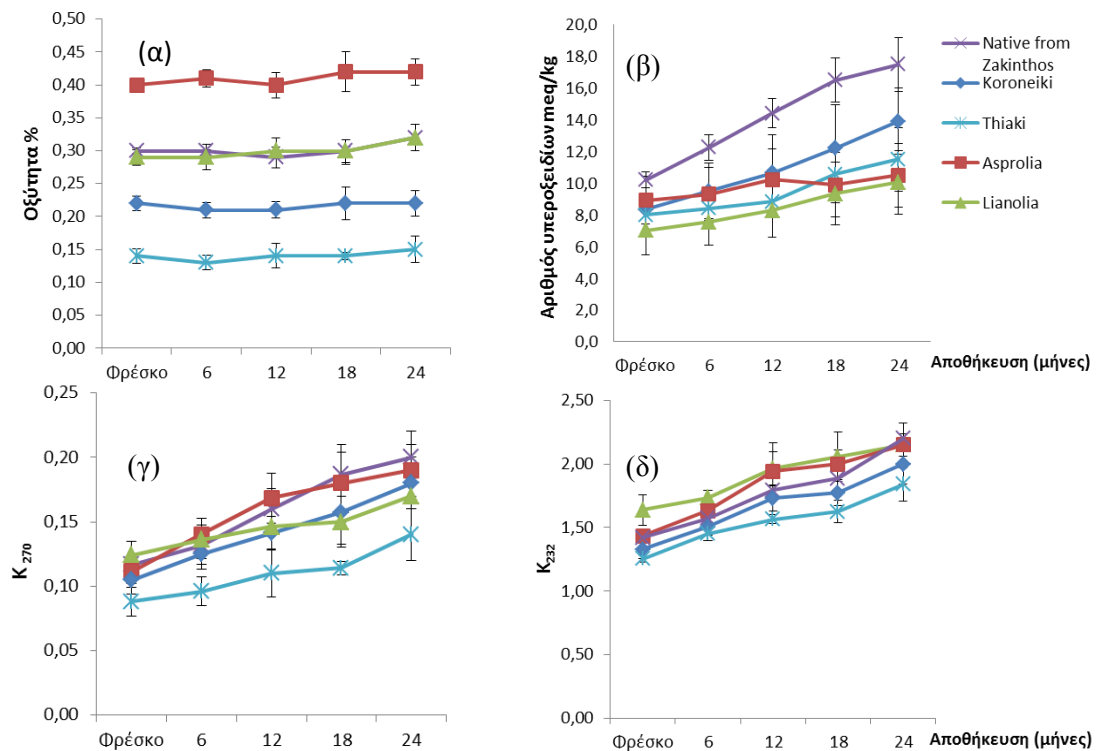
Επιπλέον όπως φαίνεται στο **σχήμα 10.1β** στα αποθηκευμένα δείγματα ανιχνεύτηκαν και τέσσερις οξειδωμένες φαινολικές ενώσεις. Τα φάσματα μάζας αυτών δίνονται στο **σχήμα 10.3**. Το φάσμα μάζας του πρώτου οξειδωμένου προϊόντος (Ox I) έδειξε ένα χαρακτηριστικό μοριακό ιόν με $335 m/z$, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το $319 m/z$ (μοριακό ιόν DAFOA) + οξυγόνο. Το φάσμα μάζας του δεύτερου οξειδωμένου προϊόντος (Ox II) έδειξε ένα χαρακτηριστικό μοριακό ιόν με $319 m/z$ που είναι το ιόν $303 m/z$ (μοριακό ιόν DAFLA) + οξυγόνο. Το φάσμα μάζας του τρίτου οξειδωμένου προϊόντος (Ox III) έδειξε ένα χαρακτηριστικό μοριακό ιόν με $393 m/z$, που είναι το ιόν $377 m/z$ (μοριακό ιόν AFOA) + οξυγόνο. Τέλος, το φάσμα μάζας του τέταρτου οξειδωμένου προϊόντος (Ox IV) έδειξε ένα χαρακτηριστικό μοριακό ιόν $377 m/z$, που είναι το ιόν $361 m/z$ (μοριακό ιόν AFLA) + οξυγόνο. Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας και τα οποία αφορούν οξειδωμένα προϊόντα σε θερμοοξειδωμένα (Lerma-Garcia, Herrero-Martinez, Simo-Alfonso, Lercker, & Cerretani, 2009a; Ríos et al., 2005), θερμασμένα ή αποθηκευμένα ελαιόλαδα (Daskalaki et al., 2009), καθώς και τις αυτοοξειδωμένες πρότυπες ενώσεις DAFOA και AFOA (Di Maio et al., 2013).



Σχήμα 10.3: Φάσματα μάζας των οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων, Ox I (α), Ox II (β), Ox III (γ) and Ox IV (δ).

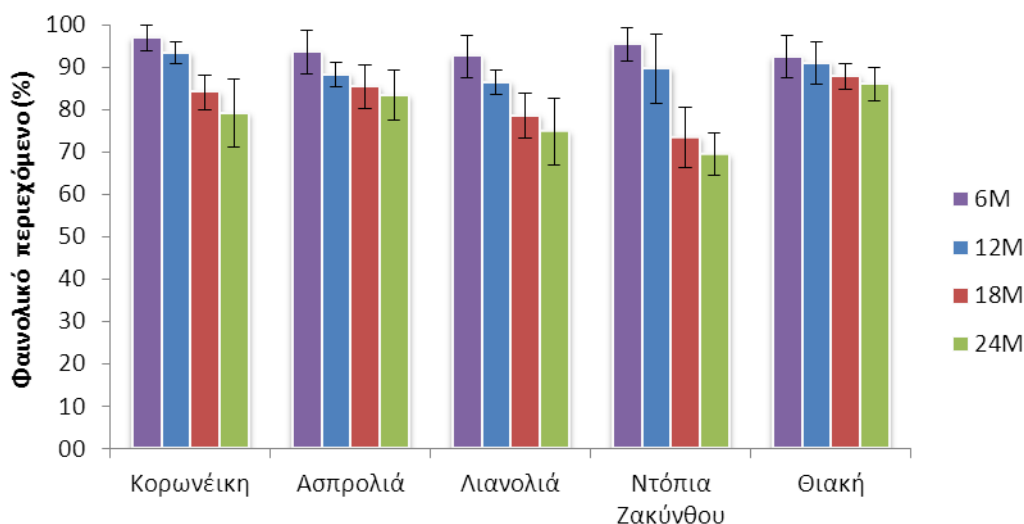
10.3.2 Μεταβολές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και στο συνολικό περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις των ελαιολάδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε γυάλινα μπουκάλια (κενό: 0,5%) σε υπόγειο χωρίς θέρμανση για μια περίοδο 24 μηνών. Οι συνθήκες περιλάμβαναν θερμοκρασίες 12 ± 6 °C, από Σεπτέμβριο έως Ιούνιο και 20 ± 5 °C από τον Ιούλιο μέχρι και τον Αύγουστο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οι ελεύθερες οξυττες δεν μεταβλήθηκαν, ενώ οι συντελεστές απόσβεσης και οι αριθμοί υπεροξειδίων αυξήθηκαν σταδιακά (σχήμα 10.4). Ωστόσο, ακόμα και μετά από 24 μήνες, κανένα από τα δείγματα δεν υπερέβη τα ανώτατα όρια που έχουν καθοριστεί για το παρθένο ελαιόλαδο από τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, γεγονός που δείχνει ότι η οξείδωση του ελαιολάδου προχώρησε σε πολύ αργό ρυθμό. Η σταθερότητα των δειγμάτων μπορεί να αποδοθεί στις συνθήκες αποθήκευσης καθώς και στα άριστα χαρακτηριστικά ποιότητας (παράστημα 2) των φρέσκων δειγμάτων, παράμετροι που συνέβαλαν στο να περιοριστεί η οξείδωση.



Σχήμα 10.4: Μεταβολές στην οξύτητα (α), στους αριθμούς υπεροξειδίων (β) και στους συντελεστές απόσβεσης K₂₇₀ (γ) και K₂₃₂ (δ) κατά την αποθήκευση.

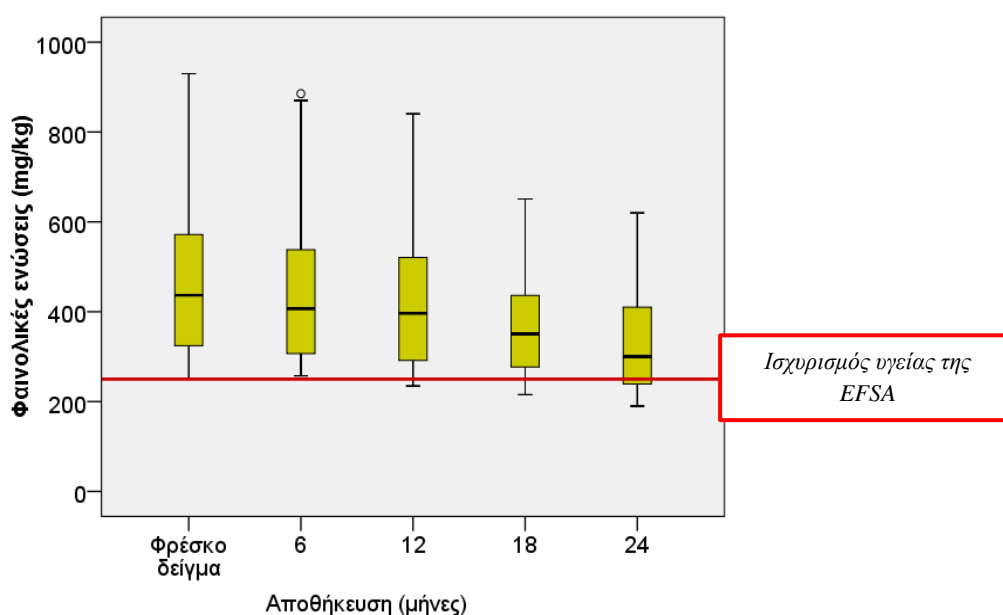
Οι αλλαγές στην περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιολάδου είναι αποτέλεσμα οξειδωτικής και υδρολυτικής δραστηριότητας. Η μείωση των συνολικών φαινολικών ενώσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική τους πρώτους 6 μήνες αποθήκευσης. Μετά από 12 μήνες αποθήκευσης οι ποσοστιαίες μειώσεις στο σύνολο των φαινολικών ενώσεων των ελαιολάδων σε σχέση με την ποικιλία, διακυμάνθηκαν ως εξής: Λιανολιά 14%, Ασπρολιά 11%, Ντόπια Ζακύνθου 10%, Κορωνέικη 7% και Θιακή 7% (**σχήμα 10.5**). Στους 18 μήνες αποθήκευσης, διάστημα το οποίο γενικά θεωρείται ως η μέγιστη περίοδος διατήρησης του ελαιολάδου από την εμφιάλωση ως την κατανάλωση, τα παρθένα ελαιόλαδα της Ντόπιας Ζακύνθου και της Λιανολιάς έδειξαν το υψηλότερο ποσοστό μείωσης στο σύνολο των φαινολικών ενώσεων (μέση μείωση 26 και 21% αντίστοιχα), ενώ ακολουθούν τα δείγματα της Κορωνέικης της Ασπρολιάς και της Θιακής (15, 14%, 9%). Περαιτέρω μειώσεις παρατηρήθηκαν στις ολικές φαινολικές ενώσεις στους 24 μήνες αποθήκευσης οι οποίες έφτασαν το 31, 25, 21, 16, και 13% (μέσες τιμές για Ντόπια ποικιλία Ζακύνθου, Λιανολιά, Κορωνέικη, Ασπρολιά και Θιακή αντίστοιχα). Υπολογίζοντας τις μέσες τιμές μείωσης των φαινολικών για όλες τις ποικιλίες βρέθηκε ότι κυμάνθηκαν στο 10, 18 και 22% στους 12, 18 και 24 μήνες αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης οι φαινολικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα σταθερές γεγονός που είναι πολύ σημαντικό για τη διατήρηση της ποιότητας του ελαιολάδου.



Σχήμα 10.5: Εναπομένον φαινολικό περιεχόμενο (%) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Σε παλαιότερη εργασία, παρατηρήθηκε απώλεια 50-62 % στο σύνολο των φαινολικών ενώσεων κατά την αποθήκευση ελαιολάδων Λιανολιάς για 12 μήνες. Τα δείγματα αυτά ήταν αποθηκευμένα σε γυάλινα μπουκάλια με κενό 3%, σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι (Okogeri & Tasioula-Margari, 2002). Επιπλέον, σε μια άλλη εργασία, σε ισπανικά ελαιόλαδα της ποικιλίας Cornicabra που αποθηκεύθηκαν στους 25 °C, στο σκοτάδι χωρίς κενό για 21 μήνες, η μείωση των συνολικών φαινολικών ενώσεων κυμάνθηκε από 43% έως 73%, παρότι οι αριθμοί υπεροξειδίων δεν υπερέβησαν το ανώτατο όριο των 20 meq/kg κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης (Gómez-Alonso, Mancebo-Campos, Salvador, & Fregapane, 2007). Αποδεικνύεται σαφώς ότι η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο είναι σημαντικοί παράγοντες για τον περιορισμό της απώλειας φαινολικών ενώσεων.

Επιπλέον στο **σχήμα 10.6** παρουσιάζεται η διακύμανση του συνόλου των δειγμάτων σε φαινολικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Όπως φαίνεται από το εύρος τιμών, μετά από τους 12 μήνες κάποια δείγματα αρχίζουν να μην καλύπτουν την προϋπόθεση του ισχυρισμού υγείας της EFSA των 250mg/kg. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συσκευασία του ελαιολάδου γίνεται συνήθως 2 με 6 μήνες μετά την παραλαβή του από τον ελαιόκαρπο και ότι η μέγιστη διάρκεια ζωής του είναι 18 μήνες, η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 350 mg/kg, ώστε το ελαιόλαδο να καλύπτει τον ισχυρισμό υγείας της EFSA σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης που μπορεί να φτάσει τους 24 μήνες.



Σχήμα 10.6: Διακύμανση σε φαινολικές ενώσεις του συνόλου των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

11.3.3 Μεταβολές στη συγκέντρωση των επιμέρους φαινολικών ενώσεων και σχηματισμός φαινολικών προϊόντων οξείδωσης

Ο πίνακας 10.2 περιλαμβάνει τους ρυθμούς αποδόμησης/σχηματισμού των κυριότερων σεκοϊριδοειδών και των οξειδωμένων ή υδρολυμένων παραγώγων για κάθε ποικιλία. Η αύξηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης καθώς και η εμφάνιση ορισμένων οξειδωμένων μορφών των σεκοϊριδοειδών, είναι αποτελέσματα υδρολυτικής και οξειδωτικής δράσης αντίστοιχα. Η υδρόλυση των σύνθετων φαινολών, κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου, οδήγησε σε παράλληλη αύξηση της περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη). Οι σημαντικότερες αλλαγές στις συγκεντρώσεις των σεκοϊριδοειδών παρατηρήθηκαν σε ελαιόλαδα των ποικιλιών Ντόπια Ζακύνθου και Ασπρολιά ενώ ακολούθησαν οι ποικιλίες Κορωνέικη και Λιανολιά. Τέλος, οι χαμηλότερες μεταβολές παρατηρήθηκαν στα ελαιόλαδα της ποικιλίας Θιακή. Οι διαφορές στους ρυθμούς μεταβολής ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) μεταξύ των παραπάνω ομάδων.

Πίνακας 10.2: Μεταβολές στα επιμέρους σεκοϊριδοειδή και ο σχηματισμός προϊόντων οξείδωσης και υδρόλυσης κατά την αποθήκευση εκφρασμένες ως mg/kg ανά μήνα.

	Ντόπια Ζακύνθου	Κορωνέικη	Λιανολιά	Ασπρολιά	Θιακή
Υδροξυτυροσόλη	0,58	0,36	0,37	0,72	0,16
DAFOA ^a	-3,77	-1,57	-1,84	-2,27	-0,74
AFOA ^b	-1,50	-0,72	-0,47	-0,81	-0,07
Τυροσόλη	0,39	0,36	0,19	0,88	0,28
DAFLA ^c	-2,63	-1,90	-1,87	-2,02	-1,10
AFLA ^d	-0,67	-0,66	-0,62	-0,20	-0,09
Οξειδωμένο I	0,66	0,21	0,39	0,15	0,09
Οξειδωμένο II	0,41	0,28	0,35	0,27	0,21
Οξειδωμένο III	0,38	0,16	0,07	0,35	0,07
Οξειδωμένο IV	0,15	0,12	0,04	0,26	0,13

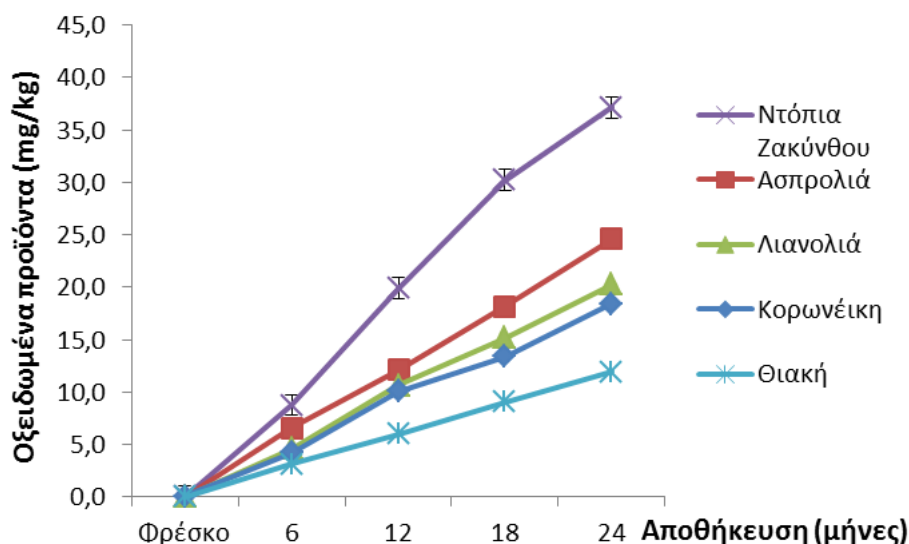
^a DAFOA, Διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης

^b AFOA, Αλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης

^c DAFLA, Διαλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη

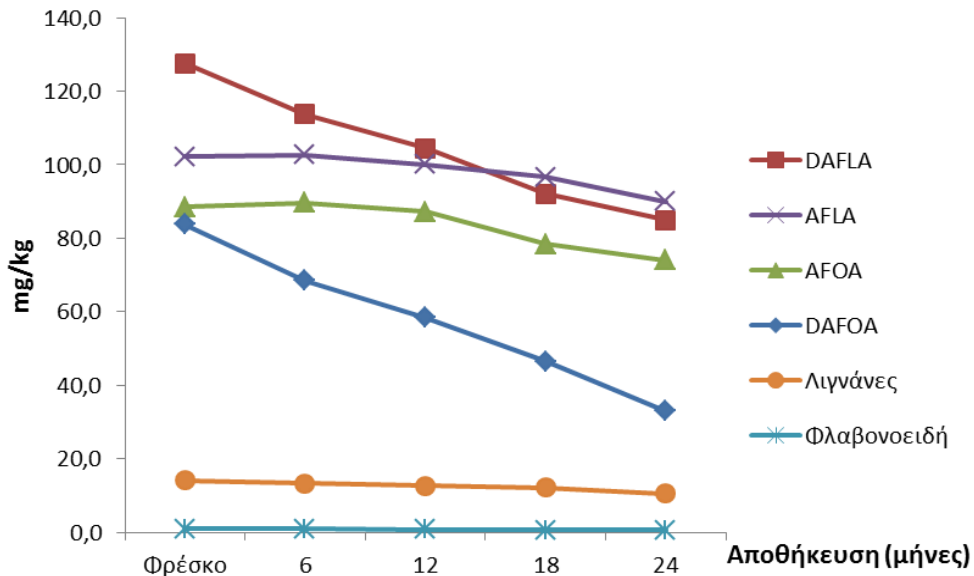
^d AFLA, Αλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη

Οι υψηλότερες τιμές των συνολικών οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων καταγράφηκαν στα ελαιόλαδα της ποικιλίας Ντόπια Ζακύνθου (σχήμα 10.7), γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με την μεγάλη αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις (πίνακας 10.1).

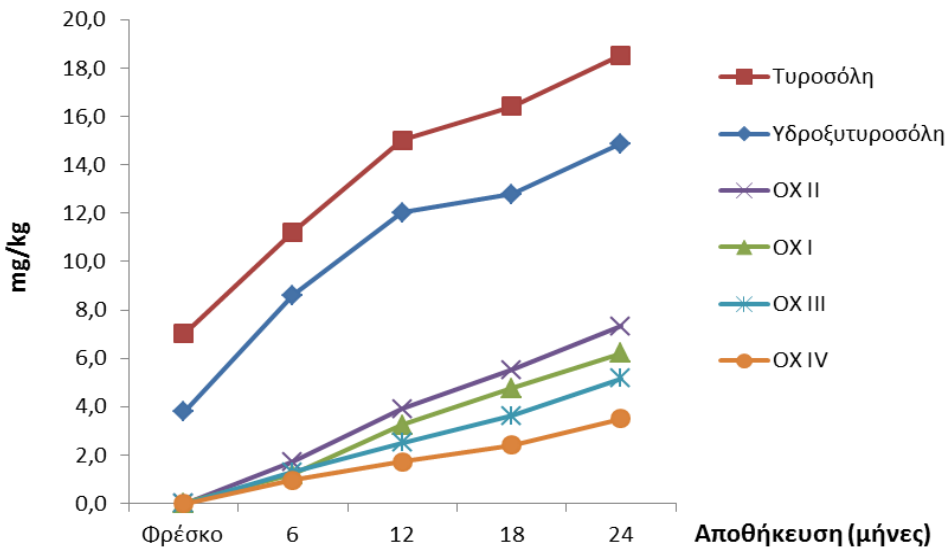


Σχήμα 10.7: Σχηματισμός του συνόλου των προϊόντων οξείδωσης των σεκοϊριδοειδών στα ελαιόλαδα ανά ποικιλία ελιάς.

Επιπλέον, οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των επιμέρους φαινολικών ενώσεων, για όλες τις ποικιλίες που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθούν οι αλλαγές σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (σχήμα 10.8). Όπως φαίνεται στο σχήμα 10.8α η μείωση ήταν μεγαλύτερη στα περισσότερο πολικά σεκοϊριδοειδή, DAFOA και DAFLA, υποδεικνύοντας μια πιο ενεργή συμμετοχή αυτών των ενώσεων στην υδρόλυση και στην οξείδωση. Τα λιγότερο πολικά σεκοϊριδοειδή, AFOA και AFLA, παρέμειναν σταθερά μέχρι τους 12 μήνες αποθήκευσης και μειώθηκαν αργότερα. Τέλος, τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες παρέμειναν αμετάβλητες. Σε γενικές γραμμές οι μειώσεις που παρατηρήθηκαν για τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις ήταν χαμηλότερες από εκείνες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Gómez-Alonso et al., 2007; Morelló, Motilva, Tovar, & Romero, 2004a; Okogeri & Tasioula-Margari, 2002), το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία και διαθεσιμότητα σε οξυγόνο). Στην περίπτωσή μας ο ρυθμός οξείδωσης ήταν πολύ μικρός, ώστε να έχει αξιοσημείωτη επίδραση στη συγκέντρωση των σεκοϊριδοειδών.



(α)



(β)

Σχήμα 10.8: Μεταβολές στις φαινολικές ενώσεις (α) και σχηματισμός υδρολυμένων και οξειδωμένων προϊόντων (β).

Στο **σχήμα 10.8β** απεικονίζεται ο σχηματισμός των υδρολυμένων ενώσεων (υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη) και των προϊόντων οξείδωσης κατά την αποθήκευση. Η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη αυξήθηκαν βαθμιαία κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η αύξηση ήταν μεγαλύτερη τους πρώτους 12 μήνες της αποθήκευσης. Η υδρόλυση των σεκοϊριδοειδών επηρεάζεται από την οξύτητα του ελαίου και το νερό, που υπάρχει στα θολά λάδια και απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της διήθησης (Brenes et al., 2001). Τα αρχικά μας δείγματα είχαν μεν χαμηλή οξύτητα αλλά

αποθηκευτήκαν χωρίς διήθηση, συνεπώς τα ίχνη υγρασίας, συνέβαλαν στο σχηματισμό των παραπάνω υδρολυμένων φαινολικών ενώσεων. Η δημιουργία απλών φαινολικών ενώσεων από τα σεκοϊριδοειδή μπορεί να έχει επιπτώσεις στη γεύση του ελαιόλαδου.

Επιπλέον, ανιχνεύθηκαν τέσσερις οξειδωμένες φαινολικές ενώσεις και η μεταβολή αυτών παρακολούθηθηκε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης (**σχήμα 10.8β**). Μία σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης παρατηρήθηκε συναρτήσει του χρόνου. Οι μέσες συγκεντρώσεις έφτασαν μέχρι 6,20, 7,33, 5,16 και 3,50 mg/kg για τα οξειδωμένα προϊόντα I-IV, αντίστοιχα. Τα ποσοστά σχηματισμού των οξειδωμένων φαινολικών ενώσεων I-IV συσχετίζονται με την αρχική συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων τους DAFOA, DAFLA, AFOA και AFLA αντίστοιχα (Συντελεστές Pearson: 0,86, 0,68, 0,86 και 0,79 αντίστοιχα, οι συσχετίσεις ήταν σημαντικές σε επίπεδο 0,05) .

10.3.4 Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης

Η βηματική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (Stepwise Linear Regression Analysis, SLRA) εφαρμόστηκε ώστε να βρεθεί αν και κατά πόσο, τα αρχικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (ελεύθερη οξύτητα, αριθμοί υπεροξειδίων, ειδικοί συντελεστές απόσβεσης, σύνθεση σε λιπαρά οξέα και η αρχική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων) συσχετίζονται με τον ρυθμό μείωσης των ολικών φαινολικών, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Όπως φάνηκε από τον συντελεστή Pearson (R), η συνολική μείωση των φαινολικών ενώσεων (εκφρασμένα ως mg/kg ανά μήνα) είχε ισχυρή θετική συσχέτιση με την αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις (**πίνακας 10.3**). Δηλαδή, όσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις τόσο μεγαλύτερο ήταν και το ποσοστό της μείωσης τους. Τα αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά (ο βαθμός οξείδωσης και η ελεύθερη οξύτητα), επίσης συσχετίζονται θετικά με το ρυθμό μείωσης των φαινολικών ενώσεων αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Τα προτεινόμενα μοντέλα δίνονται στον **πίνακα 10.3**. Το R^2 το οποίο φανερώνει το ποσοστό της μεταβλητότητας των δεδομένων που εξηγείται από κάθε γραμμικό μοντέλο, βρέθηκε 0,679 για το πρώτο μοντέλο γεγονός που δείχνει ότι η αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις εξηγεί το 67,9 % της μεταβλητότητας του ρυθμού μείωσης αυτών. Παρατηρώντας τα επόμενα μοντέλα, βλέπουμε ότι ο βαθμός οξείδωσης (όπως αυτός εκφράζεται με τη χρήση του συντελεστή K_{270}) και η ελεύθερη οξύτητα επίσης συνεισφέρουν στο τελικό μοντέλο αλλά εξηγούν μόλις το 3,4 και 3,2 % της μεταβλητότητας αντίστοιχα.

Πίνακας 10.3: Προτεινόμενα μοντέλα, εξαρτημένη μεταβλητή: ρυθμός μείωσης του συνόλου των φαινολικών ενώσεων.

Model	R	R ²	Adjusted R ²	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				Durbin-Watson	
					R ² Change	F Change	df1	df2		Sig. F Change
1	0,824 ^a	0,679	0,670	2,38234	0,679	80,329	1	38	0,000	
2	0,844 ^b	0,713	0,697	2,28386	0,034	4,348	1	37	0,044	
3	0,863 ^c	0,744	0,723	2,18463	0,032	4,438	1	36	0,042	1,731

^a Προγνωστικός δείκτης: (Σταθερά) Ολικές φαινολικές ενώσεις

^b Προγνωστικοί δείκτες: (Σταθερά) Ολικές φαινολικές ενώσεις, K₂₇₀

^c Προγνωστικοί δείκτες: (Σταθερά) Ολικές φαινολικές ενώσεις, K₂₇₀, Ελεύθερη οξύτητα (%)

10.4 Συμπεράσματα

Η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων είναι πολύ σημαντική παράμετρος εκτίμησης της ποιότητας των παρθένων ελαιολάδων. Τα δείγματα που αναλύθηκαν κάλυπταν ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων σε φαινολικές ενώσεις (250 ως 930 mg/kg) και οι μεταβολές αυτών παρακολούθηθηκαν για 24 μήνες αποθήκευσης οδηγώντας στα εξής συμπεράσματα:

- Ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του φαινολικού κλάσματος αποτελείται από σεκοϊριδοειδή, ενώ παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού και το σύστημα φυγοκέντρησης επηρέασαν τη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων.
- Κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης η μεγαλύτερη μέση μείωση σε ολικές φαινολικές ενώσεις παρατηρήθηκε στα δείγματα της ποικιλίας Ντόπια Ζακύνθου με 26 και 31% στους 18 και 24 μήνες αντίστοιχα.
- Πιο μεγάλες μειώσεις παρατηρήθηκαν στα πολικά σεκοϊριδοειδή DAFOA και DAFLA, σε σχέση με τα λιγότερο πολικά, AFOA και AFLA. Φαίνεται ότι στα αρχικά στάδια της αυτοξείδωσης, οι περισσότερα πολικές ενώσεις, προσανατολίζονται στη διεπιφάνεια αέρα/λαδιού και προστατεύουν περισσότερο από την οξείδωση σε σχέση με τις λιγότερο πολικές οι οποίες παραμένουν διαλυμένες στο λάδι.
- Οι φλαβόνες και οι λιγνάνες δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

- Η μείωση των σεκοϊριδοειδών οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης των απλών φαινολών, τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, και στο σχηματισμό προϊόντων οξείδωσης, λόγω υδρολυτικών και οξειδωτικών αντιδράσεων αντίστοιχα.
- Η αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις ήταν ο κύριος παράγοντας που συσχετίστηκε με τη μείωση αυτών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ενώ η αρχική κατάσταση οξείδωσης και η ελεύθερη οξύτητα συσχετίστηκαν σε πολύ μικρότερο βαθμό.
- Ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν τέσσερα προϊόντα οξείδωσης. Η συνολική συγκέντρωση τους έφτασε μέχρι και 39 mg/kg μετά από 24 μήνες αποθήκευσης, ενώ ο ρυθμός σχηματισμού τους συσχετίστηκε με τις αρχικές συγκεντρώσεις των πρόδρομων ενώσεων του καθενός.
- Αξίζει να τονιστεί ότι η χρήση κατάλληλων συνθηκών αποθήκευσης για το παρθένο ελαιόλαδο, δίνει τη δυνατότητα διατήρησης της ποιότητάς του για μεγάλο χρονικό διάστημα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συσκευασία του ελαιολάδου γίνεται συνήθως 2 με 6 μήνες μετά την παραλαβή αυτού και ότι η μέγιστη διάρκεια ζωής του είναι 18 μήνες, η αρχική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 350 mg/kg ώστε το ελαιόλαδο να καλύπτει τον ισχυρισμό υγείας της EFSA (περιεκτικότητα 250 mg/kg) κατά τη διάρκεια όλου του διαστήματος αποθήκευσης.

Κεφάλαιο 11

Μεταβολές στη σύσταση του πτητικού κλάσματος ελαιολάδων από διαφορετικές ελληνικές ποικιλίες κατά την αποθήκευση

11.1 Εισαγωγή

Η αύξηση της ζήτησης, για υψηλής ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο, μπορεί να αποδοθεί όχι μόνο στα πιθανά οφέλη για την υγεία αλλά επίσης και στις άριστες οργανοληπτικές ιδιότητες που το χαρακτηρίζουν. Το ιδιαίτερο άρωμα του ελαιολάδου οφείλεται στις πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται από την ενζυματική οξείδωση του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος, μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων, που είναι γνωστές ως «βιοσυνθετική οδός της λιποξυγενάσης» (Hatanaka, 1993; Olias et al., 1993). Οι ενώσεις με 5 και 6 άτομα άνθρακα και κυρίως οι C6 κορεσμένες και ακόρεστες γραμμικές αλδεΐδες, αλκοόλες και εστέρες, αποτελούν το σημαντικότερο κλάσμα. Η δημιουργία αυτών των ενώσεων εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, τις συνθήκες αποθήκευσης του καρπού πριν την εξαγωγή του ελαιολάδου καθώς και από τη θερμοκρασία και τη διάρκεια της μάλαξης (Angerosa et al., 2001; Benincasa et al., 2003; Morales et al., 1996). Αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για το «πράσινο άρωμα» του ελαιολάδου (Aparicio & Morales, 1998; Kalua et al., 2007).

Μετά την παραλαβή του ελαιολάδου από τον καρπό αρχίζει η διαδικασία της οξείδωσης, η οποία επηρεάζεται από τις συνθήκες της αποθήκευσης, όπως τη θερμοκρασία, το φως και την διαθεσιμότητα σε οξυγόνο καθώς και από την ίδια τη σύσταση του λαδιού (Gutiérrez & Fernández, 2002; Velasco & Dobarganes, 2002). Οι ενώσεις που συμβάλλουν στη διαδικασία της οξείδωσης είναι τα πολυακόρεστα οξέα, λινελαϊκό και λινολενικό. Αντίθετα, κάποιες ήσσονες ενώσεις όπως οι τοκοφερόλες και τα φαινολικά συστατικά δρουν ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, προσφέροντας οξειδωτική σταθερότητα (Velasco & Dobarganes, 2002).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οι αντιδράσεις οξειδωσης μειώνουν την υψηλή διατροφική αξία του ελαιολάδου και μεταβάλλουν το άρωμα και τη γεύση του, μέσω της δημιουργίας οργανοληπτικών ελαττωμάτων, που προκύπτουν από τα προϊόντα αποδόμησης των υπεροξειδίων (Morales et al., 1997). Οι πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το ευχάριστο άρωμα μειώνονται και ταυτόχρονα αναδεικνύονται οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Το κυριότερο οργανοληπτικό μειονέκτημα που αναπτύσσεται κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου είναι η ιδιότητα του ταγγού. Οι ενώσεις που συνεισφέρουν στο οργανοληπτικό μειονέκτημα του ταγγού είναι οι C5-C10 κορεσμένες και ακόρεστες αλδεΐδες, οι C6-C9 διενάλες και τα καρβοξυλικά οξέα. Εκτός από την αντίληψη του ταγγού οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις έχουν συσχετιστεί με τις αντιλήψεις του «ελαιώδους» και του «λιπαρού» (Morales et al., 2005).

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που προσδιορίζουν το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο πρέπει να διατηρούνται κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του, που κυμαίνεται συνήθως από 9 ως 18 μήνες. Επιπλέον, η πρόβλεψη του χρόνου ζωής των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων, που προέρχονται από διαφορετικές ποικιλίες, θα ήταν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην εμπορία του ελαιολάδου. Για την πρόβλεψη του χρόνου ζωής του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες κατά τις οποίες εφαρμόζονται δοκιμές επιταχυνόμενης οξειδωσης (Morales et al., 1997; Pagliarini, Zanoni, & Giovanelli, 2000), παρόλα αυτά, λόγω των ακραίων συνθηκών που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις δοκιμές, είναι αμφισβητήσιμο το κατά πόσο τα αποτελέσματα μπορούν να συσχετιστούν με την αποθήκευση σε πραγματικές συνθήκες. Τις περισσότερες φορές αυτές οι μέθοδοι δεν έχουν ικανοποιητική συσχέτιση με τη διαδικασία της αυτοοξειδωσης, η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες δωματίου (Frankel, 2005; Velasco & Dobarganes, 2002). Επιπλέον, οι παραπάνω δοκιμές δεν μπορούν να προβλέψουν τη δημιουργία των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά μειονεκτήματα.

Στο συγκεκριμένο μέρος της έρευνας, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS) με στόχο την εκτίμηση των μεταβολών που πραγματοποιούνται στη σύσταση του πτητικού κλάσματος κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων από πέντε ελληνικές ποικιλίες. Επιπλέον, έγινε χρήση της

βηματικής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (SLRA), με στόχο να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της αρχικής σύστασης των ελαιολάδων σε λιπαρά οξέα και φαινολικές ενώσεις και του ρυθμού σχηματισμού των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το οργανοληπτικό μειονέκτημα του ταγγού.

11.2 Μέθοδοι και Υλικά

11.2.1 Δείγματα ελαιολάδου

Τα δείγματα ελαιολάδου συλλέχθηκαν από περιοχές της δυτικής Ελλάδας κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2007-2008 και 2010-2011: Κορωνέικη από Ζάκυνθο και Κεφαλονιά (n=14), Λιανολιά από Κέρκυρα και Πρέβεζα (n=8), Ασπρολιά από Λευκάδα (n=8), Θιακή από Κεφαλονιά (n=6) και Ντόπια ποικιλία Ζακύνθου (n=6). Η παραλαβή του ελαιολάδου έγινε σε φυγοκεντρικά συστήματα δύο και τριών φάσεων. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από Νοέμβριο ως τέλη Ιανουαρίου. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα που ανήκαν στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων δίνονται στο **παράρτημα 2**. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια (κενό 0,5%) και αποθηκεύτηκαν σε υπόγειο χωρίς θέρμανση για 18 μήνες. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης οι θερμοκρασίες ήταν γενικά χαμηλότερες από 18 °C (12 ± 6 °C), εκτός από την περίοδο του καλοκαιριού όπου η θερμοκρασία έφτασε τους 25 °C (20 ± 5 °C). Αυτές οι συνθήκες αντιπροσωπεύουν ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης.

11.2.2 Πρότυπα, αντιδραστήρια και διαλύτες

Η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το εξάνιο που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων ήταν HPLC καθαρότητας από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το ανθρακικό νάτριο, το μολυβδαινικό νάτριο και το γαλλικό οξύ, που χρησιμοποιήθηκαν στον χρωματομετρικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών και των ο-διφαινολών, ήταν όλα από την Merck (Darmstadt, Γερμανία). Η 4-μεθυλο-2-πεντανόλη, από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (IS) στον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων. Για τον προσδιορισμό του δείκτη κατακράτησης (RI) έγινε χρήση πρότυπων αλκανίων C8-C20 από την Fluka (Buchs, Ελβετία) και επτανίου από την Merck (Darmstadt, Γερμανία).

11.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας

Οι προσδιορισμοί του αριθμού υπεροξειδίων, της ελεύθερης οξύτητας, των ειδικών συντελεστών απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) και της σύστασης σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του Κανονισμού της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC, 1991), όπως περιγράφονται στο **κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.4)**.

11.2.4 Εκχύλιση και χρωματομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών και των ορθο-διφαινολών

Η εκχύλιση των φαινολικών ενώσεων έγινε όπως περιγράφεται στο **κεφάλαιο 9, (παράγραφος 9.2.5)** με τη διαφορά ότι έγινε έκπλυση με εξάνιο 2 φορές με 5ml. Το φαινολικό εκχύλισμα που παραλήφθηκε χρησιμοποιήθηκε για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών και των ο-διφαινολών.

Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολών και των ο-διφαινολών έγινε με βάση τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Gutfinger (1981), στο φασματοφωτόμετρο LKB Biochrom UV/Vis Ultraspec II (Cambridge, Αγγλία).

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών, 0,1 ml του πολικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml. Προστέθηκαν 5 ml απεσταγμένο νερό και 0,5 ml αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu. Το μίγμα αναδεύτηκε και μετά από την πάροδο τριών λεπτών προστέθηκε 1 ml Na_2CO_3 και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 10 ml με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα παρέμεινε στο σκοτάδι για μία ώρα και έγινε μέτρηση της απορρόφησής του στα 725 nm χρησιμοποιώντας τυφλό διάλυμα που περιείχε τα αντίστοιχα αντιδραστήρια. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων έγινε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0-400 ppm.

Για τον προσδιορισμό των ο-διφαινολών 0,4 ml του πολικού εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 5 ml. Προστέθηκαν 3,6 ml διαλύματος μεθανόλη/νερό (50:50, v/v) και 1 ml αντιδραστήριο $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5% σε μίγμα αιθανόλη/νερό (50:50, v/v). Το μίγμα αναδεύτηκε στο vortex για 1 λεπτό. Μετά τη πάροδο 15 λεπτών μετρήθηκε η απορρόφηση στα 370 nm χρησιμοποιώντας τυφλό διάλυμα που περιείχε τα αντίστοιχα αντιδραστήρια. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ο-

διφαινολών έγινε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος σε συγκεντρώσεις 0-140 ppm.

11.2.5 Εκχύλιση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων με SPME-GC-MS

Για τον ποιοτικό και ημιποσοτικό προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SPME-GC-MS. 4,50 g δείγματος τοποθετήθηκαν σε ειδικό φιαλίδιο των 20ml, προστέθηκε 20μl εσωτερικού προτύπου (4-μεθυλ-2-πεντανόλη 160,4mg σε 100ml μεθανόλη) και το φιαλίδιο σφραγίστηκε με το ειδικό πώμα. Η δειγματοληψία έγινε με έκθεση της ίνας 30/50μm DVB/CAR/PDMS (Supelco Ltd., Bellefonte, PA) για 30 λεπτά στον υπερκείμενο εσωτερικό χώρο του φιαλιδίου. Η θερμοκρασία του δείγματος διατηρούνταν σταθερή με τη χρήση ενός υδατόλουτρου, υπό ανάδευση, στους 40 °C.

Ο αναλυτικός προσδιορισμός έγινε στον αέριο χρωματογράφο GC-2010 Plus ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με ανιχνευτή μάζας GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Ιαπωνία). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό ήταν η DB-5ms, 60 m × 0.32 mm × 1 μm (J & W Scientific, Folsom, ΗΠΑ). Στον εγχυτήρα χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία διαχωρισμού ροής (split injection) σε αναλογία 2:1 στους 260 °C, ενώ η ίνα παρέμεινε στον εγχυτήρα για 10 λεπτά.

Το πρόγραμμα μεταβολής της θερμοκρασίας κατά το διαχωρισμό στη στήλη είχε ως εξής:

- Αρχική θερμοκρασία του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ίση με 40 °C.
- Διατήρηση του φούρνου στη θερμοκρασία των 40 °C για 5 λεπτά.
- Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 3 °C/λεπτό στους 160 °C.
- Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/λεπτό στους 240 °C.
- Παραμονή στη θερμοκρασία των 240 °C για 5 λεπτά.

Οι συνθήκες του MS ήταν οι εξής: θερμοκρασία πηγής: 230 °C, θερμοκρασία στο τετράπολο: 150 °C, θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς των εκλούμενων συστατικών: 270 °C, ενέργεια δέσμης ηλεκτρονίων ιονισμού (EI): 70 eV, καταγραφή όλων των ιόντων με λόγο m/z: 29–350 με ρυθμό 3 scans/sec.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με σύγκριση των φασμάτων μάζας με αυτά της βιβλιοθήκης (Nist 11 Mass Spectral Library) και με τον υπολογισμό των δεικτών κατακράτησης με τη χρήση πρότυπου διαλύματος αλκανίων (C8–C20). Τέλος, οι συγκεντρώσεις των επιμέρους πτητικών ενώσεων εκφράστηκαν ως mg 4-μεθυλ-2-πεντανόλης ανά κιλό ελαιολάδου.

11.2.6 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) και ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 19.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, έγινε με εφαρμογή one-way ANOVA με έλεγχο της πραγματικής σημαντικής διαφοράς του Tukey, σε 95 % όρια εμπιστοσύνης.

11.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

11.3.1 Ποιοτικά χαρακτηριστικά των φρέσκων δειγμάτων και μεταβολές κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για 18 μήνες

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι αλλαγές στη σύνθεση του πτητικού κλάσματος κατά τη διάρκεια αποθήκευσης για 18 μήνες, 42 δείγματα ελαιολάδου συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια δύο ελαιοκομικών περιόδων (2007-2008 και 2010-2011). Τα δείγματα αυτά ανήκαν σε πέντε ελληνικές ποικιλίες ελιάς και είχαν διαφορές στη σύσταση σε λιπαρά οξέα αλλά και σε φαινολικό περιεχόμενο (πίνακας 11.1).

Πίνακας 11.1: Σύσταση των φρέσκων δειγμάτων σε ολικές φαινολικές ενώσεις και λιπαρά οξέα.

	Ντόπια Ζακύνθου (n=6)	Κορωνέικη (n=14)	Θιακή (n=6)	Λιανολιά (n=8)	Ασπρολιά (n=8)
Ολικά φαινολικά (mg γαλλικό οξύ/kg)	107,20-450,38	79,72-366,00	90,70-140,74	69,70-330,52	185,05-425,23
ο-διφαινόλες (mg γαλλικό οξύ/kg)	43,08-167,97	38,98-135,17	24,99-55,12	30,86-97,08	48,17-165,16
Λιπαρά οξέα (%)					
Μυριστικό οξύ (C14:0)	0,00-0,02	0,01-0,02	0,00-0,01	0,00-0,01	0,00-0,01
Παλμιτικό οξύ (C16:0)	12,99-14,16	11,52-14,44	10,60-13,30	11,52-15,59	13,01-15,95
Πελμιτελαϊκό οξύ (C16:1)	1,11-1,41	0,83-1,29	0,69-1,20	0,80-1,68	1,17-1,74
Δεκαεπτανικό οξύ (C17:0)	0,02-0,06	0,03-0,21	0,12-0,26	0,04-0,50	0,04-0,22
Δεκαεπτενικό οξύ (C17:1)	0,08-0,09	0,07-0,11	0,12-0,24	0,07-0,12	0,07-0,10
Στεατικό οξύ (C18:0)	2,56-2,72	1,99-3,17	2,42-3,26	1,78-3,35	1,80-2,22
Ελαϊκό οξύ (C18:1)	70,47-73,00	71,32-76,29	72,15-76,80	65,10-71,72	67,41-73,54
Λινελαϊκό οξύ (C18:2)	6,47-10,07	6,30-8,78	5,63-8,44	9,62-10,85	8,03-11,70
Λινολενικό οξύ (C18:3)	0,66-0,81	0,64-0,94	0,57-0,71	0,71-0,91	0,69-0,87
Αραχιδικό οξύ (C20:0)	0,39-0,46	0,42-0,53	0,57-0,54	0,37-0,44	0,35-0,67
Εικοσενικό οξύ (C20:1)	0,21-0,27	0,14-0,32	0,27-0,32	0,20-0,24	0,26-0,37
Βεχενικό οξύ (C22:0)	0,21-0,68	0,00-0,62	0,16-0,22	0,00-0,61	0,00-0,38
Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0)	0,11-0,16	0,11-0,18	0,12-0,15	0,09-0,11	0,12-0,17

Η Κορωνέικη, η Ντόπια Ζακύνθου και η Θιακή είναι ποικιλίες που χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (μέσες τιμές 6,51, 7,21, και 6,10%, αντίστοιχα), ενώ οι ποικιλίες Λιανολιά και Ασπρολιά χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (μέσες τιμές 10,05 και 10,89%, αντίστοιχα). Όσον αφορά τις συνολικές φαινολικές ενώσεις, τα δείγματα των ποικιλιών Ντόπια Ζακύνθου και Ασπρολιά βρέθηκαν να έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις (μέσες τιμές 242,41 και 227,49 mg/kg), τα δείγματα των ποικιλιών Κορωνέικη και Λιανολιά περιείχαν μεσαίες συγκεντρώσεις (μέσες τιμές 161,40, 157,83 mg/kg, αντίστοιχα), ενώ τα δείγματα της Θιακής ήταν τα φτωχότερα (μέση τιμή 105,57 mg/kg). Τέλος, τα δείγματα από τη Ντόπια Ζακύνθου, την Ασπρολιά και τη Λιανολιά περιείχαν μεγάλες ποσότητες σε ο-διφαινόλες (99,24, 75,94, 73,61 και mg/kg), ενώ ακολουθούσαν τα δείγματα της Κορωνέικης και της Θιακής (46,69 και 38,20 mg/kg). Από τις ντόπιες ποικιλίες της περιοχής (Ντόπια Ζακύνθου, Ασπρολιά και Λιανολιά) παραλήφθηκαν ελαιόλαδα πλούσια σε φαινολικά συστατικά, εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα της Θιακής που

παρελήφθησαν από ώριμο καρπό. Τα δέντρα αυτά είναι στη πλειοψηφία τους υπεραιώνόβια

Όπως φαίνεται στον **πίνακα 11.2** (αναλυτικά, **παράρτημα 2**), τα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας όλων των φρέσκων δειγμάτων, όπως η ελεύθερη οξύτητα, οι ειδικοί συντελεστές απόσβεσης (K_{232} , K_{270}), και οι αριθμοί υπεροξειδίων ήταν εντός των ορίων για την κατάταξη τους ως εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα.

Πίνακας 11.2: Αρχικά και τελικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ελαιολάδου.

Ποικιλία	Μήνες	Αριθμός Υπεροξειδίων (meq O ₂ /kg λαδιού)	Ελεύθερη οξύτητα (% ελαϊκό οξύ)	K_{270}	K_{232}
Ντόπια Ζακύνθου (n=6)	0	8,5-9,8 ^a	0,22-0,40 ^a	0,11-0,12 ^a	1,31-1,49 ^a
	18	15,2-18,4 ^b	0,22-0,41 ^a	0,16-0,20 ^b	1,59-2,03 ^b
Κορωνέικη (n=14)	0	7,1-10,8 ^a	0,11-0,42 ^a	0,09-0,10 ^a	1,28-1,43 ^a
	18	10,0-16,8 ^b	0,11-0,46 ^a	0,13-0,19 ^b	1,66-1,98 ^b
Θιακή (n=6)	0	7,0-8,5 ^a	0,11-0,16 ^a	0,08-0,10 ^a	1,22-1,28 ^a
	18	8,1-15,5 ^b	0,11-0,17 ^a	0,11-0,19 ^b	1,52-1,77 ^b
Λιανολιά (n=8)	0	7,8-10,0 ^a	0,14-0,35 ^a	0,11-0,13 ^a	1,50-1,71 ^a
	18	10,1-16,8 ^b	0,15-0,37 ^a	0,15-0,17 ^b	1,80-2,12 ^b
Ασπρολιά (n=8)	0	6,9-11,3 ^a	0,14-0,65 ^a	0,10-0,12 ^a	1,39-1,49 ^a
	18	8,1-14,5 ^b	0,14-0,65 ^a	0,13-0,20 ^b	1,63-2,11 ^b

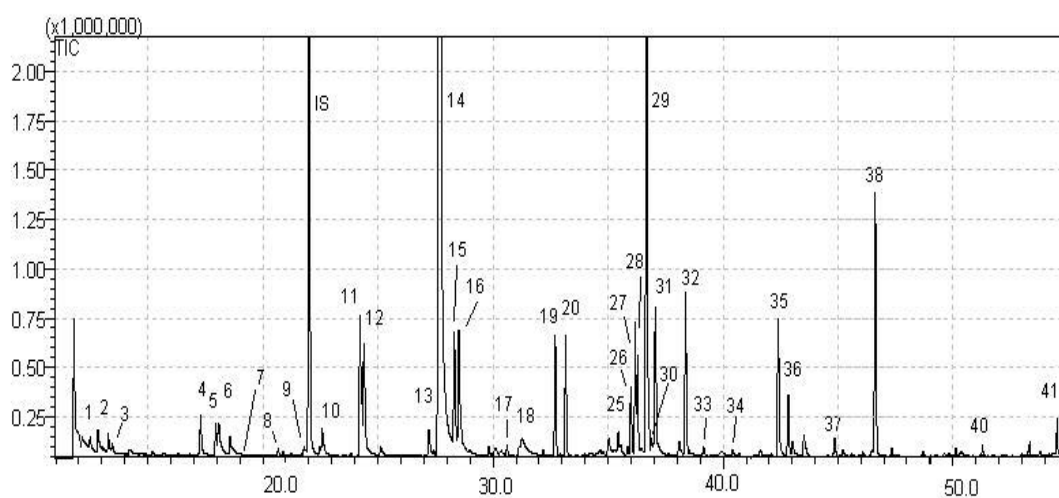
Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$), μεταξύ των μετρήσεων στα φρέσκα δείγματα και στους 18 μήνες, για κάθε ποικιλία, υποδεικνύονται με διαφορετικό γράμμα.

Οι ελεύθερες οξύτητες των δειγμάτων δεν μεταβλήθηκαν κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ενώ οι ειδικοί συντελεστές απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) και οι αριθμοί υπεροξειδίων αυξήθηκαν σταδιακά. Κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης, ακόμα και μετά από 18 μήνες, κανένα από τα δείγματα δεν ξεπέρασε τα ανώτατα όρια που έχουν καθοριστεί από τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα (EC, 1991). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε γυάλινες φιάλες (με κενό 0,5%) σε υπόγειο χωρίς κεντρική θέρμανση και φως για 18 μήνες. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες αυτές περιλάμβαναν θερμοκρασίες 12 ± 6 °C από τον Σεπτέμβριο έως τον Ιούνιο και 20 ± 5 °C από τον Ιούλιο μέχρι τον Αύγουστο. Αυτές οι συνθήκες είναι κοινή πρακτική στη βιομηχανία του ελαιολάδου, όπου η θερμοκρασία

αποθήκευσης είναι συνήθως 10 °C χαμηλότερη σε σχέση με τις οικιακές συνθήκες, γεγονός που παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του προϊόντος.

11.3.2 Σύσταση των φρέσκων δειγμάτων ελαιολάδου σε πτητικές ενώσεις

Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα του πτητικού κλάσματος δίνεται στο **σχήμα 11.1**, ενώ οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ελαιολάδου δίνονται στον **πίνακα 11.3**. Το πτητικό κλάσμα των δειγμάτων που αναλύθηκαν αποτελείται από αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, υδρογονάνθρακες, κετόνες και καρβοξυλικά οξέα.



Σχήμα 11.1: Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα των πτητικών ενώσεων του παρθένου ελαιολάδου (οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στις ενώσεις που δίνονται στον **πίνακα 11.3**).

Πίνακας 11.3: Οι πτητικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν στα δείγματα ελαιολάδου και το εύρος των τιμών τους (εκφρασμένες ως mg 4-μεθυλ-2-πεντανόλη/kg ελαιολάδου).

A/A	Ένωση	RI ^a	Ντόπια Ζακύνθου (n=6)	Κορωνέικη (n=14)	Θιακή (n=6)	Λιανολιά (n=8)	Ασπρολιά (n=8)
1	Αιθανόλη	473	0,60-2,15	0,00-2,54	0,00-0,40	0,00-1,67	0,00-0,55
2	1,3-Πενταδιένιο, (E)-	524	0,04-0,20	0,05-0,20	0,00-0,15	0,00-0,14	0,00-0,05
3	Οξικό οξύ	575	0,00-0,65	0,00-0,29	0,00 ^c	0,00-0,30	0,00
4	1-Πεντεν-3-όλη	680	0,15-0,45	0,00-0,38	0,00-0,10	0,00-0,02	0,00-0,10
5	1-Πεντεν-3-όνη	683	0,43-1,70	0,15-1,02	0,00-0,40	0,00-0,30	0,00-0,16
6	3-Πεντανόνη	694	0,08-0,36	0,00-0,31	0,00	0,00-0,02	0,00-0,23
7	Πεντανάλη	696	0,00-0,15	0,00-0,11	0,00-0,10	0,00	0,00-0,10
8	3-Μεθυλ-1-βουτανόλη	734	0,00-0,14	0,00-0,15	0,00	0,00	0,00
9	2-Πεντενάλη, (E)-	757	0,00-0,26	0,00-0,13	0,00	0,00	0,00
IS ^b	4-Μεθυλ-2-πεντανόλη						
10	2-Πεντεν-1-όλη, (Z)-	766	0,17-0,70	0,05-0,85	0,00	0,00-0,58	0,00-0,45
11	3-Εξενάλη, (Z)-	796	0,00-0,76	0,00-1,61	0,00-0,55	0,00-0,90	0,00-0,20
12	Εξανάλη	803	1,44-1,80	0,72-2,05	0,78-1,85	0,36-2,90	0,65-1,85
13	3-Εξεν-1-όλη, (Z)-	849	0,00-0,19	0,00-0,24	0,00-0,13	0,00-0,32	0,00-0,26
14	2-Εξενάλη, (E)-	855	17,96-31,32	13,59-35,28	16,75-33,31	18,00-39,15	15,46-26,27
15	2-Εξεν-1-όλη, (E)-	863	0,20-1,96	0,19-2,40	0,00-0,59	0,35-3,45	0,17-2,00
16	1-Εξανόλη	865	0,27-2,95	0,00-3,00	0,16-0,83	0,00-3,34	0,39-1,48
17	Επτανάλη	899	0,00	0,00	0,00	0,00-0,12	0,00
18	2,4-Εξαδιενάλη, (E, E)-	909	0,00-0,98	0,00-2,56	0,00-1,52	0,00-2,82	0,59-1,10
19	α-πινένιο	942	0,66-0,99	0,55-1,35	0,23-0,54	0,00-2,99	0,00-0,35
20	3-Αιθυλ-1,5-οκταδιένιο	949	0,64-1,19	0,62-1,72	0,22-0,68	0,00-0,42	0,08-0,38
21	2-Επτανάλη, (E)-	957	0,09-0,16	0,00-0,14	0,00	0,00-0,15	0,00-0,09
22	1-Επτανόλη	967	0,00-0,07	0,00-0,12	0,00-0,06	0,00-0,10	0,00-0,09
23	Βενζαλδεΐδη	971	0,00-0,20	0,00-0,23	0,00-0,21	0,00-2,00	0,00-0,15
24	Εξανοϊκό οξύ	974	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,02
25	6-Μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	982	0,00-0,89	0,00-0,45	0,00	0,00-1,89	0,00-0,72
26	Υδρογονάνθρακας	992	0,55-0,80	0,09-0,94	0,20-0,49	0,00-0,43	0,00-0,37
27	Υδρογονάνθρακας	994	0,96-1,55	0,14-1,84	0,31-0,90	0,00-0,66	0,00-0,34
28	1,2,4-Τριμεθυλ-βενζόλιο	999	0,82-1,52	0,29-2,11	0,40-1,00	0,00-1,02	0,00-0,51
29	Οξικός 3-εξενυλεστέρας, (Z)-	1004	0,00-1,17	0,57-5,70	2,19-5,24	0,00-1,50	0,40-4,22
30	Οκτανάλη	1005	0,00-0,02	0,00	0,00	0,00-0,02	0,00
31	Οξικός εξυλεστέρας	1010	0,00-0,34	0,28-1,90	1,21-3,00	0,00-0,30	0,54-2,75
32	Λεμονένιο	1036	0,00-2,06	0,00-2,60	0,00-0,20	0,00-2,45	0,00-0,77
33	3,7-διμεθυλ- 1,3,6-οκτατριένιο, (E)-	1044	0,90-9,06	0,00-1,47	0,00-0,52	0,00-2,21	0,11-0,40
34	1-οκτανόλη	1065	0,00-0,10	0,00-0,08	0,00-0,12	0,00-0,13	0,00-0,13
35	Εννεανάλη	1102	0,49-0,99	0,25-0,88	0,15-0,38	0,18-0,96	0,21-1,23
36	4,8-διμεθυλ-1,3,7-εννεατριένιο, (E)-	1109	1,02-2,43	0,11-1,73	0,00-0,52	0,09-0,56	0,00-0,10
37	1-εννεανόλη	1168	0,00-0,20	0,00-0,24	0,00-0,12	0,00-0,22	0,00-0,20
38	2-Δωδεκένιο, (E)-	1202	3,05-6,80	0,70-5,70	0,00-1,87	0,00-5,44	0,00-0,26
39	Εννεανικό οξύ	1270	0,00-0,25	0,00	0,00	0,00-0,12	0,00-0,62
40	α-Κοπαένιο	1360	0,00-0,08	0,00-0,18	0,00-0,08	0,00	0,00-0,40
41	α-Φαρνεσένιο, (E,E)-	1524	0,12-1,44	0,00-0,21	0,06-0,22	0,00-0,83	0,00

^a RI: Δείκτες κατακράτησης (DB-5 column)

^b IS: Εσωτερικό πρότυπο

Τα κυριότερα πτητικά συστατικά, τα οποία προέρχονται από το λινελαϊκό και λινολενικό οξύ, μέσω της βιοσυνθετικής πορείας της λιποξυγενάσης, είναι ενώσεις με C6 [εξανάλη, 1-εξανόλη, οξικός εξυλεστέρας από το λινελαϊκό οξύ και (Z)-3-εξανάλη, (E)-2-εξανάλη, (E)-2-εξεν-1-όλη, (Z)-3-εξεν-1-όλη, οξικός (Z)-3-εξενυλεστέρας από το λινολενικό οξύ] και C5 (1-πεντεν-3-όλη, 1-πεντεν-3-όνη, 3-πεντανόνη, πεντανάλη, (E)-2-πεντενάλη και (Z)-2-πεντεν-1-όλη). Όλες αυτές οι ενώσεις είναι υπεύθυνες για τα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Hatanaka, 1993; Olias et al., 1993).

Η (E)-2-εξανάλη ήταν η επικρατέστερη ένωση του πτητικού κλάσματος και η συγκέντρωσή της κυμάνθηκε μεταξύ 13,59-39,15 mg/kg. Το άρωμα της (E)-2-εξανάλης προσομοιάζει αυτό του «φρεσκοκομμένου γρασιδιού», «πράσινων φύλλων», «πράσινου μήλου» και «πικραμύγδαλου» (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006; Morales et al., 2005; Reiners & Grosch, 1998). Η εξανάλη και η (Z)-3-εξανάλη βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις από 0 ως 3,50 mg/kg. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και η (Z)-3-εξανάλη εμφανίζεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις από την (E)-2-εξανάλη, συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στο «πράσινο άρωμα» λόγω του χαμηλού κατωφλιού οσμής (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006; Morales et al., 2005; Reiners & Grosch, 1998). Η (Z)-3-εξανάλη βρέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα της Κορωνέικης ποικιλίας (μέχρι 1,61 mg/kg), ενώ ακολουθούσαν τα δείγματα της Λιανολιάς, της Ντόπιας Ζακύνθου και της Θιακής (μέχρι 0,90 mg/kg). Στα δείγματα της Ασπρολιάς η (Z)-3-εξανάλη βρέθηκε σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 0,20 mg/kg.

Οι συνολικές συγκεντρώσεις των εξαν-1-όλη, (E)-2-εξεν-1-όλη και (Z)-3-εξεν-1-όλη βρέθηκαν από 0 ως 3,45 mg/kg. Αυτές οι ενώσεις στη βιβλιογραφία έχουν συσχετιστεί με τα αρώματα «ώριμο φρουτώδες», «πικρό» και «απαλό πράσινο», ενώ η συνεισφορά τους στο αρωματικό προφίλ είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή των αλδευδών λόγω του υψηλότερου κατωφλιού οσμής (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006; Morales et al., 2005; Reiners & Grosch, 1998).

Ο οξικός (Z)-3-εξενυλεστέρας και ο οξικός εξυλεστέρας, που είναι υπεύθυνοι για τα αρώματα του «φρουτώδους», «πράσινης μπανάνας», «πράσινων φύλλων», «λουλουδιών» και γενικά για τα πιο γλυκά αρώματα (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006; Morales et al., 2005; Reiners & Grosch, 1998), βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ελαιόλαδα από τις ποικιλίες Κορωνέικη, Ασπρολιά και Θιακή (ως

7,04 mg/kg) ενώ στα ελαιόλαδα Λιανολιάς και Ντόπιας Ζακύνθου δεν ξεπέρασαν τα 1,80 mg/kg.

Οι πτητικές ενώσεις με 5 άτομα άνθρακα όπως είναι η 1-πεντεν-3-όλη, η 1-πεντεν-3-όνη, η 3-πεντανόνη, η πεντανάλη, η (E)-2-πεντενάλη και η (Z)-2-πεντεν-1-όλη, οι οποίες προέρχονται από το λινελαϊκό και το λινολενικό οξύ μέσω της βιοσυνθετικής πορείας της Λιποξυγενάσης, βρέθηκαν κυρίως στα ελαιόλαδα της Κορωνέικης και της Ντόπιας Ζακύνθου, σε συγκεντρώσεις που συνολικά δεν ξεπερνούσαν τα 3,50 mg/kg. Σύμφωνα με δεδομένα της βιβλιογραφίας αυτές οι ενώσεις ευθύνονται για θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες που θυμίζουν «πράσινο», «γλυκό», «φράουλες» κ.α. (Aparicio & Luna, 2002; Luna et al., 2006; Morales et al., 2005; Reiners & Grosch, 1998).

Στα δείγματα που μελετήθηκαν βρέθηκαν και κάποιοι υδρογονάνθρακες, ωστόσο ο ρόλος αυτών των ενώσεων στο άρωμα του ελαιολάδου δεν είναι πλήρως διεκρινισμένος. Μεταξύ αυτών των ενώσεων εντοπίζονται τερπενικοί υδρογονάνθρακες, όπως το α -κοπαένιο, το λεμονένιο, το trans- β -οκιμένιο και το α -φαρνεσένιο, οι οποίες δίνουν το άρωμα «ευκαλύπτου», «λεμονιού», «χόρτου», «κίτρου», «βοτάνων», «ξύλου» κ.α (Temime et al., 2006).

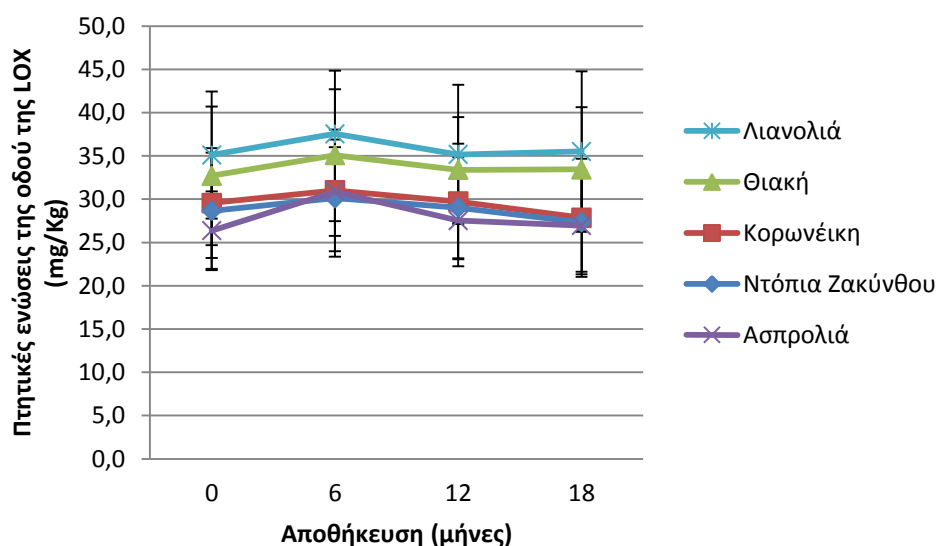
Τέλος, στα φρέσκα δείγματα οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες για τα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η εννεανάλη, η επτανάλη, η (E)-2-επτενάλη, η οκτανάλη, η 3-μεθυλ-2-βουτανόλη καθώς και κάποια καρβοξυλικά οξέα βρέθηκαν σε ιδιαίτερα μικρές συγκεντρώσεις δεδομένου ότι τα επιλεγθέντα δείγματα ήταν υψηλής ποιότητας.

11.3.3 Μεταβολές στη σύσταση των πτητικών ενώσεων στους 18 μήνες αποθήκευσης

Για την μελέτη των αλλαγών που συμβαίνουν στο πτητικό κλάσμα του παρθένου ελαιολάδου, κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής του, εστίασαμε στις προαναφερόμενες ενώσεις, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, καθώς και στα βασικά δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης τα οποία είναι υπεύθυνα για το οργανοληπτικό μειονέκτημα του ταγγού.

11.3.3.1 Μεταβολές στα προϊόντα με 6 άτομα άνθρακα που σχηματίζονται μέσω της οδού της λιποξυγενάσης

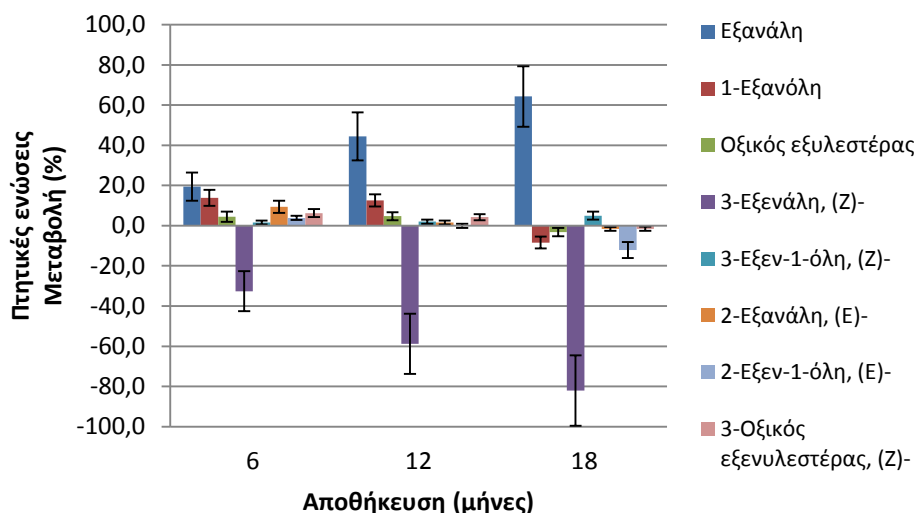
Όσον αφορά τις μεταβολές των ενώσεων με 6 άτομα άνθρακα που προέρχονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι της λιποξυγενάσης και είναι υπεύθυνες για τα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή της ολικής τους συγκέντρωσης παρουσιάζει την ίδια τάση σε όλες τις ποικιλίες (**Σχήμα 11.2**). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση, ως 15%, στα συνολικά προϊόντα τους 6 πρώτους μήνες της αποθήκευσης και μία μικρή μείωση στη συνέχεια, η οποία ακόμη και στους 18 μήνες, δεν ξεπέρασε το 10% σε σχέση με τις αρχικές συγκεντρώσεις. Οι μεταβολές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p>0,05$) γεγονός που δείχνει ότι κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης, το σύνολο των ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παραμένει σταθερό.



Σχήμα 11.2: Μεταβολές στα συνολικά προϊόντα της οδού της λιποξυγενάσης με 6 άτομα άνθρακα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε βάση την ποικιλία (μέση τιμή και εύρος).

Στο **σχήμα 11.3** απεικονίζεται το ποσοστό της μεταβολής των επιμέρους προϊόντων (με 6 άτομα άνθρακα) της βιοσυνθετικής οδού της λιποξυγενάσης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές για τις περισσότερες από αυτές τις ενώσεις, με εξαίρεση την (Z)-3-εξενάλη και την εξανάλη. Συγκεκριμένα, η (Z)-3-εξενάλη ήταν η μόνη ένωση που έδειξε σημαντική μείωση η οποία σε πολλά δείγματα έφτασε και το 100% στους 18 μήνες. Η μείωση της (Z)-3-εξενάλης μπορεί να φέρει σημαντική αλλαγή στο άρωμα λόγω του χαμηλού

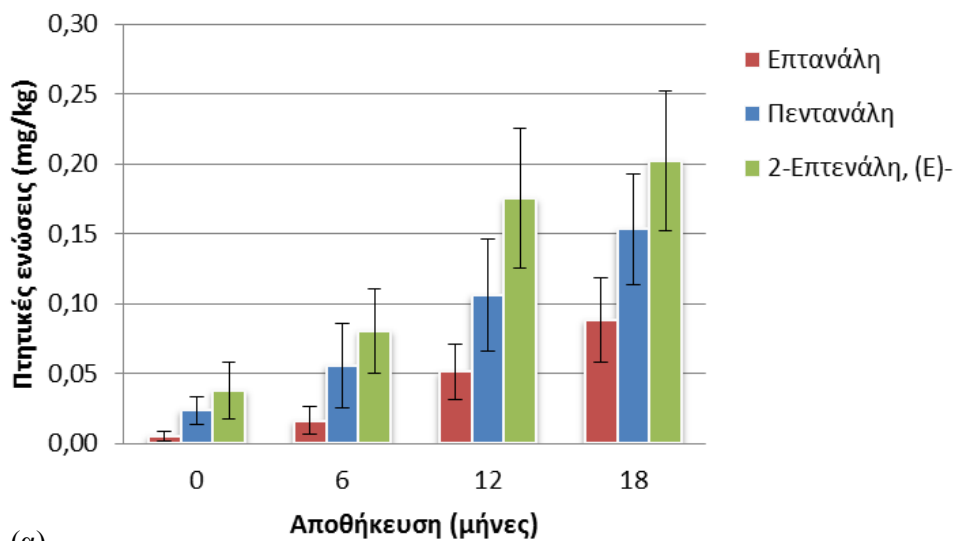
κατώφλιου οσμής. Από την άλλη πλευρά, για την ίδια περίοδο αποθήκευσης, η εξανάλη αυξήθηκε μέχρι και 80%. Η αύξηση της εξανάλης, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, είναι αναμενόμενη αφού είναι προϊόν τόσο ενζυμικής όσο και χημικής οξείδωσης.



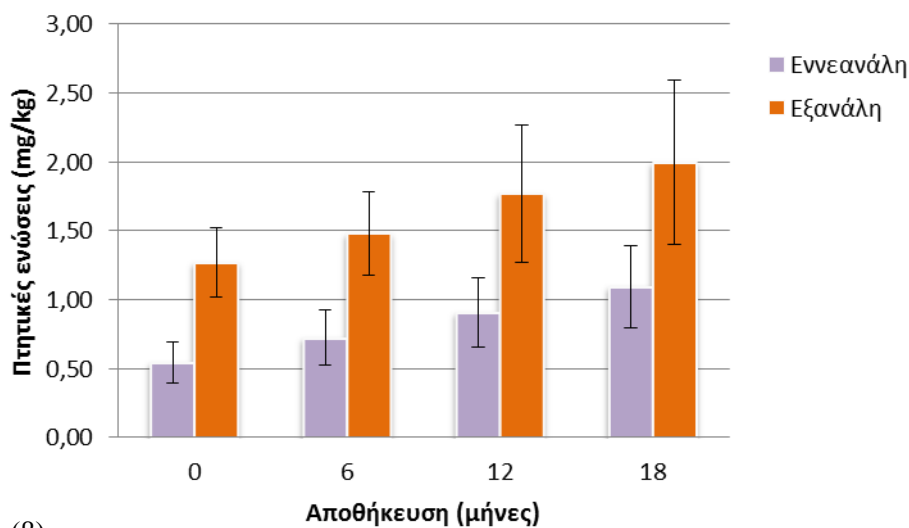
Σχήμα 11.3: Εκατοστιαίες μεταβολές των επιμέρους προϊόντων της οδού της λιποξυγενάσης με 6 άτομα άνθρακα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

11.3.3.2 Μεταβολές στα βασικά δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης

Στο **σχήμα 11.4** απεικονίζεται η μεταβολή των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για το οργανοληπτικό ελάττωμα του ταγγού. Στα φρέσκα δείγματα οι συγκεντρώσεις της εξανάλης και της εννεανάλης κυμάνθηκαν σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,36-2,05 και 0,15-1,23 mg/kg αντίστοιχα, ενώ η πεντανάλη, η επτανάλη και η (E)-2-επτενάλη βρέθηκαν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,00-0,16 mg/kg). Μεταξύ των προϊόντων οξείδωσης η επτανάλη, η (E)-2-επτενάλη και η πεντανάλη παρουσίασαν τη μεγαλύτερη τάση για αύξηση (**σχήμα 11.4α**) ενώ ακολουθούν η εξανάλη και η εννεανάλη (**σχήμα 11.4β**). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η εξανάλη και η εννεανάλη υπάρχουν και στα φρέσκα ελαιόλαδα ενώ η επτανάλη, η (E)-2-επτενάλη και η πεντανάλη σχηματίζονται κυρίως κατά την αποθήκευση, οι τελευταίες μπορούν να θεωρηθούν δείκτες οξείδωσης. Επιπλέον, η επτανάλη, η (E)-2-επτενάλη και η πεντανάλη χαρακτηρίζονται από μικρό κατώφλι οσμής με συνέπεια η συνεισφορά τους στα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά να είναι σημαντική.



(α)



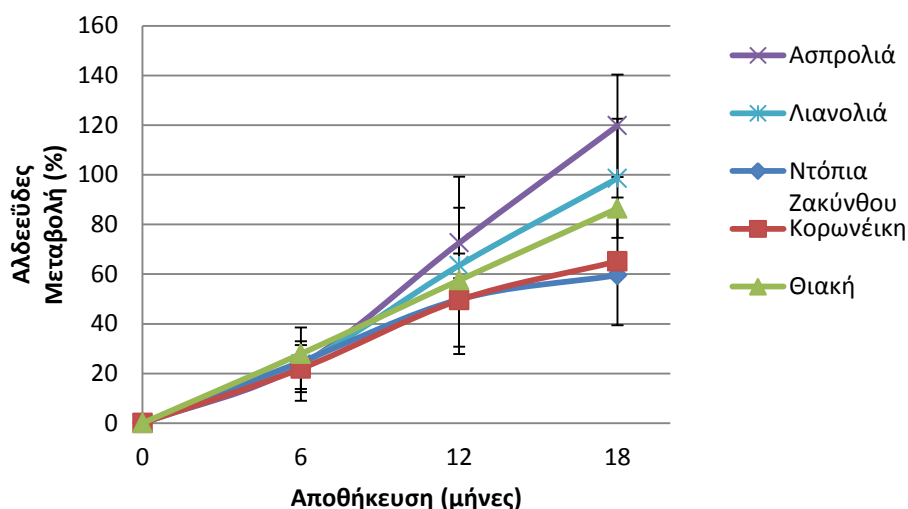
(β)

Σχήμα 11.4: Μεταβολή των αλδευδών που είναι υπεύθυνες για τα αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αναπτύσσονται στα αποθηκευμένα ελαιόλαδα με βάση την τάξη μεγέθους (α) < 0,30 mg/kg και (β) 0,50-3,00 mg/kg.

Στη βιβλιογραφία, σε μελέτες που έχουν διεξαχθεί κάτω από πειραματικές συνθήκες που διαφέρουν ως προς τη θερμοκρασία, τη συσκευασία, το φως κλπ, έχουν προταθεί διάφορες ενώσεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες οξείδωσης. Η (E)-2-επτενάλη έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οξείδωσης σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν κάτω από διάφορες συνθήκες (γυαλί/ PET/PVC περιέκτες, 15/30/40 °C θερμοκρασίας, φως ή σκοτάδι) για ένα χρόνο (Καπανούρας et al., 2004), η πεντανάλη έχει προταθεί ως δείκτης οξείδωσης όταν η αποθήκευση πραγματοποιήθηκε σε

χαμηλές θερμοκρασίες (Kalua et al., 2006a), ενώ η εννεανάλη σε συνθήκες επιταχυνόμενης οξείδωσης σε θερμοκρασία 60 °C (Vichi et al., 2003b).

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της ποικιλίας της ελιάς στο σχηματισμό των αλδευδών που είναι υπεύθυνες για το ελάττωμα του ταγγού. Η επί της εκατό μεταβολή της ολικής συγκέντρωσης αυτών των ενώσεων, ανά ποικιλία, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης απεικονίζεται στο **σχήμα 11.5**. Μέχρι τους έξι μήνες, το ποσοστό μεταβολής κυμάνθηκε σε παραπλήσια επίπεδα σε όλες τις ποικιλίες, με αύξηση 20-30%. Από όλες τις ποικιλίες, η Κορωνέικη έδειξε τη μικρότερη αύξηση ενώ η Λιανολιά και η Ασπρολιά τη μεγαλύτερη, χωρίς ωστόσο αυτές οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ τους ($p>0,05$). Στους 12 μήνες αποθήκευσης στα δείγματα ελαιολάδου της Κορωνέικης και της Ντόπιας Ζακύνθου παρατηρήθηκε η μικρότερη μέση ποσοστιαία αύξηση (50%) στις παραπάνω αλδεύδες. Ακολούθησαν τα δείγματα της Θιακής και της Λιανολιάς με μέση αύξηση 57 και 64% αντίστοιχα, ενώ στα δείγματα Ασπρολιάς παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη αύξηση που έφτασε το 77%. Παρόλα αυτά, λόγω της μεγάλης διακύμανσης των τιμών, ακόμη και στους 12 μήνες οι διαφορές μεταξύ των ποικιλιών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p>0,05$). Στους 18 μήνες αποθήκευσης τα δείγματα της Κορωνέικης και της Ντόπιας Ζακύνθου εξακολούθησαν να παρουσιάζουν την χαμηλότερη ποσοστιαία αύξηση, με μία μέση τιμή 65 %, σε αντίθεση με τα δείγματα της Λιανολιάς και της Ασπρολιάς στα οποία η αύξηση των συγκεκριμένων αλδευδών έφτασε το 120%. Οι διαφορές μεταξύ αυτών των δύο ομάδων δειγμάτων ήταν στατιστικά σημαντικές ($p<0,05$). Όσον αφορά τα δείγματα της Θιακής, παρουσίασαν ενδιάμεσες μεταβολές σε όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης, χωρίς να διαφοροποιούνται στατιστικά με κάποια από τις υπόλοιπες ποικιλίες.



Σχήμα 11.5: Εκατοστιαία μεταβολή των αλδεϋδών που είναι υπεύθυνες για τα ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (ιδιότητα του ταγγού) ανά ποικιλία.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν στις διαφορές στην αρχική σύσταση των δειγμάτων σε λιπαρά οξέα και/ή σε φαινολικά συστατικά. Η Λιανολία και η Ασπρολιά χαρακτηρίζονται ως ποικιλίες υψηλής περιεκτικότητας σε λινελαϊκό οξύ (μέσες τιμές 10,05 και 10,89% αντίστοιχα), ενώ η Κορωνέικη, η Ντόπια Ζακύνθου και η Θιακή ως χαμηλής περιεκτικότητας (μέσες τιμές 6,51, 7,21 και 6,10 % αντίστοιχα). Όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις, στο σύνολο τους τα δείγματα περιείχαν μεσαίες προς υψηλές συγκεντρώσεις, εκτός των δειγμάτων της Θιακής που περιείχαν μικρές συγκεντρώσεις (**πίνακας 11.1**).

Από τις πτητικές ενώσεις που υπάρχουν σε ταγγισμένα δείγματα δεν ευθύνονται όλες και στον ίδιο βαθμό για τη δυσάρεστη οσμή. Το κατά πόσο μία ένωση συνεισφέρει στο τελικό άρωμα εξαρτάται από το κατώφλι οσμής. Έτσι, οι ακόρεστες αλδεϋδες 2-επτενάλη, 2-οκτενάλη και 2-δεκενάλη θεωρούνται οι περισσότερο υπεύθυνες για το μειονέκτημα του ταγγού λόγω του πολύ χαμηλού κατωφλιού οσμής. Ακολουθούν οι κορεσμένες αλδεϋδες, πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, οκτανάλη και εννεανάλη καθώς και κάποια καρβοξυλικά οξέα, όπως το βουτανοϊκό, εξανοϊκό και οξικό οξύ (Morales et al., 2005). Η σύγκριση των κατωφλιών οσμής είναι ιδιαίτερα δύσκολη λόγω των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών και έτσι στη βιβλιογραφία για τις ίδιες ενώσεις παραθέτονται διαφορετικές τιμές (Kalua et al., 2007).

11.3.4 Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης

Η βηματική ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (Stepwise Linear Regression Analysis, SLRA) εφαρμόστηκε ώστε να διευκρινιστεί αν και κατά πόσο, οι μετρήσιμες μεταβλητές, δηλαδή το φαινολικό περιεχόμενο και η σύσταση σε λιπαρά οξέα, συσχετίζονται με τις διαφορές που σημειώθηκαν στον ρυθμό σχηματισμού των αλδευδών που είναι υπεύθυνες για την οργανοληπτική ιδιότητα του ταγγού. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κλίσεις ευθείας της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης των αλδευδών (mg/kg) και του χρόνου αποθήκευσης σε μήνες. Βρέθηκε ότι η ποσότητα του λινελαϊκού οξέος και η αναλογία ολικών/ο-διφαινόλων να έχουν τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τον ρυθμό σχηματισμού της (E)-2-επτενάλης. Οι συντελεστές Pearson για τις παραπάνω μεταβλητές βρέθηκαν 0,714 και - 0,694 αντίστοιχα. Το προτεινόμενο μοντέλο δίνεται στον **πίνακα 11.4**, όπου το R^2 φανερώνει το ποσοστό της μεταβλητότητας των δεδομένων που εξηγείται από κάθε γραμμικό μοντέλο. Στο πρώτο μοντέλο το R^2 βρέθηκε ίσο με 0,510 γεγονός που δείχνει ότι η ποσότητα του λινελαϊκού οξέος εξηγεί το 51,0 % της μεταβλητότητας του ρυθμού σχηματισμού της (E)-2-επτενάλης. Προχωρώντας στο δεύτερο μοντέλο παρατηρούμε ότι το R^2 είναι 0,711, που σημαίνει ότι 20,2% της μεταβλητότητας των δεδομένων εξηγείται από το λόγο ολικά φαινολικά/ο-διφαινόλες. Ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (Adjusted R^2) έχει λάβει υπόψη του και το μέγεθος του δείγματος και το γεγονός ότι βρίσκεται πολύ κοντά στο R^2 δείχνει ότι το μοντέλο γενικεύεται ικανοποιητικά.

Πίνακας 11.4: Προτεινόμενα μοντέλα, εξαρτημένη μεταβλητή: ρυθμός σχηματισμού της (E)-2-επτενάλης.

Model	R	R^2	Adjusted R^2	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				Durbin-Watson	
					R^2 Change	F Change	df1	df2		Sig. F Change
1	0,714 ^a	0,510	0,496	0,005977	0,510	36,409	1	35	0,000	
2	0,843 ^b	0,711	0,694	0,004653	0,202	23,746	1	34	0,000	1,781

^a Προγνωστικός δείκτης: (Σταθερά), C18:2

^b Προγνωστικοί δείκτες: (Σταθερά), C18:2, ολικά φαινολικά/ο-διφαινόλες

11.4 Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια δύο περιόδων συγκομιδής, συλλέχθηκαν 42 δείγματα παρθένου ελαιολάδου, που ανήκαν στις βασικές ποικιλίες ελιάς που καλλιεργούνται στη δυτική Ελλάδα, και αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα μπουκάλια (με κενό 0,5%), σε σκοτεινό υπόγειο χώρο χωρίς κεντρική θέρμανση. Οι μεταβολές στα χαρακτηριστικά ποιότητας και στη σύσταση σε πτητικές ενώσεις παρακολούθηθηκαν για 18 μήνες αποθήκευσης οδηγώντας στα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Μετά από 18 μήνες αποθήκευσης, τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, όπως η ελεύθερη οξύτητα, οι συντελεστές απορρόφησης (K_{232} , K_{270}) και οι αριθμοί υπεροξειδίων δεν ξεπέρασαν τα ανώτατα όρια που έχουν καθοριστεί από τον κανονισμό της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα.
- ✓ Η συνολική συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τις θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες, παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια των 18 μηνών.
- ✓ Η ποσοστιαία μεταβολή των πτητικών προϊόντων οξείδωσης [πεντανάλη, εξανάλη, επτανάλη, (E)-2-επτενάλη και εννεανάλη] ήταν υψηλότερη στα παρθένα ελαιόλαδα των ποικιλιών Λιανολιά και Ασπρολιά σε σύγκριση με αυτά των ποικιλιών Κορωνέικη, Ντόπια Ζακύνθου και Θιακή, ωστόσο οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο στους 18 μήνες αποθήκευσης.
- ✓ Τα ελαιόλαδα που προέρχονται από τις ποικιλίες Λιανολιά και Ασπρολιά, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ, είναι πιο ευαίσθητα στην οξειδωτική αλλοίωση σε σύγκριση με τα ελαιόλαδα των ποικιλιών Κορωνέικη, Ντόπια Ζακύνθου και Θιακή που χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ.
- ✓ Μεταξύ των πτητικών προϊόντων οξείδωσης, η (E)-2-επτενάλη μπορεί να προταθεί ως δείκτης της οξείδωσης, κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης
- ✓ Το λινελαϊκό οξύ και η αναλογία ολικά φαινολικά/ο-διφαινόλες είχαν την μέγιστη συσχέτιση με το ρυθμό σχηματισμού της (E)-2-επτενάλης.

Κεφάλαιο 12

Μεταβολή στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων κατά την αποθήκευση

12.1 Εισαγωγή

Όπως για κάθε τρόφιμο έτσι και για το ελαιόλαδο έχουν θεσπιστεί κριτήρια για να ελέγχεται η ποιότητά του. Τα κριτήρια ποιότητας του ελαιολάδου, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και σύμφωνα με το Εμπορικό Πρότυπο του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου αποτελούν η ελεύθερη οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίων, η απορρόφηση στο υπεριώδες και η οργανοληπτική αξιολόγηση. Από αυτά, η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί κριτήριο ποιότητας μόνο για το παρθένο ελαιόλαδο. Η αποδοχή του ελαιολάδου από τους καταναλωτές εξαρτάται από τα γευστικά χαρακτηριστικά, τα οποία προσδιορίζονται μέσω της διαδικασίας της οργανοληπτικής αξιολόγησης, που γίνεται από εκπαιδευμένους δοκιμαστές με εκτίμηση των θετικών και των αρνητικών χαρακτηριστικών (IOC, 2013b). Μέσω της μεθόδου αυτής γίνεται κατάταξη των ελαιολάδων συναρτήσει της έντασης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών από την ομάδα των δοκιμαστών. Η κατηγορία «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο», εκτός από τα υπόλοιπα ποιοτικά κριτήρια, θα πρέπει να έχει μέση τιμή φρουτώδους μεγαλύτερη από το μηδέν και να μην έχει κάποιο οργανοληπτικό ελάττωμα (IOC, 2013a).

Κατά τη διάρκεια του διαστήματος αποθήκευσης του ελαιολάδου επέρχεται προοδευτικά αλλοίωση, ο βαθμός της οποίας εξαρτάται από τις συνθήκες αποθήκευσης (Boskou, 2006; Κυριτσάκης, 2007). Η οξειδωση ή αλλιώς τάγγιση είναι η σημαντικότερη αλλοίωση των εδώδιμων ελαίων που συμβαίνει κατά την αποθήκευση, καθώς προκαλεί υποβάθμιση των θρεπτικών ιδιοτήτων αλλά και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της λιπαρής ύλης (Velasco & Dobarganes, 2002).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, οι πτητικές και οι φαινολικές ενώσεις, που είναι υπεύθυνες για τα θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου, μεταβάλλονται ποσοτικά και ποιοτικά λόγω οξειδωτικών αντιδράσεων ή λόγω αποδόμησης. Ως συνέπεια, οι θετικές ιδιότητες του φρουτώδους, του πικρού και του πικάντικου μειώνονται, ενώ οι αρνητικές οργανοληπτικές ιδιότητες αρχίζουν να σταδιακά να αναδεικνύονται έχοντας ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας του ελαιολάδου. Μετά από κάποιο διάστημα το ελαιόλαδο δεν καλύπτει πια τις προϋποθέσεις για την κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου και μπορεί να μεταβεί στην κατηγορία του παρθένου ή και του μειονεκτικού ελαιολάδου. Το πόσο γρήγορα θα συμβούν αυτές οι μεταβολές εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι, οι συνθήκες της αποθήκευσης (θερμοκρασία, φως και υλικό συσκευασίας), η ποικιλία της ελιάς και τα αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά (Ben-Hassine et al., 2013).

Τα αποθηκευμένα ελαιόλαδα χαρακτηρίζονται κυρίως από τη παρουσία πολλών C7-C12 κορεσμένων και ακόρεστων αλδεϋδών (Angerosa, 2002; Morales et al., 2005). Άλλες ενώσεις που συνεισφέρουν στο οργανοληπτικό μειονέκτημα του ταγγού είναι οι C6-C9 διενάλες και τα καρβοξυλικά οξέα (Morales et al., 2005). Η ύπαρξη καρβοξυλικών οξέων υποδεικνύει υψηλό επίπεδο αλλοίωσης του ελαίου, καθώς οι ενώσεις αυτές εμφανίζονται στο τέλος της οξειδωτικής διαδικασίας (Kochhar, 1996).

Πολλές από τις παραπάνω ενώσεις έχουν προταθεί ως δείκτες οξείδωσης. Η εννεανάλη έχει προταθεί ως δείκτης για την ανίχνευση του αρχικού σταδίου της οξείδωσης θερμοοξειδωμένων δειγμάτων και η αναλογία εξανάλης/εννεανάλης για τη διάκριση μεταξύ οξειδωμένων και καλής ποιότητας δειγμάτων ελαιολάδου (Morales et al., 1997). Η εξανάλη, αν και αυξάνεται κατά την οξείδωση, δεν διακρίνει τα οξειδωμένα από τα παρθένα ελαιόλαδα καθώς προέρχεται τόσο από χημικές όσο και από ενζυματικές πορείες οξείδωσης (Morales et al., 1997; Vichi et al., 2003b). Άλλοι προτεινόμενοι δείκτες οξείδωσης είναι οι C6 αλκοόλες και C5 κετόνες (Cavalli et al., 2004). Τέλος, η (E)-2-επτενάλη, έχει δείξει θετική συσχέτιση με την αντίληψη του ταγγού (Solinas, Angerosa, & Cucurachi, 1987).

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η σύσταση του ελαιολάδου σε φαινολικές ενώσεις επίσης υφίσταται μεταβολές, λόγω αντιδράσεων υδρόλυσης ή/και οξείδωσης, οι οποίες μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικές όχι μόνο από τη πλευρά της θρεπτικής αξίας του

προϊόντος αλλά και να επηρεάσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του και πιο συγκεκριμένα την αντίληψη του πικρού και του πικάντικου (Brenes et al., 2001).

Αν και δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία που να περιγράφει τις μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου κατά την αποθήκευση, αυτές αποτελούν ένα κρίσιμο ζήτημα, αφού συσχετίζονται με τον χρόνο ζωής του. Δεδομένου ότι η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί κριτήριο ποιότητας για το παρθένο ελαιόλαδο, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, είναι σημαντικό οι τιμές της να παραμένουν εντός των προβλεπόμενων ορίων σε όλο το διάστημα της αποθήκευσης. Για το λόγο αυτό έγινε μελέτη των μεταβολών των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών ελαιολάδων από 2 ελληνικές ποικιλίες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για 18 μήνες. Επίσης, έγινε προσπάθεια κατάταξης των δειγμάτων σε κατηγορίες εξαιρετικού παρθένου, παρθένου και ελαττωματικού ελαιολάδου (δείγματα με το ελάττωμα του ταγγού) με βάση το προφίλ τους σε πτητικές ενώσεις.

12.2 Μέθοδοι και υλικά

12.2.1 Δείγματα

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου των ποικιλιών Κορωνέικη (n=6) και Λιανολιά (n=6) τα οποία συλλέχτηκαν κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2011-2012 και 2013-2014 από τις περιοχές της Πρέβεζας και της Ζακύνθου. Στα δείγματα έγινε έλεγχος των αρχικών ποιοτικών χαρακτηριστικών (αριθμοί υπεροξειδίων, ελεύθερη οξύτητα, ειδικοί συντελεστές απόσβεσης και οργανοληπτικός έλεγχος). Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για αποθήκευση ανήκαν όλα στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου. Οι συνθήκες αποθήκευσης περιγράφονται στο κεφάλαιο 10 (παράγραφος 10.2.1).

Για τη κατάταξη των δειγμάτων σε κατηγορίες εξαιρετικού παρθένου, παρθένου και ελαττωματικού ελαιολάδου με βάση το προφίλ τους σε πτητικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν 44 δείγματα. Επιλέχτηκαν δείγματα τα οποία είχαν εξεταστεί από την ομάδα οργανοληπτικού ελέγχου και είχαν χαρακτηριστεί εξαιρετικά παρθένα καθώς και δείγματα τα οποία είχαν αναπτύξει το ελάττωμα του ταγγού, τόσο παρθένα όσο και ελαττωματικά. Στα δείγματα αυτά έγινε ανάλυση των πτητικών ενώσεων.

12.2.2 Οργανοληπτική αξιολόγησης ελαιολάδου

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων έγινε από 8 εκπαιδευμένους δοκιμαστές σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο (IOC, 2013b).

12.2.3 Προσδιορισμός κριτηρίων ποιότητας

Οι προσδιορισμοί του αριθμού υπεροξειδίων, της ελεύθερης οξύτητας και των ειδικών συντελεστών απόσβεσης (K_{232} , K_{270}) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις επίσημες μεθόδους του Κανονισμού της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (EC, 1991) όπως περιγράφονται στο κεφάλαιο 9 (παράγραφος 9.2.4).

12.2.4 Εκχύλιση και ημιποσοτικοποίηση των πτητικών ενώσεων με SPME-GC-MS

Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 11 (παράγραφος 11.2.5).

12.2.5 Στατιστική επεξεργασία

Για να βρεθούν ομοιογενείς ομάδες δειγμάτων με βάση τα αναλυθέντα συστατικά, εφαρμόστηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA) με στόχο να εξαχθεί το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης από τους λιγότερους δυνατούς παράγοντες. Η επεξεργασία έγινε με το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 19.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

12.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

12.3.1 Περιγραφή των φρέσκων δειγμάτων

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, συλλέχτηκαν δείγματα ελαιολάδου από δύο ελληνικές ποικιλίες ελιάς, την Κορωνέικη και τη Λιανολιά. Όλα τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν ανήκαν στη κατηγορία του εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου με βάση την ελεύθερη οξύτητα, τον αριθμό υπεροξειδίων και τους ειδικούς συντελεστές απόσβεσης (πίνακας 12.1) καθώς και την οργανοληπτική αξιολόγηση (πίνακας 12.2). Όπως φαίνεται από τους μέσους όρους των ιδιοτήτων, φρουτώδες, πικρό και πικάντικο οι ποικιλίες δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Ωστόσο, σύμφωνα με τους δοκιμαστές, τα δείγματα της Κορωνέικης άφηναν μία συνολική αίσθηση «πράσινου-φρέσκου», ενώ αυτά της

Λιανολιάς άφηναν μία συνολική αίσθηση «αρωματικών φρούτων» και «λουλουδιών». Όσον αφορά τη γεύση, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως μέτριας έντασης σε πικρό και πικάντικο.

Πίνακας 12.1: Κριτήρια ποιότητας των φρέσκων δειγμάτων.

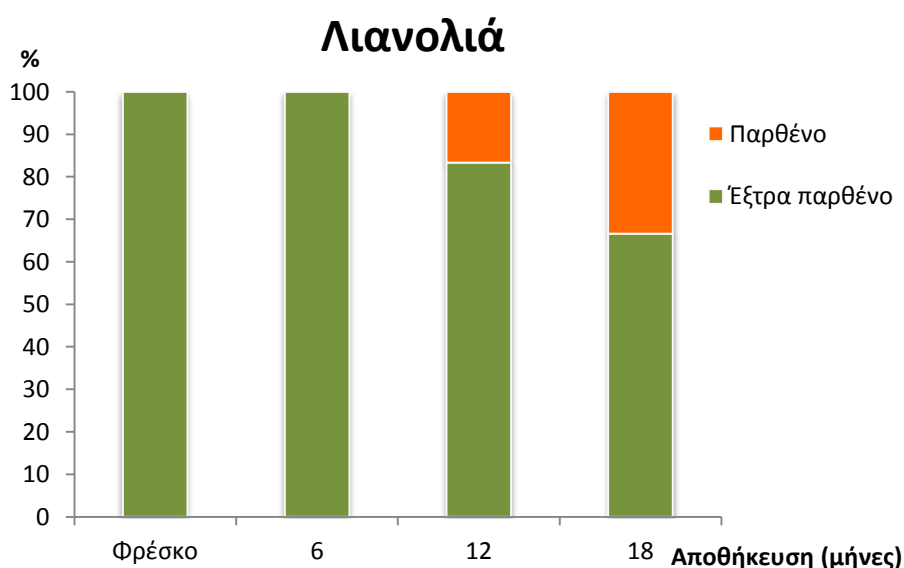
A/A	Περιοχή	Ποικιλία	Ελαιοκομική Περίοδος	Ελεύθερη οξύτητα %	Αριθμός Υπεροξειδίων	K ₂₇₀	K ₂₃₂
1	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2010-2012	0,11	6,0	0,16	1,58
2	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2010-2012	0,17	6,4	0,16	1,46
3	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2010-2012	0,22	11,9	0,15	1,58
4	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2010-2012	0,22	4,1	0,16	1,46
5	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2010-2012	0,25	13,9	0,15	1,52
6	Πρέβεζα	Κορωνέικη	2013-2014	0,28	12,5	0,13	1,70
7	Πρέβεζα	Λιανολιά	2010-2012	0,56	9,8	0,14	1,72
8	Πρέβεζα	Λιανολιά	2010-2012	0,11	5,1	0,16	1,92
9	Πρέβεζα	Λιανολιά	2010-2012	0,22	6,5	0,13	1,67
10	Πρέβεζα	Λιανολιά	2013-2014	0,67	9,3	0,13	1,72
11	Πρέβεζα	Λιανολιά	2013-2014	0,66	13,3	0,15	1,62
12	Πρέβεζα	Λιανολιά	2013-2014	0,74	11,3	0,11	1,84

Πίνακας 12.2: Εύρος τιμών της οργανοληπτικής αξιολόγησης των φρέσκων δειγμάτων και περιγραφή των χαρακτηριστικών τους.

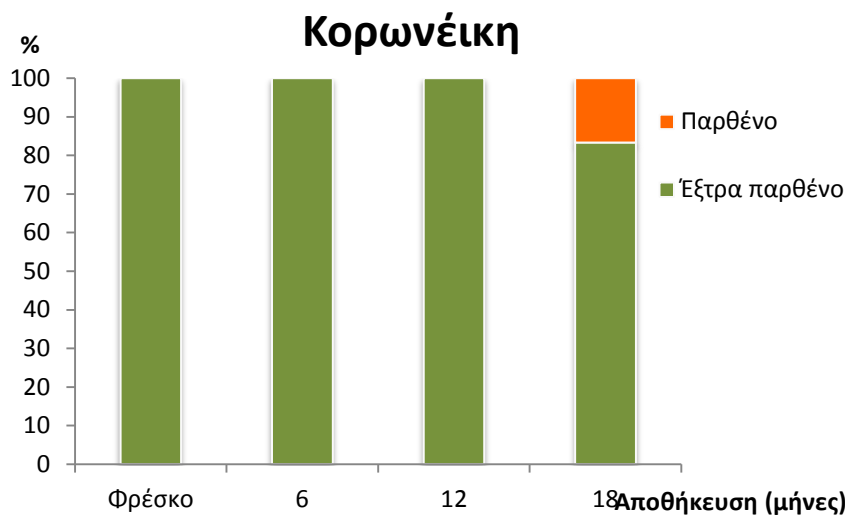
Ποικιλία	Φρουτώδες	Πικρό	Πικάντικο	Περιγραφή
Κορωνέικη	4,8-5,7	2,0-3,5	2,1-4,0	Φρουτώδες Φρεσκοκομμένο χόρτο Πράσινα χόρτα Μέτρια πικρή και πικάντικη γεύση
Λιανολιά	4,8-5,5	2,0-3,5	2,5-4,0	Φρουτώδες Λουλούδια - Βότανα Χαμομήλι Μήλο Μέτρια πικρή και πικάντικη γεύση

12.3.2 Μεταβολές στην οργανοληπτική αξιολόγηση κατά την αποθήκευση

Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων (οξύτητα, αριθμός υπεροξειδίων και K) δεν ξεπέρασαν τα όρια που έχουν θεσπιστεί για τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα. Συγκεκριμένα οι μέγιστες τιμές που καταγράφηκαν ήταν οι εξής: οξύτητα 0,76% , αριθμός υπεροξειδίων 19,1 meq/kg, K₂₃₂ 2,41 και K₂₇₀ 0,20. Ωστόσο, όπως φάνηκε από την οργανοληπτική αξιολόγηση άρχισαν να γίνονται αντιληπτά οργανοληπτικά ελαττώματα. Συγκεκριμένα σε κάποια δείγματα άρχισε να ανιχνεύεται το ελάττωμα του ταγγού. Σύμφωνα με τον κανονισμό 2568/91 όταν με την ιδιότητα του φρουτώδους, συνυπάρχει ελάττωμα στο δείγμα (διάμεσος τιμή<3,5) τότε αυτό κατατάσσεται στην κατηγορία του παρθένου ελαιολάδου. Όπως φαίνεται στα **σχήματα 12.1-12.2** στους 12 μήνες αποθήκευσης 1 δείγμα της ποικιλίας Λιανολιά ανέπτυξε το ελάττωμα του ταγγού. Στους 18 μήνες αποθήκευσης 2 από τα δείγματα της ποικιλίας Λιανολιά και 1 από τα δείγματα της ποικιλίας Κορωνέικη ανέπτυξαν το οργανοληπτικό ελάττωμα ταγγού και κατατάχτηκαν στη κατηγορία του παρθένου ελαιολάδου. Στα δείγματα από τη ποικιλία Λιανολιά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη τάση για αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους σε σχέση με αυτά της Κορωνέικης, γεγονός που αποδόθηκε κυρίως στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της πρώτης ποικιλίας σε λινελαϊκό οξύ όπως αναλυτικά συζητήθηκε στο **κεφάλαιο 11**.

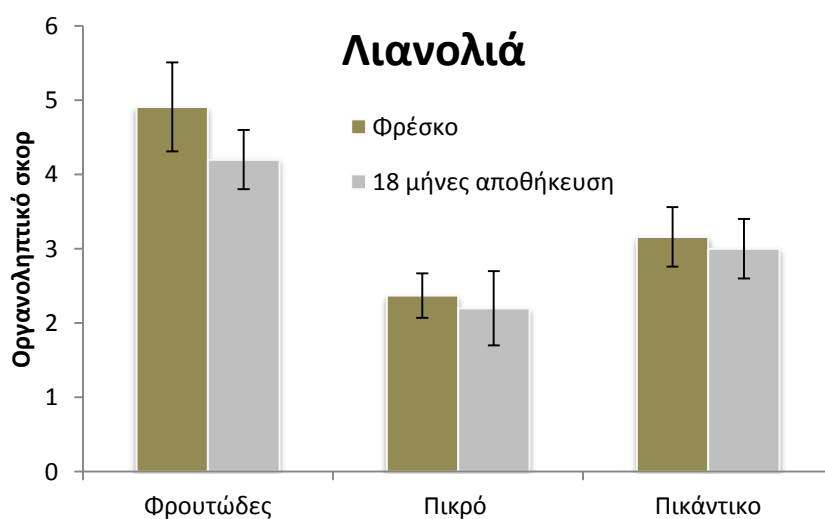


Σχήμα 12.1: Κατάταξη των δειγμάτων Λιανολιάς σε κατηγορίες, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, με βάση τον οργανοληπτικό έλεγχο.

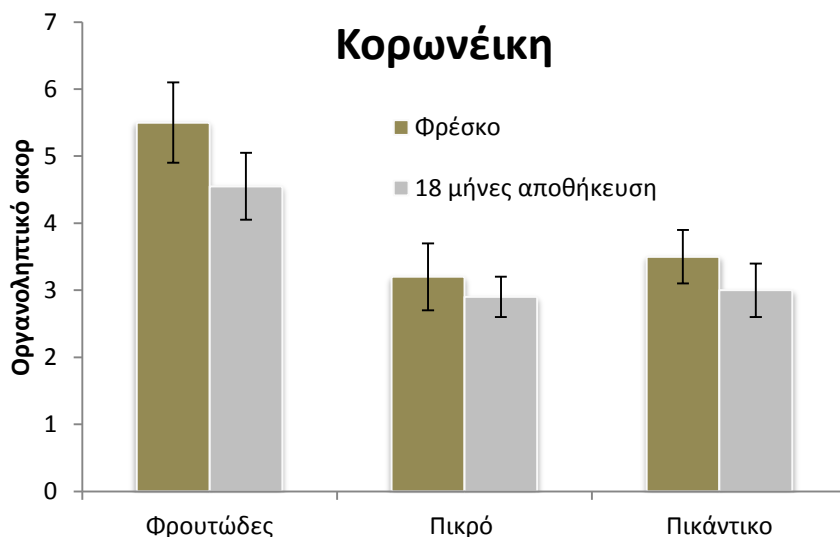


Σχήμα 12.2: Κατάταξη των δειγμάτων Κορωνέικης σε κατηγορίες, κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, με βάση τον οργανοληπτικό έλεγχο.

Όσον αφορά το φρουτώδες άρωμα, παρατηρείται μείωση που φτάνει το 25% και στις τις δύο ποικιλίες μετά το τέλος της αποθήκευσης (**σχήματα 12.3-12.4**). Η μεταβολή στο άρωμα μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τα αρνητικά χαρακτηριστικά και στη μεταβολή των αναλογιών αυτών των ομάδων ενώσεων επί του πτητικού κλάσματος. Επιπλέον, όπως φαίνεται στα **σχήματα 12.3-12.4** η μείωση στις ιδιότητες του πικρού και πικάντικου, έφτασε το 29% μετά τους 18 μήνες. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στη μεταβολή της φαινολικής σύστασης κατά την αποθήκευση.



Σχήμα 12.3: Βαθμολόγηση των θετικών ιδιοτήτων της ποικιλίας Λιανολιάς στη αρχή και στο τέλος της αποθήκευσης.



Σχήμα 12.4: Βαθμολόγηση των θετικών ιδιοτήτων της ποικιλίας Κορωνέικης στη αρχή και στο τέλος της αποθήκευσης.

12.3.3 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

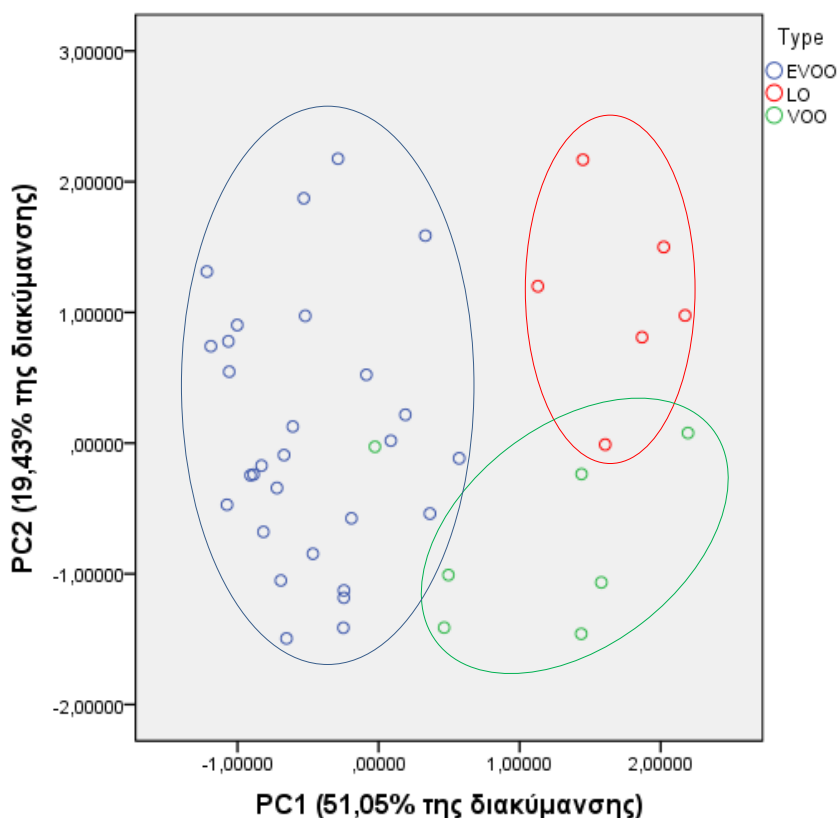
Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον στράφηκε στο να καταστεί δυνατή η ταξινόμηση των ελαιολάδων σε κατηγορίες (εξαιρετικό παρθένο, παρθένο και ελαττωματικό) με τη χρήση αποκλειστικά της σύστασης σε πτητικές ενώσεις. Η χρήση στατιστικών προσεγγίσεων, όπως είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA), μπορεί να εντοπίσει μοτίβα σε δείγματα και τις μεταβλητές που συμβάλλουν στην ομαδοποίηση αυτών. Για να βρεθούν ομοιογενείς ομάδες δειγμάτων με βάση τα αναλυθέντα συστατικά, εφαρμόστηκε η ανάλυση κύριων συνιστωσών στις ποσοτικές μετρήσεις όλων των επιμέρους πτητικών συστατικών αλλά και με τη χρήση ομαδοποίησης αυτών (πίνακας 12.3). Οι κύριες ομαδοποιήσεις περιλάμβαναν διαχωρισμό των πτητικών ενώσεων με βάση τη χαρακτηριστική τους ομάδα (αλδεΐδες, αλκοόλες, κετόνες, εστέρες, οξέα) ή την πρόδρομη ένωση (προϊόντα λινελαϊκού ή λινολενικού οξέος). Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το ελάττωμα του ταγγού, οι οποίες είναι κυρίως οι αλδεΐδες. Αυτές ομαδοποιήθηκαν με διάφορους τρόπους, επικρατέστερος των οποίων ήταν μία ομάδα με τις κορεσμένες και μία με τις ακόρεστες από C7 ως C10. Όσον αφορά αυτές τις αλδεΐδες, η κατάταξη αυτή και ειδικά όταν γίνεται υπολογισμός των αναλογιών επί του συνολικού πτητικού κλάσματος, μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη γιατί οι ενώσεις που απαρτίζουν την κάθε ομάδα έχουν κατώφλια οσμής της ίδιας τάξης μεγέθους. Ως εκ τούτου, οι ακόρεστες αλδεΐδες λόγω του ιδιαίτερα χαμηλού κατωφλιού οσμής, αν και σε μικρή

ποσότητα, είναι ικανές να διαμορφώσουν το συνολικό άρωμα. Επίσης, υπολογίστηκε ένα ξεχωριστό άθροισμα των κορεσμένων αλδευδών που περιείχε και την εξανάλη. Η εξανάλη, αν και έχει την τάση να αυξάνεται κατά την οξείδωση, έχει υποστηριχτεί ότι δεν διακρίνει τα οξειδωμένα από τα παρθένα ελαιόλαδα καθώς προέρχεται τόσο από χημικές όσο και από ενζυματικές πορείες οξείδωσης, υπάρχει εξαρχής στο δείγμα, ενώ μέχρι κάποια συγκέντρωση συσχετίζεται με θετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Morales et al., 1997; Vichi et al., 2003b). Τέλος, έγινε χρήση και της αναλογίας εννεανάλη/εξανάλη γιατί προτείνεται ως δείκτης για τη διάκριση μεταξύ οξειδωμένων και καλής ποιότητας δειγμάτων ελαιολάδου στη βιβλιογραφία (Morales et al., 1997).

Πίνακας 12.3: Ομαδοποίηση των πτητικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν σε φρέσκα και αποθηκευμένα δείγματα.

Προϊόντα οδού λιποξυγενάσης με C6	RI	Κορεσμένες αλδεΐδες (C7-C10)	RI
3-Εξενάλη, (Z)-	796	Επτανάλη	899
Εξανάλη	803	Οκτανάλη	1005
3-Εξεν-1-όλη, (Z)-	849	Εννεανάλη	1102
2-Εξενάλη, (E)-	855	Δεκανάλη	1201
2-Εξεν-1-όλη, (E)-	863	Ακόρεστες αλδεΐδες (C7-C10)	RI
1-Εξανόλη	865	2-Επτενάλη, (E)-	957
3-οξικός εξενυλεστέρας, (Z)-	1004	2-Οκτενάλη, (E)-	1050
Οξικός εξυλεστέρας	1010	2-Εννενάλη, (E)-	1162
Προϊόντα οδού λιποξυγενάσης με C5	RI	2-Δεκενάλη, (E)-	1250
1-Πεντεν-3-όλη	680	Διάφορες άλλες ενώσεις	RI
1-Πεντεν-3-όνη	683	1,3-Πενταδιένιο, (E)-	524
3-Πεντανόνη	694	2,4-Εξαδιενάλη, (E, E)-	909
Πεντανάλη	696	α -πινένιο	942
2-Πεντενάλη, (E)-	757	3-Αιθυλ-1,5-οκταδιένιο	949
2-Πεντεν-1-όλη, (Z)-	766	Βενζαλδεΐδη	971
Οξέα	RI	6-Μεθυλ-5-επτεν-2-όνη	982
Οξικό οξύ	575	Υδρογονάνθρακας	992
Εξανικό οξύ	974	Υδρογονάνθρακας	994
Εννεανικό οξύ	1270	1,2,4-Τριμεθυλ-βενζόλιο	999
Διάφορες αλκοόλες	RI	Λιμονένιο	1036
Αιθανόλη	473	3,7-διμεθυλ- 1,3,6-οκτατριένιο, (E)-	1044
3-Μεθυλ-1-βουτανόλη	734	4,8-διμεθυλ-1,3,7-νονατριένιο, (E)-	1109
1-Επτανόλη	920	2-Δωδεκένιο, (E)-	1202
1-Οκτανόλη	1065	α -Κοπαένιο	1360
1-Εννεανόλη	1168	α -Φαρνεσένιο	1524

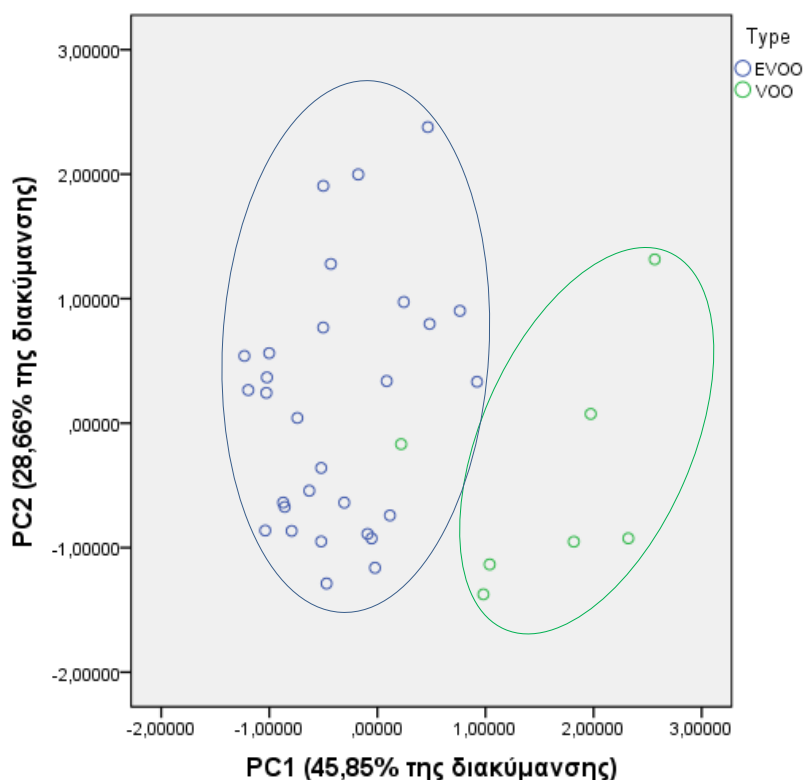
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κύριων συνιστωσών απεικονίζονται γραφικά στα **σχήματα 12.5-12.6**. Στην πρώτη περίπτωση 2 κύριες συνιστώσες (PC) εξηγούν το 70,48 % της διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) αντιπροσωπεύει το 51,05 % της συνολικής διακύμανσης και παρουσιάζει υψηλό βαθμό συσχέτισης με τα εκατοστιαία ποσοστά των ακόρεστων και κορεσμένων αλδευδών με C7-C10. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) αντιπροσωπεύει το 19,43 % της διακύμανσης και παρουσιάζει καλή θετική συσχέτιση με τη συνολική ποσότητα των προϊόντων της οδού της LOX και το εκατοστιαίο ποσοστό των κορεσμένων αλκοολών με C7-C9.



Σχήμα 12.5. Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (EVOO: εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο, VOO: παρθένο ελαιόλαδο και LO: ελαττωματικό ελαιόλαδο).

Περαιτέρω προσπάθεια έγινε ώστε να επιτευχθεί η κατάταξη του δείγματος όταν η ανάπτυξη του ελαττώματος βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, δηλαδή το σημείο εκείνο που το δείγμα από εξαιρετικό παρθένο μεταβαίνει στη κατηγορία του παρθένου. Για το λόγο αυτό έγινε ανάλυση κύριων συνιστωσών με χρήση των δειγμάτων εξαιρετικού παρθένου και παρθένου ελαιολάδου. Τα αποτελέσματα PCA απεικονίζονται γραφικά στο **σχήμα 12.6**. Σε αυτή τη περίπτωση βρέθηκαν πάλι 2 κύριες συνιστώσες που

εξηγούν το 74,51% της διακύμανσης. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) αντιπροσωπεύει το 45,85% της συνολικής διακύμανσης και παρουσιάζει επίσης υψηλό βαθμό συσχέτισης με το εκατοστιαίο ποσοστό των ακόρεστων και κορεσμένων αλδευδών με C7-C10. Η δεύτερη κύρια συνιστώσα (PC2) αντιπροσωπεύει το 28,66% της συνολικής διακύμανσης και παρουσιάζει καλή θετική συσχέτιση με τη συνολική ποσότητα των προϊόντων της οδού της LOX, με το εκατοστιαίο ποσοστό των ακόρεστων αλκοολών (C7-C9) καθώς και με την αναλογία εννεανάλη/εξανάλη. Παρατηρούμε ότι ένα από τα δείγματα του παρθένου ελαιολάδου δεν κατατάσσεται σωστά. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι στο συγκεκριμένο δείγμα παρότι επικρατεί το ελάττωμα του ταγγού συνυπάρχει και το ελάττωμα της μούργας.



Σχήμα 12.6: Γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (EVOO: εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και VOO: παρθένο ελαιόλαδο).

12.4 Συμπεράσματα

Δεδομένου ότι η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί κριτήριο ποιότητας για το παρθένο ελαιόλαδο, σύμφωνα με τον Κανονισμό 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, είναι σημαντικό οι τιμές της να παραμένουν εντός των προβλεπόμενων ορίων σε όλο το διάστημα της αποθήκευσης του ελαιολάδου, μέχρι και την κατανάλωση. Η μελέτη

των μεταβολών στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κατά την αποθήκευση εξαιρετικών παρθένων ελαιολάδων από δυο ποικιλίες οδήγησε στα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Σε ιδανικές συνθήκες αποθήκευσης, κάποια δείγματα εμφανίζουν οργανοληπτικό ελάττωμα, ακόμη και αν τα υπόλοιπα κριτήρια ποιότητας δεν ξεπερνούν τα όρια του Κανονισμού 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.
- ✓ Τα δείγματα ελαιολάδου από την ποικιλία Λιανολιά, έδειξαν μεγαλύτερη τάση για εμφάνιση ελαττώματος σε σχέση με αυτά της Κορωνέικης. Η διαφορά στη συμπεριφορά των δειγμάτων αποδόθηκε στη διαφορετική σύσταση σε λιπαρά οξέα.
- ✓ Τα δείγματα είναι δυνατόν να διαχωριστούν στις κατηγορίες του εξαιρετικού παρθένου, παρθένου και μειονεκτικού ελαιολάδου με βάση το προφίλ τους σε πτητικές ενώσεις. Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών βρήκε δύο κύριες συνιστώσες που μπορούν να εξηγήσουν το 70,48 % της διακύμανσης.
- ✓ Καλύτερος διαχωρισμός παρατηρήθηκε μεταξύ των κατηγοριών του εξαιρετικού παρθένου και παρθένου ελαιολάδου. Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών βρήκε δύο κύριες συνιστώσες που μπορούν να εξηγήσουν το 74,5 % της διακύμανσης.
- ✓ Υψηλοί βαθμοί συσχέτισης βρέθηκαν με τα εκατοστιαία ποσοστά των ακόρεστων και κορεσμένων αλδευδών με C7-C10 (PC1) καθώς και με τη συνολική ποσότητα των προϊόντων της οδού της LOX, με το εκατοστιαίο ποσοστό των ακόρεστων αλκοολών (C7-C9) καθώς και με την αναλογία εννεανάλη/εξανάλη (PC2)

Γενικά Συμπεράσματα – Προοπτικές

- Ποσοστό μεγαλύτερο από 90% του φαινολικού κλάσματος των ελαιολάδων που προέρχονται από ελληνικές ποικιλίες αποτελείται από σεκοϊριδοειδή, ενώ παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού και το σύστημα φυγοκέντρισης επηρεάζουν τη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων.
- Σε συνθήκες τηγανίσματος (180 °C) το περιεχόμενο των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο μειώνεται σημαντικά. Στα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης η μείωση φτάνει μέχρι και 90% μετά από 60 λεπτά, ενώ στις υπόλοιπες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων η μείωση δεν ξεπερνά το 40% το ίδιο χρονικό διάστημα.
- Σε συνθήκες βρασμού οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα. Τα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης μειώνονται μέχρι 20% μετά από 4 ώρες, ενώ η μείωση που παρατηρείται στις υπόλοιπες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων δεν είναι στατιστικά σημαντική.
- Ελαιόλαδα που χαρακτηρίζονται από πολύ καλά αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά και αποθηκεύονται σε συνθήκες απουσίας φωτός, με ελάχιστο διαθέσιμο οξυγόνο και μέση θερμοκρασία μικρότερη από 18°C, διατηρούν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά εντός των ορίων που προβλέπονται από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα για τα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα για 24 μήνες.
- Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, υπό τις αναφερθείσες συνθήκες, οι φαινολικές ενώσεις μειώνονται σταδιακά αλλά η μείωση δεν ξεπερνά το 31% ακόμη και μετά από 24 μήνες. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση σε φαινολικές ενώσεις τόσο μεγαλύτερη είναι και η μείωση αυτών κατά την αποθήκευση.
- Τα πολικά σεκοϊριδοειδή, παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό μείωσης, σε σχέση με τα λιγότερο πολικά. Αυτό δείχνει ότι στα αρχικά στάδια της αυτοξειδωσης, οι περισσότεροι πολικές ενώσεις, λόγω του προσανατολισμού τους στη διεπιφάνεια αέρα/λαδιού προστατεύουν περισσότερο από την οξείδωση σε σχέση με τις λιγότερο πολικές οι οποίες παραμένουν διαλυμένες στο λάδι.
- Η μείωση των σεκοϊριδοειδών κατά την αποθήκευση, λόγω υδρολυτικών και οξειδωτικών αντιδράσεων, οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης και στο σχηματισμό προϊόντων οξείδωσης.
- Ο ρυθμός σχηματισμού των οξειδωμένων προϊόντων των σεκοϊριδοειδών συσχετίστηκε με τις αρχικές συγκεντρώσεις των πρόδρομων ενώσεων του καθενός,

ενώ σε κάποια δείγματα το σύνολο των προϊόντων αυτών έφτασε μέχρι και 39 mg/kg μετά από 24 μήνες αποθήκευσης.


- Η αρχική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 350 mg/kg, ώστε το ελαιόλαδο να καλύπτει τον ισχυρισμό υγείας της EFSA (περιεκτικότητα 250 mg/kg) κατά τη διάρκεια όλου του διαστήματος αποθήκευσης.
- Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης για 18 μήνες, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη συνολική συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για τις θετικές οργανοληπτικές ιδιότητες.
- Η ποσοστιαία μεταβολή των πτητικών προϊόντων οξείδωσης ήταν μεγαλύτερη στα παρθένα ελαιόλαδα, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ.
- Κάτω από τις επιλεγμένες συνθήκες αποθήκευσης, η (E)-2-επτενάλη μπορεί να προταθεί ως δείκτης οξείδωσης, ενώ ο ρυθμός σχηματισμού αυτής της ένωσης συσχετίζεται με τη συγκέντρωση σε λινελαϊκό οξύ και την αναλογία ολικά φαινολικά/ο-διφαινόλες.
- Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ελαιολάδων σε ιδανικές συνθήκες, κάποια δείγματα εμφανίζουν οργανοληπτικό ελάττωμα, ακόμη και αν τα υπόλοιπα κριτήρια ποιότητας δεν ξεπερνούν τα όρια του Κανονισμού 2568/91 της Ευρωπαϊκής Ένωσης για το εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο.
- Τα δείγματα ελαιολάδου από τη ποικιλία Λιανολιά έδειξαν μεγαλύτερη τάση για εμφάνιση οργανοληπτικού ελαττώματος σε σχέση με αυτά της Κορωνέικης, γεγονός που αποδόθηκε στη διαφορετική σύσταση σε λιπαρά οξέα.
- Τα δείγματα είναι δυνατόν να διαχωριστούν στις κατηγορίες του εξαιρετικού παρθένου και του παρθένου ελαιολάδου με βάση το προφίλ τους σε πτητικές ενώσεις. Βρέθηκαν δύο κύριες συνιστώσες που εξηγούν το 74,5 % της διακύμανσης με υψηλούς βαθμούς συσχέτισης με: τα εκατοστιαία ποσοστά των ακόρεστων και κορεσμένων αλδευδών με C7-C10, τη συνολική ποσότητα των προϊόντων της οδού της LOX, το εκατοστιαίο ποσοστό των ακόρεστων αλκοολών (C7-C9) καθώς και την αναλογία εννεανάλη/εξανάλη.

Συντμήσεις - Abbreviations

EVOO	Extra Virgin Olive Oil	Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο
VOO	Virgin Olive Oil	Παρθένο ελαιόλαδο
LO	Lampante Olive Oil	Μειονεκτικό ελαιόλαδο
LDL	Low-density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνης Χαμηλής Πυκνότητας
LA	Linoleic Acid	Λινελαϊκό οξύ
LnA	Linolenic Acid	Λινολενικό οξύ
3,4-DHPEA-EDA	Dialdehydic Form of Oleuropein Aglycone (DAFOA)	Διαλδεϋδική, αποκαρβοξυλιωμένη μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης
<i>p</i> -HPEA-EDA	Dialdehydic Form of Ligstroside Aglycone (DAFLA)	Διαλδεϋδική, αποκαρβοξυλιωμένη μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη
3,4-DHPEA-EA	Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone (AFOA)	Αλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης της ελαιοευρωπαϊνης
<i>p</i> -HPEA-EA	Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone (AFLA)	Αλδεϋδική μορφή της αγλυκόνης του λιγκστροζίτη
3,4-DHPEA	Hydroxytyrosol	Υδροξυτυροσόλη
<i>p</i> -DHPEA	Tyrosol	Τυροσόλη
LOX	Lipoxygenase	Λιποξυγενάση
AH	Acyl hydrolase	Ακυλο-υδρολάση
HPL	Hydroperoxide lyases	Υδροϋπεροξειδική λύση
ADH	Alcohol dehydrogenase	Αλκοολική αφυδρογονάση
AAT	Alcohol acetyl transferases	Αλκοολική ακετυλο-τρανσφεράση
LLE	Liquid-liquid extraction	Εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης
SPE	Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	Solid Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης
DHS	Dynamic Headspace	Θερμική εκρόφηση μετά από διαβίβαση αδρανούς αερίου
LRA	Linear Regression Analysis	Ανάλυση Γραμμικής Παλινδρόμησης
PCA	Principal Component Analysis	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών

Παράρτημα Ι

Φύλλο αξιολόγησης χαρακτηριστικών του ελαιολαδου σύμφωνα με την επίσημη μέθοδο οργανοληπτικής αξιολόγησης.

	ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	
	ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	EN 5.08.01_02
		Ισχύει από: 14/04/2014

ΕΝΤΑΣΗ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΤΩΝ ΕΛΑΤΤΩΜΑΤΩΝ	
Ατροχάδο/Μούργα (*)	_____
Μουχλιασμένο/νοτισμ ένο/χωματίλα (*)	_____
Κρασώδες-Ξυδάτο- Όξινο-Ξινό (*)	_____
Παγόπηκτες ελιές (υγρό ξύλο)	_____
Ταγγό	_____
Άλλα ελαττώματα	_____
Περιγραφή :	Μεταλλικό <input type="checkbox"/> Άχυρο <input type="checkbox"/> Σκουληκιασμένο <input type="checkbox"/> Τραχύ <input type="checkbox"/> Άλμη <input type="checkbox"/> Ψημένο ή καμένο <input type="checkbox"/> Φυτικά υγρά <input type="checkbox"/> Σπάρτο <input type="checkbox"/> Αγγουρώδες <input type="checkbox"/> Γράσο <input type="checkbox"/>
<i>(*) Διαγράφεται ό,τι δεν ισχύει</i>	
ΕΝΤΑΣΗ ΑΝΤΙΛΗΨΗΣ ΤΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ	
Φρουτώδες	_____
	Άγουρο <input type="checkbox"/> Ωριμο <input type="checkbox"/>
Πικρό	_____
Πικάντικο	_____

Όνομα δοκιμαστή:

Κωδικός δείγματος:

Ημερομηνία:

Σχόλια:

Κωδικός δοκιμαστή:

Υπογραφή δοκιμαστή:

EN 5.08.01_02

Παράρτημα ΙΙ

Πίνακας Π1: Αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη των μεταβολών του πτητικού και φαινολικού κλάσματος κατά την αποθήκευση.

A/A	Περιοχή	Ποικιλία	Ελαιοκομική Περίοδος	Ελεύθερη οξύτητα %	Αριθμός Υπεροξειδίων	K ₂₇₀	K ₂₃₂
1	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,27	8,6	0,12	1,31
2	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,39	10,7	0,13	1,48
3	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,22	14,2	0,13	1,49
4	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,40	9,6	0,11	1,42
5	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,22	8,7	0,12	1,34
6	Ζάκυνθος	Ντόπια	2007-2008	0,28	9,3	0,11	1,49
7	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,25	8,9	0,11	1,33
8	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,20	10,1	0,12	1,32
9	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,21	10,3	0,12	1,31
10	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,12	9,8	0,12	1,35
11	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,25	10,8	0,12	1,23
12	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,17	9,5	0,11	1,22
13	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,22	12,2	0,11	1,41
14	Ζάκυνθος	Κορωνέικη	2007-2008	0,42	9,7	0,10	1,34
15	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,33	9,0	0,10	1,27
16	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,19	10,8	0,09	1,43
17	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,15	10,0	0,10	1,31
18	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,18	9,2	0,10	1,34
19	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,22	8,9	0,10	1,28
20	Κεφαλονιά	Κορωνέικη	2007-2008	0,11	7,1	0,10	1,37
21	Κεφαλονιά	Θιακή	2007-2008	0,16	8,5	0,08	1,28
22	Κεφαλονιά	Θιακή	2007-2008	0,12	7,9	0,08	1,22
23	Κεφαλονιά	Θιακή	2007-2008	0,15	8,3	0,10	1,27
24	Κεφαλονιά	Θιακή	2007-2008	0,11	8,2	0,08	1,27
25	Κεφαλονιά	Θιακή	2007-2008	0,14	7,0	0,10	1,23
26	Κεφαλονιά	Θιακή	2010-2011	0,13	8,1	0,09	1,25

27	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,62	11,3	0,12	1,49
28	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,21	7,9	0,1	1,43
29	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,32	9,2	0,1	1,4
30	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,14	6,9	0,12	1,4
31	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,46	8,7	0,12	1,49
32	Λευκάδα	Ασπρολιά	2007-2008	0,65	9,5	0,11	1,39
33	Λευκάδα	Ασπρολιά	2010-2011	0,51	10,2	0,11	1,45
34	Λευκάδα	Ασπρολιά	2010-2011	0,25	8,1	0,1	1,35
35	Κέρκυρα	Λιανολιά	2007-2008	0,18	4,4	0,10	1,53
36	Κέρκυρα	Λιανολιά	2007-2008	0,30	6,9	0,12	1,68
37	Κέρκυρα	Λιανολιά	2007-2008	0,25	7,4	0,13	1,77
38	Κέρκυρα	Λιανολιά	2007-2008	0,50	8,1	0,14	1,78
39	Πρέβεζα	Λιανολιά	2007-2008	0,35	7,7	0,11	1,50
40	Πρέβεζα	Λιανολιά	2007-2008	0,14	8,0	0,13	1,71
41	Πρέβεζα	Λιανολιά	2010-2011	0,25	7,2	0,11	1,45
42	Πρέβεζα	Λιανολιά	2010-2011	0,31	7,5	0,12	1,52
43	Κεφαλονιά	Μουζολιά	2007-2008	0,13	8,0	0,09	1,30
44	Κεφαλονιά	Ντόπια	2007-2008	0,23	10,3	0,10	1,31

Βιβλιογραφία

- Agiomyrgianaki, A., Petrakis, P. V., & Dais, P. (2012). Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis. *Food Chemistry*, *135*(4), 2561-2568.
- Aguilera, M. P., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A., & Uceda, M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, *89*(3), 387-391.
- Alonso, M. V., Aparicio, R., Calvente, J. J., & Morales, M. T. (1994). Good control practices underlined by an on-line fuzzy control database. *Grasas Aceites*, *45*, 75-81.
- Amelotti, G., Daghetta, A., & Ferrario, A. (1989). Content and structure of partial glycerides in virgin olive oil: Their evolution by different working process and preservation form. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, *66*, 681-692.
- Amiot, M.-J., Fleuriet, A., & Macheix, J.-J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, *28*(1), 67-69.
- Amiot, M. J., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *34*(5), 823-826.
- Andrewes, P., Busch, J. L., de Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J Agric Food Chem*, *51*(5), 1415-1420.
- Andrikopoulos, N. K., Hassapidou, M. N., & Manoukas, A. G. (1989). The tocopherol content of greek olive oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *46*(4), 503-509.
- Angerosa, F. (2000). Sensory Quality of Olive Oils. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (pp. 355-392): Springer US.
- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*(9-10), 639-660.
- Angerosa, F., & Basti, C. (2001). Olive oil volatile compounds from the lipoxygenase pathway in relation to fruit ripeness. *Italian Journal of Food Science*, *13*, 421-428.
- Angerosa, F., Basti, C., & Vito, R. (1999). Virgin Olive Oil Volatile Compounds from Lipoxygenase Pathway and Characterization of Some Italian Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(3), 836-839.
- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Corana, F., & Mellerio, G. (1996a). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *736*(1-2), 195-203.
- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Konstantinou, P., & Di Giacinto, L. (1995). GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(7), 1802-1807.

- Angerosa, F., Di Giacinto, L., & d'Alessandro, N. (1997). Quantitation of some flavor components responsible for the “green” attributes in virgin olive oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20(9), 507-510.
- Angerosa, F., Lanza, B., & Marsilio, V. (1996b). Biogenesis of “fusty” defect in virgin olive oils. *Grasas y Aceites*, 47, 142-150.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72(1), 19-28.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31.
- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2003). Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrienoic acid lyase in tomatoes. *Food Chemistry*, 81(2), 275-279.
- Aparicio, R., Ferreiro, L., & Alonso, V. (1994). Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 292(3), 235-241.
- Aparicio, R., & Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 614-627.
- Aparicio, R., & Morales, M. T. (1998). Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1116-1122.
- Aparicio, R., Morales, M. T., & Alonso, M. V. (1996). Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(10), 1253-1264.
- Aparicio, R., Morales, M. T., & Alonso, V. (1997). Authentication of European Virgin Olive Oils by Their Chemical Compounds, Sensory Attributes, and Consumers' Attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1076-1083.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., & Gutiérrez, F. (1999). Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4150-4155.
- Armaforte, E., Mancebo-Campos, V., Bendini, A., Desamparados Salvador, M., Fregapane, G., & Cerretani, L. (2007). Retention effects of oxidized polyphenols during analytical extraction of phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of Separation Science*, 30(15), 2401-2406.
- Arslan, D., Karabekir, Y., & Schreiner, M. (2013). Variations of phenolic compounds, fatty acids and some qualitative characteristics of Sariulak olive oil as induced by growing area. *Food Research International*, 54(2), 1897-1906.
- Artajo, L.-S., Romero, M.-P., Tovar, M.-J., & Motilva, M.-J. (2006a). Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(1), 19-27.
- Artajo, L. S., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2006b). Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4), 518-527.
- Baccouri, O., Cerretani, L., Bendini, A., Caboni, M. F., Zarrouk, M., Pirrone, L., et al. (2007). Preliminary chemical characterization of Tunisian monovarietal virgin olive oils and comparison with Sicilian ones. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(12), 1208-1217.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., & Montedoro, G. F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(11), 1589-1593.

- Beltrán, G., Aguilera, M. P., Rio, C. D., Sanchez, S., & Martinez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89(2), 207-215.
- Ben-Hassine, K., Taamalli, A., Ferchichi, S., Mlaouah, A., Benincasa, C., Romano, E., et al. (2013). Physicochemical and sensory characteristics of virgin olive oils in relation to cultivar, extraction system and storage conditions. *Food Research International*, 54(2), 1915-1925.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G., & Gallina Toschi, T. (2003). Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2), 425-433.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., et al. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12(8), 1679-1719.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M. D., Fregapane, G., & Lercker, G. (2009). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage : An overview. *Italian Journal of Food Science*, 21(4), 389-406.
- Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2003). Assay of Aroma Active Components of Virgin Olive Oils from Southern Italian Regions by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 733-741.
- Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Muzzalupo, I., Polidori, A., et al. (2001). Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in olives and oils. *Analytical Letters*, 34(6), 1033-1051.
- Blekas, G., Psomiadou, E., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(6), 340-346.
- Bortolomeazzi, R., Berno, P., Pizzale, L., & Conte, L. S. (2001). Sesquiterpene, Alkene, and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3278-3283.
- Boselli, E., Di Lecce, G., Strabbioli, R., Pieralisi, G., & Frega, N. G. (2009). Are virgin olive oils obtained below 27°C better than those produced at higher temperatures? *LWT - Food Science and Technology*, 42(3), 748-757.
- Boskou, D. (2006). Storage and Packing. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Chemistry and Technology, Second Edition*. Champaign, Illinois: AOCS Publishing.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive Oil Composition. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Chemistry and Technology, Second Edition*. Champaign, Illinois: AOCS Publishing.
- Bradley, D. G., & Min, D. B. (1992). Singlet oxygen oxidation of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 31(3), 211-236.
- Brenes, M., García, A., Dobarganes, M. C., Velasco, J., & Romero, C. (2002a). Influence of Thermal Treatments Simulating Cooking Processes on the Polyphenol Content in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5962-5967.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., & Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5609-5614.

- Brenes, M., García, A., García, P., & Garrido, A. (2000a). Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5178-5183.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535-3540.
- Brenes, M., García, A., Rios, J. J., García, P., & Garrido, A. (2002b). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(6), 615-625.
- Brenes, M., Hidalgo, F., García, A., Rios, J., García, P., Zamora, R., et al. (2000b). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(7), 715-720.
- Brkljača, M., Giljanović, J., & Prkić, A. (2013). Determination of Metals in Olive Oil by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry: Validation and Uncertainty Measurements. *Analytical Letters*, 46(18), 2912-2926.
- Byrd-Bredbenner, C., Lagiou, P., & Trichopoulou, A. (2000). A comparison of household food availability in 11 countries. *J Hum Nutr Diet*, 13(3), 197-204.
- Caporale, G., Policastro, S., Carlucci, A., & Monteleone, E. (2006). Consumer expectations for sensory properties in virgin olive oils. *Food Quality and Preference*, 17(1-2), 116-125.
- Carlsson, D. J., Suprunchuk, T., & Wiles, D. M. (1976). Photooxidation of unsaturated oils: Effects of singlet oxygen quenchers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(10), 656-660.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., & Fernandez-Gutierrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J Sep Sci*, 28(9-10), 837-858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G., & Fernandez-Gutierrez, A. (2007a). Evaluation of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *J Agric Food Chem*, 55(12), 4771-4780.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G., & Fernández-Gutiérrez, A. (2007b). Evaluation of the Influence of Thermal Oxidation on the Phenolic Composition and on the Antioxidant Activity of Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4771-4780.
- Caruso, G., Gucci, R., Urbani, S., Esposito, S., Taticchi, A., Di Maio, I., et al. (2014). Effect of different irrigation volumes during fruit development on quality of virgin olive oil of cv. Frantoio. *Agricultural Water Management*, 134(0), 94-103.
- Cavalli, J.-F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A.-M. (2003). Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7709-7716.
- Cavalli, J.-F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A.-M. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry*, 88(1), 151-157.

- Cecchi, T., & Alfei, B. (2013). Volatile profiles of Italian monovarietal extra virgin olive oils via HS-SPME–GC–MS: Newly identified compounds, flavors molecular markers, and terpenic profile. *Food Chemistry*, *141*(3), 2025-2035.
- Cecchi, T., De Marco, C., Passamonti, P., & Pucciarelli, F. (2006). ANALYTICAL DEFINITION OF THE QUALITY OF EXTRA-VIRGIN OLIVE OIL STORED IN POLYETHYLENE TEREPHTHALATE BOTTLES. *Journal of Food Lipids*, *13*(3), 251-258.
- Cerretani, L., Bendini, A., Rodriguez-Estrada, M. T., Vittadini, E., & Chiavaro, E. (2009). Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, *115*(4), 1381-1388.
- Cerretani, L., Salvador, M., Bendini, A., & Fregapane, G. (2008). Relationship Between Sensory Evaluation Performed by Italian and Spanish Official Panels and Volatile and Phenolic Profiles of Virgin Olive Oils. *Chemosensory Perception*, *1*(4), 258-267.
- Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *8*(4), 345-358.
- Christophoridou, S., Dais, P., Tseng, L.-H., & Spraul, M. (2005). Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(12), 4667-4679.
- Cinquanta, L., Esti, M., & Notte, E. (1997). Evolution of phenolic compounds in virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *74*(10), 1259-1264.
- Clodoveo, M. L., Delcuratolo, D., Gomes, T., & Colelli, G. (2007). Effect of different temperatures and storage atmospheres on Coratina olive oil quality. *Food Chemistry*, *102*(3), 571-576.
- Corona, G., Spencer, J., & Dessì, M. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicology and Industrial Health*, *25*(4-5), 285-293.
- Costell, E., Tárrega, A., & Bayarri, S. (2010). Food Acceptance: The Role of Consumer Perception and Attitudes. *Chemosensory Perception*, *3*(1), 42-50.
- Covas, M.-I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, *55*(3), 175-186.
- Covas, M.-I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., et al. (2006a). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(4), 608-616.
- Covas, M. a.-I., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H.-J. F., Kiesewetter, H., et al. (2006b). The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, *145*(5), 333-341.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., & Ben-David, E. (2011). Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*, *127*(3), 358-366.
- Dais, P., Spyros, A., Christophoridou, S., Hatzakis, E., Fragaki, G., Agiomyrgianaki, A., et al. (2007). Comparison of Analytical Methodologies Based on ¹H and ³¹P NMR Spectroscopy with Conventional Methods of Analysis for the

- Determination of Some Olive Oil Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 577-584.
- Daskalaki, D., Kefi, G., Kotsiou, K., & Tasioula-Margari, M. (2009). Evaluation of phenolic compounds degradation in virgin olive oil during storage and heating. *Journal of Food and Nutrition Research* 48(1), 31-41.
- de la Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jauregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Nurmi, T., et al. (2010). Elevated Circulating LDL Phenol Levels in Men Who Consumed Virgin Rather Than Refined Olive Oil Are Associated with Less Oxidation of Plasma LDL. *Journal of Nutrition*, 140(3), 501-508.
- de la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., & López-Sabater, M. C. (2005). Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4331-4340.
- Delgado, C., & Guinard, J.-X. (2011). How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings? *Food Quality and Preference*, 22(2), 213-225.
- Di Giovacchino, L. (1996). Influence of Extraction Systems on Olive Oil Quality. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil, Chemistry and Technology* (pp. 12-51). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Di Giovacchino, L. (2013). Technological Aspects. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*. New York: Springer.
- Di Giovacchino, L., Angerosa, F., & Di Giacinto, L. (1996). Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(3), 371-374.
- Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surricchio, G., & Basti, C. (2001). Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(5), 279-285.
- Di Giovacchino, L., Solinas, M., & Miccoli, M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1189-1194.
- Di Maio, I., Esposto, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Veneziani, G., Urbani, S., et al. (2013). Characterization of 3,4-DHPEA-EDA oxidation products in virgin olive oil by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1381-1391.
- Douglas, C., Ellard, M., Hauffe, K., Molitor, E., de Sá, M., Reinold, S., et al. (1992). General Phenylpropanoid Metabolism: Regulation By Environmental and Developmental Signals. In H. Stafford & R. Ibrahim (Eds.), *Phenolic Metabolism in Plants* (Vol. 26, pp. 63-89): Springer US.
- EC. (1991). European Community Commission Regulation No 2568/1991 on the characteristics of olive and olive pomace oils and their analytical methods. *Official Journal of the European Communities*, L248, 1-83.
- EC. (2012). Commission Regulation (EC) No 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Official Journal of the European Communities*, L163.
- EFSA. (2011). Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive

- and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9, 4, 2033, 1-25.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., & Luque de Castro, M. D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 678-691.
- Elnagar, A. Y., Sylvester, P. W., & El Sayed, K. A. (2011). (–)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers. *Planta Med*, 77(10), 1013-1019.
- Endo, Y., Usuki, R., & Kaneda, T. (1985). Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autoxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62(9), 1387-1390.
- Escuderos, M. E. (2011). Olive Oil Aroma Evaluation By Gas Chromatographic Method: A Critical Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 41(1), 70-80.
- Esti, M., Cinquanta, L., & La Notte, E. (1998). Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32-35.
- Esti, M., Contini, M., Moneta, E., & Sinesio, F. (2009). Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1095-1100.
- EU. (2013). Commission Implementing Regulation (EU) No 1348/2013 of 16 December 2013 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, L338.
- Evangelisti, F., Zunin, P., Tiscornia, E., Petacchi, R., Drava, G., & Lanteri, S. (1997). Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions: Study of polar compounds by chemometric methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(8), 1017-1023.
- Flath, R. A., Forrey, R. R., & Guadagni, D. G. (1973). Aroma components of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(6), 948-952.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). ON TYROSINE AND TRYPTOPHANE DETERMINATIONS IN PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627-650.
- Foote, C. S. (1968). Mechanisms of Photosensitized Oxidation. *Science*, 162(3857), 963-970.
- Frankel, E. N. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22(1), 1-33.
- Frankel, E. N. (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 4(7), 220-225.
- Frankel, E. N. (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57(1), 51-55.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation, 2nd edition*. Bridgwater, UK: The Oily Press.
- Frega, N., Mozzon, M., & Lercker, G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(3), 325-329.

- Gandul-Rojas, B., & Minguéz-Mosquera, M. I. (1996). Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils from Various Spanish Olive Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(1), 31-39.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., & Pérez, A. G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 44(2), 629-635.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A., et al. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 416-429.
- García, J. M., Sellar, S., & Pérez-Camino, M. C. (1996). Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3516-3520.
- García, J. M., Yousfi, K., Mateos, R., Olmo, M., & Cert, A. (2001). Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits. *J Agric Food Chem*, 49(9), 4231-4235.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (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), 207-211.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(7), 678-690.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100(1), 36-42.
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2002). Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6812-6817.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., et al. (2008). Effects of Fly Attack (*Bactrocera oleae*) on the Phenolic Profile and Selected Chemical Parameters of Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4577-4583.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433-440.
- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2009). Effect of Malaxation Conditions on Phenol and Volatile Profiles in Olive Paste and the Corresponding Virgin Olive Oils (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3587-3595.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., Moriana, A., Pérez, D., Olmedilla, N., Ribas, F., et al. (2007). Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, 100(2), 568-578.
- Gordon, M. H., & Magos, P. (1983). The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry*, 10(2), 141-147.

- Grayhurst, P., & Girling, P. J. (2011). Packaging of Food in Glass Containers In R. Coles & M. Kirwan (Eds.), *Food and Beverage Packaging Technology (Second Edition)*: Wiley-Blackwell.
- Grob, K., Lanfranchi, M., & Mariani, C. (1990). Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(10), 626-634.
- Guinda, A., Lanzón, A., & Albi, T. (1996). Differences in Hydrocarbons of Virgin Olive Oils Obtained from Several Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1723-1726.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(11), 966-968.
- Guth, H., & Grosch, W. (1991). A Comparative Study of the Potent Odorants of Different Virgin Olive Oils. *Lipid / Fett*, 93(9), 335-339.
- Gutiérrez-Rosales, F., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., & Minguéz-Mosquera, M. I. (1992). Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(9), 866-871.
- Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J. J., & Gómez-Rey, M. L. (2003). Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6021-6025.
- Gutiérrez, F., & Fernández, J. L. (2002). Determinant Parameters and Components in the Storage of Virgin Olive Oil. Prediction of Storage Time beyond Which the Oil Is No Longer of "Extra" Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 571-577.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., & Albi, M. A. (1998). Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 121-127.
- Gutiérrez, F., Villafranca, M. J., & Castellano, J. M. (2002). Changes in the main components and quality indices of virgin olive oil during oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7), 669-676.
- Hatanaka, A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, 34(5), 1201-1218.
- Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., & Dais, P. (2008). Determination of Phospholipids in Olive Oil by 31P NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6232-6240.
- Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 473-503.
- Hrcirik, K., & Fritsche, S. (2004). Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(8), 540-549.
- Hudson, B. J. F., & Lewis, J. I. (1983). Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chemistry*, 10(2), 111-120.
- Inglese, P., Famiani, F., Galvano, F., Servili, M., Esposito, S., & Urbani, S. (2010). Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition *Horticultural Reviews* (pp. 83-147): John Wiley & Sons, Inc.
- Ingold, K. U. (1969). Peroxy radicals. *Accounts of Chemical Research*, 2(1), 1-9.
- IOC. (2007a). International Olive Council: Sensory Analysis of Olive Oil: General Basic Vocabulary. COI/T.20/Doc. N° 4/Rev. 1. September 2007.

- IOC. (2007b). International Olive Council: Sensory Analysis of Olive Oil: Glass for oil Tasting. COI/T.20/Doc. N° 5/Rev. 1. September 2007.
- IOC. (2007c). International Olive Council: Sensory Analysis of Olive Oil: Guide for the Installation of a Test Room. COI/T.20/Doc. N° 6/Rev.1. September 2007
- IOC. (2009). International Olive Council: Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc N° 29. November 2009.
- IOC. (2013a). International Olive Council: Standard guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil testers. COI/T.20/ Doc. N°14/Rev. 4. May 2013.
- IOC. (2013b). International Olive Council: Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T.20/Doc. N° 15/Rev. 6. November 2013.
- IOC. (2013c). International Olive Council: Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T.15/NC N° 3/Rev. 7. May 2013.
- IOC. (2015). Trends in world olive oil consumption. Market Newsletter., *No 91*.
- IOOC. (1984). International Olive Oil Council, Document No 6, Madrid.
- Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Hassine, K. B., Taamali, A., et al. (2010). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry*, *119*(1), 220-225.
- Jeleń, H. H., Obuchowska, M., Zawirska-Wojtasiak, R., & Wąsowicz, E. (2000). Headspace Solid-Phase Microextraction Use for the Characterization of Volatile Compounds in Vegetable Oils of Different Sensory Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(6), 2360-2367.
- Jiménez, M. S., Velarte, R., & Castillo, J. R. (2007). Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food Chemistry*, *100*(1), 8-14.
- Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., Artemiou, A., & Giogios, I. (2014). Composition, volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters. *LWT - Food Science and Technology*, *58*(1), 272-279.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2005). Discrimination of Olive Oils and Fruits into Cultivars and Maturity Stages Based on Phenolic and Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(20), 8054-8062.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, *100*(1), 273-286.
- Kalua, C. M., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2006a). Discrimination of Storage Conditions and Freshness in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(19), 7144-7151.
- Kalua, C. M., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2008). Changes in Virgin Olive Oil Quality during Low-Temperature Fruit Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(7), 2415-2422.
- Kalua, C. M., Bedgood Jr, D. R., & Prenzler, P. D. (2006b). Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta*, *556*(2), 407-414.
- Kanavouras, A., Cert, A., & Hernandez, R. J. (2005a). Oxidation of Olive Oil under Still Air. *Food Science and Technology International*, *11*(3), 183-189.

- Kanavouras, A., Hernandez-Munoz, P., & Coutelieris, F. A. (2004). Shelf life predictions for packaged olive oil using flavor compounds as markers. *European Food Research and Technology*, 219(2), 190-198.
- Kanavouras, A., Hernandez-Munoz, P., & Coutelieris, F. A. (2006). Packaging of Olive Oil: Quality Issues and Shelf Life Predictions. *Food Reviews International*, 22(4), 381-404.
- Kanavouras, A., Kiritsakis, A., & Hernandez, R. J. (2005b). Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chemistry*, 90(1-2), 69-79.
- Kandylis, P., Vekiari, A. S., Kanellaki, M., Grati Kamoun, N., Msallem, M., & Kourkoutas, Y. (2011). Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5), 1333-1341.
- Karaosmanoglu, H., Soyer, F., Ozen, B., & Tokatli, F. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Turkish Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8238-8245.
- Kashima, M., Cha, G.-S., Isoda, Y., Hirano, J., & Miyazawa, T. (1991). The antioxidant effects of phospholipids on perilla oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(2), 119-122.
- Kaya, A., Tekin, A. R., & Öner, M. D. (1993). Oxidative Stability of Sunflower and Olive Oils: Comparison between a Modified Active Oxygen Method and Long Term Storage. *LWT - Food Science and Technology*, 26(5), 464-468.
- Kiosseoglou, V., & Kouzounas, P. (1993). The role of diglycerides, monoglycerides, and free fatty acids in olive oil minor surface-active lipid interaction with proteins at oil-water interfaces *Journal of Dispersion Science and Technology*, 14(5), 527-539.
- Kiritsakis, A., Nanos, G. D., Polymenopoulos, Z., Thomai, T., & Sfakiotakis, E. M. (1998). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 721-724.
- Kiritsakis, A. K. (1998). Flavor components of olive oil—A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673-681.
- Kirwan, M. J., Plant, S., & Strawbridge, J. W. (2011). Plastics in Food Packaging In R. Coles & M. Kirwan (Eds.), *Food and Beverage Packaging Technology (Second Edition)*: Wiley-Blackwell.
- Kochhar, S. P. (1996). Oxidative pathways to the formation of off-flavours. In M. J. Saxby (Ed.), *Food Taints and Off-Flavours* (pp. 168-225): Springer US.
- Koidis, A., & Boskou, D. (2006). The contents of proteins and phospholipids in cloudy (veiled) virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 323-328.
- Koprivnjak, O., Procida, G., & Zelinotti, T. (2000). Changes in the volatile components of virgin olive oil during fruit storage in aqueous media. *Food Chemistry*, 70(3), 377-384.
- Kyriakidis, N. B., & Dourou, E. F. I. (2002). EFFECT OF STORAGE AND DACUS INFECTION OF OLIVE FRUITS ON THE QUALITY OF THE PRODUCED VIRGIN OLIVE OIL. *Journal of Food Lipids*, 9(1), 47-55.
- Lanzón, A., Albi, T., Cert, A., & Gracián, J. (1994). The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(3), 285-291.

- Lavelli, V., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2006). Effect of Storage on Secoiridoid and Tocopherol Contents and Antioxidant Activity of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3002-3007.
- Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Ramis-Ramos, G., & Simó-Alfonso, E. F. (2008). Prediction of the genetic variety of Spanish extra virgin olive oils using fatty acid and phenolic compound profiles established by direct infusion mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108(3), 1142-1148.
- Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Simo-Alfonso, E. F., Lercker, G., & Cerretani, L. (2009a). Evaluation of the oxidative status of virgin olive oils with different phenolic content by direct infusion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(5), 1543-1550.
- Lerma-García, M. J., Simo-Alfonso, E. F., Chiavaro, E., Bendini, A., Lercker, G., & Cerretani, L. (2009b). Study of chemical changes produced in virgin olive oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *J Agric Food Chem*, 57(17), 7834-7840.
- Lozano-Sánchez, J., Bendini, A., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control*, 30(2), 606-615.
- Lozano-Sánchez, J., Giambanelli, E., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., et al. (2011). Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11491-11500.
- Lukić, M., Lukić, I., Krapac, M., Sladonja, B., & Piližota, V. (2013). Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chemistry*, 136(1), 251-258.
- Luna, G., Morales, M. T., & Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98(2), 243-252.
- Mastrobattista, G. (1999). Effect of light on extra virgin olive oils in different types of glass bottles. *Italian Journal Of Food Science*, 3, 193-195.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M. C., & García, J. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(1), 71-75.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcuía, F., et al. (2001). Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Matthäus, B. (2010). Oxidation of edible oils. In E. A. Decker, R. J. Elias & D. J. McClements (Eds.), *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications* (pp. 183-238): Woodhead Publishing.
- Mechri, B., Echbili, A., Issaoui, M., Braham, M., Elhadj, S. B., & Hammami, M. (2007). Short-term effects in soil microbial community following agronomic application of olive mill wastewaters in a field of olive trees. *Applied Soil Ecology*, 36(2-3), 216-223.
- Méndez, A. I., & Falqué, E. (2007). Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*, 18(5), 521-529.

- Michel, M., & Buszewski, B. (2009). Porous graphitic carbon sorbents in biomedical and environmental applications. *Adsorption*, 15(2), 193-202.
- Minguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., & Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(3), 192-196.
- Miyashita, K., & Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(10), 1380-1384.
- Mohamed Mousa, Y., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I., & Kiritsakis, A. (1996). Effect of Altitude on Fruit and Oil Quality Characteristics of 'Mastoides' Olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 345-350.
- Montedoro, G., Baldioli, M., Selvaggini, R., Begliomini, A. L., Taticchi, A., & Servili, M. (2002). Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: The importance of the endogenous enzymes. *Acta Horticulturae*, 586, 551-556.
- Montedoro, G., Bertuccioli, M., & Anichini, F. (1978). Aroma analysis of virgin olive oil by head space volatiles extraction techniques. In G. Charalampous & G. Inglet (Eds.), *Flavor of foods and beverages* (pp. 247-281). New York: Academic Press.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1571-1576.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., & Macchioni, A. (1993). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 2228-2234.
- Morales, M. T., Alonso, M. V., Rios, J. J., & Aparicio, R. (1995). Virgin Olive Oil Aroma: Relationship between Volatile Compounds and Sensory Attributes by Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2925-2931.
- Morales, M. T., Aparicio, R., & Calvente, J. J. (1996). Influence of Olive Ripeness on the Concentration of Green Aroma Compounds in Virgin Olive Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(3), 171-178.
- Morales, M. T., Aparicio, R., & Rios, J. J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, 668(2), 455-462.
- Morales, M. T., Luna, G., & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293-301.
- Morales, M. T., Rios, J. J., & Aparicio, R. (1997). Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2666-2673.
- Morales, M. T., & Tsimidou, M. (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: analysis and properties* (pp. 393-458). Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Morelló, J.-R., Motilva, M. a.-J., Tovar, M. a.-J., & Romero, M. a.-P. (2004a). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.

- Morelló, J.-R., Romero, M.-P., & Motilva, M.-J. (2004b). Effect of the Maturation Process of the Olive Fruit on the Phenolic Fraction of Drupes and Oils from Arbequina, Farga, and Morrut Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6002-6009.
- Morelló, J.-R., Romero, M.-P., Ramo, T., & Motilva, M.-J. (2005). Evaluation of l-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168(1), 65-72.
- Morelló, J., Romero, M., & Motilva, M. (2006). Influence of seasonal conditions on the composition and quality parameters of monovarietal virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(8), 683-690.
- Moyano, M. J., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2010). The Color of Olive Oils: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 278-291.
- Nenadis, N., & Tsimidou, M. (2002). Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), 257-259.
- Newmark, H. L. (1997). Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6(12), 1101-1103.
- Nissiotis, M., & Tasioula-Margari, M. (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food Chemistry*, 77(3), 371-376.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., et al. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. [10.1039/B719736E]. *Natural Product Reports*, 25(6), 1167-1179.
- Ocakoglu, D., Tokatli, F., Ozen, B., & Korel, F. (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113(2), 401-410.
- Okogeri, O., & Tasioula-Margari, M. (2002). Changes Occurring in Phenolic Compounds and α -Tocopherol of Virgin Olive Oil during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1077-1080.
- Olias, J. M., Perez, A. G., Rios, J. J., & Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(12), 2368-2373.
- Oliveras-Lopez, M. J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., & Mulinacci, N. (2007). Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73(4), 726-732.
- Oliveras-López, M. J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., & Mulinacci, N. (2007). Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73(4), 726-732.
- Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M. Á., & Peragón, J. (2008). Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*, 28(1), 45-54.
- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalter, B., & Bartsch, H. (2000a). Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinical Chemistry*, 46(7), 976-988.

- Owen, R. W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000b). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38(8), 647-659.
- Page, B., Edwards, M., & May, N. (2011). Metal Packaging In R. Coles & M. Kirwan (Eds.), *Food and Beverage Packaging Technology (Second Edition)*: Wiley-Blackwell.
- Pagliarini, E., Zanoni, B., & Giovanelli, G. (2000). Predictive Study on Tuscan Extra Virgin Olive Oil Stability under Several Commercial Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1345-1351.
- Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(9), 669-671.
- Pastore, G., D'Aloise, A., Lucchetti, S., Maldini, M., Moneta, E., Peparario, M., et al. (2014). Effect of oxygen reduction during malaxation on the quality of extra virgin olive oil (Cv. Carboncella) extracted through “two-phase” and “three-phase” centrifugal decanters. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 163-172.
- Pérez-Camino, M. C., & Cert, A. (1999). Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1558-1562.
- Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Segura, F., & Lopez-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(10), 1199-1208.
- Perez, A. G., Sanz, C., & Olias, J. M. (1993). Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9), 1462-1466.
- Petrakis, C. (2006). Olive Oil Extraction. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Chemistry and Technology, Second Edition* (pp. 191-223). Champaign, Illinois: AOCS Publishing.
- Pirisi, F. M., Angioni, A., Cabras, P., Garau, V. L., di Teulada, M. T. S., dos Santos, M. K., et al. (1997). Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *Journal of Chromatography A*, 768(2), 207-213.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M., & Muggelli, M. (2000). Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1191-1196.
- Pokorný, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science & Technology*, 2(0), 223-227.
- Pouliarekou, E., Badeka, A., Tasioula-Margari, M., Kontakos, S., Longobardi, F., & Kontominas, M. G. (2011). Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *J Chromatogr A*, 1218(42), 7534-7542.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36.
- Pristouri, G., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2010). Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food Control*, 21(4), 412-418.

- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (1998). Simultaneous HPLC Determination of Tocopherols, Carotenoids, and Chlorophylls for Monitoring Their Effect on Virgin Olive Oil Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 5132-5138.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (1999). On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4025-4032.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 640-647.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002a). Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 716-721.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002b). Stability of Virgin Olive Oil. 2. Photo-oxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 722-727.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., & Boskou, D. (2000). α -Tocopherol Content of Greek Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1770-1775.
- Rahmani, M., & Csallany, A. S. (1991). Chlorophyll and β -carotene pigments in moroccan virgin olive oils measured by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(9), 672-674.
- Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., & Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(4), 228-238.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., & Sotiriou, E. (2005). Effects of processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Research International*, 38(8-9), 873-878.
- Rawls, H. R., & Van Santen, P. J. (1970). A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 47(4), 121-125.
- Reiners, J., & Grosch, W. (1998). Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2754-2763.
- Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001). Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(9), 881-888.
- Ríos, J. J., Gil, M. J., & Gutiérrez-Rosales, F. (2005). Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1093(1-2), 167-176.
- Ripa, V., De Rose, F., Caravita, M. A., Parise, M. R., Perri, E., Rosati, A., et al. (2008). Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*, 22(2), 95-103.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., & Cimato, A. (1999). Polyphenolic Content in Five Tuscany Cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 964-967.

- Romero-Segura, C., Sanz, C., & Perez, A. G. (2009). Purification and Characterization of an Olive Fruit β -Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7983-7988.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., & De Castro, A. (2007). In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 680-686.
- Rovellini, P., & Cortesi, N. (2002). Liquid chromatography –mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: Aldehydic forms and their oxidized products. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 77, 1-14.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., & Antolovich, M. (1999). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*, 855(2), 529-537.
- Salas, J., Willams, M., Harwood, J., & Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10), 1163-1168.
- Salas, J. J. (2004). Characterization of Alcohol Acyltransferase from Olive Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3155-3158.
- Salas, J. J., & Sánchez, J. (1998). Alcohol dehydrogenases from olive (*Olea europaea*) fruit. *Phytochemistry*, 48(1), 35-40.
- Salas, J. n. J., & Sánchez, J. (1999). Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europaea*) fruits. *Plant Science*, 143(1), 19-26.
- Salvador, M. D., Aranda, F., & Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73(1), 45-53.
- Sanchez, J., & Salas, J. J. (2000). Biogenesis of olive oil aroma. In J. & Harwood & R. Aparicio (Eds.) (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publications, Inc.
- Sanders, T. A. B. (1983). Nutritional significance of rancidity. In J. C. Allen & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in foods* (pp. 59-66). London: Applied Science Publishers.
- Savarese, M., De Marco, E., Caporaso, N., & Sacchi, R. (2013). *Extra virgin olive oil overall quality assessment during prolonged storage in PET containers. Proceedings GV (Proceedings in GV - Global Virtual Conference)*. Paper presented at the Global Virtual Conference
- Schnürer, J., Olsson, J., & Börjesson, T. (1999). Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2-3), 209-217.
- Schwartz, S. J., & Lorenzo, T. V. (1990). Chlorophylls in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 29(1), 1-17.
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., & Montedoro, G. (2006). Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by Direct Injection in High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2832-2838.
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., & Montedoro, G. (1999). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-nuclear

- magnetic resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 873-882.
- Servili, M., Conner, J. M., Piggott, J. R., Withers, S. J., & Paterson, A. (1995). Sensory characterisation of virgin olive oil and relationship with headspace composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67(1), 61-70.
- Servili, M., & Montedoro, G. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 602-613.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (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(1-2), 113-127.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montedoro, G. (2007a). Effect of Olive Stoning on the Volatile and Phenolic Composition of Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7028-7035.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montedoro, G. (2007b). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *J Agric Food Chem*, 55(17), 7028-7035.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Siedow, J. N. (1991). PLANT LIPOXYGENASE - STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 145-188.
- Simic, M. G., Slobodan, V. J., & Etsuo, N. (1992). Mechanisms of Lipid Oxidative Processes and Their Inhibition *Lipid Oxidation in Food* (Vol. 500, pp. 14-32): American Chemical Society.
- Solinas, M., Angerosa, F., & Cucurachi, A. (1987). Relation between the autoxidation of oils and fats and the rising of Rancidity in organoleptic Evaluation *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64, 137.
- Stark, A. H., & Madar, P. Z. (2002). Olive Oil as a Functional Food: Epidemiology and Nutritional Approaches. *Nutrition Reviews*, 60(6), 170-176.
- Takahama, U., & Oniki, T. (2000). Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research*, 113(1111), 301-309.
- Tasioula-Margari, M. (2011). Virgin olive oil antioxidants In C. Savalas & S. Nicolau (Eds.), *Olive Consumption and Health* United States: Nova Science Publishers.
- Tasioula-Margari, M., & Okogeri, O. (2001a). Isolation and Characterization of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds by HPLC/UV and GC-MS. *Journal of Food Science*, 66(4), 530-534.
- Tasioula-Margari, M., & Okogeri, O. (2001b). Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*, 74(3), 377-383.
- Temime, S. B., Campeol, E., Cioni, P. L., Daoud, D., & Zarrouk, M. (2006). Volatile compounds from Chétoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, 99(2), 315-325.
- Torres, M. M., & Maestri, D. M. (2006). Chemical composition of Arbequina virgin olive oil in relation to extraction and storage conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2311-2317.
- Tovar, M. J., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv.

- Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J Agric Food Chem*, 49(11), 5502-5508.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., & Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(9), 869-873.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992a). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, 44(1), 53-60.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., & Boskou, D. (1992b). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil—Part I. *Food Chemistry*, 45(2), 141-144.
- Tsimis, D. A., & Karakasides, N. G. (2002). How the choice of container affects olive oil quality—a review. *Packaging Technology and Science*, 15(3), 147-154.
- Tura, D., Failla, O., Pedò, S., Gigliotti, C., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2008). Effects of seasonal weather variability on olive oil composition in northern Italy. *Acta Horticulturae*, 791, 769-776.
- Tura, D., Prenzler, P. D., Bedgood Jr, D. R., Antolovich, M., & Robards, K. (2004). Varietal and processing effects on the volatile profile of Australian olive oils. *Food Chemistry*, 84(3), 341-349.
- Vas, G., & Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 233-254.
- Velasco, J., & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 661-676.
- Vercellotti, J. R., Angelo, A. J. S., & Spanier, A. M. (1992). Lipid Oxidation in Foods *Lipid Oxidation in Food* (Vol. 500, pp. 1-11): American Chemical Society.
- Verleyen, T., Forcades, M., Verhe, R., Dewettinck, K., Huyghebaert, A., & De Greyt, W. (2002). Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 117-122.
- Vichi, S., Castellote, A. I., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003a). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983(1-2), 19-33.
- Vichi, S., Guadayol, J. M., Caixach, J., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2006). Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125(1), 117-123.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003b). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6564-6571.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive oil by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1090(1-2), 146-154.
- Vichi, S., Romero, A., Tous, J., Tamames, E. L., & Buxaderas, S. (2008). Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance. *Journal of Chromatography A*, 1211(1-2), 1-7.

- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P. c., Gonçalves, A., Pereira, J. A., et al. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89(4), 561-568.
- Visioli, F., & Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sci*, 55(24), 1965-1971.
- Visioli, F., Poli, A., & Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65-75.
- Wahrburg, U., Kratz, M., & Cullen, P. (2002). Mediterranean diet, olive oil and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 698-705.
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*, 12(4), 331-342.
- Werkhoff, P., & Bretschneider, W. (1987). Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocusing in a cold trap : II. Effect of sampling and desorption parameters on recovery. *Journal of Chromatography A*, 405(0), 99-106.
- Williams, M., Morales, M. T., Aparicio, R., & Harwood, J. L. (1998). Analysis of volatiles from callus cultures of olive *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 47(7), 1253-1259.
- Williams, M., Salas, J. J., Sanchez, J., & Harwood, J. L. (2000). Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*, 53(1), 13-19.
- Κυριτσάκης, Α. (2007). *Ελαιόλαδο Συμβατικό και Βιολογικό, Βρώσιμη Ελιά - Πάστα Ελιάς*
- Μπαλατσούρας, Γ. (1986). *Ελαιόλαδο-Σπορέλαια-Λίπη*. Αθήνα: Καραμπερόπουλος Α.Ε.
- Μπαλατσούρας, Γ. (1997). *Σύγχρονη ελαιοκομία: Ελαιόλαδο* Αθήνα: Ιδιωτική έκδοση.

