

Περιφέρεια Βορείου Αιγαίου
Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΕΡΕΥΝΑ ΠΡΩΘΗΣΗΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΚΑΙ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΛΙΑΣ Β. ΑΙΓΑΙΟΥ ΜΕΣΩ ΑΝΑΔΕΙΞΗΣ ΤΟΥ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΔΙΑΙΤΕΡΩΝ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ**



Παραδοτέο ΠΑ1: «Έκθεση με την απογραφή υφιστάμενων μελετών και μετρήσεων στην περιοχή του Βορείου Αιγαίου και προκαταρκτική αξιολόγηση των ανωτέρω. Κατάρτιση σχεδίου δειγματοληψιών και μετρήσεων Β' φάσης».



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Τίτλος Προγράμματος: «Εξειδικευμένη έρευνα προώθησης ελαιολάδου και προϊόντων ελιάς Β. Αιγαίου μέσω ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας»

Φορέας Χρηματοδότησης: Περιφέρεια Βορείου Αιγαίου

Έναρξη του Προγράμματος: 02/02/2018

Παραδοτέο ΠΑ1: Έκθεση με την απογραφή υφιστάμενων μελετών και μετρήσεων στην περιοχή του Βορείου Αιγαίου και προκαταρκτική αξιολόγηση των ανωτέρω. Κατάρτιση σχεδίου δειγματοληψιών και μετρήσεων Β' φάσης

Ημερομηνία κατάθεσης: 02/07/2018

Συγγραφείς: Νατάσα Καλογιούρη, Χημικός, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια
Δασενάκη Μαριλένα, Χημικός, Μεταδιδακτορική ερευνήτρια
Νικόλαος Σ. Θωμαΐδης, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Επιστημονικός Υπόθυνος: Νικόλαος Σ. Θωμαΐδης, Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α.

τηλ: 210727-4317, -4430/ fax: 210-7274750

e-mail: ntho@chem.uoa.gr

URL: <http://trams.chem.uoa.gr>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 Σκοπός Ερευνητικού Έργου	4
1.2. Εισαγωγικά για το ελαιόλαδο	9
1.3 Προκαταρκτικές μελέτες τεκμηρίωσης της αυθεντικότητας του Λεσβιακού ελαιολάδου.....	18
1.3.1 Οργανοληπτικό Προφίλ.....	18
1.3.2 Ανάπτυξη μεθόδου LC-QTOF-MS για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών: Προκαταρκτική έρευνα διάκρισης βιολογικού – συμβατικού ελαιολάδου.....	42
1.3.3 Ταξινόμηση των ελληνικών ποικιλιών με μη στοχευμένη σάρωση UHPLC-QTOF- MS και προχωρημένες χημειομετρικές τεχνικές	46
1.3.4 Προκαταρκτικές μελέτες συσχετισμού του φαινολικού προφίλ και του γεωγραφικού υψόμετρου κατά την ελαιοκομική περίοδο 2016-2017	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	52
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΑΣΗΣ - ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΣΧΕΔΙΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ Β' ΦΑΣΗΣ	52
2.1. Δράση 1: Χαρτογράφηση της Ποιότητας του Έξτρα Παρθένου Ελαιόλαδου από Κολοβή και Αδραμυτιανή και άλλες ποικιλίες Βορείου Αιγαίου - προϊόντα με ένδειξη νησιωτικής παραγωγής και με ισχυρισμό υγείας.....	53
2.1.1. Σχεδιασμός Δειγματοληψιών για τη Δράση 1	56
2.1.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την υλοποίηση της Δράσης 1.....	62
2.1.3 Πειράματα σε ελαιοτριβεία	64
2.2. Δράση 2: Έξτρα Παρθένο ελαιόλαδο με υψηλή σταθερότητα, χωρίς απώλεια των βιοδραστικών του συστατικών	68
2.3 Δράση 3: Ελαιόλαδο με υψηλή διατροφική αξία ως συμπλήρωμα διατροφής και ενισχυτικό γεύσης.....	71
2.4 Δράση 4: Βρώσιμη ελιά και πάστα ελιάς.....	72
2.5 Δράση 5: Αξιοποίηση κατσίγαρου, ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σκοπός Ερευνητικού Έργου

Ο σκοπός του ερευνητικού έργου είναι η διεξαγωγή μιας συστηματικής εξειδικευμένης έρευνας με στόχο την ανάδειξη της εξαιρετικής ποιότητας όλων των προϊόντων ελιάς της Περιφέρειας, και την διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης των παραπροϊόντων της παραγωγικής διαδικασίας με βάση το βιοδραστικό τους περιεχόμενο. Η έρευνα αυτή περιλαμβάνει την ανάλυση ενός μεγάλου και αντιπροσωπευτικού αριθμού δειγμάτων προϊόντων ελιάς από το Β. Αιγαίο με χρήση μιας καινοτόμας και πρωτοποριακής μεθοδολογίας προσδιορισμού του βιοδραστικού τους περιεχομένου, το οποίο θα διερευνηθεί για πρώτη φορά εντατικά και σε βάθος. Αυτή η προσπάθεια θα ενισχύσει την περιορισμένη διεθνή αναγνωρισιμότητα των ελαιολάδων του Β. Αιγαίου και θα αποτελέσει την απαραίτητη τεκμηρίωση για την ανάδειξη της μοναδικότητας και αυθεντικότητας τους.

Η αυθεντικότητα των τροφίμων καθώς και η ευεργετική τους δράση στην υγεία αποτελεί σημαντικό πυλώνα της πολιτικής της Ευρωπαϊκής Ένωσης στον αγροδιατροφικό τομέα. Αφορά άμεσα τους παραγωγούς, τους τυποποιητές, τους φορείς ελέγχου τροφίμων και προστασίας των καταναλωτών αλλά και τους ίδιους τους καταναλωτές. Η ανάπτυξη της Αναλυτικής Χημείας έχει συνεισφέρει σημαντικά στην τεκμηρίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, και πρόσφατα στην τεκμηρίωση της αυθεντικότητας τους όπως και της ανάδειξης του βιοδραστικού περιεχομένου και την ευεργετική δράση συγκεκριμένων τροφίμων στην ανθρώπινη υγεία. Στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος βρίσκεται η Μεσογειακή διατροφή, χάρη στις ευεργετικές ιδιότητες που έχει για τον οργανισμό, με κυρίαρχο πρωταγωνιστή το ελαιόλαδο. Η ανάδειξη του περιεχομένου των βιοδραστικών ενώσεων του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, οδήγησε στη γνωμοδότηση της EFSA (**EFSA Journal 2011; 9(4):2033**) και τη νομοθετική ρύθμιση από την Ε.Ε. με τον Κανονισμό 432/2012.

Το ενδιαφέρον του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας (ΕΑΧ) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), για το αντικείμενο της παρούσας έρευνας απορρέει απευθείας από τον ιδρυτικό σκοπό και τα αντικείμενα ενδιαφέροντος του. Το ΕΑΧ έχει σαν κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον την ανάπτυξη μεθόδων και τεχνικών για τη

διασφάλιση της ποιότητας, μεταξύ άλλων, και της ιχνηλασιμότητας των τροφίμων. Το EAX διαθέτει πολυετή πείρα στην ανάπτυξη και εφαρμογή σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων και τεχνικών σε πλήθος ερευνητικών εφαρμογών, όπως στον τομέα της Χημείας Τροφίμων. Η ερευνητική ομάδα TrAMS (Trace Analysis and Mass Spectrometry Group) του EAX, αποτελεί μία από τις λίγες ομάδες παγκοσμίως που εξειδικεύεται στην ανάλυση ελαιολάδων και έχει αναπτύξει μιας μοναδική και καινοτόμο αυτοματοποιημένη μεθοδολογία εργασίας η οποία επιτρέπει την ανίχνευση συνολικά 238.000 φυσικών ενώσεων με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Η πορεία εργασίας (workflow) αυτή της μεθοδολογίας περιέχει μια σειρά από πρωτότυπα βήματα – αλγορίθμους που αναπτύχθηκαν από την ομάδα του EAX και περιλαμβάνουν (ενδεικτικά) καινοτόμο αλγόριθμο αφαίρεσης υποβάθρου, αυτόματη σάρωση μαζών με νέο αλγόριθμο υπολογισμού του ισοτοπικού προφίλ, αυτοματοποιημένη πρόβλεψη του χρόνου ανάλυσης κάθε ύποπτης ένωσης με καινοτόμο μοντέλο πρόβλεψης και ελέγχου του αποτελέσματος με πρωτοποριακούς αλγορίθμους εξέτασης του πεδίου εφαρμογής (applicability domain), καινοτόμο αλγόριθμο σύγκρισης του πειραματικού φάσματος μαζών με τα φάσματα μαζών βιβλιοθήκης MassBank, καινοτόμο αλγόριθμο ποσοτικοποίησης μεγάλου αριθμού ενώσεων με χημειομετρικούς δείκτες ομοιότητας με σειρά πρότυπων ενώσεων και καινοτόμο αλγόριθμο εντοπισμού τάσεων σε μεγάλες βάσεις δεδομένων (big data) όπως αυτές που θα παραχθούν από την ανάλυση των δειγμάτων του ερευνητικού προγράμματος. Γίνεται από τα παραπάνω αντιληπτό ότι η μοναδική αυτή μεθοδολογία εφαρμόζεται για πρώτη φορά και μάλιστα σε μία περιοχή όπως η Περ. Β. Αιγαίου, που παρουσιάζει μοναδικό φυσικό περιβάλλον και ποτέ πριν δεν έχει μελετηθεί σε τέτοιο βαθμό, με επίσης μοναδικό σχεδιασμό δειγματοληψιών, που θα καταδείξουν τα ιδιαίτερα βιοδραστικά συστατικά και την υψηλή και ιδιαίτερη ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων της.

Το EAX του ΕΚΠΑ είναι το μοναδικό εργαστήριο στην Ελλάδα που έχει εκδηλώσει έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη και την ανάδειξη των ελαιολάδων της Περιφέρειας του Β. Αιγαίου. Έχουν ήδη ξεκινήσει από το 2014 χωρίς χρηματοδότηση και με ιδίους πόρους, προκαταρκτικές μελέτες για το ελαιόλαδο του Β. Αιγαίου. Από τη βασική έρευνα που προηγήθηκε έχουν ήδη δημοσιευτεί τρεις ερευνητικές εργασίες σε διεθνή περιοδικά. Στην πρώτη εργασία ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 40 αντιοξειδωτικά (Kalogiouri et al. 2016), αποδεικνύοντας πως οι

ποικιλίες Κολοβή και Αδραμυτιανή έχουν πλούσιο φαινολικό προφίλ. Το φαινολικό αυτό προφίλ συσχετίστηκε με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και αποδείχθηκε ότι η ξεχωριστή γεύση των Λεσβιακών ελαιολάδων οφείλεται στο βιοδραστικό περιεχόμενό τους. Στην δεύτερη εργασία προτάθηκε μία πλήρως τεκμηριωμένη νέα μέθοδο ποσοτικοποίησης πολλών αντιοξειδωτικών ενώσεων στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο από Κολοβή από διάφορες περιοχές της Λέσβου και έγινε διαχωρισμός μεταξύ βιολογικών ελαιολάδων και συμβατικής καλλιέργειας. Πρόκειται για μια εργασία στην οποία δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά η μοναδική αναλυτική μεθοδολογία που ταυτοποιεί νέες ενώσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ισχυρισμό υγείας (EFSA 432/2012) (Kalogiouri et al. 2017). Στην τελευταία ερευνητική εργασία η οποία έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό Food Chemistry (Kalogiouri et al. 2018) ταυτοποιήθηκαν χαρακτηριστικοί δείκτες, υπεύθυνοι για την κατηγοριοποίηση των ελαιολάδων διαφορετικών ποικιλιών (Κολοβή, Μανάκι, Κορωνέικη, Χαλκιδική, Αμφίσσης, Λαδοελιά). Τέλος, άλλη μία εργασία, η οποία αφορά τη νοθεία της επιτραπέζιας ελιάς και την ανίχνευση αντιοξειδωτικών σε φύλλα ελιάς, βρίσκεται στην διαδικασία της υποβολής.

Μέσα από αυτές τις εργασίες αποδεικνύεται η μακρόχρονη εμπειρία και εξειδίκευση, αλλά και η μοναδικότητα του ΕΑΧ και της ομάδας TrAMS στις αναλύσεις ελαιολάδων και προϊόντων ελιάς, καθώς και η μοναδικότητα της μεθοδολογίας της ερευνητικής ομάδας, με δεδομένο ότι δεν υπάρχουν αντίστοιχες ερευνητικές εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία. Αξίζει να επισημανθεί ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες εργασίες για ποικιλίες ελαιολάδων από την Ισπανία, την Πορτογαλία, την Ιταλία και το Μαρόκο. Στην Ελλάδα, όμως, οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι αρκετά λιγότερες. Μάλιστα, οι αναφορές σε ποικιλίες ελαιολάδου που προέρχονται από τη Λέσβο είναι ελάχιστες. Το 2005 δημοσιεύθηκε μια εργασία για την οποία είχε χρησιμοποιηθεί μόλις 1 δείγμα της ποικιλίας Κολοβή από τη Λέσβο για την ταυτοποίηση 27 αντιοξειδωτικών (**Christophoridou et al. 2005**). Το 2016 δημοσιεύθηκε μια μελέτη, η οποία βασιζόταν στην εύρεση και σύγκριση ποιοτικών χαρακτηριστικών 74 δειγμάτων ελαιολάδου (πηγικές ενώσεις και λιπαρά οξέα) που ανήκαν σε 5 διαφορετικές ποικιλίες (Χαλκιδικής, Κουτσουρελιά, Τοπική Μάκρης, Μανάκι και Κολοβή). Τα δείγματα της Κολοβής ήταν μόλις 8 (**Kosma et al. 2016**). Επίσης, σε μελέτες του φαινολικού προφίλ έχουν χρησιμοποιηθεί και προωθούνται μέχρι στιγμής ελαιόλαδα κυρίως της ποικιλίας Κορωνέικης (**Kanakis 2013, Katsoyannos 2015**). Δυστυχώς, σε μια άλλη μελέτη που

πραγματοποιήθηκε σε 340 δείγματα από 23 ποικιλίες, η ποικιλία Αδραμυτιανή παρουσιάζεται ως η ποικιλία με τη χαμηλότερη συγκέντρωση συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών, με την Κολοβή να ακολουθεί σε λίγο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (**Karkoula et al. 2014**). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, ωστόσο, ότι στη συγκεκριμένη μελέτη τα αποτελέσματα βασίστηκαν στην ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μόλις 4 ενώσεων. Είναι, επομένως, προφανές ότι απαιτείται μια συστηματικότερη μελέτη και ένας μεγάλος και αντιπροσωπευτικός αριθμός δειγμάτων από το Β. Αιγαίο (κυρίως από τη Λέσβο), ώστε να γίνει χαρτογράφηση των ελαιολάδων της Περιφέρειας και να τεκμηριωθούν ασφαλώς τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και συμπεράσματα. Ήδη, έχει πραγματοποιηθεί προσπάθεια χαρτογράφησης των ελαιολάδων που προέρχονται από τα νησιά του Ιονίου (**Karabagias et al. 2013**), αλλά δεν υπάρχει ανάλογη έρευνα για προϊόντα τα οποία προέρχονται από τα νησιά του Β. Αιγαίου. Μια τέτοια προσπάθεια θα ενισχύσει την περιορισμένη, προς το παρόν, διεθνή αναγνωρισιμότητα των ελαιολάδων του Β. Αιγαίου, ενώ ακόμα θα αλλάξει πλήρως η αντίληψη του μέσου έλληνα καταναλωτή πως οι λιγότερο γνωστές ποικιλίες Κολοβή και Αδραμυτιανή υστερούν έναντι της γνωστής ποικιλίας «Κορωνέικη» της Κρήτης και της Πελοποννήσου.

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με τις παραπάνω εργασίες που υποβιβάζουν την αξία των ελαιολάδων του Β. Αιγαίου, οι ερευνητικές μελέτες που έχει πραγματοποιήσει το ΕΑΧ, ανατρέπουν εξ' ολοκλήρου τα παραπάνω δεδομένα. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, έχει ήδη δημοσιευθεί μια εργασία στην οποία έχουν ανιχνευθεί και ποσοτικοποιηθεί 40 αντιοξειδωτικά σε 16 δείγματα ελαιολάδων των ποικιλιών Κολοβή και Αδραμυτιανή, αποδεικνύοντας πως αυτές οι ποικιλίες έχουν πλούσιο φαινολικό προφίλ (**Kalogiouri et al. 2016**). Το φαινολικό αυτό προφίλ συσχετίστηκε με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους και αποδείχθηκε ότι η ξεχωριστή (ήδη βραβευμένη) γεύση των Λεσβιακών ελαιολάδων οφείλεται στο πλούσιο βιοδραστικό περιεχόμενο τους (**Kalogiouri et al. 2016**). Λαμβάνοντας 41 μονοποικιλιακά δείγματα Κολοβής από τη Λέσβο κατά την ελαιοκομική περίοδο 2015-2016, δημοσιεύθηκε σε διεθνές περιοδικό η δεύτερη εργασία που προτείνει μία πλήρως τεκμηριωμένη νέα μέθοδο ποσοτικοποίησης περισσότερων από 40 ενώσεων στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Στις μελέτες αυτές έχει χρησιμοποιηθεί έξτρα παρθένο ελαιόλαδο από Κολοβή οργανικής και συμβατικής καλλιέργειας από διάφορες περιοχές της Λέσβου (**Kalogiouri et al. 2017**). Μέσα από αυτές τις εργασίες είναι ξεκάθαρο ότι το παραγόμενο ελαιόλαδο της Λέσβου, όχι μόνο δεν υπολείπεται σε βιοδραστικό περιεχόμενο, αλλά μέσα από

στοχευμένες δράσεις μπορεί και να αναδειχθεί σε πρωταγωνιστικό προϊόν στην παγκόσμια αγορά ελαιολάδου. Κατά την ίδια ελαιοκομική περίοδο, χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου 11 μονοποικιλιακά δείγματα Κολοβής, 9 δείγματα Χονδροελιάς Χαλκιδικής, 5 δείγματα Αμφίσσης, 17 Κορωνέικης, 4 Λαδοελιάς και 5 Μανάκι με στόχο να βρεθούν χαρακτηριστικές ενώσεις «δείκτες» για την κάθε ποικιλία. Σε αυτή την εργασία, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η εξέταση του συνόλου του μεταβολώματος των δειγμάτων διαφορετικών ποικιλιών. Επιπλέον, δημιουργήθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία μια λίστα που περιλάμβανε 1607 ενώσεις που συνήθως απαντώνται σε ελιές αλλά και παραπροϊόντα της ελιάς, ώστε να επιταχυνθεί η διαδικασία ταυτοποίησης των άγνωστων ενώσεων (Kalogiouri et al. 2018). Τέλος, κατά την ελαιοκομική περίοδο 2016-2017 συλλέχθηκαν 39 δείγματα Κολοβής και Αδραμυτιανής ώστε να πραγματοποιηθούν προκαταρκτικές μελέτες αναφορικά με το πώς διαμορφώνεται το φαινολικό προφίλ των Λεσβιακών ελαιολάδων ανάλογα με το γεωγραφικό υψόμετρο και τον τύπο της καλλιέργειας. Καθίσταται από τα παραπάνω σαφές ότι εδώ και 4 χρόνια πραγματοποιείται μια συστηματική προσπάθεια από το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ ώστε να αναδειχθεί η εξαιρετική ποιότητα των ελαιολάδων του Β. Αιγαίου.

Σύμφωνα με την παρούσα ερευνητική πρόταση, στόχος είναι (1) η ανάδειξη της εξαιρετικής ποιότητας των μονοποικιλιακών ελαιολάδων του Β. Αιγαίου, με σκοπό την ανίχνευση και προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων με μια καινοτόμο και πολυδύναμη μέθοδο, την ανάδειξη του βιοδραστικού περιεχομένου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας και την προώθηση του με βάση τον ισχυρισμό υγείας (EFSA, 432/2012) καθώς και την ένδειξη νησιωτικής παραγωγής, (2) η ανάπτυξη βελτιωμένων προϊόντων έξτρα παρθένου ελαιολάδου με υψηλή σταθερότητα χωρίς απώλεια βιοδραστικών συστατικών, (3) η εξειδικευμένη έρευνα και ανάδειξη του βιοδραστικού περιεχομένου ελαιολάδου Κολοβής το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενισχυτικό γεύσης και εμπλουτισμό του βιοδραστικού περιεχομένου μειονεκτικών ελαιολάδων και ως πρώτη ύλη για τα συμπληρώματα διατροφής, (4) η εξειδικευμένη έρευνα του φαινολικού αποτυπώματος των βρώσιμων ελιών και της πάστας ελιάς με στόχο την ανάδειξη και την προώθηση των προϊόντων με πιθανούς ισχυρισμούς υγείας και (5) η εμπορική εκμετάλλευση των παραπροϊόντων των ελαιοτριβείων (κατσίγαρος, ελαιοπυρήνα, φύλλα).

Αυτή η προσπάθεια ανάδειξης των προϊόντων ελιάς της Περιφέρειας θα ενισχύσει την περιορισμένη διεθνή αναγνωρισιμότητα των ελαιόλαδων του Βορείου Αιγαίου και θα αποτελέσει την απαραίτητη τεκμηρίωση για την ανάδειξη της μοναδικότητας και αυθεντικότητας τους. Η ερευνητική αυτή τεκμηρίωση θα αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη νέων προϊόντων με απώτερο στόχο την ενίσχυση του Αγροδιατροφικού Τομέα της Περιφέρειας. Τα τοπικά προϊόντα που προέρχονται από την ελιά θα γίνουν διεθνώς γνωστά με βάση σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα. Εκτιμάται ότι αυτό θα έχει ως έμμεσο αποτέλεσμα και την αύξηση του τουρισμού, μέσα από την προώθηση των τοπικών προϊόντων με διεθνή καταξίωση σε ειδικά καταστήματα, χώρους μαζικής εστίασης και καταλυμάτων, ακόμα και τη δημιουργία χώρων πολιτιστικού ενδιαφέροντος που θα συνδέονται με την προβολή του «πολιτισμού της ελιάς». Είναι λοιπόν σαφές ότι πρόκειται για στοχευμένες δράσεις οι οποίες θα έχουν ως αποτέλεσμα τη στήριξη της παραγωγής και την οικονομική ανάπτυξη, καθώς, επιπλέον, θα ανοίξουν και αρκετές νέες θέσεις εργασίας. Οι επιδράσεις αυτής της μελέτης θα είναι θετικές και ως προς το περιβάλλον, καθώς θα πραγματοποιηθεί μια πρωτότυπη έρευνα και για την εμπορική αξιοποίηση των αποβλήτων που θα έχει ως συνέπεια την προστασία του περιβάλλοντος. Πρόκειται, ξεκάθαρα, για μια έρευνα σχεδιασμένη για τη δημιουργία και προώθηση προϊόντων στο πλαίσιο της κυκλικής οικονομίας.

1.2. Εισαγωγικά για το ελαιόλαδο

Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της Μεσογειακής Διατροφής, αλλά η κατανάλωση του εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο, τόσο για την μοναδική του γεύση, αλλά και για τις ευεργετικές του ιδιότητες, που οφείλονται στα συστατικά του, όπως φυσικά αντιοξειδωτικά και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Ελαιόλαδο ονομάζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής (Olea Europea) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες φυσικές σε κατάλληλες θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (**International Olive Oil Council, Trade Standard applying to olive oils and olive'pomace oils COI/T.15/NC No 3/ Rev. 8, 2015, 1-16**) το ελαιόλαδο διαχωρίζεται

σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την οξύτητα του, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

1. ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ

Έλαια λαμβανόμενα 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. Τα παρθένα ελαιόλαδα κατατάσσονται αποκλειστικά και περιγράφονται με τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,8 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

β) Παρθένο ελαιόλαδο Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 2 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

γ) Ελαιόλαδο λαμπάντε Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, υπερβαίνει τα 2 g ανά 100 g ή/και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2. ΕΞΕΥΓΕΝΙΣΜΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Ελαιόλαδο λαμβανόμενο από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

3. ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΑΠΟΤΕΛΟΥΜΕΝΟ ΑΠΟ ΕΞΕΥΓΕΝΙΣΜΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ ΚΑΙ ΠΑΡΘΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ

Έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

4. ΑΚΑΤΕΡΓΑΣΤΟ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟ

Έλαιο που λαμβάνεται από τους πυρήνες της ελιάς κατόπιν επεξεργασίας με διαλύτες ή με φυσικά μέσα ή έλαιο που αντιστοιχεί, με εξαίρεση ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, σε ελαιόλαδο λαμπάντε εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διεργασίες επανεστεροποίησης και πρόσμειξης με έλαια άλλης φύσης και των οποίων τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

5. ΕΞΕΥΓΕΝΙΣΜΕΝΟ ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟ

Έλαιο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό του ακατέργαστου πυρηνελαίου, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

6. ΠΥΡΗΝΕΛΑΙΟ

Έλαιο που λαμβάνεται από ανάμειξη εξευγενισμένου πυρηνελαίου και παρθένων ελαιολάδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, του οποίου η περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1 g ανά 100 g και του οποίου τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

Συστατικά ελαιολάδου

Το έλαιο που προέρχεται από τον καρπό της ελιάς *Elea Europeae*, έχει συγκεκριμένη σύσταση, και αποτελείται από 2 κλάσματα, το σαπωνοποιήσιμο και το μη σαπωνοποιήσιμο. Το σαπωνοποιήσιμο κλάσμα καθιστά το 98,5-99,5% του ελαίου. Το κύριο συστατικό του ελαιόλαδου είναι τα τριγλυκερίδια, τα οποία αποτελούν το 99% της σύστασης του. Αποτελείται επίσης από ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο- και διάκυλογλυκερίνες, υδρογονάνθρακες, τοκοφερόλες, αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες, στερόλες, τριτερπενικά οξέα και τέλος

πτητικές και αρωματικές ενώσεις. Μια μεγάλη κατηγορία συστατικών του ελαιόλαδου είναι οι φαινολικές ενώσεις. Στις παρακάτω παραγράφους αναπτύσσεται η κάθε κατηγορία συστατικών του ελαιόλαδου που προαναφέρθηκε.

Λιπαρά οξέα

Στο ελαιόλαδο υπάρχουν λιπαρά οξέα κορεσμένα και ακόρεστα, και η περιεκτικότητά τους ορίζει το είδος του ελαιόλαδου, μέσω της ελεύθερης οξύτητας που εκφράζεται με το ελαϊκό οξύ, αλλά και την βρωσιμότητά του (trans- λιπαρά οξέα). Κορεσμένα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο είναι το Λαυρικό οξύ (C12:0), Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Στεατικό οξύ (C18:0), Αραχιδικό οξύ (C20:0), Επταδεκανοϊκό οξύ (C17:0), Βεχενικό οξύ (C22:0), και Λιγνοκηρικό οξύ (C24:0). Ακόρεστα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο είναι το Παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), Επταδεκενοϊκό οξύ (C17:1), Ελαϊκό οξύ (C18:1), Λινολεϊκό οξύ (C18:2), Λινολενικό οξύ (C18:3), Εικοσεναϊκό οξύ (C20:1), και Ερουκικό οξύ (C22:1). Η περιεκτικότητά σε λιπαρά οξέα διαφέρει σε διαφορετικά δείγματα, αφού παίζει ρόλο ο γεωγραφικός παράγοντας, το κλίμα, η ποικιλία, αλλά και το στάδιο ωριμότητας του καρπού. Τα κύρια λιπαρά οξέα, που βρίσκονται γενικά σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα είναι το Ελαϊκό οξύ, το Παλμιτικό και το Λινελαϊκό οξύ. Βάση των περιεκτικότητων αυτών των λιπαρών οξέων, τα ελαιόλαδα κατατάσσονται σε 2 τύπους, στα ελαιόλαδα με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και χαμηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινελαϊκό, και στα ελαιόλαδα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ και υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό και λινελαϊκό οξύ.

Τριγλυκερίδια

Τα κύρια τριγλυκερίδια που βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στο ελαιόλαδο είναι τα OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5-5,7%) και SOO(3-7%). Σε μικρότερο ποσοστό, υπάρχουν επίσης τα POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO και LLL.

Μono- και διακυλογλυκερίνες

Η παρουσία των μερικών-γλυκερών οφείλεται σε ατελή τριακυλογλυκερολική βιοσύνθεση ή σε υδρολυτικές αντιδράσεις που έλαβαν χώρα. Γενικά στο παρθένο ελαιόλαδο, η συγκέντρωση των διακυλογλυκερολών κυμαίνεται στο 1-2,8%.

Υδρογονάνθρακες

Στο ελαιόλαδο υπάρχουν κυρίως 2 υδρογονάνθρακες, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο. Υπάρχουν επίσης σε μικρότερες περιεκτικότητες διτερπένια και τριτερπένια, πολυολεφίνες, n-παραφίνες και ισοπρενοειδή. Το σκουαλένιο αποτελεί το 90% του υδρογονανθρακικού κλάσματος του ελαιόλαδου, και είναι ο τελευταίος μεταβολίτης που προηγείται του σχηματισμού στερολικού δακτυλίου. Πιστεύεται ότι η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε σκουαλένιο είναι σημαντική για την παρουσία ευεργετικών ιδιοτήτων του ελαιόλαδου στη υγεία και τη δράση του ενάντιας ορισμένων μορφών καρκίνου. Όπως και τα υπόλοιπα συστατικά, έτσι και στο σκουαλένιο, η συγκέντρωσή του εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και τον τρόπο εκχύλισης του ελαιόλαδου.

Τοκοφερόλες

Από τις 8 ομόλογες τοκοφερόλες, στο παρθένο ελαιόλαδο εμφανίζονται οι παρακάτω: α-τοκοφερόλη, β-τοκοφερόλη, γ-τοκοφερόλη και δ-τοκοφερόλη. Το 90% της περιεκτικότητας του παρθένου ελαιόλαδου σε τοκοφερόλες όμως, καταλαμβάνει η α-τοκοφερόλη, στην ελεύθερη της μορφή. Η περιεκτικότητα της κυμαίνεται σε ευρύ φάσμα mg kg^{-1} ελαίου, αφού η περιεκτικότητα της εξαρτάται από την ποικιλία ελιάς, και την τεχνολογία εκχύλισης. Η α-τοκοφερόλη είναι γνωστό *in vivo* αντιοξειδωτικό, οπότε είναι επιθυμητό να διατηρείται. Έχει βρεθεί ότι κατά τις διαδικασίες εξευγενισμού και υδρογόνωσης του ελαίου η συγκέντρωση τοκοφερόλης μειώνεται.

Χρωστικές ουσίες

Οι χρωστικές ουσίες που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι οι χλωροφύλλες και τα καρετονοειδή, τα οποία του δίνουν το χαρακτηριστικό του χρώμα. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να υποστούν οξείδωση, κάτω από ορισμένες συνθήκες, σε άχρωμα προϊόντα. Συνεπώς, η περιεκτικότητα των χρωστικών επηρεάζεται από την ποικιλία της ελιάς, την γεωγραφική θέση παραγωγής, το στάδιο ωρίμανσης, τον τρόπο εκχύλισης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Αν και ακόμα δεν υπάρχει τυποποιημένη μέθοδος μέτρησης της περιεκτικότητας των χρωστικών, αποτελούν δείκτη ποιότητας του ελαιόλαδου. Κυρίαρχη ένωση ανάμεσα στις χλωροφύλλες είναι η φαιοφυτίνη-α, ενώ κυρίαρχες ενώσεις καρετονοειδών είναι η λουτεΐνη και το β-καροτένιο.

Αλειφατικές και αρωματικές αλκοόλες

Οι κυριότερες κατηγορίες αλειφατικών και αρωματικών αλκοολών είναι οι λιπαρές αλκοόλες και οι διτερπενοειδείς αλκοόλες, που μπορούν να συναντηθούν στην ελεύθερη αλλά και στην

εστεροποιημένη μορφή τους. Οι λιπαρές αλκοόλες είναι ευθύγραμμες κορεσμένες αλκοόλες με περισσότερα από 16 άτομα άνθρακα, και βρίσκονται στην ελεύθερη αλλά και εστεροποιημένη μορφή. Οι κυριότερες λιπαρές αλκοόλες που βρίσκονται στο ελαιόλαδο είναι η εικοσιδυανόλη, η εικοσιτετρανόλη, η εικοσιεξανόλη και η εικοσιοκτανόλη. Οι περιεκτικότητες των εστεροποιημένων λιπαρών αλκοολών με λιπαρά οξέα είναι σημαντικές, αφού χρησιμοποιούνται για την διαφοροποίηση του ελαιόλαδου στις κατηγορίες του. Οι κυριότερες άκυκλες διτερπενοειδής αλκοόλες που βρίσκονται στο αλειφατικό κλάσμα αλκοολών του ελαιόλαδου είναι η φυτόλη και η γερανυλγερανιόλη.

Στερόλες

Οι στερόλες είναι λιπίδια που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο γνησιότητας του ελαιόλαδου. Υπάρχουν 4 κατηγορίες στερολών στο ελαιόλαδο, οι κοινές στερόλες, οι 4α- μεθυλοστερόλες, οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες και οι τριτερπενοειδείς διαλκοόλες. Οι περιεκτικότητά τους εξαρτάται από την ποικιλία ελιάς, αλλά και τις τεχνικές επεξεργασίας, που χρησιμοποιούνται κατά την εξαγωγή ελαιόλαδου.

Βιοδραστικά συστατικά

Το ελαιόλαδο είναι ένα λειτουργικό τρόφιμο που περιέχει μεγάλες περιεκτικότητες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, που εκφράζονται σε ελαϊκό οξύ, άλλα, και συστατικά σε μικρότερη περιεκτικότητα, τα οποία έχουν βιολογική δράση. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών αυτών στο ελαιόλαδο δεν είναι συγκεκριμένες και ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία, το κλίμα, την ωριμότητα των ελιών κατά την συγκομιδή, την επεξεργασία που υπέστησαν, και το είδος ελαιόλαδου. Τα συστατικά αυτά δείχνουν να εμπλέκονται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του ελαιόλαδου. Γνωστές βιοδραστικές ενώσεις του ελαιόλαδου είναι το σκουαλένιο, τα τριτερπένια, αλλά και οι φαινολικές ενώσεις που εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στην οξείδωση λιπιδίων, του DNA, αλλά και της LDL.

Φαινολικές ενώσεις

Γενικά, φαινολική ένωση ορίζεται κάθε ένωση η οποία περιέχει ένα αρωματικό δακτύλιο που φέρει έναν τουλάχιστο υδρόξυ-υποκαταστάτη, και τα παράγωγά τους. Οι ενώσεις αυτές ποικίλουν σε δομή αλλά και λειτουργία, και συναντώνται στα περισσότερα λαχανικά και φρούτα. Έχουν ανακαλυφθεί περισσότερες από 8000 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις, από

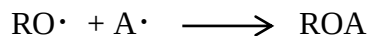
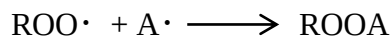
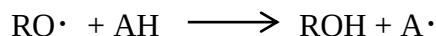
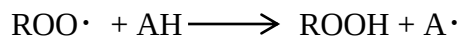
απλά μόρια, μέχρι πολυμερισμένα μόρια. Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερεύοντα συστατικά του ελαιόλαδου και βρίσκονται στο πολικό κλάσμα του που διαχωρίζεται κατά την εκχύλιση του ελαιόλαδου με μίγμα διαλυτών νερού-μεθανόλης. Η περιεκτικότητά τους στο παρθένο ελαιόλαδο εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως την ποικιλία του ελαιόδεντρου, την γεωγραφική περιοχή, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού και τις τεχνολογικές επεξεργασίες. Οι φαινόλες ή πολυφαινόλες έχουν συσχετιστεί με τη σταθερότητα, αλλά και με τα βιολογικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου. Τα τελευταία χρόνια, καταβάλλεται προσπάθεια σύνδεσης της πρόσληψης φαινολικών ενώσεων μέσα από τη διατροφή με τη μείωση κινδύνου για παθήσεις, όπως καρδιαγγειακής νόσου και καρκίνου, ενώ έρευνες έχουν ήδη συσχετίσει τις φαινόλες με τον ευεργετικό ρόλο του ελαιόλαδου, στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι πολυφαινόλες, παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διάρκεια ζωής του ελαιόλαδου, λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Επιπλέον, επηρεάζουν και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου.

Ευεργετικές ιδιότητες

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν αρκετές ευεργετικές ιδιότητες. Αυτές περιλαμβάνουν:

- (α) Αντιοξειδωτική δράση
- (β) Αντιφλεγμονώδης δράση
- (γ) Αντιδιαβητική δράση
- (δ) Αντικαρκινική δράση
- (ε) Αντιμικροβιακή δράση
- (στ) Αντιιική δράση
- (ζ) Προστασία δέρματος
- (η) Αντιγηραντική δράση

(α) Αντιοξειδωτική δράση: Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που καθυστερούν ή αποτρέπουν τις οξειδωτικές διαδικασίες ενός υποστρώματος. Οι φαινολικές ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των καταστροφέων των ελεύθερων ριζών (free radical terminators). Ο τρόπος που αποτρέπουν την οξείδωση των λιπιδίων είναι με το να γίνονται δότες ενός ατόμου υδρογόνου στις ρίζες λιπιδίου, και έτσι να σταματούν τη διάδοση της αλυσίδας που παράχθηκε λόγω του ριζικού πολυμερισμού, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις:



Οι φαινολικές ενώσεις λοιπόν, είναι καλοί δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου, αφού οι ενδιάμεσες ριζικές ενώσεις τους είναι σχετικά σταθερές λόγω συντονισμού, που απεντοπίζει το φορτίο, και λόγω της δομής τους, που αποτρέπει το μοριακό οξυγόνο να τους χτυπήσει, και να συνεχιστεί έτσι ο ριζικός πολυμερισμός.

(β) Αντιφλεγμονώδης δράση: Η δράση των φαινολικών ενώσεων ως αντιφλεγμονωδών είναι αποτελεσματικότερη εάν η χρήση τους γίνεται τοπικά. Η δράση τους επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και κυρίως από τη δομή τους. Τέτοια δράση έχουν κυρίως τα φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό, και το p-κουμαρικό οξύ.

(γ) Αντι-αθηροσκληρωτική δράση: Αποτρέποντας την υπεροξείδωση των λιπιδίων, που είναι ο βασικότερος παράγοντας στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης, οι φαινολικές ενώσεις έχουν αντι-αθηροσκληρωτική δράση. Εφόσον αποτρέπεται η υπεροξείδωση των λιπιδίων, παρεμποδίζεται και η οξειδωτική μετατροπή της LDL, άρα ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού έναντι των καρδιοπαθειών. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) και τον ισχυρισμό υγείας, αν στο ελαιόλαδο το σύνολο των φαινολικών ενώσεων της υδροξυτυροσόλης, της τυροσόλης και των παραγώγων της ελαιοευρωπεΐνης είναι ανώτερο των 250 mg kg⁻¹, ανήκει στην κατηγορία των ελαιολάδων που προστατεύουν τη χοληστερόλη LDL από την οξείδωση σύμφωνα με την Ευρωπαϊκό Κανονισμό 432/2012 (**Official Journal of the European Union, L-136, 2012, 1-40**).

(δ) Αντικαρκινική δράση: Πολλές από τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο ελαιόλαδο έχουν αντικαρκινική δράση, αφού έχει διαπιστευτεί ότι καθυστερούν την έναρξη και εξέλιξη της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, μειώνουν το οξειδωτικό στρες, μέσω της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδάσης. Έτσι αναστέλλεται ο σχηματισμός προϊόντων προσθήκης του DNA, που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία

καρκίνου. ^[19] Συγκεκριμένα υποστηρίζεται, ότι έχουν ευεργετικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου του μαστού, αλλά και του παχέος εντέρου.

(ε) Αντιμικροβιακή δράση: Κάποιες φαινολικές ενώσεις έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση τόσο στα Gram⁺, αλλά και στα Gram⁻ βακτήρια. Δρουν καταστρέφοντας τη βακτηριακή μεμβράνη ή/και διασπώντας τις πεπτιδογλυκάνες του κυττάρου. Φαινολικές ενώσεις όπως η Ελαιοευρωπαϊνή και τα προϊόντα υδρόλυσης της, μπορούν ακόμη να αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, της *Salmonella enteritidis*, της *Escherichia coli* και *B cereus*.

(στ) Αντιική δράση: Έχει διαπιστωθεί, σύμφωνα με έρευνες, ότι ορισμένες φαινολικές ενώσεις έχουν αντιική δράση έναντι συγκεκριμένων ιών, όπως *Herpes mononucleosis*, τον ιό της ηπατίτιδας, και άλλους διάφορους ιούς.

(ζ) Προστασία του δέρματος: Αυτά τα συστατικά έχουν άμεση αντιοξειδωτική δράση στο δέρμα, αφού απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες στην επιφάνεια του δέρματος. Επίσης δρουν προστατεύοντας το δέρμα από την υπεριώδη ακτινοβολία και αποτρέποντας την ανάπτυξη του όγκου.

(η) Αντιγηραντική δράση: Στο ελαιόλαδο υπάρχουν κάποιες φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν αντιγηραντική δράση, όπως η ελαιοευρωπαϊνή.

Κατηγορίες φαινολικών ενώσεων

Οι φαινολικές ενώσεις χωρίζονται σε 7 κατηγορίες:

- 1) Φαινολικά οξέα
- 2) Απλές φαινόλες
- 3) Φλαβονοειδή
- 4) Σεκοϊριδοειδή
- 5) Λιγνάνες
- 6) Υδροξυ-ισοχρωμάνες
- 7) Ψευδοφαινόλες

Χαρακτηριστικές ενώσεις κάθε κατηγορίας

Κατηγορία	Χαρακτηριστικές Ενώσεις
Φαινολικά οξέα	Βανιλλικό οξύ, γαλλικό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, o-κουμαρικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, συριγγικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, συναπικό οξύ, ομοβανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, υδροξυφαινυλο-αιθανικό οξύ, ελενολικό οξύ
Απλές φαινόλες	Υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη, βανιλίνη
Φλαβονοειδή	Λουτεολίνη, απιγενίνη, ρουτίνη, γλυκοζίτης της λουτεολίνης, κερκετίνη
Σεκοϊροϊδοειδή	Ελαιοευρωπεΐνη, άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, Λινγκστροσίδη, άγλυκη λινγκστροσίδη, ελαιοκανθάλη, ελαιασίνη
Λιγνάνες	Πινореζινόλη, 1-ακετοξυ-πινореζινόλη

1.3 Προκαταρκτικές μελέτες τεκμηρίωσης της αυθεντικότητας των Λεσβιακών ελαιολάδων

1.3.1 Οργανοληπτικό Προφίλ

Η αξιολόγηση της αυθεντικότητας καθίσταται αναγκαία τα τελευταία χρόνια στη βιομηχανία τροφίμων λόγω της αυξανόμενης ανάγκης για ακριβή επισήμανση στην ετικέτα. Ένα προϊόν χαρακτηρίζεται αυθεντικό όταν αρχικά, περιγράφεται με ακρίβεια από την ετικέτα και ακολουθεί την τρέχουσα νομοθεσία στη χώρα που παράγεται ή πωλείται. Η γνησιότητα αποτελεί ένα πολύπλευρο ζήτημα που καλύπτει πολλές πτυχές, όπως χαρακτηρισμός, νοθεία, εσφαλμένη επισήμανση και παραπλανητική προέλευση (**Dennis 1998**). Έτσι, υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που σε συνδυασμό με τα κατάλληλα εργαλεία επεξεργασίας θα μπορούν να εγγυηθούν τη γνησιότητα διαφόρων προϊόντων τροφίμων.

Στην εποχή μας, καθίσταται αναγκαία η μελέτη της αυθεντικότητας της ελιάς και των παραπροϊόντων της, λόγω της οικονομικής τους σημασίας, της θρεπτικής τους αξίας αλλά και των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων που έχουν μελετηθεί εκτενώς από την επιστημονική κοινότητα. Τα κυριότερα θέματα γνησιότητας που έχουν να κάνουν με την ποιότητα του ελαιολάδου είναι η νοθεία, η λανθασμένη περιγραφή της γεωγραφικής προέλευσης, ο τύπος της καλλιέργειας (οργανική ή συμβατική) και το οργανοληπτικό προφίλ. Η γεύση και το άρωμα είναι το αποτέλεσμα συγκεκριμένων συστατικών που βρίσκονται στο ελαιόλαδο και αυτά

καθορίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου **(COI / T.15NC αριθ. 3-25, 2003)**, υπάρχουν τρία θετικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στα εξαιρετικά παρθένα και παρθένα ελαιόλαδα: φρουτώδες, πικρό ή πικάντικο και δεκαέξι αρνητικά: ατροχάδο, μούχλα, μούργα, κρασώδες, μεταλλικό, ταγγό, καμμένο, άχυρο-ξύλο, παχύ, λιπαντικά, απόνερα, άλμη, σπάρτο, χωματίλα, σκουλήκι, αγγούρι. Σύμφωνα με το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, η παρουσία των θετικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών είναι απαραίτητη για την ταξινόμηση των ελαιολάδων ως «εξαιρετικά παρθένο». Αντιθέτως, τα ελαιόλαδα με αρνητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχουν μη αποδεκτή γεύση και χαρακτηρίζονται «μειονεκτικά». Η επίσημη μέθοδος για την οργανοληπτική αξιολόγηση του ελαιόλαδου εφαρμόζεται μέχρι στιγμής σε δοκιμαστικά πάνελ, όπως αυτά έχουν προταθεί από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου **(International Olive Oil Council, Sensory analysis of olive oil standard guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters)** σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 1348/2013 **(Official Journal of the European Union, L338, 2013, 34-67)**.

Ανεξαρτητα από την οργανοληπτική αξιολόγηση σε πάνελ, τα τελευταία τριάντα χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές αναλυτικές μεθοδολογίες για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πτητικών συστατικών που χαρακτηρίζουν τη γεύση και το άρωμα του ελαιόλαδου. Μεταξύ αυτών, η αέρια χρωματογραφία είναι η κύρια τεχνική που εφαρμόζεται για το σκοπό αυτό. Εκτός από το πτητικό κλάσμα, όμως, μια άλλη ομάδα ενώσεων, τα βιοδραστικά συστατικά φαίνεται να καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τη γεύση και το άρωμα του ελαιόλαδου. Για την μελέτη αυτών των ενώσεων, η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) παρουσιάζει υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία, επιτρέποντας την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων που βρίσκονται στα τρόφιμα, τόσο με στοχευμένη όσο και με μη στοχευμένη σάρωση. Οι μη στοχευμένες μέθοδοι σάρωσης, σε συνδυασμό με τα κατάλληλα χημειομετρικά εργαλεία βελτιώνουν το εύρος της παραδοσιακής στοχευμένης ανάλυσης και επιταχύνουν τις προοπτικές νέων εφαρμογών. Δεδομένου ότι η χρήση της υγροχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού χαρακτηριστικών μαζών, καθίσταται αναγκαία η χρήση χημειομετρικών εργαλείων για την προτεραιοποίηση και ταξινόμησή τους.

Μέχρι τώρα, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες για τις οργανοληπτικές διαφορές αρώματος και γεύσης μεταξύ εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων και μειονεκτικών. Εντούτοις, έχει βρεθεί ότι υπάρχει σχέση μεταξύ συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων και της πικρής γεύσης του ελαιολάδου, και πιο συγκεκριμένα της ελαιοευρωπείνης και της λινγκστροσίδης. Όμως, η σχέση μεταξύ των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του ελαιολάδου και της ύπαρξης φαινολικών ενώσεων δεν έχει πλήρως ξεκαθαριστεί, αφού υπάρχουν αντιπαράθεσεις όσον αφορά τις ενώσεις που καθορίζουν τη γεύση του ελαιολάδου (**Bendini et al. 2007**).

Στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας έχει πραγματοποιηθεί ήδη από το 2016 ενδεδειγμένη μελέτη της σύνδεσης του οργανοληπτικού προφίλ του ελαιολάδου με το φαινολικό του αποτύπωμα και εξετάστηκε αν μπορεί να πραγματοποιηθεί διάκριση μεταξύ εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων και μειονεκτικών βασιζόμενη στο φαινολικό προφίλ του ελαιολάδου (**Kalogiouri et al. 2016**).

Ο πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη και εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου εργασίας με LC-HRMS, που θα συμπεριλαμβάνει στοχευμένη, «ύποπτη» και μη στοχευμένη σάρωση για τη μελέτη του αποτυπώματος του ελαιολάδου. Για αυτό τον σκοπό, αναπτύχθηκε μια στοχευμένη ποσοτική μέθοδος για τον προσδιορισμό 15 ενώσεων ενώ ακόμα πραγματοποιήθηκε ύποπτη σάρωση για 60 ενώσεις οι οποίες προσδιορίστηκαν ημιποσοτικά.

Όλα τα αντιδραστήρια και τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική πορεία ήταν υψηλής καθαρότητας (>95%). Μεθανόλη (LC-MS) και υδροξείδιο του νατρίου (>99%) αγοράστηκαν από τη Merck (Darmstadt, Germany). Οξικό αμμώνιο ($\geq 99.0\%$) για HPLC και μυρμηκικό οξύ (LC-MS Ultra) αγοράστηκαν από τη Fluka (Buchs, Switzerland). Ισοπροπανόλη αγοράστηκε από τη Fisher Scientific (Geel, Belgium). Ακόμη, απεσταγμένο νερό παρέχόταν από συσκευή καθαρισμού Milli-Q (Millipore Direct-Q UV, Bedford, MA, USA). Τα πρότυπα που αγοράστηκαν ήταν: συριγγικό οξύ 95% από Extrasynthèse (Genay, France), γαλλικό οξύ 98%, φερουλικό οξύ 98%, επικατεχίνη 97%, π-κουμαρικό 98%, ομοβανιλικό οξύ 97%, κερκετίνη 98%, ελαιοευρωπαϊνή 98%, πινορεξινόλη 95% και συρινγγαλδεΐδη 98% από Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), υδροξυτυροσώλη 98% και λουτεολίνη 98% από Santa Cruz Biotechnologies, καφεϊκό οξύ 99%, βανιλίνη 99%, αιθυλο-βανιλίνη 98%, απιγενίνη 97% και τυροσώλη 98% από Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Για τον προσδιορισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, εξανοϊκό οξύ 99.5%, οκτανοϊκό 99.5%, δωδεκανοϊκό 99.5%, μυριστικό 99.5%, πενταδεκανοϊκό 99.5%, παλμιτικό 99%, παλμιτολεϊκό 98.5%, επταδεκανοϊκό 98%,

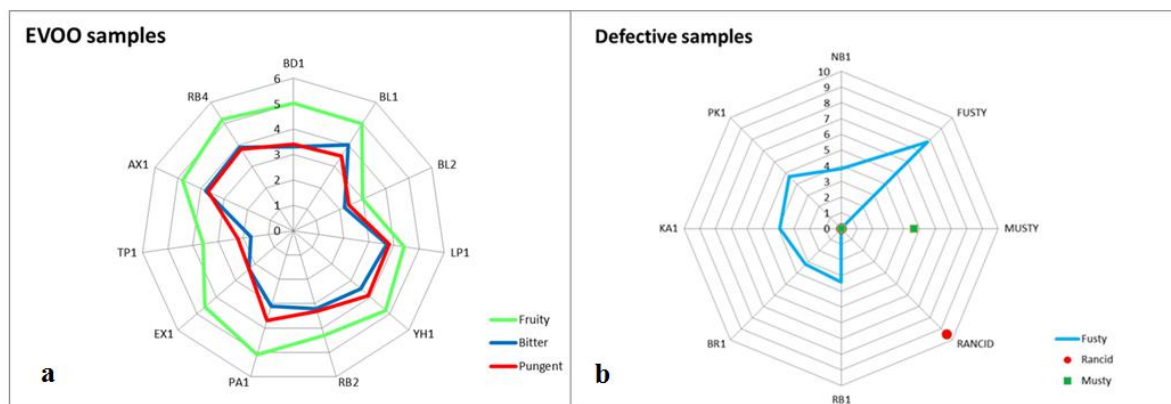
επταδεκενοϊκό 99%, στεατικό 98.5%, ελαϊκό οξύ 99%, α-λινολενικό 99%, α-λινολεϊκό 99%, αραχιδονικό 99%, cis-εικοσενοϊκό οξύ 99%, heneicosanoic 99%, docosanoic 99%, tricosanoic 99%, και λιγνοκερικό οξύ 99% αγοράστηκαν από Sigma-Aldrich. Τα πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ενώσεων (1000 mg l^{-1}) διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη και αποθηκεύθηκαν στους -20°C σε σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια.

Για τη συγκεκριμένη μελέτη, το ΕΑΧ προμηθεύτηκε 3 τυποποιημένα ελαττωματικά δείγματα ελαιολάδου με γνωστή βαθμολογία (ατροχάδο, κρασώδες και μούχλα) από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOC) και 16 παρθένα ελαιόλαδα των ποικιλιών Κολοβή και Αδραμυτιανή, τόσο μονοποικιλιακών όσο και μιγμάτων μαζί με την οργανοληπτική αξιολόγηση του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ στη Λέσβο. Αυτά τα δείγματα παρήχθησαν από ελιές κατά την ελαιοκομική περίοδο 2014-2015 και καλλιεργήθηκαν σε διάφορες περιοχές της Λέσβου. Για την παροχή της οργανοληπτικής αξιολόγησης, τα ελαιόλαδα υποβλήθηκαν σε κατάλληλο πάνελ βάσει του κανονισμού αριθ. 1348/2013 της ΕΕ (**Official Journal of the European Union, L338, 2013, pp.34-67**) και των οδηγιών του Διεθνούς Συμβουλίου Ελαιολάδου (**International Olive Oil Council, Sensory analysis of olive oil standard guide for the selection, training and monitoring of skilled virgin olive oil tasters. 2013, pp. 1-14.**). Τα αποτελέσματα εκφράζονταν ως η μέση τιμή των βαθμολογιών που καταγράφηκαν από οκτώ δοκιμαστές. Το **Σχήμα 1.1** περιγράφει με μορφή αραχνοδιαγράμματος το οργανοληπτικό προφίλ των εξαιρετικά παρθένων και ελαττωματικών ελαιολάδων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη εργασία. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα και τη βαθμολογία του οργανοληπτικού προφίλ, τη γεωγραφική προέλευση, την ποικιλία και τον τύπο παραγωγής, καθώς και με την εποχή συγκομιδής, συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.1**.

Πίνακας 1.1: Πληροφορίες δειγμάτων για τη μελέτη του οργανοληπτικού προφίλ

Δείγμα	Γεύση	Περιοχή	Ποικιλία	Τύπος καλλιέργειας	Συγκομιδή	Φρουτώδες	Πικρό	Πικάντικο	Μούχλα	Κρασώδες	Ατρόχαδο
AX1	EVOO	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ	4.8	3.8	3.7			
BD1	EVOO	ΑΓΙΑΣΟΣ	70% ΚΟΛΟΒΗ, 30% ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	5.0	3.3	3.4			
BL1	EVOO	ΑΚΡΑΣΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	5.0	4.0	3.5			
BL2	EVOO	ΑΚΡΑΣΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	3.0	2.2	2.4			
BR1	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ	ΑΓ. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ	20%ΚΟΛΟΒΗ, 80% ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ				3.2		
EX1	EVOO	ΓΕΡΑ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ - ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ	4.6	2.3	2.3			
Fusty	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ								7.8		
KAI	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ	ΓΕΡΑ	70%ΚΟΛΟΒΗ, 30% ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ-ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ				3.9		
LP1	EVOO	ΜΟΡΙΑ	70%ΚΟΛΟΒΗ, 30% ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ	4.4	3.7	3.8			
Musty	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ									4.65	
NB1	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ	ΜΑΝΤΑΜΑΔΟΣ	20%ΚΟΛΟΒΗ, 80% ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ-ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ				3.8		
PA1	EVOO	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ-ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ	5.1	3.1	3.7			

PK1	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ				4.7		
Rancid	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ										9.5
RB1	ΜΕΙΟΝΕΚΤΙΚΟ	ΠΑΡΑΚΟΙΛΑ	ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ				3.4		
RB2	ΕΥΟΟ	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ-ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ	4.3	3.2	3.3			
RB4	ΕΥΟΟ	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ - ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ	5.2	3.9	3.8			
TP1	ΕΥΟΟ	ΓΕΡΑ	70%ΚΟΛΟΒΗ, 30%ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ - ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ	3.6	1.7	2.2			
ΥΗ1	ΕΥΟΟ	ΚΩΜΗ	70%ΚΟΛΟΒΗ 30%ΑΔΡΑΜΥΤΙΑΝΗ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ	ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ	4.8	3.5	3.9			



Σχήμα 1.1: Αραχνοδιαγράμματα του οργανοληπτικού προφίλ δειγμάτων ελαιολάδου με αισθητηριακά χαρακτηριστικά για (α) δείγματα EVOO (φρουτώδες, πικρό, πικάντικο). β) μειονεκτικά ελαιόλαδα (κρασώδες, ατρόχαδο, μούχλα).

Όλα τα δείγματα προστατεύθηκαν από το φως και την υγρασία και αποθηκεύτηκαν σε σκούρα γυάλινα φιαλίδια σε ιδανική θερμοκρασία 14-15 °C (Piscopo et al. 2012). Επιπλέον, για να διατηρηθεί καλύτερα η ποιότητα των ελαιολάδων και να αυξηθεί η αντίσταση κατά της αυτοξείδωσης, προστέθηκε στις φιάλες άζωτο (Stefanoudaki et al. 2010) ως αδρανές αέριο.

Για την απομόνωση των φαινολικών ενώσεων από τα δείγματα ελαιολάδου χρησιμοποιήθηκε μέθοδος μικροεκχύλισης υγρού-υγρού (LLME), όπως αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε από τους Becerra-Herrera et al. (Becerra-Herrera et al. 2014). Ζυγίσθηκαν 0,5 g εκάστου δείγματος και προστέθηκαν 0,5 mL μεθανόλη:νερό (80:20, v/v) σε σωλήνες Eppendorf των 2 mL. Στη συνέχεια, το μίγμα αναμίχθηκε για 2 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 13.400 rpm. Η άνω, μεθανολική στιβάδα συλλέχθηκε και διηθήθηκε μέσω φίλτρων σύριγγας μεμβράνης αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL® RC) (διάμετρος 15 mm, μέγεθος πόρου 0,22 μm, Macherey-Nagel (Düren, Germany)). Η μεθανολική φάση αραιώθηκε με υπερκάθαρο νερό μέχρι τα 0,5 mL. Τέλος, 5 μl αυτού του διαλύματος εγχύθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα.

Για τον εσωτερικό έλεγχο ποιότητας, παρασκευάστηκαν λευκά δείγματα (blanks) και εγχύθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα για την ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης. Επίσης, παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC). Παρασκευάστηκε αρχικά ένα σύνθετο δείγμα (pool sample) που περιλάμβανε ίσες ποσότητες από όλα τα εκχυλίσματα των επι μέρους δειγμάτων και το δείγμα αυτό εμβολιάστηκε με τους υπό εξέταση αναλύτες, σε τελική συγκέντρωση 1 mg L⁻¹. Η ανάλυση του δείγματος QC πραγματοποιείται περιοδικά (κάθε 10 δείγματα) ώστε να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μέσω

της παρακολούθησης του εμβαδού κορυφής συγκεκριμένων ενώσεων (π.χ. ελαιοευρωπεΐνη, υδροξυτυροσόλη) στα δείγματα QC.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC). Η χρωματογραφική ανάλυση αντίστροφης φάσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σύστημα UHPLC με αντλία HPG-3400 (Dionex UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific, Germany) και το σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ένα φασματομέτρο μάζας Q-TOF (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) σε αρνητικό ιοντισμό. Ο διαχωρισμός διεξήχθη χρησιμοποιώντας στήλη Acclaim RSLC C18 (2.1 x 100 mm, 2.2 μm) από την Thermo Fisher Scientific (Driesch, Germany) με προ-στήλη ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm , VanGuard Pre-Column, Waters Ιρλανδία). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία στήλης 30 °C. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από: (A) 90% H₂O, 10% MeOH και 5 mM CH₃COONH₄, (B) 100% MeOH και 5 mM CH₃COONH₄. Η βαθμίδα έκλουσης ξεκίνησε με 1% οργανική φάση B (ρυθμός ροής 0.2 ml min⁻¹) κατά τη διάρκεια ενός λεπτού, σταδιακά αυξανόμενη στο 39% για τα επόμενα 2 λεπτά και στη συνέχεια αυξήθηκε 99.9% (ρυθμός ροής 0,4 ml min⁻¹) στα επόμενα 11 λεπτά. Αυτές οι συνθήκες διατηρήθηκαν σταθερές για 2 λεπτά (ρυθμός ροής 0,48 ml min⁻¹) και στη συνέχεια οι αρχικές συνθήκες (1%B - 99%A) αποκαταστάθηκαν εντός 0,1 λεπτού (ο ρυθμός ροής μειώθηκε στα 0,2 ml min⁻¹) για να επανεξισορροπηθεί η στήλη για την επόμενη ένεση.

Το σύστημα Q-TOF MS είναι εξοπλισμένο με ηλεκτροψεκασμό (ESI), που λειτουργεί σε αρνητικό ιονισμό με τις ακόλουθες ρυθμίσεις: τριχοειδής τάση 3500 V, απόκλιση τελικής πλάκας 500 V, πίεση νεφοποιητή 2 bar (N₂), αέριο ξήρανσης 8 l min⁻¹ (N₂) και θερμοκρασία ξήρανσης 200 °C. Το QTOF ήταν ρυθμισμένο σε λειτουργία AutoMS με την οποία γίνεται καταγραφή φάσματος με εύρος μαζών 50-1000 m/z και ρυθμό σάρωσης 2,00 Hz. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία AutoMS 5 precursor η οποία βασίζεται στη θραυσματοποίηση των πέντε μεγαλύτερων σε αφθονία ιόντων. Σε δεύτερη φάση, στις περιπτώσεις που χρειάστηκαν πληροφορίες για συγκεκριμένες μάζες για τις οποίες οι εντάσεις των σημάτων ήταν χαμηλές, πραγματοποιήθηκε και δεύτερη ανάλυση, χρησιμοποιώντας τη λίστα των επιθυμητών μαζών με AutoMS. Εξωτερική βαθμονόμηση του Q-TOF διεξαγόταν καθημερινά και σε κάθε ανάλυση πραγματοποιούνταν και εσωτερική βαθμονόμηση. Η βαθμονόμηση του φασματομέτρου μαζών QTOF έγινε με διάλυμα βαθμονόμησης (calibrant) μυρμηκικού νατρίου,

το οποίο αποτελείται από συμπλέγματα φορμικού νατρίου συγκέντρωσης 10mM σε μίγμα νερού:ισοπροπανόλης (1:1). Το όργανο παρείχε μια τυπική ισχύ διαχωρισμού (FWHM) μεταξύ 36.000-40.000 σε m/z: 226.1593, 430.9137 και 702.8636.

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων που περιέχονται στο ελαιόλαδο ακολουθήθηκαν δύο τεχνικές σάρωσης:

- **Σάρωση στοχευμένων ενώσεων (Target screening)**

Δημιουργήθηκε μια λίστα στοχευμένων ενώσεων (target list) η οποία αποτελείται από 14 φαινολικές ενώσεις που έχουν εντοπιστεί στο ελαιόλαδο ή/και σε άλλα τμήματα του δέντρου αλλά συγκεντρώνουν πιθανότητες να βρίσκονται και στο ελαιόλαδο.

Η λίστα (**Πίνακας 1.2**) περιλάμβανε φαινολικές ενώσεις και από τις πέντε βασικές κατηγορίες για τις οποίες υπήρχαν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα. Αρχικά, για την εύρεση του θεωρητικού m/z της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Isotope Pattern. Έπειτα, αφού έγινε ανάλυση των δειγμάτων με τη λειτουργία AutoMS, βρέθηκε ο χρόνος ανάσχεσης της κάθε ένωσης με τη βοήθεια των λογισμικών Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonik GmbH) και Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH) και συγκρίθηκε με εκείνο των αντίστοιχων προτύπων. Κατόπιν, υπολογίστηκε το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχεί σε κάθε ένωση. Τέλος, τα φάσματα MS/MS των δειγμάτων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα MS/MS φάσματα των πρότυπων ουσιών (**Πίνακας 1.2**) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των MS/MS θραυσμάτων που βρέθηκαν με θραύσματα που αναφέρονται σε προηγούμενες εργασίες.

Πίνακας 1.2 : Λίστα στοχευμένων ενώσεων

Ενώσεις	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻	t _R (min)
Αιθυλο-Βανιλίνη	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0557	5.45
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	8.24
Βανιλίνη	C ₈ H ₈ O ₃	152.0473	4.71
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169.0142	1.24
Ελαιοευρωπαΐνη	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1722	5.96
Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0716	4.35
Καφεϊκό οξύ	C ₉ H ₈ O ₄	179.0349	1.53
Ομοβανιλλικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0491	1.48
Πινореζινόλη	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	357.1334	6.48

π-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0403	1.34
Συριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0417	1.43
Τυροσόλη	C ₈ H ₁₀ O ₂	137.0610	4.08
Υδροξυτυροσόλη	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.0551	3.52
Φερουλικό οξύ	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506	1.39

t_R: χρόνος ανάσχεσης

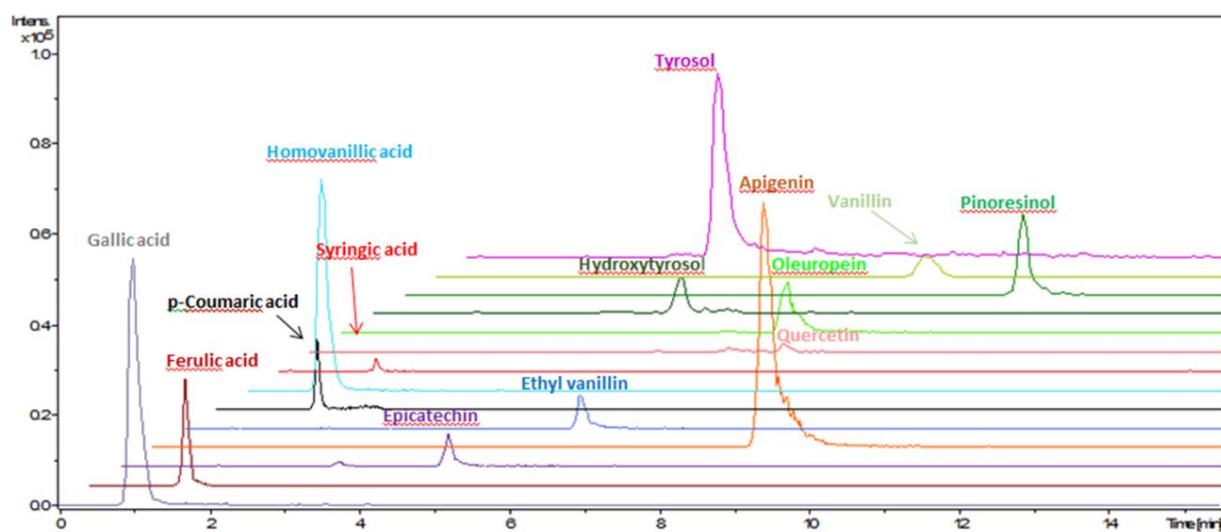
Τα αποτελέσματα της στοχευμένης σάρωσης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 1.3** και τα χρωματογραφήματα που αντιστοιχούν στις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1.2**.

Πίνακας 1.3: Αποτελέσματα στοχευμένης σάρωσης

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	Δt _R (min)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος
Βανιλίνη	C ₈ H ₈ O ₃	151.0400	151.0400	4.73	+0.02	71.0140 95.0140 108.0217 136.0162	C ₃ H ₃ O ₂ C ₅ H ₃ O ₂ C ₆ H ₄ O ₂ C ₇ H ₄ O ₃
Απιγενίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	269.0453	8.24	-	149.0248 151.0037	C ₈ H ₅ O ₃ C ₇ H ₃ O ₄
Επικατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.0716	289.0716	4.37	+0.02	137.0248 151.0416	C ₇ H ₅ O ₃ C ₈ H ₇ O ₃
Αίθυλο-βανιλίνη	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.0557	165.0558	5.44	-0.01	67.0190 92.0266 108.0215 137.0245	C ₄ H ₃ O C ₆ H ₄ O C ₆ H ₄ O ₂ C ₇ H ₅ O ₃
Φερουλικό οξύ	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506	193.0506	1.40	+0.01	134.0370 178.0271	C ₈ H ₆ O ₂ C ₉ H ₆ O ₄
Γαλλικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₅	169.0142	169.0140	1.25	+0.01	125.0246	C ₆ H ₅ O ₃
Ομοβανιλλικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0506	181.0506	1.50	+0.02	59.0134 122.0369 137.0610 154.0266	C ₂ H ₃ O ₂ C ₇ H ₆ O ₂ C ₈ H ₉ O ₂ C ₇ H ₆ O ₄
Υδροξυτυροσόλη	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.0557	153.0557	3.53	+0.01	123.0446	C ₇ H ₇ O ₂
Ελαιοευρωπαϊνή	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	539.1770	539.1770	5.96	-	59.0138 89.0244 101.0242 111.0083 121.0295 307.0823 377.1242	C ₂ H ₃ O ₂ C ₃ H ₅ O ₃ C ₄ H ₅ O ₃ C ₅ H ₃ O ₃ C ₇ H ₅ O ₂ C ₁₅ H ₁₅ O ₇ C ₁₉ H ₂₁ O ₈
p-Κουμαρικό οξύ	C ₉ H ₈ O ₃	163.0400	163.0402	1.34	-	119.0506 93.0349	C ₈ H ₇ O C ₆ H ₅ O

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	Δt _R (min)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος
Πινορεξινόλη	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	357.1343	357.1340	6.49	+0.01	151.0399	C ₈ H ₇ O ₃
Κερκετίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0353	301.0350	7.42	-0.04	121.0294 151.0024	C ₇ H ₅ O ₂ C ₇ H ₃ O ₄
Συριγγικό οξύ	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0455	197.0454	1.44	+0.01	182.0218	C ₈ H ₆ O ₅
Τυροσόλη	C ₈ H ₁₀ O ₂	137.0608	137.0610	4.07	-0.01	81.0262 93.0345 112.0530	C ₅ H ₅ O C ₆ H ₅ O C ₆ H ₈ O ₂

Πειρ: πειραματικό, θεωρ: θεωρητικό



Σχήμα 1.2: Χρωματογραφήματα των στοχευμένων ενώσεων σε δείγματα EVOO

Στο επόμενο βήμα, οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν ποσοτικοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα λαμβάνοντας υπόψη ότι η ποσοτική ανάλυση είναι ζωτικής σημασίας για την παροχή μιας περιεκτικής επισκόπησης της φαινολικής σύνθεσης των EVOO. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς χρησιμοποιώντας καφεϊκό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο (IS).

Πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου για όλους τους παραπάνω υπό εξέταση αναλύτες. Εξετάστηκαν τα παρακάτω κριτήρια επίδοσης της μεθόδου: πιστότητα (RSD%), όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), γραμμικότητα (καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστές παλινδρόμησης (r^2)), καθώς και οι ανακτήσεις (RE%) όπως και η επίδραση μήτρας (ME%). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.4**.

Πίνακας 1.4: Αποτελέσματα επικύρωσης μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών ενώσεων σε ελαιόλαδο.

Ένωση	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Επαναληψι- μότητα RSD _r % (n=10)	Αναπαραγω- γιμότητα RSD _R % (n=6)	Γραμμικότητα y= (a±Sa)+(b±Sb)x γραμμική περιοχή: 0.05-5 mg kg ⁻¹	r ²	%RE	ME %
Γαλλικό οξύ	0.029	0.091	4.5	5.2	y = (0.02±0.01)+(0.11±0.02)x	0.995	104	-6.23
p-κουμαρικό οξύ	0.030	0.092	1.2	4.1	y = (0.01±0.02)+(0.03±0.01)x	0.993	97	-6.39
Φερουλικό οξύ	0.034	0.086	2.2	2.7	y = (0.03±0.02)+(0.032±0.005)x	0.995	101	-4.89
Συριγγικό οξύ	0.029	0.090	2.1	2.4	y = (0.006±0.002)+(0.07±0.01)x	0.992	101	-6.28
Ομοβανιλλικό οξύ	0.027	0.089	2.4	6.3	y = (0.001±0.002)+(0.02±0.01)x	0.995	100	-6.41
Τυροσόλη	0.030	0.091	4.1	3.2	y = (-0.006±0.003)+(0.041±0.004)x	0.997	97	-4.11
Υδροξυτυροσόλη	0.034	0.077	2.9	4.3	y = (-0.022±0.004)+(0.09±0.06)x	0.997	105	-4.92
Πινορεξινόλη	0.023	0.075	2.1	2.7	y = (-0.005±0.004)+(0.03±0.01)x	0.997	107	-8.09
Απιγενίνη	0.015	0.046	3.5	4.1	y = (0.10±0.07)+(0.52±0.37)x	0.996	102	-4.41
Ελαιοευρωπαϊνή	0.022	0.068	4.9	2.9	y = (-0.019±0.002)+(0.13±0.02)x	0.998	98	-6.44
Βανιλίνη	0.039	0.078	1.1	4.9	y = (-0.02±0.01)+(0.11±0.07)x	0.996	96	-7.47
Αιθυλο-βανιλίνη	0.028	0.084	3.7	6.3	y = (-0.027±0.001)+(0.161±0.004)x	0.996	100	-4.20
Επικατεχίνη	0.029	0.088	4.8	5.5	y = (-0.02±0.01)+(0.096±0.003)x	0.993	96	-6.57
Κερκετίνη	0.023	0.069	2.9	4.3	y = (-0.005±0.001)x+(0.03±0.02)x	0.995	98	-9.41

- **Σάρωση «ύποπτων» ενώσεων (Suspect Screening)**

Η λίστα με τις «ύποπτες» ενώσεις (suspect list) περιελάμβανε φαινολικές ενώσεις οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε φύλλα και καρπούς αλλά και στο ελαιόλαδο ή σε άλλα όργανα του δένδρου της ελιάς και έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία (**Πίνακας 1.3**). Συγκεκριμένα, για την εύρεση του θεωρητικού m/z της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Isotope Pattern. Έπειτα, αφού έγινε ανάλυση των δειγμάτων, βρέθηκε ο χρόνος ανάσχεσης της κάθε ένωσης μέσω των λογισμικών Target Analysis 1.3 (Bruker Daltonik GmbH) και Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonik GmbH) και συγκρίθηκε με εκείνο του μοντέλου πρόβλεψης χρόνου ανάσχεσης QSRR (**Aalizadeh et al. 2016**). Κατόπιν, υπολογίστηκε το εμβαδόν των κορυφών που αντιστοιχεί σε κάθε ένωση, καθώς επίσης και ο λόγος εμβαδόν προς ένταση κορυφής (peak score) που βρέθηκε μεγαλύτερος του 4 (ιδανικά πρέπει να είναι 4-38). Για την αξιολόγηση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν online εργαλεία θραυσματοποίησης (MetFrag) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων με online βιβλιοθήκες (MassBank) και τη βιβλιογραφία, διασταυρώνοντας τα αποτελέσματα με προηγούμενες εργασίες.

Πίνακας 1.5: Λίστα ενώσεων για «ύποπτη» σάρωση

Ενώσεις	Μοριακός Τύπος
Αζελαϊκό οξύ	C ₉ H ₁₆ O ₄
Aesculin	C ₁₅ H ₁₅ O ₉
Αμπισισικό οξύ	C ₁₅ H ₂₀ O ₄
7-Γλυκοζίτης της Απιγενίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
Βανιλλικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₄
Βενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₂
2,5-διυδροξυ-Βενζοϊκό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄
Verbascoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
Verucosin	C ₂₀ H ₂₄ O ₅
Βερχεμόλη	C ₂₀ H ₂₄ O ₇
2-Vicenin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
Γαλλοκατεχίνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
Γεντισικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄
Διοσμετίνη	C ₁₆ H ₁₂ O ₆

Διοσμίνη	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅
Ελαιασίνη	C ₁₇ H ₂₀ O ₆
Άγλυκο της Ελαιοευρωπεΐνης	C ₁₉ H ₂₂ O ₈
Άγλυκο της μεθυλο-ελαιοευρωπεΐνης	C ₂₀ H ₂₄ O ₈
Διμεθυλοελαιοευρωπεΐνη	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃
2-Μεθοξυ ελαιοευρωπεΐνη	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₄
10-Υδροξυ άγλυκο της Ελαιοευρωπεΐνη	C ₁₉ H ₂₂ O ₉
10-Υδροξυ-10-άγλυκο μεθυλο-Ελαιοευρωπεΐνη	C ₂₀ H ₂₄ O ₉
10-Υδροξυ δεκαρβοξυμέθυλο άγλυκο Ελαιοευρωπεΐνη	C ₁₇ H ₂₀ O ₇
Ελαιοκανθάλη	C ₁₇ H ₂₀ O ₅
Ελενολικό οξύ	C ₁₁ H ₁₄ O ₆
2-ο-Γλυκοζίτης του ελενολικού οξέος	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁
Μεθυλεστέρας του ελενολικού οξέος	C ₁₂ H ₁₆ O ₆
Υδροξυλιωμένο ελενολικό οξύ	C ₁₁ H ₁₄ O ₇
Hellicoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₇
Esculetin	C ₉ H ₆ O ₄
Iso-Acteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅
1-(3'-μεθοξυ-4'-υδροξυ)-φαινυλ-6,7- διυδροξυ-ισοχρωμάνη	C ₁₆ H ₁₆ O ₅
1-φαινυλ-6,7-διυδροξυ-ισοχρωμάνη	C ₁₅ H ₁₄ O ₃
Calceolarioside	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁
3-ο-γλυκοζίτης της Κερκετίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Cichoriin	C ₁₅ H ₁₆ O ₉
π-μεθοξυ-Βενζοκινόνη	C ₇ H ₆ O ₃
Λικοδιόνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅
Λινγκστροσίδη	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂
Άγλυκο Λινγκστροσίδης	C ₁₉ H ₂₂ O ₇
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
7-ο-Γλυκοζίτης της Λουτεολίνης	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
3,7-ο-Διγλυκοζίτης της Λουτεολίνης	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Chrysoeriol (3-Μεθυλο-ο-Λουτεολίνη)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
Μασλινικό οξύ	C ₃₀ H ₄₈ O ₄
Ναρινγενίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₅

Nuzhenide	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇
Ολεανολικό οξύ	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
Oleoside	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁
Olivil	C ₂₀ H ₂₄ O ₇
Ομοβανιλλική αλκοόλη	C ₉ H ₁₂ O ₃
1-Ακετοξυπινορεζινόλη	C ₂₂ H ₂₄ O ₈
1-Υδροξυπινορεζινόλη	C ₂₀ H ₂₂ O ₇
Πρωτοκατεχικό οξύ	C ₇ H ₆ O ₄
Ροσμαρινικό οξύ	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Ρουτίνη	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Γλυκοζίτης της Τυροσόλης (Salidroside)	C ₁₄ H ₂₀ O ₇
Secologanoside	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁
Σκοπολετίνη	C ₁₀ H ₈ O ₄
Suspensaside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆
Συρινγγαλδεϋδη	C ₉ H ₁₀ O ₄
Συρινγγαρεσινόλη	C ₂₂ H ₂₆ O ₈
Ταξιφολίνη	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
Γλυκοζίτης Υδροξυτυροσόλης	C ₁₄ H ₂₀ O ₈
Όξυ Υδροξυτυροσόλη	C ₁₀ H ₁₂ O ₄
π-υδροξυ-Φαινυλοξικό οξύ	C ₈ H ₈ O ₃
Fustin	C ₁₅ H ₁₂ O ₆
Fraxamoside	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃

Μετά την ύποπτη σάρωση, ακολούθησε μη στοχευμένη σάρωση. Η μη στοχευμένη σάρωση περιλαμβάνει την ανίχνευση κορυφών και την ταυτοποίηση των ενώσεων χωρίς να υπάρχουν εκ των προτέρων πληροφορίες για το ποιές είναι αυτές ή διαθέσιμα πρότυπα. Οι επιλεγμένες κορυφές ταυτοποιήθηκαν πειραματικά σύμφωνα με την ακρίβεια μάζας (< 5 ppm), το ισοτοπικό προφίλ του προδρόμου ιόντος (< 50 mSigma), τα MS/MS θραύσματά τους και τον χρόνο ανάσχεσης. Με τη βοήθεια του αλγορίθμου Smart Formula στο λογισμικό Data Analysis 4.1 προτάθηκαν μοριακοί τύποι για τις ενώσεις και τα θραύσματα. Τα φάσματα MS/MS εξετάστηκαν και ερμηνεύτηκαν όπως αναφέρθηκε στην ύποπτη σάρωση, έτσι ώστε να γίνει εφικτός ο προσδιορισμός των υποψήφιων ενώσεων. Το πρότυπο πρόβλεψης QSRR

χρησιμοποιήθηκε επίσης ως συμπληρωματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των μη στοχευόμενων ενώσεων στις περιπτώσεις που δεν υπήρχαν πρότυπα.

Το επίπεδο εμπιστοσύνης που επιτεύχθηκε στην ταυτοποίηση των ανιχνευόμενων ενώσεων αποδείχθηκε σύμφωνα με τους **Schymanski et al. 2014**. Το επίπεδο 1 αντιστοιχεί σε επιβεβαιωμένες δομές όπου υπάρχει πρότυπο αναφοράς, επίπεδο 2 σε πιθανές δομές (επίπεδο 2a: απόδειξη με αντιστοίχιση φάσματος από βιβλιογραφία ή βιβλιοθήκη και επίπεδο 2b: διαγνωστικά στοιχεία όπου καμία άλλη δομή δεν πληρεί τις πειραματικές πληροφορίες MS/MS) 3 για τις υποψήφιες ενώσεις, το επίπεδο 4 αντιστοιχεί σε αναμφισβήτητο μοριακό τύπο και το επίπεδο 5 για την ακριβή μάζα που ενδιαφέρει.

Κατά την ύποπτη σάρωση, ταυτοποιήθηκαν 26 βιοδραστικές ενώσεις από τις 60 της αρχικής λίστας. Τα αποτελέσματα της ύποπτης σάρωσης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 1.6**. Τα χρωματογραφήματα των ύποπτων ενώσεων που ανήκουν στην ομάδα των σεκοϊριδοειδών απεικονίζονται στο **Σχήμα 1.3**. Για τις ενώσεις αυτές, έγινε ημιποσοτική ανάλυση, χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς προτύπων με συγγενική δομή. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο κάθε δείγματος παρουσιάζεται σχηματικά στο **Σχήμα 1.4**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπάρχει μεγάλη ποσοτική διαφορά στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο ανάμεσα στα έξτρα παρθένα ελαιόλαδα και τα μειονεκτικά.

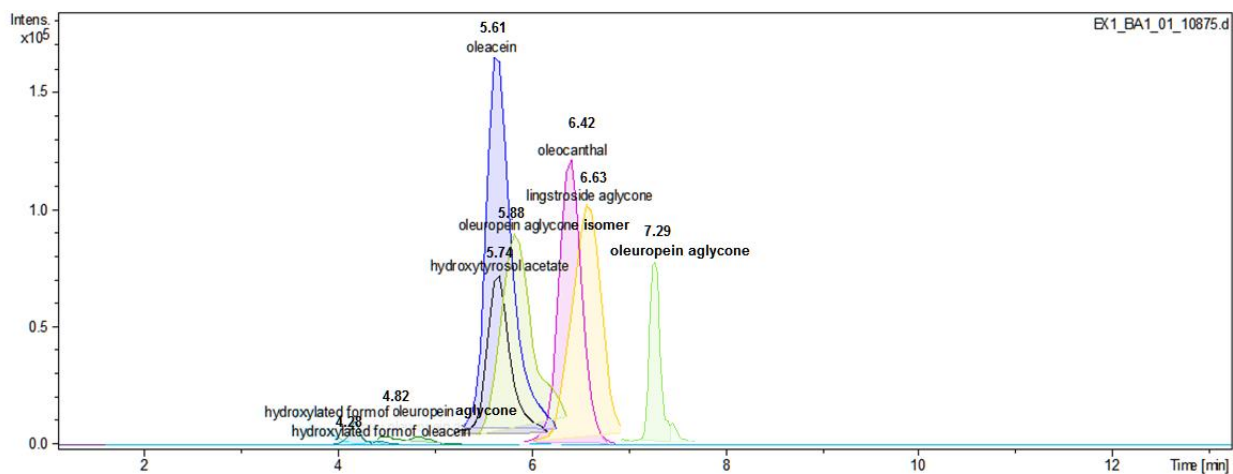
Πίνακας 1.6: Ενώσεις που προσδιορίστηκαν με ύποπτη σάρωση

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	t _R (min) (predicted)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος θραύσματος	Peak score A/I	Επίπεδο Ταυτοποίησης
Ελενολικό οξύ	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	241.0714	241.0714	4.51	4.26	59.0137 95.0496 127.0400 151.0402 171.0300	C ₂ H ₃ O ₂ C ₆ H ₇ O C ₆ H ₇ O ₃ C ₈ H ₇ O ₃ C ₇ H ₇ O ₅	10	2a
Ισομερές I Ελενολικού οξέος	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	241.0722	241.0714	3.92	*	95.0494	C ₆ H ₇ O	4	3
Ισομερές II Ελενολικού οξέος	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	241.0722	241.0714	1.31	*	95.0494	C ₆ H ₇ O	6	3
Μεθυλοεστέρρας του Ελενολικού οξέος	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	255.0874	255.0874	4.58	4.53	67.0189 69.0346 185.0455	C ₄ H ₃ O C ₄ H ₅ O C ₈ H ₉ O ₅	8	2a
Λουτεολίνη	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0404	285.0404	7.55	Επιβεβαιώ θηκε με πρότυπο	133.0295 151.0036	C ₈ H ₅ O ₂ C ₇ H ₃ O ₄	12	1
Υδροξυλιωμένη μορφή του Ελενολικού οξέος	C ₁₁ H ₁₄ O ₇	257.0667	257.0667	1.36	*	59.0104 137.0603 181.0535	C ₂ H ₃ O ₂ C ₈ H ₉ O ₂ C ₉ H ₉ O ₄	11	2a
Ισομερές της υδροξυλιωμένης μορφής του Ελενολικού οξέος	C ₁₁ H ₁₄ O ₇	257.0667	257.0665	1.41	*	-	-	8	3
Οξική υδροξυτυροσόλη	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195.0660	195.0662	6.71	6.48	134.0373 149.0608 161.0246	C ₈ H ₆ O ₂ C ₉ H ₉ O ₂ C ₉ H ₅ O ₃	15	2b
Ισομερές της οξικής υδροξυτυροσόλης	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195.0660	195.0662	5.74	6.48	59.0136 134.0373 161.0246	C ₂ H ₃ O ₂ C ₈ H ₆ O ₂ C ₉ H ₅ O ₃	12	3

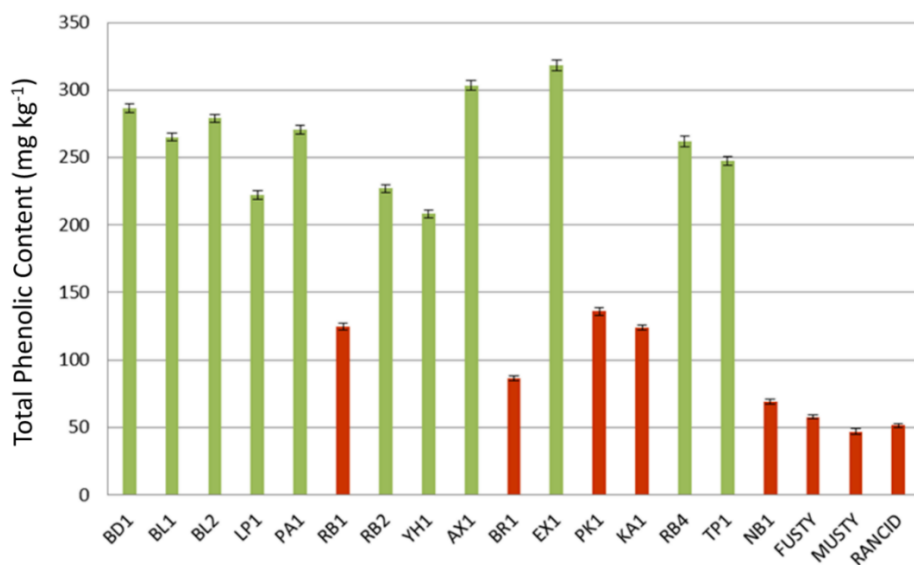
Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	t _R (min) (predicted)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος θραύσματος	Peak score A/I	Επίπεδο Ταυτοποίησης
Άγλυκη δεκαρβοξυμεθυλ- ελαιοευρωπαϊνή	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	319.1185	319.1185	5.61	6.14	69.0342 95.0502 123.0451 139.0608 165.0556 183.0660 195.0656	C ₄ H ₅ O C ₆ H ₇ O C ₇ H ₇ O ₂ C ₈ H ₁₁ O ₂ C ₉ H ₉ O ₃ C ₉ H ₁₁ O ₄ C ₁₀ H ₁₁ O ₄	16	2a
Άγλυκη δεκαρβοξυμεθυλ- λινγκστροσίδη	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	303.1237	303.1237	6.42	6.76	124.0531 137.0608 147.0453 165.0556 183.0662	C ₇ H ₈ O ₂ C ₈ H ₁₀ O ₂ C ₉ H ₇ O ₂ C ₉ H ₉ O ₃ C ₉ H ₁₁ O ₄	15	2a
10-υδροξύ ελαιοευρωπαϊνή άγλυκη	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	393.1193	393.1191	4.82	5.48	137.0244 181.0502	C ₇ H ₅ O ₃ C ₉ H ₉ O ₄	8	2b
Ισομερές άγλυκης ελαιοευρωπαϊνής	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	377.1241	377.1241	5.88	6.88	111.0087 149.0241 263.0926 275.0923	C ₅ H ₃ O ₃ C ₈ H ₅ O ₃ C ₁₄ H ₁₅ O ₅ C ₁₅ H ₁₅ O ₅	16	3
Άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή	C ₁₉ H ₂₂ O ₈	377.1241	377.1247	7.29	6.88	111.0088 149.0244 195.0644 275.0919 307.0823	C ₅ H ₃ O ₃ C ₈ H ₅ O ₃ C ₁₀ H ₁₁ O ₄ C ₁₅ H ₁₅ O ₅ C ₁₅ H ₁₅ O ₇	19	2a
Άγλυκη λινγκστροσίδη	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	361.1291	361.1293	6.63	6.83	259.0975 291.0875	C ₁₅ H ₁₅ O ₄ C ₁₅ H ₁₅ O ₆	19	2a
Συριγγαρεξινόλη	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	417.1554	417.1556	6.18	8.10	127.0408 181.0503	C ₆ H ₇ O ₃ C ₉ H ₉ O ₄	9	2b

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	t _R (min) (predicted)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος θραύσματος	Peak score A/I	Επίπεδο Ταυτοποίησης
Oleoside	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.1089	389.1087	7.91	*	113.0244 139.0032 149.0240 165.0552 183.0666	C ₅ H ₅ O ₃ C ₆ H ₃ O ₄ C ₈ H ₅ O ₃ C ₉ H ₉ O ₃ C ₉ H ₁₁ O ₄	12	2a
Oleoside Ισομερές	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.1089	389.1087	5.7	*	165.0552	C ₉ H ₉ O ₃	11	3
1-υδροξύπινορεζινόλη	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373.1292	373.1292	6.39	6.39	121.0294 151.0401 163.0402	C ₇ H ₅ O ₂ C ₈ H ₇ O ₃ C ₉ H ₇ O ₃	8	2b
1-υδροξύπινορεζινόλη ισομερές	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373.1292	373.1294	6.42	*	-	-	9	3
Ολεανολικό οξύ	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.3535	455.3540	13.94	12.69**	44.9980 120.0940 152.1202 407.3316	CHO ₂ C ₉ H ₁₂ C ₁₀ H ₁₆ O C ₂₉ H ₄₃ O	8	2a
Maslinic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.3484	471.3485	12.82	12.58	44.9982 405.3156 423.3423	CHO ₂ C ₂₉ H ₄₁ O C ₂₉ H ₄₃ O ₂	12	2a
1- ακετόξύπινορεζινόλη	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	415.1398	415.1399	6.42	7.20	151.0402 280.0951 343.1188	C ₈ H ₇ O ₃ C ₁₄ H ₁₆ O ₆ C ₁₉ H ₁₉ O ₆	10	2b
Άγλυκη μεθυλο- ελαιοευρωπαϊνή	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	391.1412	391.1418	7.51	7.37	59.0140 67.0192 99.0456 111.0087 137.0608 291.0875	C ₂ H ₃ O ₂ C ₄ H ₃ O C ₅ H ₇ O ₂ C ₅ H ₃ O ₃ C ₈ H ₉ O ₂ C ₁₆ H ₁₅ O ₆	6	2b

Ένωση	Μοριακός Τύπος	[M-H] ⁻ m/z θεωρ.	[M-H] ⁻ m/z πειρ.	t _R (min)	t _R (min) (predicted)	Θραύσματα m/z	Συντακτικός Τύπος θραύσματος	Peak score A/I	Επίπεδο Ταυτοποίησης
10-υδροξυ-10-μεθυλο ελαιευρωπαϊνή άγλυκη	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	407.1347	407.1347	6.71	6.75	99.0453 111.0087 121.0295 135.0453 137.0243 149.0245 163.0402 179.0351 195.0665 241.0871	C ₅ H ₇ O ₂ C ₅ H ₃ O ₃ C ₇ H ₅ O ₂ C ₈ H ₇ O ₂ C ₇ H ₅ O ₃ C ₈ H ₅ O ₃ C ₉ H ₇ O ₃ C ₉ H ₇ O ₄ C ₁₀ H ₁₁ O ₄ C ₁₅ H ₁₃ O ₃	19	2b
10-υδροξυ δεκαρβοξυμεθυλ- ελαιοευρωπαϊνή άγλυκη	C ₁₇ H ₂₀ O ₇	335.1150	335.1151	4.28	5.52	59.0139 85.0296 121.0292 151.0401 153.0557 155.0716 199.0613	C ₂ H ₃ O ₂ C ₄ H ₅ O ₂ C ₇ H ₅ O ₂ C ₈ H ₇ O ₃ C ₈ H ₉ O ₃ C ₈ H ₁₁ O ₃ C ₉ H ₁₁ O ₅	8	2a
Peak Score (A/I): λόγος εμβαδού κορυφής προς την ένταση Επίπεδο Ταυτοποίησης : Το επίπεδο 1 αντιστοιχεί σε επιβεβαιωμένες δομές όπου υπάρχει πρότυπο αναφοράς, επίπεδο 2 σε πιθανές δομές (επίπεδο 2a: απόδειξη με αντιστοίχιση φάσματος από βιβλιογραφία ή βιβλιοθήκη και επίπεδο 2b: διαγνωστικά στοιχεία όπου καμία άλλη δομή δεν πληροί τις πειραματικές πληροφορίες MS / MS) 3 για τις υποψήφιες ενώσεις, το επίπεδο 4 για τις μονοσήμαντες μοριακές μορφές και το επίπεδο 5 για την ακριβή μάζα που ενδιαφέρει. *t_R: Τα αποτελέσματα πρόβλεψης του χρόνου κατακράτησης δεν είναι αξιόπιστα και θα πρέπει να εφαρμόζονται και άλλες μέθοδοι επαλήθευσης, όπως το πρότυπο θραυσματοποίησης MS / MS. **t_R: Το αποτέλεσμα της πρόβλεψης του χρόνου κατακράτησης δεν είναι αξιόπιστο επειδή το ολεανολικό οξύ βρίσκεται έξω από το πεδίο εφαρμογής του μοντέλου.									



Σχήμα 1.3: Χρωματογράφημα σεκοϊριδοειδών

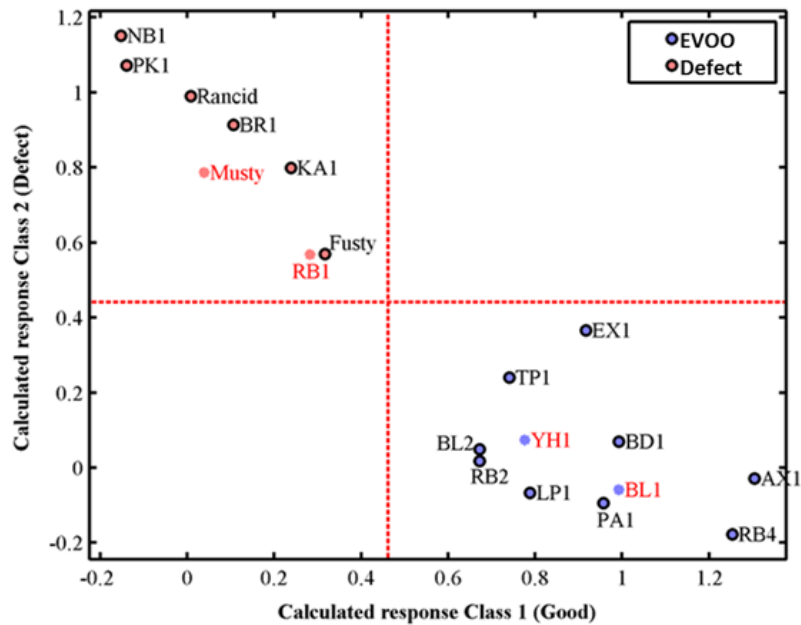


Σχήμα 1.4: Συνολικό φαινολικό περιεχόμενο (άθροισμα στοχευμένων και ύποπτων ενώσεων; έξτρα παρθένα ελαιόλαδα: πράσινο, μειονεκτικά: κόκκινο).

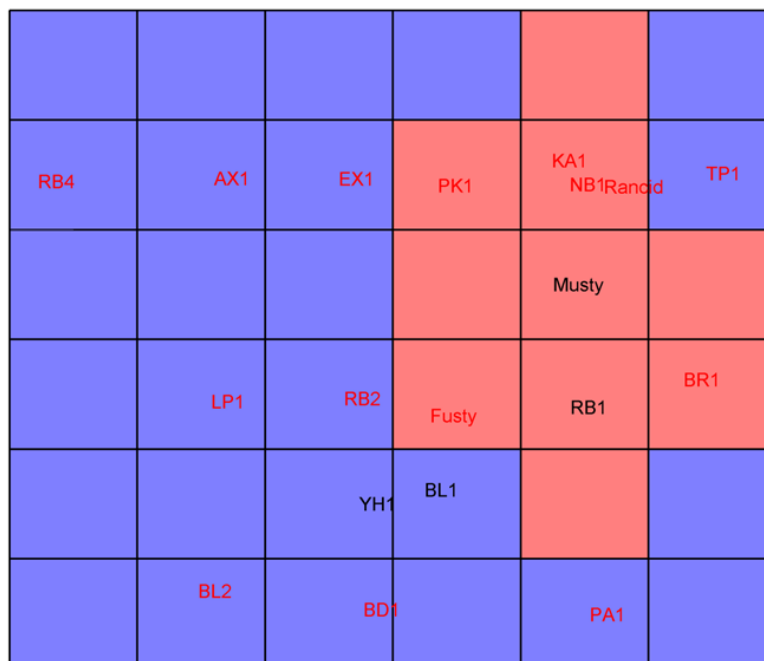
Για την επεξεργασία των δεδομένων της μη στοχευμένης σάρωσης, πρώτα απ' όλα, τα δυαδικά αρχεία όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν μετατράπηκαν σε αρχεία mzXML χρησιμοποιώντας το λογισμικό Proteowizard. Στη συνέχεια, αυτά τα αρχεία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία χρησιμοποιώντας τη γλώσσα R και το πακέτο XCMS για να εξαχθούν οι κορυφές που υπάρχουν στα δείγματα. Αυτή η διαδικασία περιελάμβανε τη συλλογή κορυφών με τον αλγόριθμο CentWave, την ομαδοποίηση κορυφών που παριστάνουν τον ίδιο αναλύτη σε όλα τα δείγματα και τη διόρθωση της χρωματογραφικής μετατόπισης του χρόνου ανάσχεσης. Το επόμενο βήμα ήταν να συγκεντρωθούν οι κορυφές των οποίων ο χρόνος ανάσχεσης μετακινήθηκε. Στο τελικό βήμα, εφαρμόστηκε ένα βήμα για την πλήρωση των ελλειπών κορυφών. Αυτό αντικαθιστά τις τιμές που λείπουν με μικρή τιμή έντασης. Το πακέτο CAMERA χρησιμοποιήθηκε επίσης για να αποσυστήσσει και να αφαιρέσει τις κορυφές του προϊόντος προσθήκης για να αποφευχθεί η συλληλότητα κατά τη διάρκεια της κατασκευής του μοντέλου. Οι εσωτερικές παράμετροι των αλγορίθμων που χρησιμοποιήθηκαν για την ευθυγράμμιση κορυφής κορυφής, ομαδοποίησης και χρόνου κατακράτησης βελτιστοποιήθηκαν με IPO.

Μέσω της μη στοχευμένης σάρωσης αποκτήθηκαν 304 m/z. Με την εφαρμογή χημειομετρίας, οι μάζες αυτές αξιολογήθηκαν ως προς τη σημαντικότητά τους και περιορίστηκαν στις 151. Από τις 151, οι 15 είχαν ήδη ταυτοποιηθεί με ύποπτη σάρωση. Πραγματοποιήθηκε προσπάθεια, λοιπόν, για την ταυτοποίηση των υπόλοιπων 136. Εφαρμόστηκαν χημειομετρικές τεχνικές, PLS-DA και CP-ANN και αναπτύχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης, τα οποία ταξινομούν με επιτυχία τα έξτρα παρθένα και τα μειονεκτικά ελαιόλαδα.

Το μοντέλο πρόβλεψης με PLS-DA παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.5**, ενώ το μοντέλο πρόβλεψης με CP-ANN παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.6**.

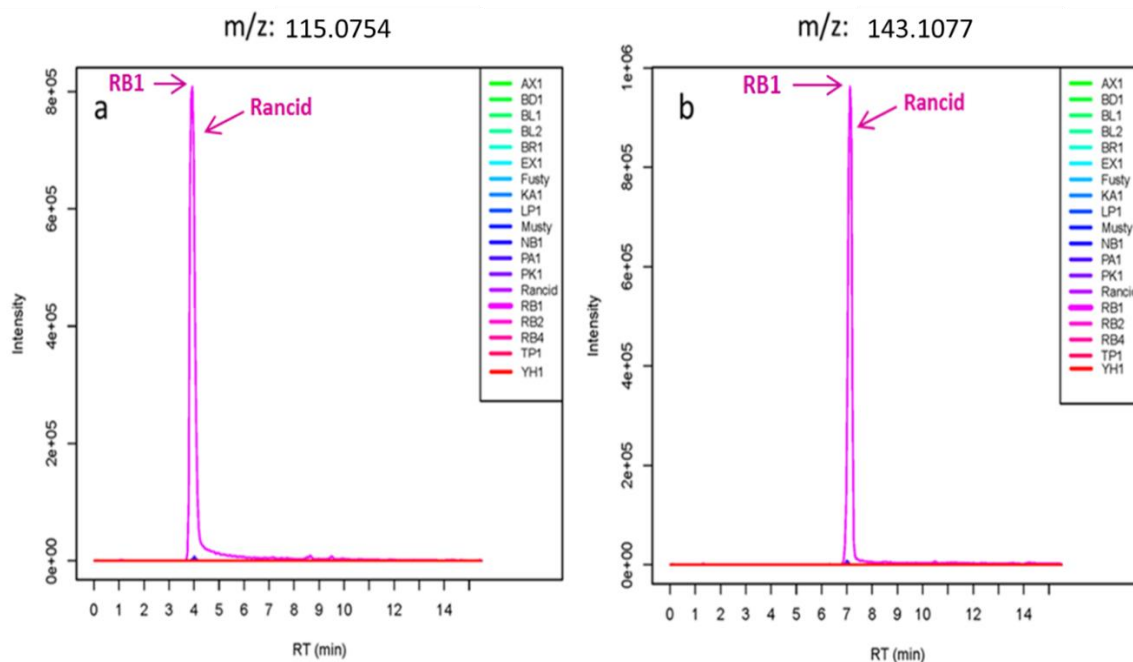


Σχήμα 1.5: Ταξινόμηση μεταξύ έξτρα παρθένων (μπλε δειγματα) και μειονεκτικών δειγμάτων (κόκκινα δείγματα) με PLS-DA



Σχήμα 1.6: Απεικόνιση των έξτρα παρθένων ελαιολάδων (μπλε νευρώνες) και των μειονεκτικών (κόκκινοι νευρώνες) με SOMs.

Επιπλέον, μέσω της μη στοχευμένης ανάλυσης, ταυτοποιήθηκαν 11 ενώσεις δείκτες ως υπεύθυνες για την ταξινόμηση μεταξύ έξτρα παρθένων και μειονεκτικών ελαιολάδων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις εξανϊκό και οκτανοϊκό οξύ που ταυτοποιήθηκαν σε μειονεκτικά ελαιόλαδα, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.7**.



Σχήμα 1.7: Χρωματογραφήματα εξανοϊκού και οκτανοϊκού οξέος σε μειονεκτικά δείγματα.

1.3.2 Ανάπτυξη μεθόδου LC-QTOF-MS για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών: Προκαταρκτική έρευνα διάκρισης βιολογικού – συμβατικού ελαιολάδου

Σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκαν 41 μονοποικιλιακά δείγματα Κολοβής τα οποία αποτελούνταν από 17 βιολογικά και 24 συμβατικής καλλιέργειας της ελαιοκομικής περιόδου 2015-2016. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν 11 έξτρα παρθένα μονοποικιλιακά ελαιόλαδα (2 βιολογικά και 9 συμβατικής καλλιέργειας) της ελαιοκομικής περιόδου 2014-2015. Η κατανομή των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν απεικονίζεται στο **Σχήμα 1.8**. Τα δείγματα με πλάγια γραμματοσειρά αντιστοιχούν στην ελαιοκομική περίοδο 2014-2015, τα δείγματα με έντονη

γραμματοσειρά αντιστοιχούν στην ελαιοκομική περίοδο 2015-2016. Τέλος, τα δείγματα βιολογικής καλλιέργειας έχουν επισημανθεί με «*».



Σχήμα 1.8: Γεωγραφική κατανομή των έξτρα παρθένων μονοποικιλιακών δειγμάτων Κολοβής των ελαιοκομικών περιόδων 2014-2015 και 2015-2016.

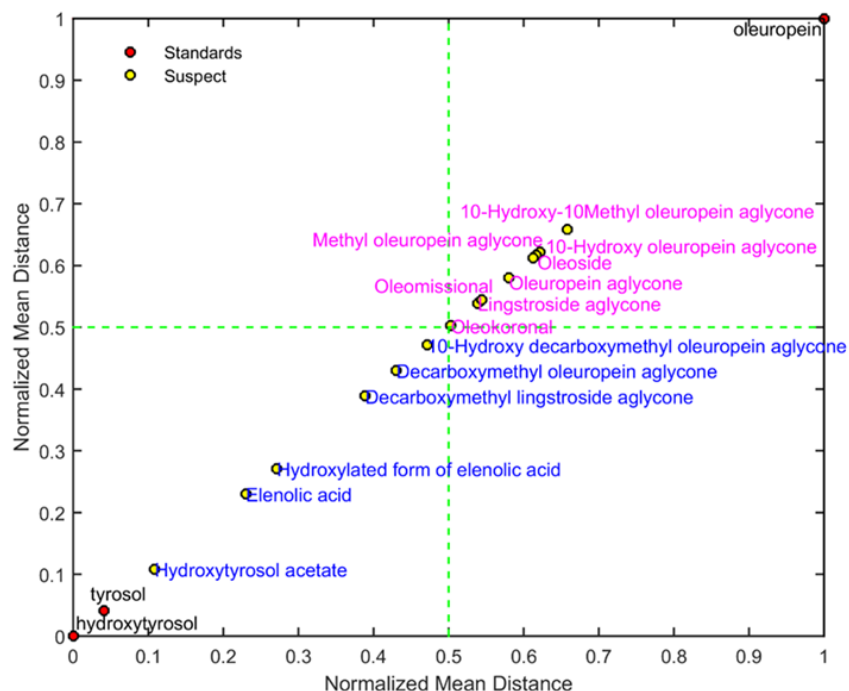
Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου UHPLC-QTOF-MS. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν οι παρακάτω: (1) ο διαλύτης εκχύλισης (MeOH, MeOH:H₂O 80:20 v/v, ACN), (2) το εσωτερικό πρότυπο (συρινγγαλδεΐδη ή καφεϊκό οξύ), (3) η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου (0,5-1,5 mg L⁻¹). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μίγμα MeOH:H₂O, 80:20 v/v επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο εκχυλιστικό μέσο. Επιπλέον, ως καταλληλότερο εσωτερικό πρότυπο επιλέχθηκε η συρινγγαλδεΐδη σε συγκέντρωση 1,30 mg L⁻¹.

Η βελτιστοποιημένη μέθοδος, στη συνέχεια, επικυρώθηκε και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.7**.

Πίνακας 1.7: Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου UHPLC-QTOF-MS

Ένωση	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Γραμμικότητα $y=(a\pm S_a) + (b\pm S_b)x$ (linear range: 0.02-10 mg kg ⁻¹ ; 0.02-100 mg kg ⁻¹)	r ²	Επαναληψι- μότητα RSD _r % (n=6)	Αναπαραγω- γιμότητα RSD _R , (%) (n×k=3×3)	%RE	%ME
Γαλλικό οξύ	0.005	0.014	$y=(0.79\pm0.68)+(7.73\pm0.16)x$	0.995	2.1	5.1	98.4	-5.89
Π-Κουμαρικό οξύ	0.024	0.073	$y=(0.06\pm0.05)+(0.51\pm0.01)x$	0.994	1.9	4.1	96.8	-6.13
Φερουλικό οξύ	0.011	0.032	$y=(0.017\pm0.008)+(0.687\pm0.004)x$	0.999	2.2	3.5	95.2	-4.31
Συριγγικό οξύ	0.003	0.008	$y=(0.06\pm0.04)+(0.48\pm0.01)x$	0.995	1.8	3.6	97.6	-4.90
Ομοβανιλλικό οξύ	0.017	0.051	$y=(0.02\pm0.09)+(1.49\pm0.02)x$	0.998	1.9	5.4	97.5	-7.27
Τυροσόλη	0.028	0.086	$y=(-4.34\pm2.83)+(4.99\pm0.08)x$	0.996	1.3	2.6	96.9	-7.78
Υδροξυτυροσόλη	0.010	0.031	$y=(-0.43\pm1.07)+(3.77\pm0.03)x$	0.999	1.8	2.8	96.8	-5.80
Πινореξινόλη	0.023	0.068	$y=(0.01\pm0.02)+(0.297\pm0.005)x$	0.996	1.5	2.9	98.9	-7.12
Απιγενίνη	0.024	0.074	$y=(0.08\pm1.28)+(12.81\pm0.31)x$	0.993	2.3	3.1	92.4	-7.60
Ελαιοευρωπείνη	0.003	0.008	$y=(0.91\pm1.84)+(4.58\pm0.05)x$	0.998	0.7	1.4	97.7	-4.16
Βανιλίνη	0.018	0.054	$y=(-0.46\pm0.36)+(4.09\pm0.09)x$	0.995	2.2	3.1	95.2	-7.59
Αίθυλο βανιλίνη	0.013	0.039	$y=(0.51\pm0.23)+(2.04\pm0.06)x$	0.991	1.6	2.8	95.3	-6.30
Επικατεχίνη	0.019	0.059	$y=(-0.18\pm0.21)+(3.67\pm0.05)x$	0.998	1.8	3.2	94.2	-4.47
Λουτεολίνη	0.002	0.007	$y=(0.53\pm0.40)+(3.64\pm0.10)x$	0.992	2.1	3.4	96.9	-6.34

Οι ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν με τη στοχευμένη σάρωση είναι: γαλλικό οξύ, π-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, συριγγικό οξύ, ομοβανιλλικό οξύ, τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, πινορεζινόλη, απιγενίνη, ελαιοευρωπεΐνη, βανιλίνη, αιθυλοβανιλίνη και επικατεχίνη. Στην ύποπτη σάρωση ταυτοποιήθηκαν 24 φαινολικές ενώσεις. Για εκείνες τις ενώσεις όπου δεν υπήρχαν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο πρόβλεψης χημικής ομοιότητας, ώστε να προβλεφθεί ποιό είναι το καταλληλότερο πρότυπο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να εξαχθούν ημιποσοτικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με το μοντέλο που αναπτύχθηκε και παρουσιάζεται στο **Σχήμα 1.9**, οι ενώσεις ελαιοκορωνάλη, άγλυκη λινγκστροσίδη, ελαιομισσιονάλη, άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, ολεασίδη, 10-υδροξύ άγλυκη ελεοευρωπαϊνή, μέθυλοάγλυκη ελαιοευρωπαϊνή και 10-υδροξύ-10-μέθυλο άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή θα ημιποσοτικοποιηθούν σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς του προτύπου της ελαιοευρωπαϊνής. Αντίστοιχα, οι ενώσεις 10-υδροξύδεκαρβοξυμέθυλο άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή, δεκαρβοξυμέθυλο άγλυκη ελαιοευρωπαϊνή (ελαιασίνη), δεκαρβοξυμέθυλο άγλυκη λινγκστροσίδη (ελαιοκανθάλη), το ελενολικό οξύ, η υδροξυλιωμένη μορφή του ελενολικού οξέος και η οξύ-υδροξυτυροσόλη έχουν χημική ομοιότητα με την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη. Σύμφωνα με το μοντέλο, επιλέχθηκε η τυροσόλη ως καταλληλότερη για την ημιποσοτικοποίηση αυτών των ενώσεων. Πρόκειται για μια καινοτόμο μέθοδο ημιποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων η οποία αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ και ανέτρεψε τα δεδομένα που υπήρχαν στη βιβλιογραφία αναφορικά με την εξαγωγή ημιποσοτικών αποτελεσμάτων (Kalogiouri et al. 2017).



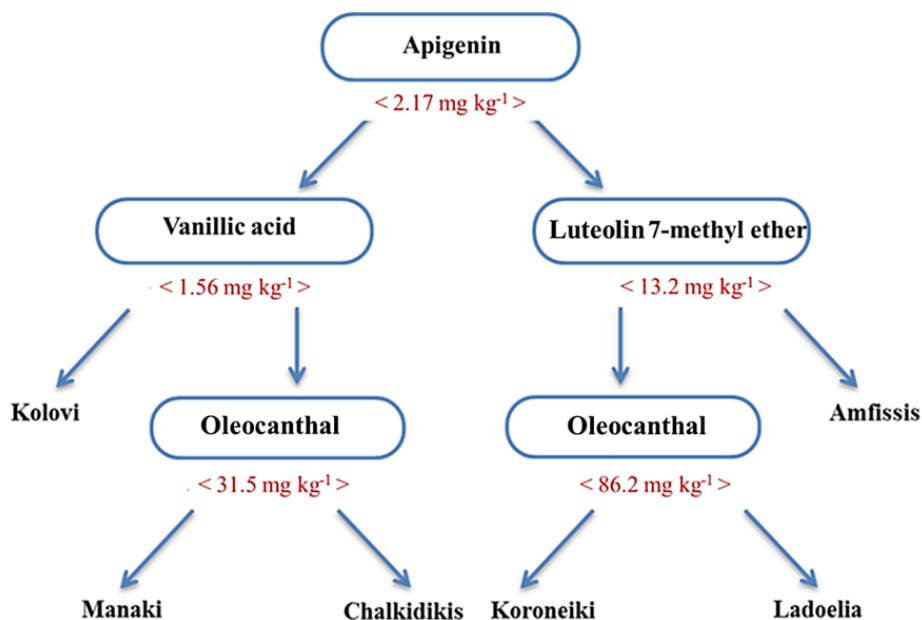
Σχήμα 1.9: Μοντέλο πρόβλεψης της χημικής ομοιότητας μεταξύ των ύποπτων ενώσεων και των πρότυπων ουσιών

Τέλος, τα ποσοτικά και ημιποσοτικά αποτελέσματα που εξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να γίνει ταξινόμηση μεταξύ έξτρα παρθένων ελαιολάδων συμβατικής και βιολογικής καλλιέργειας της ποικιλίας Κολοβής. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν επιβεβλημένες χημειομετρικές τεχνικές. Το αντιοξειδωτικό λουτεολίνη είναι υπεύθυνο γι'αυτού του είδους την ταξινόμηση και προτάθηκε η συγκέντρωση των $4,16 \text{ mg kg}^{-1}$, ως καθοριστική για την ταξινόμηση.

1.3.3 Ταξινόμηση των ελληνικών ποικιλιών με μη στοχευμένη σάρωση UHPLC-QTOF-MS και προηγμένες χημειομετρικές τεχνικές

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 51 μονοποικιλιακά έξτρα παρθένα ελαιόλαδα των ποικιλιών Μανάκι, Λαδοελιά, Χαλκιδικής, Κορωνέικη, Κολοβή και Αμφίσση. Εφαρμόστηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε στην **Παράγραφο 1.3.2**. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της μη στοχευμένης σάρωσης ώστε να εξεταστεί όλο το αποτύπωμα των έξτρα παρθένων ελαιολάδων. Για να επιταχυνθεί η διαδικασία ταυτοποίησης

των άγνωστων ενώσεων, δημιουργήθηκε και προτάθηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ μια λίστα 1608 φυσικών προϊόντων που αποτελούν συστατικά της ελιάς, των παραπροϊόντων της ελιάς και του παραγόμενου ελαιολάδου (Kalogiouri et al. 2018). Χρησιμοποιώντας το σύνολο του μεταβολώματος των έξτρα παρθένων ελαιολάδων που χρησιμοποιήθηκαν για την χαρτογράφηση και αναπτύσσοντας χημειομετρικό μοντέλο επιβλεπόμενων χημειομετρικών τεχνικών, προτάθηκαν οι δείκτες: απιγενίνη, βανιλλικό οξύ, μεθυλοαιθέρας της λουτεολίνης και ολεοκανθάλη ως υπεύθυνοι για την ταξινόμηση των ποικιλιών που εξετάστηκαν. Επιπλέον, προτάθηκαν οι συγκεντρώσεις αυτών των δεικτών, με βάση τις οποίες έγινε η κατανομή των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται με τη μορφή δένδρου ταξινόμησης στο **Σχήμα 1.10**.



Σχήμα 1.10: Δένδρο ταξινόμησης των ελληνικών μονοποικιλιακών έξτρα παρθένων ελαιολάδων Κολοβής, Κορωνέικης, Αμφίσσης, Μανάκι και Χαλκιδικής

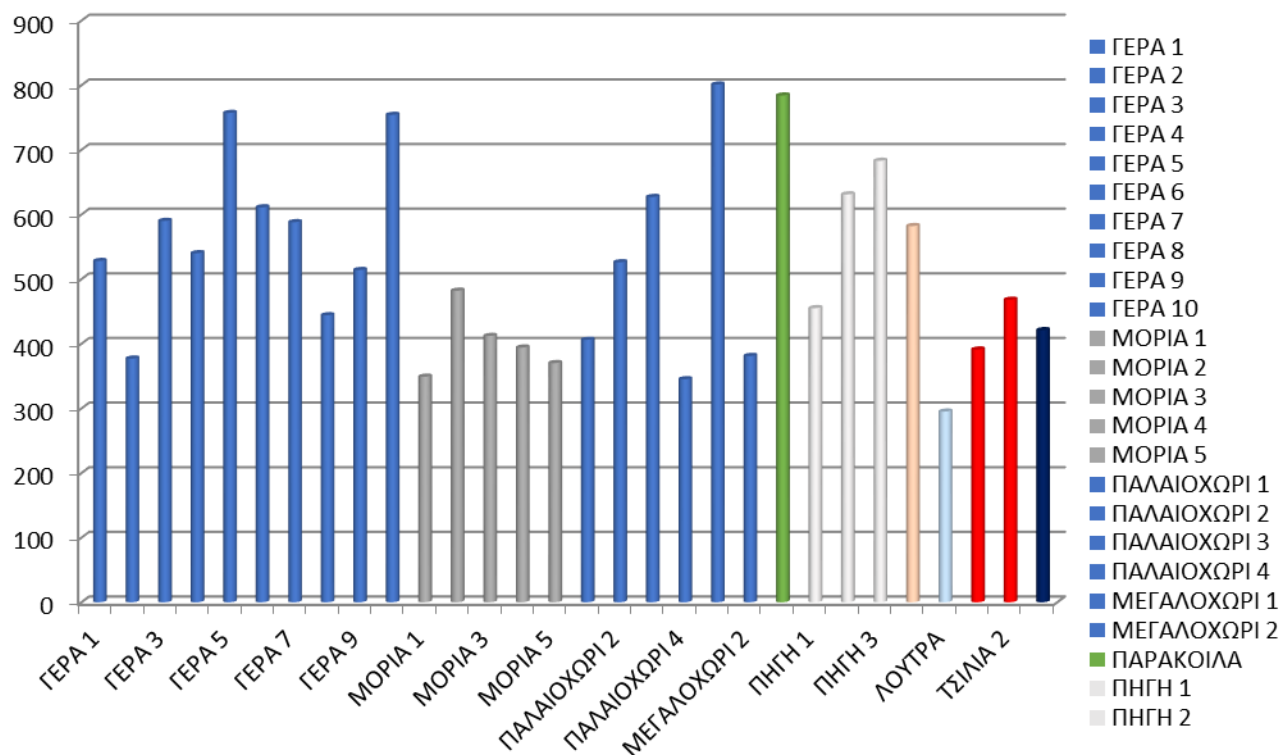
1.3.4 Προκαταρκτικές μελέτες συσχετισμού του φαινολικού προφίλ και του γεωγραφικού υψόμετρου κατά την ελαιοκομική περίοδο 2016-2017

Κατά την ελαιοκομική περίοδο 2016-2017, συλλέχθηκαν 39 δείγματα έξτρα παρθένου ελαιολάδου από διαφορετικές περιοχές της Λέσβου. Τα στοιχεία των δειγμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.8**. Για την ανάλυση των δειγμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 1.3.2**. Ακολουθήθηκε στοχευμένη και ύποπτη σάρωση. Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 11 αντιοξειδωτικά με στοχευμένη σάρωση και 24 με ύποπτη σάρωση. Οι ενώσεις αυτές ποσοτικοποιήθηκαν και ημιποσοτικοποιήθηκαν, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα (mg kg^{-1}) παρουσιάζονται με τη μορφή διαγράμματος στο **Σχήμα 1.11**.

Πίνακας 1.8: Στοιχεία δειγμάτων ελαιοκομικής περιόδου 2016-2017

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜΕΡ. ΠΑΡΑΓ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ-ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ	ΦΥΤΟΚΕΝΤΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	ΤΡΟΠΟΣ ΑΛΕΣΗΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΜΑΛΑΞΗΣ
ΜΕ1	10/12/16	Συμβατική	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΜΟ1	05/12/16	Βιολογική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80-ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΜΟ2	07/12/16	Βιολογική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80-ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΜΟ3	07/12/16	Βιολογική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80-ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ1	03/12/16	Συμβατική	ΠΑΛΑΙΟΚΗΠΟΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ1	10/11 - 10/12	Βιολογική	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ2	19/11/16	Συμβατική	ΠΑΛΑΙΟΚΗΠΟΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΑΓ1	15/12/16	Βιολογική	ΣΚΟΠΕΛΟΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ1	μέχρι 16/12/16	Βιολογική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΜΕ2	16/12/16	Συμβατική	ΜΕΓΑΛΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΡ1	16/12/16	Συμβατική	ΠΑΡΑΚΟΙΛΑ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ3	20/12/16	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ2	μέχρι 05/01/16	Συμβατική	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΑ3	μέχρι 05/01/16	Συμβατική	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΗ1	07/01/17	Συμβατική	ΠΗΓΗ	ΚΟΛ.80-ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΑΚ1	29/12/16	Συμβατική	ΑΚΡΑΣΙΟΥ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΗ2	01/12-30/12	Συμβατική	ΠΗΓΗ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΗ3	15/11-25/12/17	Βιολογική	ΠΗΓΗ	ΚΟΛ.80-ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ2	10/11-15/01/17	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ3	01/12-30/01/17	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΣΚ1	17/01/17	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min

ΔΦ1	10/12/16	Συμβατική	ΛΟΥΤΡΑ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ4Θ	20/01/17	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΚΟ1	μέχρι 10/02	Συμβατική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΚΟ2	10/02/17	Συμβατική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΚΟ3	10/02/17	Συμβατική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΚΟ4	10-02/17	Συμβατική	ΜΟΡΙΑ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΚΡ1	12/16	Συμβατική	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛ.80- ΑΔΡ.20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΘΕ1	μέχρι 10/02	Συμβατική	ΘΕΡΜΗ	ΚΟΛ.50- ΑΔΡ.50	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ4	μέχρι 15/12	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ5	μέχρι 15/12	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΓΕ6	μέχρι 15/12	Συμβατική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΑΚ1	μέχρι 10/02	Συμβατική	ΚΑΛΛΟΝΗ	ΑΔΡ80-ΚΟΛ20	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΠΛ4	ΜΕΧΡΙ 05/03/17	Βιολογική	ΠΑΛΑΙΟΧΩΡΙ	ΚΟΛΟΒΗ	3-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
Μ1	20/11-20/12	Βιολογική	ΠΕΔΙΝΑ- ΗΜΙΟΡΕΙΝΑ ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
Μ2	20/11-20/12	Βιολογική	ΟΡΕΙΝΑ ΓΕΡΑ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
Μ3	15/12-5/1	Βιολογική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
Μ4	15/12-5/1	Βιολογική	ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min
ΕΕ1	16/12	Βιολογική	ΣΚΟΠΕΛΟΣ- ΓΕΡΑΣ	ΚΟΛΟΒΗ	2-φασικό	Σφαιρόμυλοι	45-60 min



Σχήμα 1.11: Ραβδόγραμμα συσχέτισης συνολικού φαινολικού προφίλ με το υψόμετρο καλλιέργειας

Σύμφωνα με το **Σχήμα 1.11**, παρατηρείται αύξηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου σε υψηλότερο υψόμετρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το δείγμα ME1 από το Μεγαλοχώρι που παρουσιάζει το υψηλότερο φαινολικό προφίλ ενώ ακολουθούν διάφορα δείγματα από περιοχές με υψόμετρο άνω των 100-120 μέτρων όπως είναι η Γέρα και η Πηγή. Χαμηλότερο φαινολικό προφίλ παρουσιάζουν δείγματα από περιοχές με χαμηλότερο υψόμετρο όπως η Καλλονή και η Μόρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΜΒΑΣΗΣ

ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ ΣΧΕΔΙΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ Β' ΦΑΣΗΣ

Το αντικείμενο της προγραμματικής σύμβασης καθώς και τα επιμέρους θεματικά αντικείμενα της ανωτέρω ερευνητικής εργασίας, είναι τα ακόλουθα:

- Η ανάδειξη της εξαιρετικής ποιότητας των μονοποικιλιακών ελαιόλαδων του Β. Αιγαίου:

(1) Θα αναλυθούν δείγματα Έξτρα Παρθένου Ελαιόλαδου από τις ποικιλίες Κολοβή και Αδραμυτιανή της Λέσβου και από τις ποικιλίες που καλλιεργούνται στη Σάμο και στη Χίο με σκοπό την ανίχνευση και τον προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων με μία νέα, καινοτόμο και πολυδύναμη μέθοδο, την ανάδειξη του βιοδραστικού περιεχόμενου και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών ποιότητας και την προώθηση του με βάση τον ισχυρισμό υγείας (EFSA, 432/2012), καθώς και την ένδειξη νησιωτικής παραγωγής (αυθεντικότητα ελαιόλαδου). Θα βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες παραγωγής (στο χωράφι και στο ελαιοτριβείο) με σκοπό την παραγωγή προϊόντος με σταθερή ποιότητα και προστιθέμενη αξία.

(2) Εξειδικευμένη έρευνα και ανάπτυξη βελτιωμένων προϊόντων Έξτρα Παρθένου Ελαιόλαδου με υψηλή σταθερότητα χωρίς απώλεια των βιοδραστικών του συστατικών

(3) Εξειδικευμένη έρευνα και ανάδειξη του βιοδραστικού περιεχόμενου ελαιόλαδου Κολοβής το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί:

(α) για ενισχυτικό γεύσης και εμπλουτισμό του βιοδραστικού περιεχόμενου μειονεκτικών ελαιόλαδων, και

(β) ως πρώτη ύλη για τα συμπληρώματα διατροφής με βάση το Έξτρα Παρθένο Ελαιόλαδο

- Η ανάδειξη της εξαιρετικής ποιότητας των βρώσιμων ελιών και της πάστας ελιάς από την ποικιλία «Κολοβή»:

(4) Εξειδικευμένη έρευνα του φαινολικού αποτυπώματος των βρώσιμων ελιών και της πάστας ελιάς και πώς εξαρτάται η θρεπτική αξία και η ποιότητα συγκριτικά με διαφορετικούς τύπους επεξεργασίας. Στόχος είναι η ανάδειξη των βρώσιμων ελιών και πάστας ελιάς (πράσινη-μαύρη)

και η προώθηση των προϊόντων με πιθανούς ισχυρισμούς υγείας.

- Η διερεύνηση του βιοδραστικού περιεχόμενου των παραπροϊόντων ελαιουργίας:

(5) Ανάδειξη του ολικού βιοδραστικού περιεχόμενου του φρέσκου κατσίγαρου τριφασικών συστημάτων και της «ελαιοπυρήνας» διφασικών συστημάτων, υψηλής υγρασίας (55-70 %) με σκοπό να αποτελέσουν βάση για καινοτόμα προϊόντα και πρώτη ύλη για τη βιομηχανία κοσμετολογίας. Ενδεικτικά θα αναλυθούν και φύλλα ελιάς για διερεύνηση της περαιτέρω αξιοποίησης τους.

Η υλοποίηση των ανωτέρω απαιτεί τις δράσεις όπως αυτές περιγράφονται στις παρακάτω παραγράφους.

2.1. Δράση 1: Χαρτογράφηση της Ποιότητας του Έξτρα Παρθένου Ελαιόλαδου από Κολοβή και Αδραμυτιανή και άλλες ποικιλίες Βορείου Αιγαίου - προϊόντα με ένδειξη νησιωτικής παραγωγής και με ισχυρισμό υγείας

Με αυτή τη δράση θα παραχθεί η πλήρης τεκμηρίωση της ποιότητας του ελαιόλαδου της Λέσβου, της Σάμου και των άλλων νησιών του Βορείου Αιγαίου που θα αποτελέσει τη βάση για συστηματική παραγωγή και τυποποίηση του προϊόντος και τη δυναμική διεκδίκηση σημαντικής μερίδας της αγοράς σε εθνικό και διεθνές επίπεδο.

Πρώτο στόχο της Δράσης 1 αποτελεί η βελτιστοποίηση της καλλιεργητικής πρακτικής και μελέτη της περιοχής καλλιέργειας. Οι παράμετροι οι οποίες θα μελετηθούν θα είναι η ποικιλία των ελαιόδεντρων (Κολοβή, Αδραμυτιανή, Κορωνέικη στη Λέσβο και η Κορωνέικη στη Χίο και Κορωνέικη, Θρουμπολιά στη Σάμο και Ικαρία καθώς και άλλες ποικιλίες), η περιοχή της καλλιέργειας (θα μελετηθούν δείγματα από 7 ζώνες της Λέσβου) και το υψόμετρο (ορεινό, ημιορεινό, πεδινό), το είδος της καλλιέργειας (βιολογική, συμβατική) και η άρδευση (ξηρικό, αρδευόμενο).

Ειδικότερα: για τη Λέσβο, ενδεικτικά θα μελετηθούν οι περιοχές που αναφέρονται στον **Πίνακα 2.1.**

Πίνακας 2.1: Περιοχές μελέτης στη Λέσβο

α/α	Άξονας – Περιοχή μελέτης Λέσβου
1.	Γέρας
2.	Πλωμαρίου
3.	Ευεργέτουλα
4.	Αγιάσου – Πολιχνίτου
5.	Αγία Παρασκευής – Καλλονής
6.	Πέτρας – Μήθυμνας
7.	Θερμής
8.	Μανταμάδου
9.	Αλυφαντά - Λουτρά - Μόρια - Πάμφιλα – Αφάλωνας
10.	Ερεσού – Άντισσας – Σιγρίου

Για τη Π.Ε. Σάμου, θα μελετηθούν οι περιοχές που αναφέρονται στον **Πίνακα 2.2**.

Πίνακας 2.2: Περιοχές μελέτης Π.Ε. Σάμου

α/α	Άξονας – Περιοχή μελέτης Σάμου
1.	Καρλοβασίων
2.	Μαραθοκάμπου
3.	Μυτιληνίων
4.	Χώρας
5.	Βαθέος
6.	Ικαρία
7.	Φούρνοι Ικαρίας

Δεύτερος στόχος της Δράσης 1 είναι η μελέτη της επίδρασης της εποχής συλλογής του ελαιόκαρπου στο συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Για τον σκοπό αυτό, θα πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα: Οκτώβριος-Νοέμβριος (αγουρέλαιο), Δεκέμβριος και Ιανουάριος-Φεβρουάριος.

Τρίτο στόχο αποτελεί η εύρεση χαρακτηριστικών βιοδεικτών για τις ποικιλίες Κολοβή και Αδραμυτιανή (τεκμηρίωση αυθεντικότητας, καταπολέμηση νοθείας, γεωγραφική προέλευση, ένδειξη νησιωτικής γεωργίας, ισχυρισμός υγείας). Θα αξιολογηθούν οι διαφοροποιήσεις στις συγκεντρώσεις χαρακτηριστικών αντιοξειδωτικών ενώσεων ώστε να τεκμηριωθεί η μοναδικότητα τους και η χαρτογράφησή τους. Η χαρτογράφηση θα διασφαλίσει την αυθεντικότητα των ελαιολάδων, σύμφωνα με τις οδηγίες της Ε.Ε. για την προστασία της αυθεντικότητας τροφίμων (**Κανονισμός ΕΕ 1151/2012**) και την Προστασία της Γεωγραφικής Ένδειξης (Π.Γ.Ε.). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός πως δίνεται η δυνατότητα αναγραφής στην ετικέτα της «Ένδειξης νησιωτικής γεωργίας» (**Κανονισμός Ε.Ε. 1151/2013**), όπως επίσης και του ισχυρισμού υγείας των έξτρα παρθένων ελαιόλαδων τα οποία σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (**EFSA, 2012**) προστατεύουν τη χοληστερόλη LDL από την οξείδωση (**Κανονισμός 432/2012**).

Τέταρτο στόχο αποτελεί η διερεύνηση του τρόπου παραγωγής. Θα μελετηθούν δείγματα που προέρχονται από διφασικά και τριφασικά ελαιοτριβεία από την ίδια παραγωγή ελαιοκαρπού, για να στοιχειοθετηθεί η ποιοτική διαφορά τους. Θα πραγματοποιηθεί έρευνα τόσο για Κολοβή όσο και Αδραμυτιανή.

Σκοπός είναι, ακόμα, η βελτιστοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας στο εργοστάσιο με στόχο την αύξηση του φαινολικού περιεχομένου των ελαιόλαδων. Θα πραγματοποιηθούν δοκιμές σε ελαιοτριβεία και θα εξεταστούν οι παρακάτω παράμετροι: η θερμοκρασία μάλαξης (μελέτη 3 θερμοκρασιών: 25°C, 30 °C, 35 °C), ο χρόνος μάλαξης (4 χρόνοι σε διάστημα 30-60 λεπτών) και η προσθήκη νερού ή όχι στον μαλακτήρα. Θα μελετηθεί ο τύπος του ελαιοτριβείου (διφασικό ή τριφασικό) και θα πραγματοποιηθεί πείραμα προσθήκης ποσότητας νερού (3 πειράματα). Θα αναλυθούν οι πυρήνες και ο κατσίγαρος που προέρχονται από τα τριφασικά ελαιοτριβεία και η ελαιοπυρήνα υψηλής υγρασίας από τα διφασικά ελαιοτριβεία. Θα αναλυθούν και δείγματα από τον αρχικό ελαιοκαρπό, έτσι ώστε να γίνει υπολογισμός του ισοζυγίου μαζών των φαινολικών ενώσεων κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιολάδου.

Οι αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν είναι αρχικά οι βασικές αναλύσεις του κανονισμού ελαιολάδου (Οξύτητα, Κ/ΔΚ, υπεροξειδία, οργανοληπτική αξιολόγηση, κηροί-αιθυλεστέρες, λιπαρά οξέα, στερόλες). Επιπλέον, θα πραγματοποιηθούν αναλύσεις 1,2-διγλυκεριδίων και

πυροφαιοφυτίνης. Τα 1,2 – διγλυκερίδια είναι δι-εστέρες της γλυκερίνης με λιπαρά οξέα. Είναι συστατικά του ελαιολάδου που υπάρχουν λόγω ατελούς βιοσύνθεσης των τριγλυκεριδίων. Υψηλό ποσοστό δηλώνει φρέσκο, καλής ποιότητας ελαιόλαδο. Η πυροφαιοφυτίνη είναι προϊόν φυσικής αποικοδόμησης της φαιοφυτίνης-Α η οποία είναι προϊόν φυσικής αποικοδόμησης της χλωροφύλλης-Α και που συμβαίνει με την γήρανση του ελαιολάδου. Χαμηλό ποσοστό δηλώνει ένα φρέσκο, καλής ποιότητας ελαιόλαδο.

Παράλληλα, θα πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις για το φαινολικό βιοδραστικό περιεχόμενο εφαρμόζοντας καινοτόμες αναλυτικές μεθόδους (**Kalogiouri et al. 2016; 2017; 2018**), όπως αυτές έχουν ήδη περιγραφεί στο Κεφάλαιο 1. Οι παραπάνω αναλύσεις θα πραγματοποιηθούν σε 345 δείγματα ελαιολάδων από τη Λέσβο, σε 20 δείγματα από τη Χίο, 51 από τη Σάμο, 12 από την Ικαρία και 6 από τους Φούρνους. Τα δείγματα που θα παραλάβει συνολικά το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ είναι 434.

Επίσης, έχει προγραμματιστεί η υλοποίηση εδαφολογικών αναλύσεων σε συνολικά 100 δείγματα εδαφών και φύλλων. Ενδεικτικά, σε μερικά δείγματα συμβατικής καλλιέργειας και βιολογικής καλλιέργειας θα πραγματοποιηθούν αναλύσεις για φυτοφάρμακα με τη νέα ελαιοκομική περίοδο 2018-2019.

2.1.1. Σχεδιασμός Δειγματοληψιών για τη Δράση 1

Λαμβάνοντας υπόψη γενικά στοιχεία παραγωγής από τις περιοχές της Ελλάδας Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ικαρία και Φούρνοι, από τις περιόδους 2015-2016 και 2016-2017, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή προερχόταν από την Λέσβο και έφτανε τους 10689 τόνους. Ακολούθησε η Χίος με 710 τόνους, η Σάμος με 634 τόνους και παρήχθησαν 17 τόνοι από την Ικαρία. Με αυτά τα δεδομένα προβλέφθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή για τη περίοδο 2017-2018, θα είναι 16000 τόνοι για τη Λέσβο, 1200 τόνοι από τη Χίο, 3000 τόνοι από Ικαρία και 10 τόνοι από τους Φούρνους. Κατά συνέπεια, και με βάση τα στοιχεία αυτά, η αρχική δειγματοληψία που σχεδιάστηκε για την κάθε περιοχή αντίστοιχα ήταν ελαφρώς διαφοροποιημένη από την προγραμματική, περιλαμβάνοντας 310 δείγματα από τη Λέσβο, 30 από τη Χίο, 60 από τη Σάμο και 20 από την Ικαρία και 6 από τους Φούρνους. Για την πραγματοποίηση των τελικών δειγματοληψιών θα ληφθεί υπόψη και η διαθεσιμότητα προσωπικού δειγματοληψίας σε κάθε

νησί καθώς και η επικοινωνία με τα ελαιοτριβεία. Ο **Πίνακας 2.3** συνοψίζει με ποια λογική σχεδιάστηκε η δειγματοληψία της ελαιοκομικής περιόδου 2017-2018, σύμφωνα με την παραγωγή των προηγούμενων ετών και τη διαφαινόμενη παραγωγή του 2017-18 και την ενδεχόμενη διαθεσιμότητα και επικοινωνία με τα αντίστοιχα νησιά (τελική εφικτή δειγματοληψία).

Πίνακας 2.3: Παραγωγή ελαιολάδου σε τόνους κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2015-2016 και 2016-2017, πρόβλεψη παραγωγής της περιόδου 2017-2018, προτεινόμενη και τελική εφικτή δειγματοληψία.

	2015-2016 (tn)	2016-2017 (tn)	Μέγιστο (tn)	Μέγιστη Πρόβλεψη (tn)	Προγραμματική Σύμβαση	Προτεινόμενη Δειγματοληψία	Τελική εφικτή Δειγματοληψία
Λέσβος	10689	7263	10689	16000	260	310	364
Χίος	710	37	710	1200	50	30	20
Σάμος		634	634	3000	100	60	51
Ικαρία		17	17	200	30	20	12
Φούρνοι		0	0	10	0	6	6
Σύνολο		7951		20410	440 δείγματα	426 δείγματα	453 δείγματα

Ακολουθεί η περιγραφή της τελικής εφικτής δειγματοληψίας:

ΛΕΣΒΟΣ

Πιο ειδικά για τη Λέσβο, που θα έχει την μεγαλύτερη παραγωγή, η περιοχή χωρίστηκε σε 7 ζώνες, και τα δείγματα που θα παραληφθούν θα είναι συνολικά 364, και θα προέρχονται από 48 διαφορετικά ελαιοτριβεία. Τα δείγματα θα επιδιωχθεί να είναι μόνο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, αλλά ενδέχεται και να συλλεχθούν ενδεικτικά και δείγματα παρθένου ελαιολάδου και λαμπαντέ ελαιόλαδο. Ο διαχωρισμός σε ζώνες φαίνεται στους παρακάτω χάρτες.

Χάρτης 1: Ζώνες Λέσβου



Από την **Ζώνη 1**, θα συλλεχθούν 21 δείγματα από 3 ελαιοτριβεία με έδρες το Ίππειος, το Κάτω Τρίτος και τα Κεραμεία.

Από τη **Ζώνη 2** θα συλλεχθούν 113 δείγματα από 7 διαφορετικά ελαιοτριβεία με έδρες τον Μεσαγρό, τον Παλαιόκηπο, τον Σκόπελο και τον Πάπαδο.

Από τη **Ζώνη 3** θα συλλεχθούν συνολικά 62 δείγματα από 7 διαφορετικά ελαιοτριβεία: ένα από την Αγιασό, ένα από το Ακράσι, δύο από Παλαιοχώρι, ένα από Μεγαλοχώρι, ένα από Τρίγωνα και ένα από Πλωμάρι.

Από τη **Ζώνη 4** θα συλλεχθούν 24 δείγματα από 3 διαφορετικά ελαιοτριβεία, 2 από αυτά με έδρα τον Πολυχνίτο, και ένα με έδρα το Λισβόρι.

Από τη **Ζώνη 5** τα δείγματα θα είναι 14 από 4 διαφορετικά ελαιοτριβεία με έδρες Καπή, Κλειού, Μανταμάδος και Συκαμινέα.

Στην **Ζώνη 6** όπως φαίνεται από τον χάρτη, θα συμμετέχουν 8 ελαιοτριβεία με έδρες Αγία Παρασκευή, Καλλονή, Ναπή, Παράκοιλα, Πέτρα, Άντισσα, Σκουτάρος και Στύψη (συνολικά 43 δείγματα).

Τέλος από την **Ζώνη 7**, θα συλλεχθούν 84 δείγματα από 12 διαφορετικά ελαιοτριβεία. Τρία από τα ελαιοτριβεία ανήκουν στα Λουτρά, 2 στα Μιστεγνά, 2 στη Μόρια, και τα υπόλοιπα στις έδρες Αλυφαντά, Θερμή, Πάμφιλα και Πηγή.

Από τη Λέσβο, θα συλλεχθούν τα περισσότερα δείγματα από όλες τις άλλες περιοχές, όπως είχε προβλεφθεί εξ' αρχής.

ΧΙΟΣ

Από το νησί της Χίου θα συλλεχθούν συνολικά 20 δείγματα από 5 ελαιοτριβεία που ανήκουν στις περιοχές Άγιος Γεώργιος Συκούσης, Αρμόλια, Φραγκοβούνι, Λατόμι και Νέα Ποταμία, όπως φαίνεται και στον παρακάτω χάρτη:

Χάρτης 2: Ελαιοτριβεία Χίου



ΣΑΜΟΣ-ΙΚΑΡΙΑ-ΦΟΥΡΝΟΙ

Τέλος, από τα νησιά Σάμος, Ικαρία και Φουρνοι θα συλλεχθούν συνολικά 69 δείγματα.

Χάρτης 3: Ελαιοτριβεία Σάμου, Ικαρίας και Φούρνων



Από τη Σάμο, θα συλλεχθούν 51 δείγματα από 6 διαφορετικά ελαιοτριβεία στις περιοχές: Καρλόβασι, Κουμαϊϊκά, Μυτιληνιοί, Κουμαραδαίοι και Μαραθόκαμπο.

Από την Ικαρία θα συλλεχθούν 12 δείγματα από 2 διαφορετικά ελαιοτριβεία με έδρες στις Ράχες και στο Πλουμάρι.

Από τους Φούρνους θα συλλεχθούν 6 δείγματα από 1 ελαιοτριβείο.

2.1.2 Αναλυτικές μέθοδοι για την υλοποίηση της Δράσης 1

Ο υπολογισμός των δεικτών K/ΔK, της οξύτητας, των στερολών και των κήρων-αιθυλεστέρων θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό EC61/2011. Ο υπολογισμός των υπεροξειδίων θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με την ISO μέθοδο 3960:2001. Ο υπολογισμός των λιπαρών οξέων θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με την ISO μέθοδο 129662. Για τον προσδιορισμό της πυροφαιοφυτίνης και των 1,2 διγλυκεριδίων αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ η παρακάτω μέθοδος:

1 mg δείγματος ελαιολάδου ζυγίζεται σε erpendorf - με ζυγό ακρίβειας τεσσάρων (4) δεκαδικών ψηφίων- και διαλύεται σε εξάνιο μέχρι τελικό όγκο 2 ml. Στην συνέχεια ανακινείται σε vortex για διάστημα ενός λεπτού. Ακολουθεί έγχυση σε στήλη στερεάς φάσης (SPE) Strata SI-1 Silica (55um,70A) 1000mg/6ml, που έχει προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 5 ml μεθανόλης και 5 ml εξανίου. Κάθε διάλυμα ενεργοποίησης παραμένει στην στήλη για περίπου 5 λεπτά. Το erpendorf εκπλένεται 2 φορές με 1 ml εξανίου κάθε φορά. Μετά το πέρασμα του δείγματος από την στήλη, ακολουθεί ξήρανση της στήλης με εφαρμογή κενού. Στην συνέχεια, προστίθενται 5 ml μείγματος πετρελαϊκού αιθέρα : διαίθυλ-αιθέρα 9:1 και μετά το πέρας 5 λεπτών προστίθενται ακόμα 5 ml του ιδίου μείγματος. Τα 10 ml του εκλούσματος αυτού θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό διγλυκεριδίων, που θα περιγραφεί παρακάτω. Έπειτα το δείγμα ξηραίνεται με την εφαρμογή κενού. Το τελικό έκλουσμα για τον προσδιορισμό πυροφαιοφυτίνης λαμβάνεται με 5+5 ml ακετόνης σε φυγοκεντρικό σωλήνα. Το έκλουσμα μεταφέρεται σε υάλινο σωλήνα και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό ροή αζώτου μέχρι ξηρού. Τέλος, το τελικό δείγμα λαμβάνεται μετά από ανασύσταση με 200 μl ακετόνης και προστίθεται σε vial που περιέχει insert 300 μl. Το vial με το δείγμα τοποθετείται σε σύστημα HPLC-DAD όπου μετράται σε μήκος κύματος 410 και 660 nm.

Το έκλουσμα το οποίο παραλαμβάνεται κατά την προσθήκη 10ml πετρελαϊκού αιθέρα - διαίθυλ-αιθέρα 9:1, μεταφέρεται σε υάλινο σωλήνα και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό ροή αζώτου μέχρι ξηρού. Τέλος, το τελικό δείγμα λαμβάνεται μετά από ανασύσταση με 200 μl πετρελαϊκού αιθέρα - διαίθυλ-αιθέρα 9:1 και προστίθεται σε vial που περιέχει insert 300 μl. Το vial με το δείγμα μεταφέρεται σε σύστημα GC- MS/MS.

Για την προκατεργασία του κατσίγαρου, θα χρησιμοποιηθούν στηλάκια HLB Oasis 60mg/ 3ml (30μm particle size). Η προκατεργασία που πραγματοποιήθηκε έχει προταθεί από τους **Klen et al. 2011**. Τα στηλάκια ενεργοποιούνται με 2 ml μεθανόλη και μετά με 2 ml οξινισμένο νερό με υδροχλώριο (pH=2,00). Στη συνέχεια φορτώνεται 1,5 ml δείγματος στα στηλάκια. Ακολουθεί έκπληση με 10ml εξάνιο και στη συνέχεια έκλουση με 10ml μεθανόλη. Το έκλουσμα διηθείται σε φιλτράκια αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL RC). Το διήθημα εμβολιάζεται με εσωτερικό πρότυπο μυρισετίνη 2 mg l^{-1} κι έπειτα προωθείται στο χρωματογραφικό σύστημα.

Στο πείραμα των ελαιοτριβείων, θα εφαρμοστεί ο νόμος διατήρησης της μάζας που είναι γνωστός σαν προσδιορισμός των ισοζυγίων μάζας. Ένα αναλυτικό ισοζύγιο μάζας είναι απόλυτα απαραίτητο για τον σωστό σχεδιασμό και την αποτελεσματική λειτουργία ενός εργοστασίου επεξεργασίας τροφίμων, γιατί δίνει πληροφορίες: α) για τις απαιτήσεις σε υλικά, πρώτες ύλες, και για τον όγκο παραγωγής, στοιχεία που είναι απαραίτητα για τον προσδιορισμό του κόστους παραγωγής, β) για την ανακύκλωση παραπροϊόντων και το μέγεθος των εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων, γ) για τον προσδιορισμό ή έλεγχο της απόδοσης μιας γραμμής παραγωγής ή ολόκληρου του εργοστασίου, δ) για τον προσδιορισμό των προδιαγραφών αγοράς μηχανολογικού εξοπλισμού και κατασκευής αποθηκευτικών χώρων, ε) πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό των ισοζυγίων ενέργειας. Τα ισοζύγια μάζας στηρίζονται στην αρχή ότι η ύλη δεν μπορεί να δημιουργηθεί από το μηδέν, ούτε και να καταστραφεί ολοσχερώς. Με βάση την αρχή αυτή η ροή πρώτων υλών, προϊόντων και παραπροϊόντων που συμμετέχουν σε μια επεξεργασία περιγράφεται από την εξίσωση: εισερχόμενα υλικά = εξερχόμενα υλικά + συσσωρευμένα υλικά ή σύνολο πρώτων υλών = σύνολο προϊόντων + παραπροϊόντων + αποβλήτων. Αν η συσσώρευση είναι μηδέν, τότε έχουμε σταθερή κατάσταση οπότε: εισερχόμενα υλικά = εξερχόμενα υλικά. Αν η συσσώρευση δεν είναι μηδέν, τότε η συγκέντρωση υλικών στο σύστημα αλλάζει με τον χρόνο, οπότε έχουμε επεξεργασία υπό ασταθή κατάσταση. Φάση ασταθούς κατάστασης έχουμε συνήθως κατά την έναρξη λειτουργίας μιας συνεχούς επεξεργασίας, που αντιστοιχεί στη περίοδο ρύθμισης, αλλά καταλήγει τελικά στη σταθερή κατάσταση μετά την σταθεροποίηση των συνθηκών επεξεργασίας.

Για την ανάλυση των αντιοξειδωτικών, θα ακολουθηθεί η μέθοδος που έχει αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ, έχει δημοσιευθεί (**Kalogiouri et al. 2017**) και έχει

ήδη περιγραφεί στο **Κεφάλαιο 1**. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, 0,5 g ελαιολάδου ζυγίζεται σε Eppendorf και κατόπιν προστίθεται ως εσωτερικό πρότυπο συρινγγαλδεΰδη σε τελική συγκέντρωση $1,3 \text{ mg L}^{-1}$. Ακολουθεί εκχύλιση με 0,5 ml μίγματος μεθανόλης:νερού (80:20, v/v). Έπειτα, γίνεται ανακίνηση σε vortex για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση. Η οργανική φάση συλλέγεται και διηθείται σε φιλτράκια αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL RC) και στη συνέχεια προωθείται στο χρωματογραφικό σύστημα LC-QTOF/MS.

2.1.3 Πειράματα σε ελαιοτριβεία

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων που θα διεξαχθούν σε ελαιοτριβεία περιγράφεται από τους πίνακες που ακολουθούν (**Πίνακες 2.4, 2.5**).

Πίνακας 2.4: Προγραμματισμένες δοκιμές σε διφασικά ελαιοτριβεία

Ελαιόκαρπος: Κολοβή						2ΦΑΣΙΚΟ			
Μαλακτήρας	Θερμ.	Χρόνος (min)			H ₂ O				
1 ^{ος}	25°C	30		50	Όχι				
2 ^{ος}	25°C	30		50	Όχι				
3 ^{ος}	25°C	30		50	Ναι				
4 ^{ος}	30°C	30		50	Όχι				
5 ^{ος}	30°C	30		50	Ναι				
						Δείγματα			
Δοκιμή	Μαλακτήρας	Θερμοκρασία	Χρόνος	H ₂ O		ΕΛΙΕΣ	ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ (ΕΛ)	ΠΥΡΗΝΑ	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ (Δ)
1η	1 ^{ος}	23	30	Όχι		ΕΛΙΕΣ1	Β' Δ1Μ1Ε1	Β' Μ1Π1	
2η	2 ^{ος}	25	50	Όχι		ΕΛΙΕΣ2	Β' Δ2Μ2Ε2	Β' Μ2Π2	
3η	3 ^{ος}	28	30	Ναι		ΕΛΙΕΣ3	Β' Δ3Μ3Ε3	Β' Μ3Π3	
4η	3 ^{ος}	28	50	Ναι			Β' Δ4Μ3Ε4	Β' Μ3Π4	
5η	4 ^{ος}	32	30	Όχι		ΕΛΙΕΣ4	Β' Δ5Μ4Ε5	Β' Μ4Π5	
6η	4 ^{ος}	36	50	Όχι			Β' Δ6Μ4Ε6	Β' Μ4Π6	
7η	5 ^{ος}	30	30	Ναι		ΕΛΙΕΣ5	Β' Δ7Μ5Ε7	Β' Μ5Π7	
8η	5 ^{ος}	35	50	Ναι			Β' Δ8Μ5Ε8	Β' Μ5Π8	Δ8

Πίνακας 2.5: Προγραμματισμένες δοκιμές σε τριφασικά ελαιοτριβεία.

Ελαιόκαρπος: Κολοβή									
Μαλακτήρας	Θερμ.	Χρόνος (min)			H ₂ O				
1 ^{ος}	25°C	30	40	50	Όχι				
2 ^{ος}	25°C	30	40	50	Ναι				
3 ^{ος}	30°C	30	40	50	Όχι				
4 ^{ος}	30°C	30	40	50	Ναι				
						Δείγματα			
Δοκιμή	Μαλακτήρας	Θερμοκρασία	Χρόνος	H ₂ O	ΕΛΙΕΣ	ΠΥΡΗΝΑ (ΠΥΡ)	ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ (ΕΛ)	ΚΑΤΣΙΓΑΡΟΣ (Κ)	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ (Δ)
1η	1ος	25	30	Όχι	M1 ΚΟΛ	1M1ΠΥΡ1	Δ1M1 Ε1	Δ1M1 Κ1	Δ1M1 Δ1
2η	1ος	25	40	Όχι		2M1ΠΥΡ2	Δ2M1 Ε2	Δ2M1 Κ2	Δ2M1 Δ2
3η	1ος	25	50	Όχι		3M1ΠΥΡ3	Δ3M1 Ε3	Δ3M1 Κ3	Δ3M1 Δ3
4η	2ος	25	35	Ναι	M2 ΚΟΛ	4M2ΠΥΡ4	Δ4M2 Ε4	Δ4M2 Κ4	Δ4M2 Δ4
5η	2ος	25	45	Ναι		5M2ΠΥΡ5	Δ5M2 Ε5	Δ5M2 Κ5	Δ5M2 Δ5
6η	2ος	25	50	Ναι		6M2ΠΥΡ6	Δ6M2 Ε6	Δ6M2 Κ6	Δ6M2 Δ6
7η	3ος	30	30	Όχι	M3 ΚΟΛ	7M3ΠΥΡ7	Δ7M3 Ε7	Δ7M3 Κ7	Δ7M3 Δ7
8η	3ος	30	40	Όχι		8M3ΠΥΡ8	Δ8M3 Ε8	Δ8M3 Κ8	Δ8M3 Δ8
9η	3ος	32	50	Όχι		9M3ΠΥΡ9	Δ9M3 Ε9	Δ9M3 Κ9	Δ9M3 Δ9
10η	4ος	34	30	Ναι	M4 ΚΟΛ	10M4ΠΥΡ10	Δ10M4 Ε10	Δ10M4 Κ10	Δ10M3 Δ7
11η	4ος	40	40	Ναι		11M4ΠΥΡ11	Δ11M4 Ε11	Δ11M4 Κ11	Δ8M3 Δ8
12η	4ος	40	50	Ναι		12M4ΠΥΡ12	Δ12M4 Ε12	Δ12M4 Κ12	Δ9M3 Δ9

Ελαιόκαρπος: **Αδραμυτιανή**

Μαλακτήρας	Θερμ.	Χρόνος (min)			H ₂ O
5 ^{ος}	30°C	30	40	50	Όχι
6 ^{ος}	40°C	35			Ναι

Δοκιμή	Μαλακτήρας	θερμοκρασία	χρόνος	H ₂ O		ΕΛΙΕΣ	ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ (ΕΛ)	ΚΑΤΣΙΓΑΡΟΣ (Κ)	ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ (Δ)
13η	5ος	30	30	Όχι	13M4ΠΥΡ13	M5 ΑΔΡ	Δ13M5 E13	Δ13M5 K13	Δ13M5 Δ13
14η	5ος	30	40	Όχι	14M5ΠΥΡ14		Δ14M5 E14	Δ14M5 K14	Δ14M5 Δ14
15η	5ος	30	50	Όχι	15M5ΠΥΡ15		Δ15M5 E15	Δ15M5 K15	Δ15M5 Δ15
16η	6ος	40	35	Ναι	15M5ΠΥΡ16	M6 ΑΔΡ	Δ16M6 E16	Δ16M6 K16	Δ16M5 Δ16
					17M6ΠΥΡ17		Δ17M6 E17		

Τα πειράματα προβλέπεται να επαναληφθεί και την επόμενη ελαιοκομική περίοδο τόσο σε διφασικό όσο και σε τριφασικό ελαιοτριβείο. Θα χρησιμοποιήθηκαν ελιές της ποικιλίας Κολοβής. Ο χρόνος μάλαξης θα είναι 40-50 min, η θερμοκρασία μάλαξης 25 °C, χωρίς προσθήκη νερού στον μαλακτήρα. Θα πραγματοποιηθούν αναλύσεις σε δείγματα ελιάς, ελαιοπυρήνα, ελαιολάδου και υγρών αποβλήτων και τγρών αποβλήτων διαχωριστήρα, όπως περιγράφηκαν στην **Παράγραφο 2.1.2.**

2.2. Δράση 2: Έξτρα Παρθένο ελαιόλαδο με υψηλή σταθερότητα, χωρίς απώλεια των βιοδραστικών του συστατικών

Θα εφαρμοστεί πατενταρισμένη διαδικασία σταθεροποίησης ελαιολάδου χωρίς απώλεια φαινολικών συστατικών και μονοακόρεστων λιπαρών για σημαντική αύξηση της σταθερότητας του προϊόντος, καταλήγοντας έτσι σε προϊόν με υψηλή σταθερότητα. Θα εφαρμοστεί μοριακή διήθηση, η οποία απομακρύνει από το ελαιόλαδο υπεροξειδάσες που είναι τα ένζυμα που προκαλούν οξείδωση και επιταχύνουν την τάγγιση. Ταυτόχρονα, δεν υπάρχει απώλεια στις βιοδραστικές ενώσεις του ελαιολάδου. Σκοπός της δράσης αυτής είναι η παραγωγή προϊόντος υψηλής διατροφικής αξίας και υψηλής σταθερότητας, με χρόνο ζωής μεγαλύτερο των 4 ετών. Δοκιμές θα πραγματοποιηθούν σε 2 εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα τα οποία θα προέρχονται από διφασικά και τριφασικά ελαιοτριβεία. Σε αυτά θα πραγματοποιηθεί ανάλυση των βιοδραστικών συστατικών των δειγμάτων, όπως και οργανοληπτική εξέταση και βασικές αναλύσεις ποιότητας, σε καθορισμένους χρόνους. Η πρώτη ανάλυση θα ξεκινά σε t_0 , δηλαδή αμέσως μετά τη μοριακή διήθηση, και έπειτα θα ακολουθήσουν αναλύσεις κάθε 1 μήνα, για τους πρώτους 6 μήνες (από t_1 μέχρι t_6), και τέλος κάθε 3 μήνες μέχρι την συμπλήρωση 36 μηνών.

Η πατενταρισμένη διαδικασία φιλτραρίσματος γίνεται με τη χρήση μεμβρανών κυτταρίνης φιλτραρίσματος υψηλής καθαρότητας (100% κυτταρίνη). Το ελαιόλαδο διηθείται με τη βοήθεια της μεμβράνης και έτσι διατηρεί τη βιολογική του αξία για την παραγωγή καλλυντικών, για διατροφικούς σκοπούς. Κατά τον ισχυρισμό της πατέντας, το φιλτραρισμένο έλαιο, παρουσιάζει σταθερές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων, χωρίς να επηρεάζονται τα βασικά χημικά χαρακτηριστικά του ελαίου, όπως οι δείκτες διάθλασης K270, K232, ΔK, η οξύτητα και ο αριθμός υπεροξειδίων, που παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια των 7 μηνών.

Στο πείραμα αυτό θα χρησιμοποιηθούν 2 διαφορετικά δείγματα, 1 δείγμα από διφασικό ελαιοτριβείο (ΠΑΛΑΙΟΚΗΠΟΥ, 50kg), και 1 δείγμα από τριφασικό ελαιοτριβείο (ΤΖΩΡΤΖΗΣ, 110kg). Από κάθε δείγμα θα λάβουμε ακατέργαστο ελαιόλαδο (control), και διηθημένο ελαιόλαδο (Σταθερό Παραγόμενο Ελαιόλαδο).

Σε χρόνο το που ισούται με το χρόνο παραλαβής θα πραγματοποιούνται οι παρακάτω αναλύσεις εξακρίβωσης της ποιότητας του ελαιολάδου:

- 1) Ανάλυση βιοδραστικών (ολικές φαινόλες)
- 2) Ελεύθερη Οξύτητα
- 3) Δείκτες διάθλασης K270, K232, ΔK
- 4) Αριθμός Υπεροξειδίων
- 5) Α-Τοκοφερόλη
- 6) 1,2 – διγλυκερίδια
- 7) Πυροφαιοφυτίνη
- 8) Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
- 9) Οργανοληπτικός Έλεγχος

Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν έχουν ήδη περιγραφεί στην **Παράγραφο 2.1**. Η ανάλυση των βιοδραστικών θα πραγματοποιηθεί όπως περιγράφηκε στη Δράση 1. Η ελεύθερη οξύτητα θα μετρηθεί σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 61/2011. Για τον αριθμό υπεροξειδίων και για τους δείκτες διάθλασης θα πραγματοποιηθεί ανάλυση σύμφωνα με το ISO 3960:2001. Η α-τοκοφερόλη θα μετρηθεί σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει δημοσιευθεί από **Gliszczynska-Swiglo et al. (2004)**. Τα λιπαρά οξέα θα αναλυθούν σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 129662. Η οργανοληπτική αξιολόγηση θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με την οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης EU Regulation No 1348/2013. Η μέτρηση της α-τοκοφερόλης και των 1,2-διγλυκεριδίων θα πραγματοποιηθεί όπως περιγράφηκε αναλυτικά στη Δράση 1.

Το πακέτο των παραπάνω αναλύσεων θα πραγματοποιηθεί σε 4 κατηγορίες δειγμάτων:

- 1) Διφασικό Παλαιόκηπου Control
- 2) Διφασικό Παλαιόκηπου Σ.Π.Ε.
- 3) Τριφασικό Τζώρτζη Control
- 4) Τριφασικό Τζώρτζη Σ.Π.Ε.

Ο χρόνος t_0 είναι καθοριστικός, εφόσον εδώ θα διαπιστωθεί αν όντως δεν έχουν επηρεαστεί οι βιοδραστικές ουσίες από την διήθηση στο Σταθερό Παραγόμενο Ελαιόλαδο, σε σχέση με το ακατέργαστο, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μεταξύ Control – Σ.Π.Ε.

Στη συνέχεια τα δείγματα θα αποθηκεύονται σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25°C και στους 4°C, σε φιάλες του 1L.

Μετά από 1 μήνα από τον t_0 , θα επαναλαμβάνονται όλες οι αναλύσεις στα δείγματα και των 2 θερμοκρασιών. Τα αρχικά δείγματα έξτρα παρθένων ελαιολάδων που θα χρησιμοποιηθούν είναι 8 και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.6**.

Πίνακας 2.6: Παραγωγές έξτρα παρθένων ελαιολάδων που θα διατηρηθούν για τη συνέχεια των πειραμάτων στους 25°C και 4°C.

25°C	4°C
Διφασικό Παλαιόκηπου Control	Διφασικό Παλαιόκηπου Control
Διφασικό Παλαιόκηπου Σ.Π.Ε.	Διφασικό Παλαιόκηπου Σ.Π.Ε.
Τριφασικό Τζώρτζη Control	Τριφασικό Τζώρτζη Control
Τριφασικό Τζώρτζη Σ.Π.Ε.	Τριφασικό Τζώρτζη Σ.Π.Ε.

Οι αναλύσεις θα επαναλαμβάνονται κάθε μήνα για τους πρώτους 6 μήνες, και έπειτα κάθε 3 μήνες, μέχρι τον 36ο μήνα, όπως περιγράφεται στον **Πίνακα 2.7**.

Σε κάθε χρονικό σημείο, μία φιάλη από το κάθε δείγμα θα ανοίγεται για να γίνουν οι απαραίτητες αναλύσεις. Τα υπόλοιπα θα παραμένουν σε θερμοκρασίες δωματίου/ψυγείου, αντίστοιχα.

Πίνακας 2.7: Αναλύσεις των έξτρα παρθένων ελαιολάδων από τον 1^ο-36^ο μήνα

Control 2φ. 25°C	Control 2φ. 4°C	2φ. Σ.Π.Ε. 25°C	2φ. Σ.Π.Ε. 4°C	Control 3φ. 25°C	Control 3φ. 4°C	3φ. Σ.Π.Ε. 25°C	3φ. Σ.Π.Ε. 4°C
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6
9	9	9	9	9	9	9	9
12	12	12	12	12	12	12	12
15	15	15	15	15	15	15	15
17	17	17	17	17	17	17	17
21	21	21	21	21	21	21	21
24	24	24	24	24	24	24	24
27	27	27	27	27	27	27	27
30	30	30	30	30	30	30	30
33	33	33	33	33	33	33	33
36	36	36	36	36	36	36	36

2.3 Δράση 3: Ελαιόλαδο με υψηλή διατροφική αξία ως συμπλήρωμα διατροφής και ενισχυτικό γεύσης

Η δράση αυτή θα ξεκινήσει με την έναρξη της ελαιοκομικής περιόδου 2018-2019. Σκοπός είναι να πραγματοποιηθούν τα παρακάτω:

- Ανάδειξη του υψηλού βιοδραστικού περιεχόμενου ελαιολάδου Κολοβής και Κορωνέικης από καινοτόμο διφασικό σύστημα παραγωγής
- Ελαιόλαδο για ενίσχυση γεύσης και βιοδραστικού περιεχόμενου για μειονεκτικά ελαιόλαδα
- Ελαιόλαδο για encapsulation και παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής

Θα χρησιμοποιηθεί καινοτόμο διφασικό σύστημα έκθλιψης, χωρίς χρήση νερού, για την παραγωγή ελαιολάδου από Κορωνέικη και Κολοβή με υψηλό βιοδραστικό περιεχόμενο. Το σύστημα αυτό θα είναι φορητό και θα πραγματοποιηθούν εκθλίψεις σε ελιές με και χωρίς κουκούτσι. Εξαιτίας των ιδιαίτερων γευστικών ιδιοτήτων του, το παραγόμενο αυτό ελαιόλαδο αυτό δε θα μπορεί να καταναλωθεί άμεσα. Ωστόσο, θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί: (1) για ενισχυτικό γεύσης και βιοδραστικού περιεχόμενου μειονεκτικών ελαιολάδων, και (2) ως πρώτη ύλη για συμπληρώματα διατροφής με βάση το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Θα παραχθούν με αυτό το σύστημα σειρά δειγμάτων σε διαφορετικές εποχές και θα πραγματοποιηθεί το παρακάτω πακέτο αναλύσεων, όπως περιγράφηκε παραπάνω: Οξύτητα, Κ/ΔΚ, υπεροξειδία, οργανοληπτική αξιολόγηση, κηροί-αιθυλεστέρες, λιπαρά οξέα, στερόλες, 1,2-διγλυκερίδια, πυροφαιοφυτίνη, και αντιοξειδωτικά-βιοδραστικές ενώσεις.

2.4 Δράση 4: Βρώσιμη ελιά και πάστα ελιάς

Σκοπός της Δράσης 4 είναι η διερεύνηση του βιοδραστικού περιεχόμενου των βρώσιμων ελιών και της πάστας ελιάς που παράγονται στο Β. Αιγαίο από διαφορετικούς τύπους επεξεργασίας. Η δράση αυτή θα ξεκινήσει κατά τον 8^ο μήνα και θα ολοκληρωθεί τον 21^ο. Η δράση περιλαμβάνει:

- Μελέτη του φαινολικού αποτυπώματος των βρώσιμων ελιών και της πάστας ελιάς
- Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τύπων επεξεργασίας στο βιοδραστικό περιεχόμενο και στη γεύση
- Ανάδειξη προϊόντων με ένδειξη υγείας

Θα πραγματοποιηθεί έρευνα του περιεχόμενου βιοδραστικών ενώσεων σε βρώσιμες ελιές Κολοβής που έχουν παραχθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους καθώς και σε πάστα ελιάς (πράσινη – μαύρη). Θα αναδειχθεί το περιεχόμενο σε φαινολικές ενώσεις και θα τεκμηριωθεί το βιοδραστικό τους περιεχόμενο και η ευεργετική τους επίδραση στην υγεία, με σκοπό την ενίσχυση της ανταγωνιστικότητας των προϊόντων. Οι αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν θα είναι πριν από την επεξεργασία (ανάλυση πρώτων υλών, ασφάλεια) και στα τελικά προϊόντα (διατροφική αξία, βιοδραστικά συστατικά, λιπαρά οξέα). Ο εκτιμώμενος αριθμός των δειγμάτων είναι 60 (20 δείγματα από ελιές, 20 δείγματα από πάστες (10 δείγματα × 2 διαφορετικές συνταγές), 20 δείγματα από βρώσιμες (10 δείγματα × 2 διαφορετικές συνταγές)). Θα γίνουν

αναλύσεις για αντιοξειδωτικά-βιοδραστικές ενώσεις, για τη διατροφική επισήμανση, τα υπεροξειδία, τον αριθμό ανισιδίνης, τα μέταλλα και φυτοφάρμακα.

Η παραγωγική διαδικασία της επιτραπέζιας ελιάς περιλαμβάνει την παραλαβή των ελαιοκαρπών και των βοηθητικών υλών. Η διαλογή πραγματοποιείται σε ειδικό διαλογέα και ακολουθεί ξέπλυμα με νερό. Οι ελαιοκαρποί τοποθετούνται σε δεξαμενές με νερό και πραγματοποιείται τακτική αλλαγή του νερού των δεξαμενών. Ακολουθεί στράγγισμα και διαλογή σε ειδικό διαλογέα. Οι ελιές, στη συνέχεια, τοποθετούνται σε λευκοσιδηρά δοχεία χωρητικότητας 6 ή 13 κιλών, προστίθεται άλμη για να επιτευχθεί αλατότητα 8 βαθμών baume και προστίθενται 2 κομμάτια λεμονιού ανά δοχείο. Τα δοχεία σφραγίζονται και αποθηκεύονται.

Οι ελιές που θα αναλυθούν θα είναι *Τσακιστές*, *Δαμαστές* και ελιές σε άλμη *Νερολιές*. Η επεξεργασία που θα πραγματοποιηθεί για τις *Τσακιστές* είναι ξεπίκρισμα σε νερό, με καθημερινή αλλαγή νερού, προσθήκη άλμης 8% και συσκευασία σε νέα άλμη. Για τις *Δαμαστές*, θα γίνει ξεπίκρισμα σε ξηρό αλάτι, προσθήκη άλμης 8% και στσκευσία χωρίς προσθήκη νερού ή άλμης. Για τις *Νερολιές* θα πραγματοποιηθεί ξεπίκρισμα με νερό. Θα παραμείνουν στο ίδιο νερό για 4 έως 6 μήνες, θα προστεθεί άλμη 8% για περίπου 3 μήνες ώστε να πραγματοποιηθεί γαλακτική ζύμωση. Το τελικό προϊόν στη συσκευασία θα περιέχει νέα άλμη.

Η μέθοδος που έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί στο Εργαστήριο για τον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών σε επιτραπέζιες ελιές είναι η παρακάτω:

Αφαιρείται ο πυρήνας από τις βρώσιμες ελιές και στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιείται. Ζυγίζεται σε erpendorf 0,5 g. από το ομογενοποιημένο δείγμα το οποίο εμβολιάζεται με εσωτερικό πρότυπο μυρισετίνη σε τελική συγκέντρωση 1 mg kg^{-1} . Στο δείγμα προστίθεται μίγμα μεθανόλης-νερού (80:20, v/v) για την εκχύλιση. Πραγματοποιείται ανακίνηση σε vortex για 1 λεπτό. Έπειτα, το εκχύλισμα παραλαμβάνεται, διηθείται σε φίλτρα αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL RC) και εισέρχεται στο χρωματογραφικό σύστημα. Η μέθοδος έχει επικυρωθεί και τα στοιχεία της επικύωσης εμφανίζονται στον **Πίνακα 2.8**.

Πίνακας 2.8: Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου προσδιορισμού φαινολικών ουσιών σε επιτραπέζιες ελιές.

Ενώσεις	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Επαναληψι- μότητα RSD _r % (n=3)	Αναπαραγωγι- μότητα RSD _R % (n=3×2)	Γραμμικότητα y= (a±Sa)+(b±Sb)x γραμμική περιοχή: 0.02-10 mg kg ⁻¹	r ²	%RE	%ME
Γαλλικό οξύ	0.035	0.098	4.5	5.2	y = (0.04±0.03)+(0.11±0.09)x	0.991	101	-10.2
p-Κουμαρικό οξύ	0.041	0.096	5.4	6.2	y = (0.03±0.02)+(0.04±0.01)x	0.991	87.1	-11.8
Φερουλικό οξύ	0.039	0.089	5.7	6.4	y = (0.05±0.04)+(0.037±0.006)x	0.994	83.2	-15.9
Συρινγγικό οξύ	0.032	0.092	6.4	6.8	y = (0.007±0.002)+(0.07±0.01)x	0.992	92.4	-17.4
Ομοβανιλλικό οξύ	0.034	0.085	4.2	6.1	y = (0.005±0.002)+(0.02±0.01)x	0.995	90.4	-12.9
Τυροσόλη	0.035	0.094	4.8	5.9	y = (-0.006±0.003)+(0.031±0.005)x	0.997	92.4	-9.75
Υδροξυτυροσόλη	0.038	0.079	3.9	5.1	y = (-0.027±0.004)+(0.09±0.06)x	0.994	91.5	-11.1
Πινρεξινόλη	0.021	0.078	4.1	4.4	y = (-0.009±0.004)+(0.03±0.01)x	0.993	95.1	-8.09
Απιγενίνη	0.019	0.056	4.8	5.1	y = (0.10±0.07)+(0.25±0.37)x	0.992	104	-18.8
Ελαιοευρωπεΐνη	0.027	0.074	3.6	4.9	y = (-0.019±0.002)+(0.13±0.02)x	0.994	90.1	-13.7
Βανιλίνη	0.034	0.076	4.7	6.1	y = (-0.02±0.01)+(0.19±0.07)x	0.996	86.7	-16.5
Καφεϊκό οξύ	0.029	0.088	5.6	6.3	y = (-0.03±0.01)+(0.171±0.004)x	0.993	82.5	-15.2
Επικατεχίνη	0.036	0.082	4.8	5.5	y = (-0.02±0.01)+(0.046±0.007)x	0.992	81.4	-19.4
Λουτεολίνη	0.023	0.069	3.9	4.4	y = (-0.015±0.001)x+(0.03±0.02)x	0.991	94.0	-9.41
LOD: όριο ανίχνευσης, LOQ: όριο ποσοτικοποίησης, r ² : συντελεστής παλινδρόμησης, RSD: σχετική τυπική απόκλιση, RE: ανάκτηση, ME: επίδραση μήτρας								

2.5 Δράση 5: Αξιοποίηση κατσίγαρου, ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς

Στόχος αυτής της δράσης είναι η εύρεση βιοδραστικών ουσιών κατσίγαρου, ελαιοπυρήνα και φύλλων ελιάς και αξιοποίηση τους. Θα πραγματοποιηθεί ανάλυση ως προς το βιοδραστικό περιεχόμενο του φρέσκου κατσίγαρου από τριφασικά συστήματα παραγωγής και της ελαιοπυρήνας από διφασικά ελαιοτριβεία. Θα ερευνηθεί το περιεχόμενο των βιοδραστικών των φύλλων ελιάς. Θα ερευνηθεί η ανάκτηση βιοδραστικών ενώσεων (τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης, ελαιοευρωπεΐνης και προϊόντων αυτής) με φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία με χρήση απόσταξης με τη βοήθεια ηλιακού συλλέκτη. Θα διερευνηθεί η παραγωγή συμπληρώματος διατροφής ή άλλων προϊόντων κοσμετολογίας μετά από κατάλληλη αλλά απλή επεξεργασία.

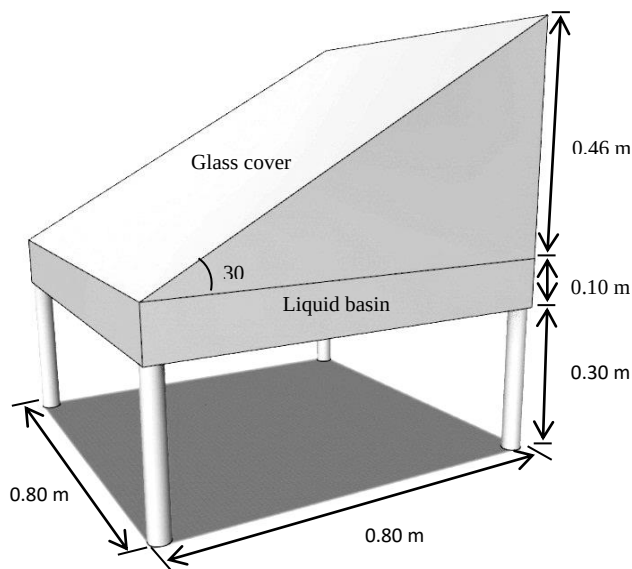
Στα πλαίσια της Δράσης 5 του έργου, αρχικά θα πραγματοποιηθεί ανάλυση του βιοδραστικού περιεχομένου α) των υγρών αποβλήτων τριφασικών ελαιοτριβείων (κατσίγαρου), β) της παραγόμενης πυρήνας σε διφασικά ελαιοτριβεία (alperujo) και γ) άλλων παραπροϊόντων της παραγωγικής διαδικασίας όπως τα φύλλα ελιάς. Δείγματα θα συλλεχθούν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και από διαφορετικά ελαιοτριβεία ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος της παραγωγικής διαδικασίας που ακολουθείται και των καλλιεργητικών πρακτικών στα επίπεδα των συγκεντρώσεων των ουσιών-στόχων στα δείγματα των παραπροϊόντων. Οι συγκεκριμένες αναλύσεις θα πραγματοποιηθούν από το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στη συνέχεια θα ερευνηθεί η δυνατότητα ανάκτησης βιοδραστικών ουσιών από τα απόβλητα με χρήση τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον. Με χρήση εργαστηριακών διατάξεων, θα μελετηθεί αρχικά πώς οι συνθήκες της απόσταξης, η προέλευση των ελαιουργικών παραπροϊόντων, οι συνθήκες παραγωγής τους και η περίοδος αποθήκευσής τους επηρεάζουν την παρουσία και τη συγκέντρωση βιοδραστικών ουσιών στο απόσταγμα. Στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί διάταξη ηλιακής απόσταξης, που είναι διαθέσιμη στο Τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου (**Σχήμα 2.1**), και θα μελετηθούν υπό πραγματικές συνθήκες πεδίου και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, ο χρόνος απόσταξης, τα χημικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος (pH, αγωγιμότητα, ολικές φαινόλες) και οι συγκεντρώσεις των περιεχόμενων αντιοξειδωτικών ουσιών κατά τη διαδικασία παραγωγής του αποστάγματος. Κατά τη λειτουργία

της διάταξης ηλιακής απόσταξης θα καταγράφονται οι περιβαλλοντικές συνθήκες (ηλιακή ακτινοβολία, θερμοκρασία περιβάλλοντος) καθώς και οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται εντός του αποστακτήρα. Παράλληλα θα πραγματοποιηθούν πειράματα για τον προσδιορισμό του αντιοξειδωτικού δυναμικού των συλλεχθέντων αποσταγμάτων ώστε να εκτιμηθεί κατά πόσο έχει ενδιαφέρον η άμεση χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών ή αν θα πρέπει να προηγείται καθαρισμός τους και απομόνωση των περιεχόμενων βιοδραστικών ουσιών.

Τέλος, πειράματα θα πραγματοποιηθούν για να διερευνηθεί η δυνατότητα ανάκτησης αντιοξειδωτικών ενώσεων από τα φύλλα της ελιάς. Θα πραγματοποιηθεί χημικός χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων και εκτίμηση του αντιοξειδωτικού τους δυναμικού.

Το σύνολο των ανωτέρω πειραμάτων θα πραγματοποιηθεί στο τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου, ενώ οι αναλύσεις των βιοδραστικών ενώσεων θα γίνουν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.



Σχήμα 2.1: Αποστακτήρας Τμήματος Περιβάλλοντος, Πανεπιστημίου Αιγαίου

Για την ανάλυση του κατσίγαρου, θα ακολουθηθεί η πορεία προκατεργασία όπως περιγράφηκε στη Δράση 1. Για την προκατεργασία της ελαιοπυρήνας η μέθοδος συνοψίζεται στα εξής: το δείγμα αρχικά ομογενοποιείται, έπειτα ζυγίζεται 0,5 g σε φυαλίδιο Eppendorf και εμβολιάζεται με εσωτερικό πρότυπο μυρισετίνη 2 mg kg⁻¹. Ακολουθεί εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης-νερού (80:20, v/v). Το εκχύλισμα παραλαμβάνεται και διηθείται σε φιλτράκια αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL RC). Έπειτα, ενίεται στο χρωματογραφικό σύστημα. Για την προκατεργασία των φύλλων η μέθοδος περιλαμβάνει ομογενοποίηση του δείγματος, ζύγιση 0,5 g σε Eppendorf και εμβολιασμό με εσωτερικό πρότυπο μυρισετίνη 2 mg kg⁻¹. Ακολουθεί εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης-νερού (80:20, v/v) και το εκχύλισμα παραλαμβάνεται και διηθείται σε φιλτράκια αναγεννημένης κυτταρίνης (CHROMAFIL RC) πριν την έγχυσή του στο LC-QTOF-MS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- R. Aalizadeh, N.S. Thomaidis, A.A. Bletsou, and P. Gago-Ferrero, Quantitative Structure-Retention Relationship Models To Support Nontarget High-Resolution Mass Spectrometric Screening of Emerging Contaminants in Environmental Samples, *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 56, no. 7, 2016, pp. 1384-1398.
- M. Becerra-Herrera, M. Sánchez-Astudillo, R. Beltrán, and A. Sayago, Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 57, no. 1, 2014, pp. 49-57.
- S. Christophoridou, P. Dais, L-H Tseng, and M. Spraul, Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling High Performance Liquid Chromatography with post column solid phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR), *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, 2005, pp. 4667-4669.
- A. Gliszczynska-Swigło and E. Sikorska, Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils, *Journal of Chromatography A*, 1048, 2004, pp. 195-198.
- N.P. Kalogiouri, R. Aalizadeh, and N.S. Thomaidis, Investigating the organic and conventional production type of olive oil with target and suspect screening by LC-QTOF-MS, a novel semi-quantification method using chemical similarity and advanced chemometrics, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, no. 23, 2017, pp. 5413-5426.
- N.P. Kalogiouri, R. Aalizadeh, N. S. Thomaidis, Application of an advanced and wide scope non-target screening workflow with LC-ESI-QTOF-MS and chemometrics for the classification of the Greek olive oil varieties, *Food Chemistry*, 2018, vol. 256, pp. 53-61.
- N.P. Kalogiouri, N.A. Alygizakis, R. Aalizadeh, and N.S. Thomaidis, Olive oil authenticity studies by target and nontarget LC-QTOF-MS combined with advanced chemometric techniques, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 28, 2016, pp. 7955-7970.
- P. Kanakis et al., From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites, *Planta Medica*, vol. 79, no. 16, 2013, pp. 1576-1587.
- I. Karabagias et al., Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses, *Food Research International*, vol. 54, no. 2, 2013, pp. 1950-1958.
- E. Karkoula, A. Skantzari, E. Melliou, and P. Magiatis, Quantitative measurement of major secoiridoid derivatives in olive oil using qNMR. Proof of the artificial formation of aldehydic oleuropein and ligstroside aglycon isomers, *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no.3, 2014, pp.600-607.

T.J. Klen and B. Mozetic Vodopivec, Ultrasonic Extraction of Phenols from Olive Mill Wastewater: Comparison with Conventional Methods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2011, pp. 12725–12731.σϭ

I. Kosma et al., Characterization and Classification of Extra Virgin Olive Oil from Five Less Well-Known Greek Olive Cultivars, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 93, no. 6, 2016, pp. 837-848.

E. Koutsoyannos et al., Quality parameters of olive oil from stoned and nonstoned Koroneiki and Megareitiki Greek olive varieties at different maturity levels, *Gracas y Aceites* 66, 1, 2015, e067, doi: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0711142>.

A. Piscopo and M. Poiana, Packaging and Storage of Olive Oil, *Olive Germplasm-The Olive cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*, I. Muzzalupo, ed., 2012, doi:10.5772/51827.

E. Stefanoudaki, M. Williams, and J. Harwood, Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 112, no. 8, 2010, pp. 906-914.