

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ Π. ΚΟΪΔΗ**

ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ, M. Sc.

**ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΘΟΛΟΥ ΚΑΙ  
ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ  
ΗΣΣΟΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2007

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ ΚΟΪΔΗ**  
**ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΧΗΜΙΚΟΥ, M. Sc.**

**ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΘΟΛΟΥ ΚΑΙ**  
**ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ**  
**ΗΣΣΟΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τομέα Χημικής και Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία προφορικής εξέτασης: 14-12-2007

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Δ. ΜΠΟΣΚΟΥ**

τ. Καθηγητής

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αναπλ. Καθηγήτρια Θ. ΧΟΛΗ-ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ	μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Επικ. Καθηγητής Γ. ΜΠΛΕΚΑΣ	μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής
Καθηγητής Ν. ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ	Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών
Καθηγητής Β. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Καθηγητής Δ. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Αναπλ. Καθηγητής Β. ΚΙΟΣΣΕΟΓΛΟΥ	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. ΤΣΙΜΙΔΟΥ	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2007**

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε από τη Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος Χημείας για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του υποψήφιου διδάκτορα κ. Αναστασίου Κοΐδη συνήλθε την Παρασκευή 14 Δεκεμβρίου 2007 και ώρα 12.30 στην αίθουσα Συνεδριάσεων του Τμήματος Χημείας και αφού παρακολούθησε την ανάπτυξη της διατριβής με τίτλο «Ανάδειξη των διαφορών μεταξύ θολού και διηθημένου ελαιολάδου σε σχέση με την παρουσία ησσόνων συστατικών» που παρουσίασε ο υποψήφιος έκρινε ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της επιστήμης.

#### ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αναπλ. Καθηγήτρια Θ. Χολή-Παπαδοπούλου  
(μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής)

Επικ. Καθηγητής Γ. Μπλέκας  
(μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής)

Καθηγητής Ν. Ανδρικόπουλος

Καθηγητής Β. Παπαγεωργίου

Καθηγητής Δ. Παπαγεωργίου

Αναπλ. Καθηγητής Β. Κιοσέογλου

Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. Τσιμίδου

© Αναστάσιος Π. Κοΐδης

© Α.Π.Θ.

«Ανάδειξη των διαφορών μεταξύ θολού και διηθημένου ελαιολάδου σε σχέση με την παρουσία ησσόνων συστατικών»

ISBN

«Η έγκριση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως».

Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2

*Στους γονείς μου, Στέλλα και Παύλο ...*

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη των ιδιοτήτων του θολού ελαιολάδου, δηλαδή του ελαιολάδου που παραλαμβάνεται από τις ελιές, δεν έχει διηθηθεί και διατηρεί θολή όψη, και η ανάδειξη των διαφορών του από το αντίστοιχο διηθημένο σε ό,τι αφορά την περιεκτικότητα σε ήσσονα συστατικά, ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την παρουσία μικροοργανισμών.

Το πειραματικό μέρος της διατριβής πραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος του στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2003-Δεκέμβριος 2006. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε πείραμα διερεύνησης της φύσης του πρωτεϊνικού κλάσματος του ελαιολάδου στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας, κ. Θ. Χολή-Παπαδοπούλου. Τα φάσματα NMR και ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου έγιναν στο Εργαστήριο NMR του Τμήματος Χημείας του Παν/μιου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Φ. Νταή. Οι παρατηρήσεις σε οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ο προσδιορισμός νερού και θολερότητας σε δείγματα ελαιολάδου έγιναν στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου της Λεόν (Ισπανία), υπό την επίβλεψη του Επίκ. Καθηγητή J. Mateo.

Εκφράζω τις θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή της Χημείας Τροφίμων, κ. Δ. Μπόσκου, επιβλέποντα της διατριβής, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και τη μεγάλη υπομονή του προς το πρόσωπό μου τα τέσσερα χρόνια που διήρκησε η διατριβή, καθώς και για τη βοήθεια του στη συγγραφή και παρουσίασή της. Τον ευχαριστώ, επίσης, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω στο εκπαιδευτικό σεμινάριο “Novel and Functional Foods” που πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο της Σλοβακίας, στη Nitra, μεταξύ 27 Ιανουαρίου και 7 Φεβρουαρίου 2003.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω τον Επίκ. Καθηγητή κ. Γ. Μπλέκα, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις κριτικές παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους καθώς και τις πολύτιμες διορθώσεις που συνέβαλαν στην αρτιότερη εμφάνιση της διατριβής. Επίσης τον ευχαριστώ για την οικονομική στήριξη που προσέφερε δίνοντας μου την ευκαιρία να συμμετέχω σε ερευνητικό πρόγραμμα που ήταν επιστημονικός υπεύθυνος.

Ευχαριστώ την Αν. Καθηγήτρια κ. Δ. Χολή-Παπαδοπούλου, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη διάθεση όλων των υλικών μέσων κατά την παραμονή μου στο Εργαστήριο Βιοχημείας και την καθοδήγηση της σε όλη την πειραματική διαδικασία. Την ευχαριστώ επίσης για τη μεσολάβηση ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάλυση ενός δείγματος πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο στο Kihara Institute for Biological Research (Γιοκοχάμα, Ιαπωνία) από τον συνεργάτη της Prof. Hisashi Hirano.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Β. Παπαγεωργίου και κ. Δ. Παπαγεωργίου από το Τμήμα Χημικών Μηχανικών και την Κτηνιατρική Σχολή του ΑΠΘ, αντίστοιχα, καθώς και τον Καθηγητή κ. Ν. Ανδρικόπουλο από το Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκόπειου Παν/μιου Αθηνών, μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για τις υποδείξεις τους στη διόρθωση των δοκιμίων.

Θερμότατες ευχαριστίες στον Αν. Καθηγητή κ. Β. Κιοσέογλου, μέλος της επταμελούς επιτροπής, για τις υποδείξεις του στο σχεδιασμό των φυσικοχημικών πειραμάτων, τη φιλική του διάθεση και τις συμβουλές του.

Την Αν. Καθηγήτρια κ. Μ. Τσιμίδου, μέλος της επταμελούς επιτροπής, ευχαριστώ πολύ για την επίβλεψη και καθοδήγησή της στην ανάλυση φωσφολιπιδίων ελαιολάδου με υγρή χρωματογραφία που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο. Την ευχαριστώ επίσης για τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις της και ακόμα, για την ευκαιρία που μου παρείχε να συμμετάσχω στο εκπαιδευτικό σεμινάριο “Chemistry & Biochemistry of Antioxidants, their effects on health, and risk evaluation of their use as food ingredients” που πραγματοποιήθηκε στο Wageningen Univeristy της Ολλανδίας (23-29 Νοεμβρίου 2003).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις εταιρείες ΕΛΑΪΣ Α.Ε, ΣΤΑΤΗΡ (Χαλκιδική), BIOLEA Α.Ε.(Κρήτη), και ΨΥΛΛΑΚΗΣ (Κρήτη) καθώς και τον παραγωγό κ. Α. Μπλέκα (Επανομή, Θεσ/νίκης) για την ευγενική παραχώρηση των δειγμάτων ελαιολάδου. Κυρίως, όμως, θέλω να ευχαριστήσω την εταιρία Δ.ΕΛ.Α (Άρτα) και ιδιαίτερα τη Χρυσάνθη Σεργιάνη που μεσολάβησε για τη δωρεά πολλών δειγμάτων ελαιολάδου την περίοδο 2004-2005.

Ευχαριστίες εκφράζω προς τον Καθηγητή κ. Φ. Νταή και το διδάκτορά του, Μανόλη Χατζάκη, για τις αναλύσεις φασμάτων NMR και τις παρατηρήσεις τους στην σύνταξη των πειραματικών αποτελεσμάτων που τους αφορούσαν. Η συνεργασία μαζί τους υπήρξε παραπάνω από άψογη. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Μανόλη για την φιλοξενία

του στην εκπαιδευτική επίσκεψη μου στην Κρήτη στο Εργαστήριο NMR (Ιούνιος 2007).

Πολλά ευχαριστώ στους Professor J. Mateo, Mr. A. Sánchez Rodriguez (Εργαστήριο Οπτικής και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας), Dr M.T. Osorio και J. Osorio για την ποικίλη βοήθεια που μου παρείχαν και την άριστη φιλοξενία και συνεργασία κατά την παραμονή μου στην Ισπανία.

Ευχαριστώ από βάθους καρδιάς το Λευτέρη Τριανταφύλλου, Κτηνίατρο του Στρατού, για τη μεγάλη βοήθειά του στα πειράματα μικροβιολογίας που διεξήχθησαν στη Κτηνιατρική Σχολή. Ευχαριστώ επίσης το Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Καθηγητή Π. Κοϊδή, για τη διάθεση του υλικοτεχνικού εξοπλισμού και τις υποδείξεις του στο πειραματικό σχεδιασμό και στη διόρθωση των δοκιμίων. Ευχαριστώ, επίσης, την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της ίδιας σχολής, κ. Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου, για τη συμβολή της στην ταυτοποίηση των μυκήτων των δειγμάτων καθώς και το στατιστικολόγο Καθηγητή κ. Χ. Μπάτζιο.

Επίσης ευχαριστώ:

Το διδάκτορα Φίλιππο Κοτάκη από το Εργαστήριο Βιοχημείας για την εκπαίδευση στις τεχνικές της ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου και για τη συνεχή βοήθειά του στο εργαστήριο.

Τους Κατερίνα Βογιατζή και Ανέστη Δούγκα, τότε προπτυχιακοί φοιτητές και σήμερα πτυχιούχοι του Τμήματος για την άριστη συνεργασία στα πλαίσια της διπλωματικής τους εργασίας.

Τους πολύτιμους συνεργάτες και φίλους στο Εργαστήριο, Γιώργο Καλατζάκη (ιδιαίτερα ευχαριστώ), Χρυσάνθη Σεργιάνη, Νίκο Νενάδη, Στέλλα Ορδούδη, Φανή Ματζουρίδου και Δέσποινα Γρηγοριάδου, καθώς και όλα τα παιδιά που δουλέψαμε μαζί αυτά τα χρόνια.

Τους αγαπημένους μου γονείς και την αδερφή μου, Μαρία, για τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση που μου προσέφεραν.

*Τέλος, ευχαριστώ πάρα πολύ την Teresa για όλα αυτά που δεν λέγονται με λέξεις...*

**Τάσος Κοϊδης**  
**Θεσσαλονίκη, Οκτώβριος 2007**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ.....</b>	<b>3</b>
1.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ .....	3
1.3.2. ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ .....	4
<b>1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....</b>	<b>7</b>
1.5.1. ΠΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	7
1.5.2. ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ.....	10
1.5.3. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	13
1.5.4. ΛΟΙΠΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....	14
1.5.4.1. Τριακυλογλυκερόλες .....	14
1.5.4.2. Μονο- και διακυλογλυκερόλες .....	15
1.5.4.3. Υδρογονάνθρακες .....	15
1.5.4.4. Στερόλες.....	15
1.5.4.5. Αλειφατικές και διτερπενοειδείς αλκοόλες.....	16
1.5.4.6. Τοκοφερόλες .....	16
1.5.4.7. Χρωστικές.....	16
1.5.4.8. Τριτερπενικά οξέα .....	17
1.5.4.9. Πτητικά συστατικά .....	17
<b>1.6. Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....</b>	<b>17</b>
1.6.1. ΓΕΝΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ.....	17
1.6.2. ΕΛΑΙΟΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΣΙΝΕΣ.....	19
1.6.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.....	20
<b>1.7. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....</b>	<b>22</b>
1.7.1. ΩΡΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ .....	22
1.7.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕΧΡΙ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ .....	22
1.7.3. ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑ - ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ - ΠΛΥΣΙΜΟ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟ.....	23
1.7.4. ΕΚΘΛΙΨΗ.....	23
1.7.5. ΜΑΛΑΞΗ.....	24
1.7.6. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ.....	24
1.7.7. ΔΙΑΥΓΑΣΗ .....	26
1.7.8. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ .....	27

1.7.9.	<i>ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	28
<b>1.8.</b>	<b>ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ</b> .....	<b>28</b>
1.8.1.	<i>ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ</i> .....	28
1.8.2.	<i>Η ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	30
1.8.3.	<i>ΤΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ</i> .....	31
<b>1.9.</b>	<b>ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ</b> .....	<b>32</b>
1.9.1.	<i>ΧΗΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ</i> .....	32
1.9.2.	<i>ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	34
1.9.3.	<i>ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ</i> .....	35
<b>1.10.</b>	<b>ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ</b> .....	<b>38</b>
1.10.1.	<i>ΛΙΠΟΥΣΗ</i> .....	38
1.10.2.	<i>ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ</i> .....	38
1.10.3.	<i>ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΟΦΕΛΙΟΜΕΝΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ</i> .....	39
<b>1.11.</b>	<b>Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</b> .....	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b>ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>41</b>
<b>3.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>42</b>
3.1.1.	<i>ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	42
3.1.1.1.	Δείγματα που υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική εξέταση .....	42
3.1.2.	<i>ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ</i> .....	43
3.1.2.1.	Διαλύτες .....	43
3.1.2.2.	Αντιδραστήρια .....	43
3.1.3.	<i>ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΠΡΟΤΥΠΑ</i> .....	44
3.1.4.	<i>ΗΘΜΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</i> .....	45
<b>3.2.</b>	<b>ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3.</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>47</b>
3.3.1.	<i>ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ</i> .....	47
3.3.1.1.	Προσδιορισμός της οξύτητας, του αριθμού υπεροξειδίων και των ειδικών φασματοσκοπικών σταθερών $K_{232}$ , και $K_{270}$ .....	47
3.3.1.2.	Προσδιορισμός της οξειδωτικής σταθερότητας με χρήση συσκευής Rancimat .....	47
3.3.2.	<i>ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΗΣΣΟΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ</i> .....	48
3.3.2.1.	Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu .....	48
3.3.2.2.	Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου και, εμμέσως, φωσφολιπιδίων .....	49
3.3.2.3.	Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford .....	49

3.3.3.	<i>ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΟ ΑΙΘΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (Α.Σ.Σ.) ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	50
3.3.4.	<i>ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΟ ΑΙΘΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (Α.Σ.Σ.) ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	50
3.3.4.1.	Απομόνωση των Α.Σ.Σ. από «μούργα» ελαιολάδου.....	50
3.3.4.2.	Προσδιορισμός ολικών σακχάρων.....	51
3.3.4.3.	Προσδιορισμός ολικών φαινολών .....	51
3.3.4.4.	Προσδιορισμός τέφρας.....	51
3.3.4.5.	Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	51
3.3.4.6.	Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου και, εμμέσως, φωσφολιπιδίων .....	52
3.3.4.7.	Προσδιορισμός ακατέργαστων ινών (crude fibre) .....	52
3.3.5.	<i>ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ</i> .....	52
3.3.5.1.	Απομόνωση φωσφολιπιδίων από το ελαιόλαδο με εκχύλιση.....	52
3.3.5.2.	Ανάλυση φωσφολιπιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης .....	53
3.3.5.3.	Ανάλυση φωσφολιπιδίων με τεχνικές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	53
3.3.6.	<i>ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</i> .....	54
3.3.6.1.	Απομόνωση πρωτεϊνών από το ελαιόλαδο .....	54
3.3.6.2.	Απομόνωση πρωτεϊνών από τα Α.Σ.Σ. ....	54
3.3.6.3.	Απομόνωση πρωτεϊνών από το μεσοκάρπιο της ελιάς.....	54
3.3.6.4.	Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	55
3.3.6.5.	Στερέωση και βαφή πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου .....	56
3.3.6.6.	Δοκιμή πρωτεϊνάσης σε πρωτεϊνικά κλάσματα.....	57
3.3.6.7.	Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή SDS σε μεμβράνη.....	57
3.3.7.	<i>ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	58
3.3.7.1.	Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε νερό και μέτρηση θολερότητας.....	58
3.3.7.2.	Εξέταση στο μικροσκόπιο .....	58
3.3.7.3.	Προσδιορισμός του χρόνου καθίζησης .....	59
3.3.7.4.	Παρασκευή γαλακτωμάτων νερού σε ελαιόλαδο (w/o) και εκτίμηση της φυσικοχημικής σταθερότητάς τους.....	59
3.3.8.	<i>ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i> .....	60
3.3.8.1.	Παρατήρηση κυτταρικών υπολειμμάτων ελιάς και μικροοργανισμών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .....	60
3.3.8.2.	Άμεση καταμέτρηση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών .....	60
3.3.8.3.	Απομόνωση ζυμομυκήτων από το θολό ελαιόλαδο.....	61
3.3.8.4.	Αναγνώριση των ζυμομυκήτων με τη χρήση API 20C-AUX και των μυκήτων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου .....	61

3.3.8.5.	Ενζυμικές δράσεις των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από το θολό ελαιόλαδο .....	62
3.3.9.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	64
<b>4.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>65</b>
4.1.	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ – ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ .....	65
4.2.	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΛΩΤΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΘΟΛΟΥ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	67
4.3.	ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΦΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ .....	70
4.3.1.	ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΘΟΛΑ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΜΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ .....	70
4.3.2.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ.....	73
4.3.2.1.	Θεωρητικό μέρος: Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνων σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου .....	73
4.3.2.2.	Πειραματικό μέρος: διερεύνηση της φύσης του πρωτεϊνικού κλάσματος του ελαιολάδου.....	75
4.4.	ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ.....	83
4.4.1.	ΕΠΙΠΕΔΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ .....	83
4.4.2.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC). .....	85
4.4.3.	ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ <sup>31</sup> P-NMR. ....	89
4.4.3.1.	Θεωρητικό υπόβαθρο .....	89
4.4.3.2.	Πειρατικό μέρος: εξέταση των δειγμάτων .....	91
4.5.	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ .....	95
4.5.1.	ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	95
4.5.2.	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ Α.Σ.Σ. ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥΣ.....	102
4.5.3.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	106
4.6.	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ .....	110
4.6.1.	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	110
4.6.2.	ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ.....	113
4.6.3.	ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	116
<b>5.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ..</b>	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>124</b>
<b>7.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>126</b>
<b>8.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>127</b>
<b>9.</b>	<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>148</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1.</b>	Σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία (% m/m μεθυλικοί εστέρες).....	14
<b>Πίνακας 1.2.</b>	Σύσταση του μεσοκαρπίου της ελιάς .....	18
<b>Πίνακας 1.3.</b>	Ενδεικτική περιεκτικότητα απόνερων σε διάφορα συστατικά.....	21
<b>Πίνακας 4.1.</b>	Παράμετροι ποιότητας των 21 εξετασθέντων δειγμάτων ελαιολάδου	66
<b>Πίνακας 4.2.</b>	Δείκτης οξειδωτικής σταθερότητας (OSI) και περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες ορισμένων δειγμάτων θολού παρθένου ελαιολάδου πριν και μετά τη διήθησή τους. ....	68
<b>Πίνακας 4.3.</b>	Περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες των υπόλοιπων δειγμάτων ελαιολάδου που εξετάστηκαν.....	69
<b>Πίνακας 4.4.</b>	Οι ανακτήσεις των πολικών φαινολών σε υπόλειμμα ηθμού που προέκυψε από διήθηση ποσότητας 40 g τριών δειγμάτων θολού ελαιολάδου. ....	69
<b>Πίνακας 4.5.</b>	Πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δειγμάτων θολού και διαυγούς ελαιολάδου που εξετάστηκαν.....	72
<b>Πίνακας 4.6.</b>	Περιεκτικότητα δειγμάτων ελαιολάδου σε στοιχειακό φωσφόρο και φωσφολιπίδια.....	84
<b>Πίνακας 4.7.</b>	Σύσταση φωσφολιπιδικού κλάσματος του δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2».....	88
<b>Πίνακας 4.8.</b>	Χρόνοι διαύγασης δειγμάτων θολού και διηθημένου ελαιολάδου.....	95
<b>Πίνακας 4.9.</b>	Περιεκτικότητα σε νερό και θολερότητα δειγμάτων θολού και διαυγασμένου ελαιολάδου.....	100
<b>Πίνακας 4.10.</b>	Περιεκτικότητα δειγμάτων θολού ελαιολάδου σε Α.Σ.Σ. ....	102
<b>Πίνακας 4.11.</b>	Χημική σύσταση των Α.Σ.Σ. που παραλήφθηκαν από δείγμα «μούργας» ελαιολάδου.....	105
<b>Πίνακας 4.12.</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πρότυπων γαλακτωμάτων με ή χωρίς προσθήκη Α.Σ.Σ. ....	107

<b>Πίνακας 4.13.</b>	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρότυπων γαλακτωμάτων με ή χωρίς προσθήκη πρότυπης φωσφατιδυλοχολίνης (PC).....	108
<b>Πίνακας 4.14.</b>	Βιοχημικές δοκιμές του API 32 C-AUX για την αναγνώριση των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο. ....	116
<b>Πίνακας 4.15.</b>	Δοκιμές ενζυμικών δράσεων σε είδη ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα θολού ελαιολάδου.....	117

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.1.</b>	Μερίδιο επί της παραγωγής των πέντε κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατά μέσο όρο την περίοδο 2000/01-2003/04.....	4
<b>Σχήμα 1.2.</b>	Οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου .....	9
<b>Σχήμα 1.3.</b>	Συντακτικοί τύποι των κυριότερων φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου	12
<b>Σχήμα 1.4.</b>	Μορφολογία ελαιόκαρπου. ....	18
<b>Σχήμα 1.5.</b>	Η βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων στα ελαιosώματα και οι ελαιosίνες, οι πρωτεΐνες των μεμβρανών των ελαιosωμάτων.....	19
<b>Σχήμα 1.6.</b>	Διαγραμματική απεικόνιση την παραγωγής ελαιολάδου με τη χρήση (Α) κλασσικού πιεστηρίου και (Β) φυγοκεντρικού συγκροτήματος τριών φάσεων .....	25
<b>Σχήμα 1.7.</b>	Ο μηχανισμός αυτοξειδωσης.....	33
<b>Σχήμα 1.8.</b>	Καταλυτική δράση λιποξυγενάσης (Gardner, 1989).....	36
<b>Σχήμα 4.1.</b>	Υγροχρωματογραφήματα ενός δείγματος θολού ελαιολάδου («Άρτα 2») πριν και μετά τη διήθησή του.....	86
<b>Σχήμα 4.2.</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος δείγματος θολού ελαιολάδου «Χαλκιδική 5» σε λειτουργική συχνότητα 203,2 Hz.....	91
<b>Σχήμα 4.3.</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος δείγματος θολού ελαιολάδου «Δράμα» (Β) σε λειτουργική συχνότητα 203,2 Hz. ....	92
<b>Σχήμα 4.4.</b>	Φάσμα 203,2 Hz <sup>31</sup> P NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος των αδιάλυτων σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικών (Α.Σ.Σ.) ενός δείγματος ελαιολάδου. ....	93
<b>Σχήμα 4.5.</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας σε Α.Σ.Σ. δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» στη διάρκεια ετήσιας αποθήκευσής του (οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση της κάθε μέτρησης). ....	103

- Σχήμα 4.6.** Προτεινόμενο μοντέλο για την εξήγηση της αύξησης της συγκέντρωσης των Α.Σ.Σ. στη διάρκεια της αποθήκευσης θολού ελαιολάδου. .... 104
- Σχήμα 4.7.** Τα αντίστροφα μυκήλια (reversed micelles) στα γαλακτώματα νερού σε έλαιο..... 109
- Σχήμα 4.8.** Μεταβολές στον πληθυσμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δυο δείγματα θολού ελαιολάδου (—■— : «Χαλκιδική 1», - -▲ - - : «Άρτα 2») και ένα εμπορικό δείγμα ελαιολάδου (—●— : εμπορικό 4) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται δείγματα από το υπερκείμενο ενώ στη δεύτερη από τον πυθμένα των φιαλιδίων. .... 113
- Σχήμα 4.9.** Μεταβολές στον πληθυσμό των ζυμομυκήτων και των μυκήτων σε δυο δείγματα θολού ελαιολάδου (—■—, --▲ --) και 1 εμπορικό δείγμα ελαιολάδου (—●—) στη διάρκεια της αποθήκευσης. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται δείγματα από το υπερκείμενο ενώ η δεύτερη από τον πυθμένα των φιαλιδίων..... 114

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1.</b>	Θολερότητα ελαιολάδου αμέσως μετά την έξοδο από το φυγοκεντρικό διαχωριστήρα.....	27
<b>Εικόνα 4.1.</b>	Διαχωρισμός πρωτεϊνών δειγμάτων θολού ελαιολάδου με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12 %). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.	76
<b>Εικόνα 4.2.</b>	Διαχωρισμός πρωτεϊνών από δείγματα θολού ελαιολάδου με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12 %). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.	77
<b>Εικόνα 4.3.</b>	Δοκιμή δράσης πρωτεΐνωσης $K^+$ σε πρωτεΐνες του δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2» και σε πρότυπη πρωτεΐνη του αυγού με τη βοήθεια της SDS-PAGE (12%). Εμφάνιση με $AgNO_3$ .	79
<b>Εικόνα 4.4.</b>	Διαχωρισμός πρωτεϊνών μεσοκαρπίου ελαιόκαρπων και Α.Σ.Σ. δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» με την τεχνική SDS-PAGE (12%). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.....	80
<b>Εικόνα 4.5.</b>	Φωτογραφίες δειγμάτων ελαιολάδου σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα αποθήκευσης (διηθημένο: «Άρτα 1», θολό 1: «Άρτα 1», θολό 2: «Κρήτη 1», θολό 3: «Καλαμάτα 1»).	96
<b>Εικόνα 4.6.</b>	Φωτογραφίες θολού ελαιολάδου ( $t=0$ ) σε οπτικό μικροσκόπιο 400x. Α: δείγμα «Χαλκιδική 4» και Β: δείγμα «Άρτα 1» (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10 $\mu m$ ).....	98
<b>Εικόνα 4.7.</b>	Φωτογραφίες του δείγματος θολού ελαιολάδου «Δράμα», με οπτικό μικροσκόπιο (400 x), σε διαφορετικές χρόνους αποθήκευσης (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10 $\mu m$ ). Α. στην αρχική κατάσταση ( $t=0$ ), Β. μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης, Γ. μετά από 45 ημέρες αποθήκευσης .....	99
<b>Εικόνα 4.8.</b>	Φωτογραφίες των στερεών σωματιδίων σε δείγματα θολού ελαιολάδου. (Α) πριν την αποθήκευση ( $t=0$ ), (Β) μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10 $\mu m$ ).....	101

- Εικόνα 4.9.** Φωτογραφία καταβυθισμένου (μετά από αποθήκευση 30 ημερών) δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2» σε οπτικό μικροσκόπιο (400x) από περιοχή πλησίον του πυθμένα του δοχείου όπου η συγκέντρωση νερού είναι υψηλή (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10 μm)..... 111
- Εικόνα 4.10.** Φωτογραφίες βακτηρίων από το ίζημα στον πυθμένα φιαλιδίου που αποθηκεύτηκε το δείγμα ελαιολάδου «Άρτα 2» (t=90 ημέρες) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)..... 112

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ



**Ελιά.** Το δέντρο της Μεσογείου. «μέγιστον αγαθόν προς πάσαν του βίου θεραπείαν ο της ελιάς καρπός» (Σόλωνας, Αθήνα 5<sup>ος</sup> αιώνας π.Χ.) που «απάνω της τα παντ' ανοιχτά ο Μόριος Δίας και η γλαυκόφθαλμη Αθηνά έχουν τα μάτια» (Σοφοκλής, Οιδίπους επί Κολωνώ).

Το ελαιόδεντρο είναι δέντρο αειθαλές και ευδοκίμει σε ξηροθερμικές περιοχές. Είναι ένα από τα λιγιστά δέντρα που ακόμη και σε πετρώδη και άγονα εδάφη, μπορεί να παράγει καρπό. Η ελιά ονομάζεται στη βοτανική *Olea Europea Sativa*. Το γένος *Olea* έχει ως κύρια χαρακτηριστικά του, τη μακροζωία και τη διατήρηση της παραγωγικότητας. Σήμερα η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί την πιο εκτεταμένη καλλιέργεια στη χώρα και η Ελλάδα είναι η χώρα με την υψηλότερη κατ' άτομο κατανάλωση ελαιολάδου στον κόσμο.

Η ιστορία της ελιάς αρχίζει πριν από την επινοήση της γραφής, στα προϊστορικά χρόνια (Hurley, 1919). Οι Μινωίτες, εξαιρετικοί θαλασσοπόροι και έμποροι, διέδωσαν την καλλιέργεια του ελαιόδεντρου στα δυτικά παράλια της Μεσογείου. Σ' αυτό βοήθησαν και οι κλιματικοί παράγοντες που χαρακτηρίζουν μόνο τις χώρες της μεσογειακής λεκάνης που έχουν τις απαραίτητες συνθήκες για την ανάπτυξη σε τόσο σημαντικό βαθμό της καλλιέργειας του ελαιόδεντρου (Fooks, 1997). Ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τρόπο διάδοσης της ελιάς στην αρχαιότητα, είναι γεγονός ότι η καλλιέργειά της εξαπλώθηκε σε μεγάλη έκταση στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο και αυτός είναι ίσως ο λόγος της σημερινής της ονομασίας «Ελιά η Ευρωπαϊκή (*Olea Europea*)». Ειδικότερα στη λεκάνη της Μεσογείου, η ελιά αποτελεί τη βασική καλλιέργεια μέχρι και σήμερα.

Ο χυμός της ελιάς, το ελαιόλαδο, στην αρχή παραγόταν σε πέτρινο μύλο. Με το πέρασμα των χρόνων το εμπόριό του αποτέλεσε το σημαντικότερο γεωργικό εισόδημα. Οι διατροφικές συνήθειες και οι πρακτικές της μαγειρικής που αναπτύχθηκαν λόγω της αφθονίας του ελαιολάδου είναι γνωστές μέχρι τις μέρες μας ως “Μεσογειακή Διατροφή”. Το ελαιόλαδο έδωσε πλούτο και υγεία στους λαούς της Μεσογείου ενώ αναφέρεται σε μύθους, θρησκευτικές τελετές και παραδόσεις (Polymerou – Kamilakis, 2006).

## **1.2. ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ**

Το συμβούλιο της ΕΟΚ προχώρησε το έτος 1986 στην περιγραφή και τον ορισμό των ελαιολάδων και των πυρηνελαιών σύμφωνα με τον κοινοτικό Κανονισμό 136/86. Ο κανονισμός αυτός αντικαταστάθηκε από τον Κανονισμό 2568/91 της 11ης Ιουνίου του έτους 1991 (EC, 1991), ο οποίος ισχύει μέχρι σήμερα με τις ενδιάμεσες τροποποιήσεις που έχουν γίνει (EC, 1998, 2003). Η τελευταία τροποποίησή του έγινε με τον Κανονισμό 1989/03 (EC, 2003). Άλλοι νομοθετικοί φορείς είναι το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOOC) και ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας του Ο.Η.Ε. Στις αρμοδιότητες του τελευταίου ανήκει η σύνταξη του Codex Alimentarius.

Σύμφωνα με τους παραπάνω φορείς *«παρθένο ελαιόλαδο είναι το έλαιο που λαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο με αποκλειστικά μηχανικά και άλλα φυσικά μέσα, κάτω από συνθήκες που δεν θα οδηγήσουν στην αλλοίωσή του»*.

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών αναφέρει ότι ελαιόλαδο ή έλαιο ελιάς ονομάζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τον καρπό της Ελαιάς της Ευρωπαϊκής (*Olea Europea*), με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και οπωσδήποτε φυσικά, σε θερμοκρασία μικρότερη από εκείνη που μπορεί να προκαλέσει την αλλοίωσή του (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 71, 2004). Το ελαιόλαδο θεωρείται βρώσιμο εφόσον έχει οξύτητα μικρότερη από 2 g/100 g (εκφρασμένη ως ελαϊκό οξύ), χρώμα κίτρινο μέχρι πρασινοκίτρινο, οργανοληπτικές ιδιότητες άμεμπτες ή τουλάχιστον μη δυσάρεστες.

Το παρθένο ελαιόλαδο χωρίζεται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου (IOOC) και για τον Codex Alimentarius οι κατηγορίες είναι οι εξής:

- Το «εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο» (extra virgin olive oil), με μέγιστη οξύτητα μέχρι 0,8 g /100 g (ως ελαϊκό οξύ), άριστους οργανοληπτικούς δείκτες (διάμεση τιμή ελαττώματος  $Md = 0$  και διάμεση τιμή φρουτώδους,  $Mf > 0$ ) και τα λοιπά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για αυτή την κατηγορία (παράρτημα I, χαρακτηριστικά ελαιολάδου, Κανονισμός Ε.Ε. 1989/03).
- Το «παρθένο ελαιόλαδο» (virgin olive oil fine) με μέγιστη οξύτητα μέχρι 2 g / 100 g, πολύ καλούς οργανοληπτικούς δείκτες (διάμεση τιμή ελαττώματος  $Md \leq 2,5$  και διάμεση τιμή φρουτώδους,  $Mf > 0$ ) και τα λοιπά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για αυτή την κατηγορία.
- Το «ελαιόλαδο λαμπάντε» (lampante olive oil), με οξύτητα υψηλότερη από 2 g / 100 g, χωρίς περιορισμούς στους οργανοληπτικούς δείκτες και τα λοιπά χαρακτηριστικά σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για αυτή την κατηγορία.

Επίσης υπάρχουν, σύμφωνα με τον Κανονισμό, και άλλα είδη όπως το «εξευγενισμένο ελαιόλαδο» που λαμβάνεται με επεξεργασία του «ελαιολάδου λαμπάντε», το «ελαιόλαδο» που είναι μίγμα παρθένου και εξευγενισμένου ελαιολάδου καθώς και το «βιομηχανικό ελαιόλαδο» (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 71, 2004; Κανονισμός EC 1989, 2003). Το βιομηχανικό ελαιόλαδο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ακόμη και μετά από εξευγενισμό, για εδώδιμους σκοπούς σε αντίθεση με το «βιομηχανοποιήσιμο ελαιόλαδο».

Από τις προδιαγραφές των παραπάνω νομοθετικών φορέων είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, στο παρθένο ελαιόλαδο, το ποσοστό υγρασίας μπορεί να ανέλθει έως 0,2 % και το αδιάλυτο σε πετρελαϊκό αιθέρα στερεό υπόλειμμα ή τα «αδιάλυτα στον πετρελαϊκό αιθέρα συστατικά» (Α.Σ.Σ.) δεν πρέπει να είναι υψηλότερα από 0,1 %.

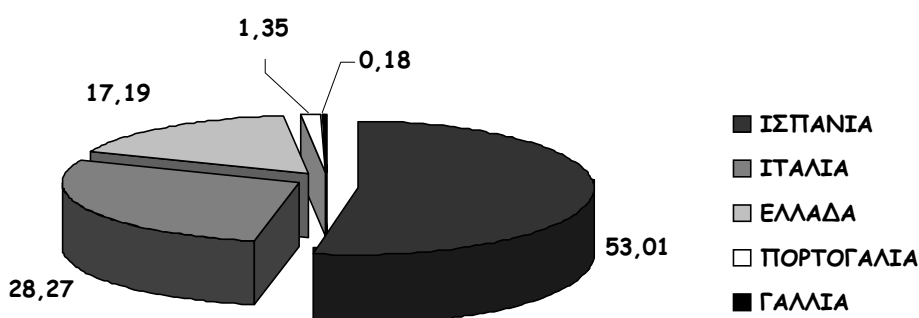
### **1.3. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ**

#### **1.3.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ**

Το ελαιόλαδο, ως προϊόν, κατέχει πολύ μικρό ποσοστό (~3,5 %) στην παγκόσμια αγορά βρώσιμων ελαίων. Χαρακτηρίζει όμως, εδώ και αιώνες, τη διατροφή των κατοίκων της Μεσογείου, οι χώρες της οποίας κατέχουν το 98 % της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου και επιτραπέζιων ελαίων (Zampounis, 2006).

Αναλυτικότερα, την τελευταία εικοσαετία η παγκόσμια παραγωγή ελαιολάδου αυξήθηκε κατά 70 % δηλαδή από 1665 χιλιάδες τόνους (χ.τ). το έτος 1986 σε 2812 χ.τ. το έτος 2002. Περισσότερη από τη μισή από την προαναφερθείσα ποσότητα προήλθε από την Ισπανία, η οποία αύξησε την παραγωγή της από 505 σε 1154 χ.τ., σημειώνοντας ρεκόρ παραγωγής την περίοδο 2003/04 με 1412 χ.τ. Η Ιταλία είναι η δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγός χώρα παγκοσμίως με μέσο όρο 540 χ.τ. Η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση με μέσο όρο 343 χ.τ., ενώ η Τυνησία καταλαμβάνει την τέταρτη θέση με 143 χ.τ. Η Συρία, η οποία κατέχει το υψηλότερο ετήσιο ποσοστό αύξησης της παραγωγής ελαιολάδου (8,5 %), ξεπέρασε την Τουρκία μετά την περίοδο 2001-2002 (Zampounis, 2006).

Τα πέντε κράτη-μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Πορτογαλία, Γαλλία) μοιράζονται από κοινού το 74-80 % της παγκόσμιας παραγωγής (τα μεταξύ τους μερίδια δίνονται στο Σχήμα 1.1), ενώ άλλες τέσσερις Μεσογειακές χώρες (Τυνησία, Τουρκία, Συρία, Μαρόκο) κατέχουν το 15-20 %. Λιγότερο από το 5 % της παγκόσμιας παραγωγής παράγεται στον υπόλοιπο κόσμο.



**Σχήμα 1.1.** Μερίδιο επί της παραγωγής των πέντε κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατά μέσο όρο την περίοδο 2000/01-2003/04.

### 1.3.2. ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ

Οι κυριότερες ελαιοπαραγωγές χώρες είναι παραδοσιακά και αυτές που καταναλώνουν περισσότερο ελαιόλαδο. Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία της Commission, η Ελλάδα έχει τη μεγαλύτερη κατά κεφαλήν κατανάλωση, 25 kg ανά άτομο ετησίως, με την Ισπανία και την Ιταλία να ακολουθούν με 12,6 και 12,3 kg

αντίστοιχα (European Commission, 2003). Αυτές οι στατιστικές, ωστόσο, έχουν μόνον ενδεικτικό χαρακτήρα διότι είναι δύσκολο να υπολογιστεί με ακρίβεια η κατά κεφαλήν κατανάλωση (ειδικότερα για την Ελλάδα εκτιμάται ότι η πραγματική κατανάλωση είναι 16-18 kg ανά άτομο ετησίως).

Η κατανάλωση ελαιολάδου στην Ισπανία, Ιταλία και Ελλάδα, αντιστοιχεί στο 60 % της παγκόσμιας κατανάλωσης και στο 83 % της κατανάλωσης όλης της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η κατανάλωση αυξάνεται στις παραπάνω χώρες με ετήσιο ρυθμό 1,7 %. Με τον ίδιο περίπου ρυθμό (1,9 %) αυξάνεται η κατανάλωση και στις άλλες τέσσερις ελαιοπαραγωγές μεσογειακές χώρες (Τυνησία, Τουρκία, Συρία, Μαρόκο). Σπουδαίο ρόλο στην αύξηση της κατανάλωσης παίζουν οι μη παραγωγές, και μη παραδοσιακά καταναλωτικές χώρες, οι οποίες επιδεικνύουν ισχυρές τάσεις αύξησης (Zampounis, 2006). Η πιο ενδιαφέρουσα ομάδα των μη παραγωγών χωρών είναι η ομάδα των μη παραγωγών χωρών της Ε.Ε. (συμπεριλαμβανομένης και της Γαλλίας) και η ομάδα των “5 Μεγάλων Νέων” χωρών (Η.Π.Α., Αυστραλία, Καναδάς, Ιαπωνία, Βραζιλία), με ετήσιο ποσοστό αύξησης 10,06 % και 8,24 %, αντίστοιχα.

#### **1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Η Μεσογειακή διατροφή θεωρείται ένα συνδυασμένο διαιτολόγιο από δημητριακά, όσπρια, φρέσκα φρούτα, λαχανικά, ερυθρό οίνο σε μικρές ποσότητες και φυσικά ελαιόλαδο, ως βασικό συστατικό, που καταναλώνεται από κατοίκους των χωρών της Μεσογειακής λεκάνης (Trichopoulou *et al.*, 1999). Όπως προκύπτει από μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, η διατροφή αυτή ενδέχεται να μειώνει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (Keys *et al.*, 1995; Trichopoulou *et al.*, 2003; Trichopoulou *et al.*, 2005) και συγκεκριμένους τύπους καρκίνου (Trichopoulou *et al.*, 2000; Trichopoulou *et al.*, 2003). Η αξία της Μεσογειακής διατροφής οφείλεται, κατά μεγάλο βαθμό, στο ελαιόλαδο και πιο συγκεκριμένα, στη σύστασή του σε λιπαρά οξέα.



Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου φαίνεται ότι έχουν επίδραση στη μείωση των επιπέδων της LDL-χοληστερόλης (χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας) στο αίμα που θεωρείται ένας από τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της αρτηριοσκλήρωσης (Bonanome *et al.*, 1992; Witztum & Steinberg, 2001).

Η FDA πρόσφατα ανακοίνωσε τον εξής διατροφικό ισχυρισμό: «υπάρχουν περιορισμένα επιστημονικά στοιχεία και μελέτες που δείχνουν ότι η ημερήσια κατανάλωση 23 g ελαιολάδου (σ.σ. δυο κουταλιές της σούπας) ίσως μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών παθήσεων εξαιτίας των μονοακόρεστων που περιέχει. Για να επιτευχθεί αυτό, το ελαιόλαδο πρέπει να αντικαταστήσει τα κορεσμένα λιπαρά της δίαιτας και όχι να καταναλωθεί επιπροσθέτως αυξάνοντας την ημερήσια πρόσληψη σε λιπαρά και θερμίδες» (FDA, 2004).

Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές όπως ο Katan (1995) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το επίπεδο πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων είναι μόνο ελάχιστα ψηλότερο στις μεσογειακές χώρες σε σχέση με τις Βόρειες Χώρες (Νορβηγία, Δανία, κα). Σε πιο πρόσφατες μελέτες αναφέρεται ότι όχι μόνον η σύσταση σε λιπαρά οξέα, με την υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ, είναι υπεύθυνα για τις βιολογικές ιδιότητες του ελαιολάδου. Σημαντικό ρόλο παίζουν και διάφορα ήσσονα συστατικά (Visioli *et al.*, 2004; Visioli *et al.*, 2006; Boskou *et al.*, 2005).

Καθώς η παρεμπόδιση της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών στον οργανισμό αλλά και φαινόμενα που έχουν γενικά σχέση με το λεγόμενο «οξειδωτικό στρες» αποκτούν ολοένα και μεγαλύτερη σπουδαιότητα, τα φυσικά αντιοξειδωτικά του ελαιολάδου και κυρίως το πολικό φαινολικό του κλάσμα καθίστανται αντικείμενα συστηματικής έρευνας. Στην έρευνα αυτή εμπλέκονται επιστήμονες πολλών ειδικοτήτων όπως χημικοί, βιοχημικοί, διατροφολόγοι, επιδημιολόγοι και άλλοι ερευνητές από το χώρο των βιοεπιστημών.

*In-vitro* δοκιμές με την υδροξυτυροσόλη και την ελαιοευρωπαϊνή, δύο συστατικά του πολικού κλάσματος του ελαιολάδου, έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές παρεμποδίζουν την οξειδωση της LDL-χοληστερόλης σε διάφορα μοντέλα (Visioli & Galli, 1994; Visioli *et al.*, 1995; Visioli *et al.*, 1998; Visioli *et al.*, 2001; Valavanidis *et al.*, 2004). Τα περισσότερα φαινολικά συστατικά είναι αμφίφιλες ενώσεις και έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τη δράση ενζύμων όπως οι λιποξυγενάσες, οι οξειδάσες του NAD(P)H κ.α. που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (Visioli *et al.*, 2006). Ειδικότερα η υδροξυτυροσόλη έχει βρεθεί ότι μπορεί να δράσει *in vitro* ευνοϊκά έναντι: α) της χημικώς επαγομένης συγκόλλησης αιμοπεταλίων, β) της συσσώρευσης θρομβοξάνης στον ορό του αίματος, γ) της παραγωγής λευκοτριενίων (δείκτες οξειδωτικού στρες) και δ) της ενεργότητας της λιποξυγενάσης (περιορίζει τη δράση της) (Petroni *et al.*, 1995; Kohyama *et al.*, 1997; De la Puerta *et al.*, 1999).

Σε *in-vivo* πειράματα βρέθηκε ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου απορροφώνται από τον ανθρώπινο οργανισμό ανάλογα με την παρεχόμενη δόση και αποβάλλονται με τα ούρα ως γλυκουρονικά παράγωγα (conjugates) (Visioli *et al.*, 2000). Νεότερες μελέτες έδειξαν την παρουσία μεταβολιτών των φαινολικών συστατικών στο πλάσμα αίματος (Caruso *et al.*, 2001; Miró-Casas *et al.*, 2003). Η απορρόφηση της υδροξυτυροσόλης στο πλάσμα είναι σχεδόν πλήρης και η ημιπερίοδος ζωής 2,6 ώρες (Miró-Casas *et al.*, 2001).

## **1.5. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Η χημική σύσταση του ελαιολάδου έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων επιστημονικών ερευνών. Το παρθένο ελαιόλαδο αποτελείται από ακυλογλυκερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα (99-99,5 %), καθώς και από άλλα σαπωνοποιήσιμα και μη συστατικά, που είναι γνωστά και ως ήσσονα συστατικά (0,5-1,0 %) που συμβάλλουν στη σταθερότητα και την ευχυμία του (Boskou, 1996; 2006). Τα ελαιόλαδα διαφέρουν ως προς τη σύσταση η οποία επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, οι καλλιεργητικές πρακτικές, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες και η διαδικασία παραλαβής (Bruni *et al.*, 1994). Η χημική σύσταση του ελαιολάδου μπορεί να χρησιμεύσει για την εκτίμηση της γνησιότητάς του (Boskou, 1996).

Τα ήσσονα συστατικά που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής ήταν οι πολικές φαινόλες, τα φωσφολιπίδια και οι πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα συστατικά, ήσσονα και μη, παρουσιάζονται σύμφωνα με τη συγκέντρωσή τους, στην παράγραφο 1.5.4.

### **1.5.1. ΠΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ**

Στις τελευταίες δεκαετίες έχει αποδοθεί από τους ερευνητές μεγάλη σημασία στην παρουσία φυσικών αντιοξειδωτικών στα φυτικά προϊόντα. Αυτό οφείλεται στη συσχέτιση ορισμένων χρόνιων παθήσεων με μηχανισμούς οξειδωσης, τη δράση «ενεργών ειδών οξυγόνου και αζώτου», το «οξειδωτικό στρες» και την απόσβεση ελευθέρων ριζών. Ο όρος «ενεργά είδη οξυγόνου» (reactive oxygen species) χρησιμοποιείται γενικώς για τις παρακάτω ενώσεις, ρίζες και ιόντα όπως η ρίζα σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), η υδροξυλική ρίζα ( $OH^{\cdot}$ ), οι υπεροξειδικές ( $ROO^{\cdot}$ ) και οι αλκοξυ- ( $RO^{\cdot}$ ) ρίζες, το μοριακό οξυγόνο στη διεγερμένη κατάσταση (singlet oxygen,  $^1O_2$ ), η ρίζα  $NO^{\cdot}$ , και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν

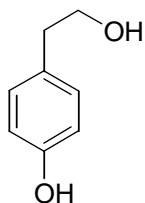
(OONO<sup>-</sup>). Οι δραστικές αυτές μορφές προσβάλλουν πολύτιμα βιομόρια και επηρεάζουν δυσμενώς μηχανισμούς που εμπλέκονται σε πολλές ασθένειες ή μηχανισμούς καθοριστικούς της έκφρασης γονιδίων. Η εμπλοκή των μηχανισμών αυτών στην παθολογία πολλών ασθενειών και στην προστασία έναντι μολύνσεων έγινε αιτία να διατυπωθεί η άποψη ότι τα αντιοξειδωτικά και κυρίως αυτά από φυτικά φυσικά προϊόντα έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία.

Ολοκληρωμένες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση συνδέουν τα πολικά φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου με τον ευεργετικό ρόλο τους στην ανθρώπινη υγεία (βλέπε παράγραφο 1.4).

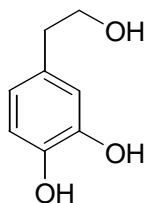
Η παρουσία των πολικών φαινολών στο ελαιόλαδο έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και υπάρχουν στη βιβλιογραφία πολλά άρθρα επισκόπησης για το θέμα αυτό (Owen *et al.*, 2000; Briante *et al.*, 2003; Visioli *et al.*, 2004; Boskou *et al.*, 2005; Boskou, 2006a). Το ενδιαφέρον οφείλεται τόσο στη βιολογική αξία αυτών των φαινολών όσο και στη συμβολή τους στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου. Έχει μάλιστα προταθεί (Blekas *et al.*, 2002) να χρησιμοποιηθεί η περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες ως μια επιπλέον παράμετρος ποιότητας του φυσικού ελαιολάδου. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού του συνόλου των πολικών φαινολών είναι η χρωματομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu (Gutfinger, 1981). Η μέθοδος αυτή, αν και έχει ορισμένα μειονεκτήματα (Psomiadou *et al.*, 2003), δίνει τιμές για τα επίπεδα των ολικών πολυφαινολών που σχετίζονται πολύ ικανοποιητικά με την οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου.

Ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές συνθήκες και άλλους παράγοντες, η συγκέντρωση των πολικών φαινολών μπορεί να κυμαίνεται από 50 έως 1.000 mg/kg ελαίου αλλά τα περισσότερα ελαιόλαδα περιέχουν πολυφαινόλες σε επίπεδα μεταξύ 100 και 300 mg/kg (Tsimidou, 1998). Όταν η συγκέντρωση είναι υψηλότερη από 300 mg/kg, το ελαιόλαδο μπορεί να έχει πικρή γεύση. Παρόλα αυτά, μια υψηλή περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες φαίνεται ότι είναι ευεργετική για τη διάρκεια ζωής του ελαιολάδου λόγω της σχέσης που υπάρχει μεταξύ σταθερότητας και περιεκτικότητας σε ολικές πολικές φαινόλες ή σε ο-διφαινόλες. Η ποικιλία του καρπού, το σύστημα που χρησιμοποιείται για την παραλαβή του ελαιολάδου και οι συνθήκες της επεξεργασίας, της συσκευασίας, της διανομής και της αποθήκευσης του ελαιολάδου επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πολικών φαινολικών συστατικών στο τελικό προϊόν. Τα εξευγενισμένα ελαιόλαδα δεν περιέχουν πολικά φαινολικά συστατικά επειδή αυτά

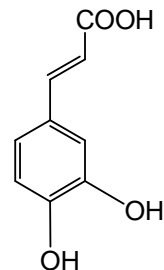
ανήκουν στο πολικό κλάσμα το οποίο απομακρύνεται πλήρως στη διάρκεια του εξευγενισμού (Boskou, 1996).



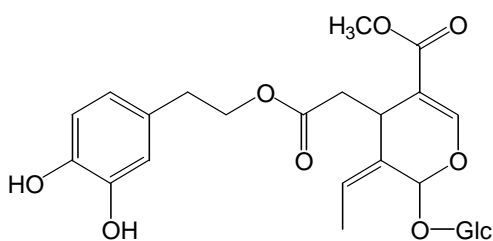
ΤΥΡΟΣΟΛΗ



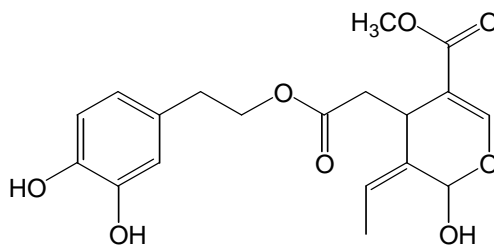
ΥΔΡΟΕΥΤΥΡΟΣΟΛΗ



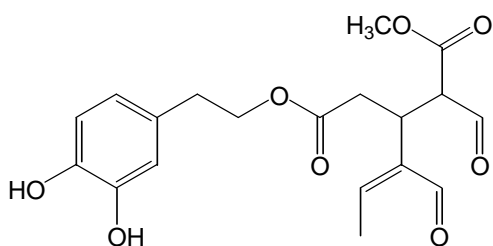
ΚΑΦΕΪΚΟ ΟΞΥ



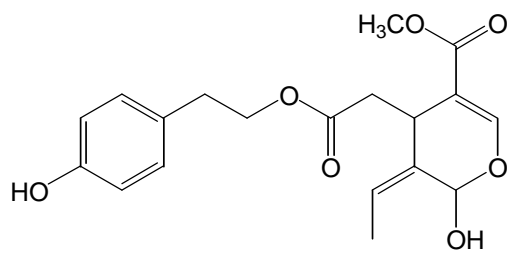
ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗ



ΑΓΛΥΚΟ ΜΕΡΟΣ ΤΗΣ  
ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ



ΔΙΑΛΛΕΥΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΑΓΛΥΚΟΥ  
ΜΕΡΟΥΣ ΤΗΣ ΕΛΑΙΟΕΥΡΩΠΑΪΝΗΣ



ΑΓΛΥΚΟ ΜΕΡΟΣ ΤΟΥ ΛΙΚΣΤΡΟΖΙΤΗ  
(ligstroside aglycone)

**Σχήμα 1.2.** Οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων φαινολικών ενώσεων του ελαιολάδου

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των επιμέρους συστατικών του φαινολικού κλάσματος είναι η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με χρήση στήλης C-18 (Tsimidou *et al.*, 1992), η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Sacchi *et al.*, 1996) ή συνδυασμός τεχνικών όπως GC-MS (Angerosa *et al.*, 1995), LC-MS (Bianco *et al.*, 2001) και LC-SPE-NMR (Christoforidou *et al.*, 2005).

Με τη βοήθεια των παραπάνω τεχνικών, οι φαινολικές ενώσεις του παρθένου ελαιολάδου κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες: Α. Τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και παράγωγά τους, Β. Παράγωγα του 4-υδροξυβενζοϊκού, του 4-υδροξυφαινυλοξικού και του 4-υδροξυκιναμωμικού οξέος, Γ. Λιγνάρες, Δ. Φλαβονοειδή (Σχήμα 1.2).

Οι πολικές φαινόλες που πιστεύεται ότι απαντούν σε υψηλότερη συγκέντρωση είναι κυρίως οι εστέρες της υδροξυτυροσόλης και της τυροσόλης με τη διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος, η οξική υδροξυτυροσόλη, η 1-ακετοξυπινορεσινόλη, η πινορεσινόλη, το άγλυκο μέρος της ελαιοευρωπαϊνης, η λουτεολίνη και το άγλυκο μέρος του λιγκστροζίτη (ligstroside aglycone) (Garcia *et al.*, 2001; Tovar *et al.*, 2001; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005).

Από τις διάφορες φαινολικές ενώσεις που έχουν εξετασθεί για τη συνεισφορά τους στη σταθερότητα του ελαιολάδου, η υδροξυτυροσόλη και το καφεϊκό οξύ (Σχήμα 1.3) βρέθηκε ότι είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά (Tsimidou *et al.*, 2003). Η υδροξυτυροσόλη βρέθηκε ότι είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, πιο ισχυρό ακόμη και από το συνθετικό αντιοξειδωτικό BHT (Boskou, 1996). Κατά τους Guttierrez-Rosales & Arnaud (2001), η υδροξυτυροσόλη, ο εστέρας της με τη διαλδεϋδική μορφή του ελενολικού οξέος και το άγλυκο μέρος της ελαιοευρωπαϊνης είναι τα αντιοξειδωτικά που οι συγκεντρώσεις τους σχετίζονται στενά με την οξειδωτική σταθερότητα του ελαίου.

### **1.5.2. ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ**

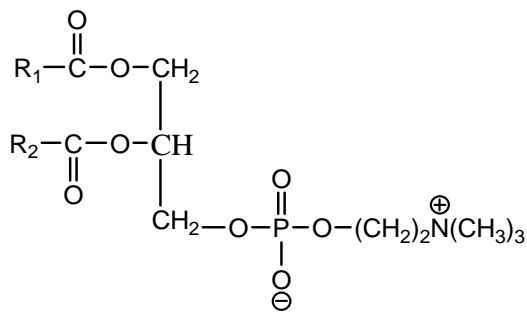
Αποτελούν ένα μικρό κλάσμα των ησσόνων συστατικών του ελαιολάδου, και οι πληροφορίες όσον αφορά στη σύστασή τους και τη συγκέντρωσή τους στο παρθένο ελαιόλαδο και στις άλλες εδώδιμες μορφές ελαιολάδου δεν είναι επαρκείς. Οι συντακτικοί τύποι των πιο σημαντικών φωσφολιπιδίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.2.

Οι διαφορές στα αποτελέσματα των ερευνητών σχετικά με τη φύση των φωσφολιπιδίων οφείλονται ίσως στις διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους που έχουν χρησιμοποιήσει. Τα κυριότερα φωσφολιπίδια του ελαιολάδου που έχουν ταυτοποιηθεί

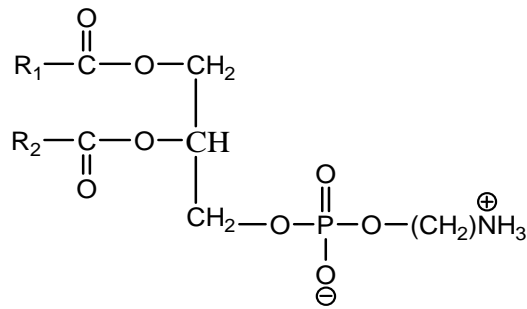
μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη και η φωσφατιδυλοσερίνη (Alter & Gutfinger, 1982). Το προφίλ των λιπαρών οξέων στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων είναι παρόμοιο με αυτό των τριακυλογλυκερολών. Οι Nomikos *et al.* (2002) διαχώρισαν υγροχρωματογραφικώς το κλάσμα των φωσφολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων του ελαιολάδου χρησιμοποιώντας στήλη με στατική φάση aminopropyl silica και ταυτοποίησαν φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και σφιγγομυελίνη. Ωστόσο η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποίησαν έχει αδυναμίες (χρήση μιας στήλης που δεν έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς και ασαφής ταυτόχρονος προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και φωσφολιπιδίων).

Σε πρόσφατη μελέτη (Boukhchina *et al.*, 2004) ταυτοποιήθηκαν γλυκεροφωσφολιπίδια στο ελαιόλαδο με τη χρήση της συνδυασμένης τεχνικής «υγρή χρωματογραφία – φασματοσκοπία μαζών (LC-MS και LC-MS-MS). Η φωσφατιδυλογλυκερόλη βρέθηκε ότι είναι το κυριότερο φωσφολιπίδιο. Επίσης ταυτοποιήθηκαν φωσφατιδικό οξύ, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη. Φωσφατιδυλοσερίνη δεν ταυτοποιήθηκε. Το αδύνατο σημείο της μελέτης αυτής είναι ότι βασίστηκε στην ανάλυση ενός μόνο δείγματος που αγοράστηκε από το εμπόριο ενώ δεν αναφέρονται ποσοτικά δεδομένα καθώς και ο τρόπος παραλαβής των φωσφολιπιδίων πριν από τη χρωματογραφική ανάλυση. Πολύ πρόσφατα, οι Jiménez *et al.* (2007) εξέτασαν το κλάσμα των φωσφολιπιδίων και των πολικών φαινολών δειγμάτων εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας μικηλίων (Micellar Liquid Chromatography, MLC). Οι κορυφές που αναγνωρίστηκαν στα υγροχρωματογραφήματα, ήταν μόνο δύο και αντιστοιχούσαν στη φωσφατιδυλοχολίνη και στη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, ενώ ο διαχωρισμός δεν ήταν καλός και οι μεγαλύτερες κορυφές δεν αναγνωρίστηκαν.

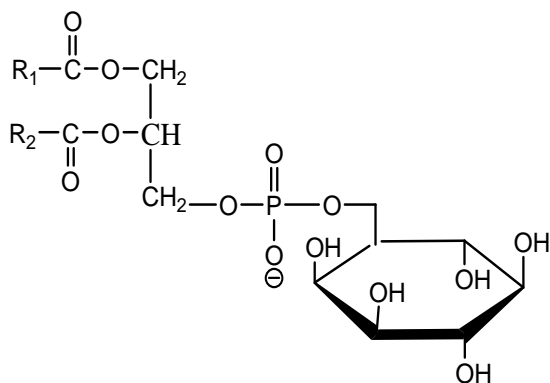
Γενικώς, μπορεί να εξαχθεί ως συμπέρασμα από τη μελέτη της βιβλιογραφίας ότι δεν υπάρχει μια ολοκληρωμένη μελέτη για τη φύση και το χαρακτήρα των φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου, καθώς και για τη συγκέντρωσή τους στο παρθένο ελαιόλαδο.



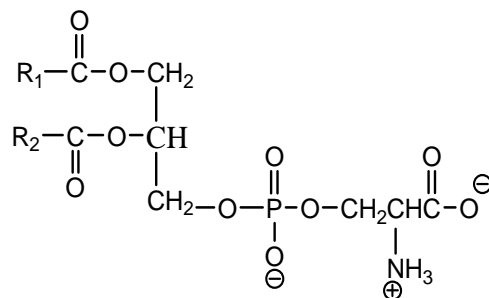
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)



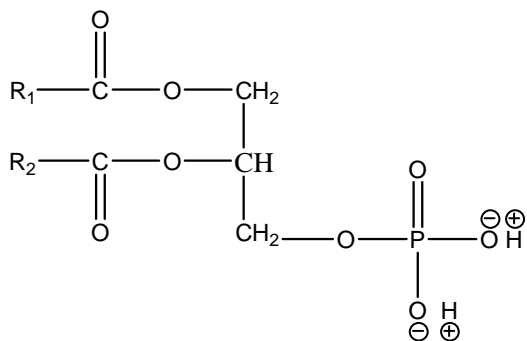
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)



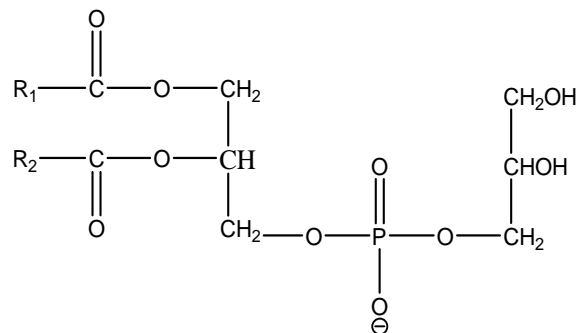
Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη (PI)



Φωσφατιδυλοσερίνη (PS)



Φωσφατιδικό οξύ (PA)



Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG)

**Σχήμα 1.3.** Συντακτικοί τύποι των κυριότερων φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου

Τα φωσφολιπίδια, με την προϋπόθεση ότι περιέχονται σε μια ικανοποιητική συγκέντρωση, μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση της σταθερότητας ενός ελαίου. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι τα φωσφολιπίδια συμπεριφέρονται ως έμμεσα

(δευτεροταγή) αντιοξειδωτικά τόσο επειδή διασπούν τα υδροϋπεροξειδία (Pokorný *et al.*, 1990; Pokorný & Korczak, 2001), όσο και επειδή σχηματίζουν σύμπλοκα με τα προ-οξειδωτικά μέταλλα (Pokorný *et al.*, 1992). Επίσης αυξάνουν τη δραστηριότητα των συμβατικών αντιοξειδωτικών. Έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν συνεργιστική δράση με τις τοκοφερόλες (Yuki *et al.*, 1980; Hudson *et al.*, 1984; Kashima *et al.*, 1991). Ακόμα δρουν ως παρεμποδιστές οξυγόνου στην διεπιφάνεια ελαίου/αέρα (Porter, 1980; Moberger, 1986). Στο παρελθόν υπήρχε η άποψη ότι στο ελαιόλαδο τα φωσφολιπίδια συνδέονται μερικώς με τις λιποπρωτεΐνες (Spattoli, 1972) αλλά κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί επαρκώς.

### 1.5.3. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές για τα επίπεδα των πρωτεϊνών στο παρθένο ελαιόλαδο, καθώς και για τον πιθανό ρόλο τους στη σταθερότητά του, σε αντίθεση με την πληθώρα των αναφορών για τα επίπεδα και το ρόλο άλλων συστατικών όπως οι πολικές φαινόλες, οι χρωστικές, οι στερόλες κ.τ.λ. Οι Hidalgo *et al.*, (2001) εφάρμοσαν μια πολύπλοκη μέθοδο για να προσδιορίσουν πρωτεΐνες σε διηθημένο, αδιάθιγτο και εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Το πρώτο στάδιο ήταν η καταβύθισή τους με ακετόνη. Μετά από διαδοχικές πλύσεις, το υπόλειμμα υδρολύθηκε με οξύ και τα αμινοξέα που ελευθερώθηκαν διαχωρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Από τη σύσταση σε αμινοξέα υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Αυτή βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,2 έως 1,5 mg/kg και ήταν συγκριτικά μικρότερη (κατά 2 έως 3 τάξεις μεγέθους) από αυτή που υπολογίστηκε από άλλη ομάδα ερευνητών (Georgalaki *et al.*, 1998a), οι οποίοι χρησιμοποίησαν διαφορετική μεθοδολογία. Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα των πρωτεϊνών στο παρθένο ελαιόλαδο και το αν παίζουν κάποιο ρόλο στη σταθερότητά του, όπως υποστηρίχθηκε αρχικώς από τους Hidalgo *et al.* (2002), παραμένουν προς το παρόν αδιευκρίνιστα.

Η Γεωργαλάκη (1999) διερεύνησε, με εφαρμογή της τεχνικής SDS-PAGE και της χρωματογραφίας μοριακού ηθμού (FPLC), τη φύση του πρωτεϊνικού κλάσματος του ελαιολάδου. Ανιχνεύτηκαν δυο διαχεόμενες πρωτεϊνικές ζώνες με μοριακή μάζα 10-40 kDa και με άγνωστη ακολουθία αμινοξέων που αντιστοιχούν σε πληθώρα μικρών πεπτιδίων (ή πρωτεϊνών) πολύ χαμηλής συγκέντρωσης. Επίσης διαπιστώθηκε καταλυτική δράση λιποξυγενάσης και φαινολοξειδάσης στο ελαιόλαδο που μειώνονταν με την επίδραση παπαΐνης, μια πρωτεάσης. Οι Hidalgo *et al.* (2002) μελέτησαν επίσης τη φύση των πρωτεϊνών του ελαιολάδου και διαπίστωσαν ότι αυτές είναι χαμηλής

μοριακής μάζας πολυπεπίδια, κυρίως ένα συγκεκριμένο πολυπεπίδιο με μοριακή μάζα 5,6 kDa. Σύμφωνα με τους ερευνητές, το πεπτίδιο αυτό προέρχεται από τη σάρκα της ελιάς γιατί ανιχνεύτηκε και στο μεσοκάρπιό της. Ωστόσο και οι δυο ομάδες ερευνητών δεν διαπίστωσαν την παρουσία ενδογενών ενζύμων της ελιάς, όπως π.χ. της λιποξυγενάσης που έχει μοριακή μάζα ~ 100 kDa, στη SDS-PAGE.

#### 1.5.4. ΛΟΙΠΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

##### 1.5.4.1. Τριακυλογλυκερόλες

Τα λιπαρά οξέα των τριακυλογλυκερολών του ελαιολάδου είναι το παλμιτικό (C16:0), το παλμιτελαϊκό (C16:1), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1), που αποτελεί 55-83 % του συνόλου των λιπαρών οξέων, το λινελαϊκό (C18:2) και το λινολενικό οξύ (C18:3) (Πίνακας 1.1).

**Πίνακας 1.1.** Σύσταση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα όπως προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία (%m/m μεθυλικοί εστέρες).

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ	ΣΥΝΤΟΜΗ ΓΡΑΦΗ	CODEX ALIMENTARIUS (2003)	ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ (ΙΟΟC, 2003)
<i>Ελαϊκό</i>	C18:1	55,0 - 83,0	55,0 - 83,0
<i>Παλμιτικό</i>	C16:0	7,5 - 20,0	7,5 - 20,0
<i>Λινελαϊκό</i>	C18:2	3,5 - 21,0	3,5 - 21,0
<i>Στεατικό</i>	C18:0	0,5 - 5,0	0,5 - 5,0
<i>Παλμιτελαϊκό</i>	C16:1	0,3 - 3,5	0,3 - 3,5
<i>Λινολενικό</i>	C18:3	-	≤ 1,0
<i>Μυριστικό</i>	C14:0	< 0,1	≤ 0,05
<i>Αραχιδικό</i>	C20:0	0,8	≤ 0,6
<i>Βεχενικό</i>	C22:0	< 0,3	≤ 0,2
<i>Λιγνοκηρικό</i>	C24:0	< 1,0	≤ 0,2
<i>Δεκαεπτανοϊκό</i>	C17:0	< 0,5	≤ 0,3
<i>Εικοσενοϊκό</i>	C20:1	-	≤ 0,4
<i>Δεκαεπτενοϊκό</i>	C17:1	< 0,6	≤ 0,3

Το προφίλ των τριακυλογλυκερολών του ελαιολάδου, όπως προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, διαφέρει από αυτό του αραβοσιτελαίου, του ηλιέλαιου, του σογιέλαιου, του κραμβέλαιου και του βαμβακέλαιου, ενώ είναι παρόμοιο με αυτό του φουντουκέλαιου. Οι κυριότερες τριακυλογλυκερόλες που βρέθηκαν στο ελαιολάδο είναι οι OOO (40–59 %), POO (12-20 %), OOL (12.5-20 %), POL (5,5-7 %) και SOO (3-7 %) όπου O = ελαϊκό οξύ, P = παλμιτικό οξύ, S = στεατικό οξύ και L = λινελαϊκό οξύ (Boskou, 1996).

#### **1.5.4.2. Μονο- και διακυλογλυκερόλες**

Η παρουσία τους οφείλεται είτε στην ατελή βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερολών είτε στις υδρολυτικές δράσεις που επικρατούν κατά τη συλλογή του ελαιόκαρπου και την παραγωγή ή την αποθήκευση του ελαίου. Στο παρθένο ελαιολάδο, η συγκέντρωση των διακυλογλυκερολών κυμαίνεται από 1,0 έως 2,8 % (Frega *et al.*, 1993; Kiosseoglou & Kouzounas, 1993). Οι μονοακυλογλυκερόλες βρίσκονται σε μικρότερη αναλογία (>0,25 %).

#### **1.5.4.3. Υδρογονάνθρακες**

Το σκουαλένιο και το β-καροτένιο είναι οι δυο κυριότεροι υδρογονάνθρακες που απαντώνται στο ελαιολάδο. Το σκουαλένιο αποτελεί το κύριο από τα ασαπωνοποιήτα συστατικά του ελαίου, στο οποίο απαντά σε επίπεδα 200-7.200 mg/kg (Perrin, 1992; Psomiadou & Tsimidou, 1999). Θεωρείται ως συστατικό με μεγάλη βιολογική αξία, κυρίως λόγω της χημειοπροληπτικής δράσης του (Rao *et al.*, 1998).

#### **1.5.4.4. Στερόλες**

Οι στερόλες είναι σημαντικά λιπίδια που σχετίζονται με τη γνησιότητα του ελαιολάδου. Στο ελαιολάδο απαντώνται τέσσερις τύποι στερολών: οι κοινές στερόλες (ή 4-απομεθυλοστερόλες), οι 4α-μεθυλοστερόλες, οι τριτερπενοειδείς αλκοόλες (ή 4,4-διμεθυλοστερόλες) και οι τριτερπενοειδείς διαλκοόλες. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε στερόλες κυμαίνεται από 1000 mg/kg, που είναι και το κατώτατο όριο (EC Regulation 2568, 1991) έως 2000 mg/kg (Morchio *et al.*, 1987; Aparicio & Luna, 2002). Η β-σιτοστερόλη αποτελεί 75-90 % του συνολικού στερολικού κλάσματος (Calaraj *et al.*, 1993). Ορισμένες στερόλες, όπως η Δ<sup>5</sup>-αβεναστερόλη, θεωρούνται υπεύθυνες για την αντίσταση του ελαιολάδου στην οξείδωση σε υψηλές θερμοκρασίες

(Boskou, 1999; Blekas & Boskou, 1999). Ποσοστό 10-40 % των στερολών βρίσκεται στο ελαιόλαδο με τη μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα (Boskou & Vlachopoulou, 1986).

#### **1.5.4.5. Αλειφατικές και διτερπενοειδείς αλκοόλες**

**Λιπαρές αλκοόλες.** Οι κυριότερες λιπαρές αλκοόλες (C>16) που υπάρχουν στο ελαιόλαδο είναι οι γραμμικές κορεσμένες αλκοόλες με 22, 24, 26 και 28 άτομα άνθρακα (Boskou *et al.*, 1983; Frega *et al.*, 1992). Τα επίπεδα τους στο ελαιόλαδο δεν είναι υψηλότερα από 250 mg/kg (Cert *et al.*, 1999; Aparicio & Luna, 2002). Στο παρθένο ελαιόλαδο απαντούν και με τη μορφή κηρών (εστέρες με λιπαρά οξέα) σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 150 mg/kg (Grob *et al.*, 1990).

**Διτερπενοειδείς αλκοόλες.** Η φυτόλη (25-300mg/kg) και η γερανυλ-γερανιόλη (<50 mg/kg) είναι δύο άκυκλα διτερπενοειδή του ελαιολάδου που απαντούν τόσο σε ελεύθερη όσο και σε εστεροποιημένη μορφή (Camera & Angerosa, 1978; Cert *et al.*, 1999; Reiter & Lorbeer, 2001).

#### **1.5.4.6. Τοκοφερόλες**

Οι τοκοφερόλες, που είναι γνωστές και ως βιταμίνη E, είναι συστατικά με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο κυμαίνεται από 60 έως 370 mg/kg. Η περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες των ελληνικών ελαιολάδων κυμαίνεται από 98 έως 370 mg/kg ελαίου (Psomiadou *et al.*, 2000). Ειδικότερα, στο ελαιόλαδο απαντά κυρίως η α-τοκοφερόλη που αποτελεί 90 % των ολικών τοκοφερολών. Επίσης απαντούν η β-τοκοφερόλη (~10 mg/kg), η δ-τοκοφερόλη (~10 mg/kg) και η γ-τοκοφερόλη (~20 mg/kg) (Ranalli & Angerosa, 1996; Psomiadou *et al.*, 2000). Ο εξευγενισμός και η υδρογόνωση των ελαίων προκαλούν μια μείωση στα επίπεδα των τοκοφερολών (Andrikopoulos *et al.*, 1989).

#### **1.5.4.7. Χρωστικές**

Στο ελαιόλαδο απαντούν δυο κατηγορίες χρωστικών, οι χλωροφύλλες (περιλαμβάνουν και τις φαιοφυτίνες) και τα καροτενοειδή. Οι χλωροφύλλες α και b και οι φαιοφυτίνες a και b (1-20 mg/kg) είναι υπεύθυνες για το χρώμα του ελαίου (Psomiadou & Tsimidou, 2001). Στα καροτενοειδή ανήκουν η λουτεΐνη, που είναι το σημαντικότερο καροτενοειδές του ελαιολάδου, και το β-καροτένιο. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε καροτενοειδή κυμαίνεται από 1 έως 20 mg/kg (Psomiadou & Tsimidou, 2001).

#### **1.5.4.8. Τριτερπενικά οξέα**

Τα υδροξυπεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα αποτελούν σημαντικά συστατικά του καρπού της ελιάς. Είναι βιολογικά ενεργές ενώσεις που απαντούν σε ίχνη και στο ελαιόλαδο. Τα οξέα ολεανολικό (3β-hydroxyolean-12-en-28-oic acid) και μασλινικό (2α, 3β-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid) είναι τα κυριότερα τριτερπενικά οξέα του παρθένου ελαιολάδου καθώς είναι συστατικά του φλοιού της ελιάς που μεταφέρονται στο τελικό προϊόν κατά την παραλαβή του (Caputo *et al.*, 1974; Pérez-Camino & Cert, 1999).

#### **1.5.4.9. Πτητικά συστατικά**

Το κλάσμα των πτητικών συστατικών του ελαιολάδου έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές και σε αυτό έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 280 ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές είναι: υδρογονάνθρακες (>80 ενώσεις), αλκοόλες (45 ενώσεις), αλδεΐδες (44), κετόνες (25), οξέα (13), εστέρες (55), αιθέρες (5), φουρανικά παράγωγα (5), πυρανόνες (1), θειόλες (1) και πυραζίνες (1 ένωση). Μόνο 80 από όλες αυτές τις ενώσεις έχει βρεθεί ότι συνεισφέρουν στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου. Είκοσι από αυτές τις ενώσεις συνεισφέρουν αρνητικά στο άρωμα του παρθένου ελαιολάδου (Sánchez-Saez *et al.*, 1991; Angerosa *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2005).

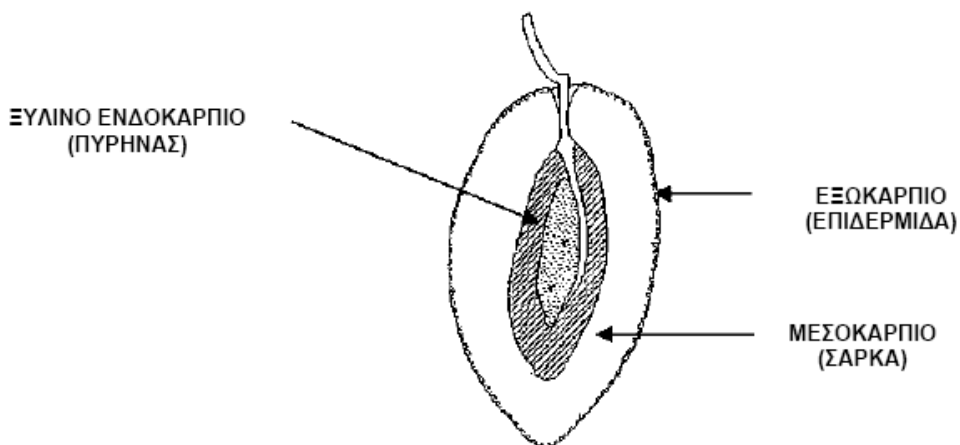
## **1.6. Ο ΚΑΡΠΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

### **1.6.1. ΓΕΝΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ**

Ο καρπός της ελιάς της Ευρωπαϊκής, που έχει ωοειδές σχήμα, αποτελείται από το περικάρπιο και το ενδοκάρπιο (πυρήνας). Κατά μέσο όρο ζυγίζει 2-12 g αν και ο καρπός κάποιων ποικιλιών μπορεί να έχει βάρος μέχρι 20 g. Το περικάρπιο αποτελείται από το επικάρπιο (φλοιό ή επιδερμίδα) και το μεσοκάρπιο (ή σάρκα). Η μορφολογία του ελαιόκαρπου φαίνεται στο Σχήμα 1.4.

Το μεσοκάρπιο αποτελεί 65-83 % του συνολικού βάρους του περικαρπίου και περιέχει το ελαιόλαδο στα ελαιосώματα (βλ. παρ. 1.6.2.). Το επικάρπιο περιβάλλεται από κηρούς και το χρώμα του μεταβάλλεται από πράσινο σε μαύρο κατά την ωρίμανση του καρπού (Εγκυκλοπαίδεια της Ελαίας, 1996). Ο ελαιόκαρπος είναι πλούσιος σε νερό (μέχρι 70 %). Η σύσταση του ελαιόκαρπου δίνεται στον Πίνακα 1.2.

Μερικά από τα υδατοδιαλυτά συστατικά ή τα προϊόντα της υδρόλυσής τους, όπως οι απλές και σύνθετες φαινόλες, μεταφέρονται και στο ελαιόλαδο κατά την παραλαβή του από τον ελαιόκαρπο. Τα περισσότερα όμως από αυτά απομακρύνονται κατά τη φυγοκέντρωση του ελαίου.



**Σχήμα 1.4.** Μορφολογία ελαιόκαρπου.

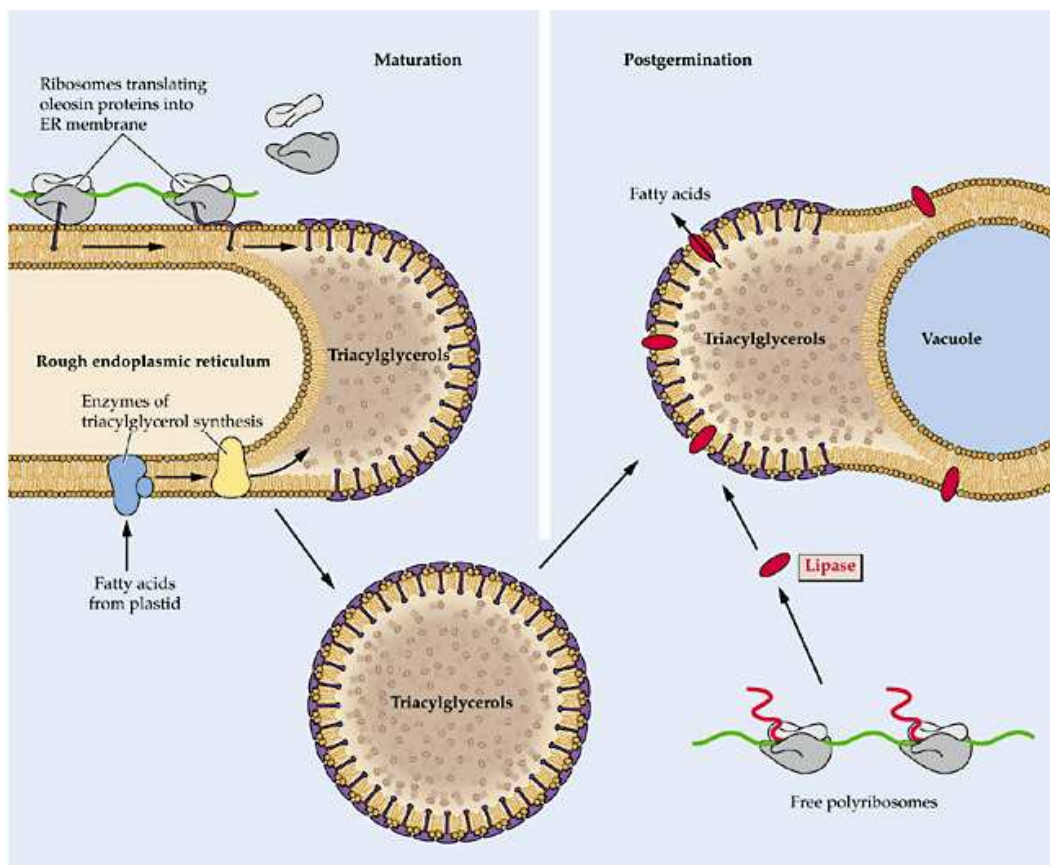
**Πίνακας 1.2.** Σύσταση του μεσοκαρπίου της ελιάς

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
Υγρασία	60-75
Ολικά λιπίδια (λίπος)	10-25
Ανάγοντα σάκχαρα	3-6
Μη ανάγοντα σάκχαρα	<0,3
Μαννιτόλη	0,5-1,0
Διαιτητικές ίνες	1-4
Ολικές πρωτεΐνες (N x 6,25)	1-2
Τέφρα	<1.0
Ολικές φαινόλες	2-3
Πηκτινικές ύλες	<0,6
Άλλα συστατικά	3-7

ΠΗΓΗ : Ferdando Diez *et al.*, 1985; Garrido Fernandez *et al.*, 1997.

## 1.6.2. ΕΛΑΙΟΣΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΣΙΝΕΣ

Τα ελαιοσώματα (oil bodies, lipid bodies, oleosomes, spherosomes) είναι μικρά σφαιρικά κυτταρικά σωματίδια που έχουν στο κέντρο τους τις τριακυλογλυκερόλες (TAG), οι οποίες ανήκουν στις απόθετες ύλες των φυτικών κυττάρων που είναι αναγκαίες για τη βλάστηση και τη μεταβλαστική περίοδο (Huang, 1996; Napier *et al.*, 1996). Τα ελαιοσώματα (Σχήμα 1.5) είναι σταθερά και η συσσωμάτωση ή η συνένωσή τους μέσα στα κύτταρα των ώριμων ελαιούχων καρπών και σπερμάτων δεν είναι δυνατή. Η σταθερότητά τους οφείλεται στην προάσπιση της επιφάνειάς τους από μια στιβάδα που σχηματίζουν οι ελαιοσίνες (oleosins), πρωτεΐνες οι οποίες υπάρχουν μόνο στα ελαιοσώματα (Huang, 1996; Murphy *et al.*, 1997).



**Σχήμα 1.5.** Η βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων στα ελαιοσώματα και οι ελαιοσίνες, οι πρωτεΐνες των μεμβρανών των ελαιοσωμάτων ([www.uky.edu/~dhild/biochem/20/lect20.html](http://www.uky.edu/~dhild/biochem/20/lect20.html)).

Οι ελαιοσίνες είναι υδρόφοβες πρωτεΐνες των μεμβρανών των ελαιοσωμάτων με χαμηλή μοριακή μάζα (15-26 kDa), που απαντούν σε αφθονία στα ελαιούχα σπέρματα

(Tzen *et al.*, 1990; Napier *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1997; Huang, 1997). Συμβάλλουν στην αντοχή των ελαιосωμάτων στις ακραίες συνθήκες ξηρασίας, ενυδάτωσης, θέρμανσης ή ψύξης στις οποίες ενδέχεται να εκτεθούν πριν την κινητοποίηση των τριακυλογλυκερολών κατά τη βλάστηση των σπερμάτων (Murphy & Cummins, 1989).

Στα κύτταρα του μεσοκαρπίου των καρπών της *Olea europaea* cv. Picual, που έχουν μέγεθος 40-70 μm, περιέχονται ένα ή περισσότερα μεγάλα, ακανόνιστου σχήματος ελαιосώματα, που έχουν μέγεθος έως και 20 μm. Τα υπόλοιπα οργανίδια του κυττάρου βρίσκονται κοντά στα κυτταρικά τοιχώματα και τον υπόλοιπο χώρο του καταλαμβάνει ένα μεγάλο χυμοτόπιο (Ross *et al.*, 1993). Η υποκυτταρική δομή του εμβρύου και του ενδοσπερμίου του ελαιόκαρπου είναι παρόμοια και περιλαμβάνει, εκτός των λοιπών οργανιδίων, λίγα πρωτεϊνοσώματα που περιβάλλονται από ένα μεγάλο αριθμό μικρών ελαιосωμάτων τα οποία έχουν μέγεθος 0,5-2,0 μm.

Ο ρόλος των ελαιосινών στα ελαιосώματα είναι πολύ σημαντικός για καρπούς πλούσιους σε λιπίδια, όπως ο ελαιόκαρπος. Το ενδοσπέρμιο και το έμβρυο πρέπει, σε αντίθεση με το μεσοκάρπιο, να υποστούν αφυδάτωση πριν το στάδιο της βλάστησης. Ο ιστός του μεσοκαρπίου δεν είναι συνεπώς αποθηκευτικός ιστός, αλλά ιστός έλξης ξενιστών για τη διασπορά των σπερμάτων. Για το λόγο αυτό τα ελαιосώματά του έχουν μεγαλύτερο μέγεθος και περιέχουν μη ανιχνεύσιμες πρωτεΐνες σε αντίθεση με αυτά του ενδοσπερμίου (Murphy, 1993).

Το κλάσμα των ελαιосωμάτων του ενδοσπερμίου και του εμβρύου των ελαιόκαρπων έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (9,3 και 9,6 % w/w αντίστοιχα), όπως είναι εμφανές κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Αντίθετα στο κλάσμα των ελαιосωμάτων του μεσοκαρπίου έχουν ανιχνευθεί ελάχιστες πρωτεΐνες, ακόμη και μετά την απομάκρυνση της λιπαρής φάσης και τη συμπύκνωση. Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση ως μια πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχεί σε μοριακή μάζα 70 kDa (Ross *et al.*, 1993).

### **1.6.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΠΟΥ ΜΕΤΑΦΕΡΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

Τα συστατικά αυτά είναι μη πολικά (λιποδιαλυτά), αλλά και περισσότερο πολικά. Η συγκέντρωσή τους στο ελαιόλαδο επηρεάζεται από την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές συνθήκες, το βαθμό ωρίμανσης, τον τρόπο παραλαβής του ελαίου και άλλους παράγοντες.

Λιποδιαλυτά συστατικά που υπάρχουν στην ελιά ή σχηματίζονται κατά την επεξεργασία της ελιάς είναι οι τριακυλογλυκερόλες, οι μονο- και διακυλογλυκερόλες,

τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, το σκουαλένιο, οι στερόλες, οι στερυλεστέρες, η α-τοκοφερόλη, οι λιποδιαλυτές χρωστικές και σχεδόν όλα τα πτητικά συστατικά.

Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν και τα περισσότερο πολικά συστατικά όπως π.χ. οι πολικές φαινόλες και πρωτεΐνες καθώς και άλλα πολικά λιπόφιλα συστατικά, όπως τα φωσφολιπίδια. Τα συστατικά αυτά είναι, είτε βιοενεργά και μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική αξία του ελαιολάδου, είτε έχουν άλλες ιδιότητες, όπως αντιοξειδωτική δράση με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου, είτε είναι σε θέση να επηρεάσουν τη γεύση.

Είναι φανερό ότι η ιδιαιτερότητα του ελαιολάδου οφείλεται κυρίως στα ήσσονα συστατικά του σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στην περίπτωση όλων των εδώδιμων ελαίων που χρησιμοποιούνται αφού υποστούν εξεγυρισμό.

**Πίνακας 1.3.** Ενδεικτική περιεκτικότητα απόνερων σε διάφορα συστατικά

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>	<b>ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ</b>
	<b>%</b>
Νερό	87,5
Σάκχαρα	2,8
Αζωτούχες ουσίες	2,4
Οργανικά οξέα	1,5
Πηκτίνες	1,5
Ελαιόλαδο	1,0
Άλατα	0,8

ΠΗΓΗ : Εγκυκλοπαίδεια της Ελιάς, 1996; Garrido Fernandez *et al.*, 1997).

Κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου στο ελαιουργείο, πραγματοποιείται διάλυση των κολλοειδών ουσιών (πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών) οι οποίες είναι υδατοδιαλυτές και συνυπάρχουν με τις φαινολικές και αυτό συντελεί στη μερική διάλυση των φαινολικών ουσιών. Η διάλυση αυτή έχει ως συνέπεια ένα μεγάλο μέρος των φαινολικών ουσιών, οι οποίες υπάρχουν στη σάρκα του καρπού, να απομακρύνονται με τα απόνερα (Ninfali *et al.*, 2001). Για το λόγο αυτό προσδιορίζονται στα απόνερα το σύνολο των απλών και πολύπλοκων φαινολικών ουσιών οι οποίες περιέχονται στον καρπό. Γι' αυτό έχουν αναπτυχθεί τεχνολογίες

παραλαβής των πολυφαινολών από τα απόνερα (Visioli *et al.*, 1999; Skaltsounis *et al.*, 2004; Crea, 2005). Η σύσταση των απόνερων δίνεται στο Πίνακα 1.3.

## **1.7. ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα η παραγωγή του ελαιολάδου βασίζεται στην ίδια αρχή, δηλαδή, στην παραλαβή του μετά την έκθλιψη των καρπών με μηχανικά μέσα. Στα σύγχρονα ελαιοτριβεία χρησιμοποιούνται κυρίως για το σκοπό αυτό ελαιουργικά συγκροτήματα δυο ή τριών φάσεων. Η όλη διαδικασία ξεκινάει με τη συγκομιδή της ελιάς.

### **1.7.1. ΩΡΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

Η συγκομιδή του καρπού της ελιάς πρέπει να γίνεται στο βέλτιστο στάδιο της ωρίμανσής του επειδή με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η παραγωγή ελαιολάδου υψηλής ποιότητας με την υψηλότερη δυνατή ελαιοπεριεκτικότητα. Το στάδιο αυτό είναι γνωστό ως στάδιο βιομηχανικής ωρίμανσης (Μπαλατσούρας, 1986α, 1986β; Κυριτσάκης, 2007). Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την ωριμότητα του καρπού με την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε ήσσονα συστατικά που καθορίζουν την ποιότητά του όπως σε πολικές φαινόλες και πτητικές ενώσεις που συνεισφέρουν στο άρωμά του (Aparicio & Morales, 1998; Morello *et al.*, 2004). Αντικειμενικά κριτήρια για την εκτίμηση του βέλτιστου σταδίου της ωρίμανσης είναι δύσκολο να καθοριστούν. Το Διεθνές Συμβούλιο του Ελαιολάδου πρότεινε μια απλή μέθοδο καθορισμού του βαθμού ωρίμανσης που βασίζεται σε έναν μαθηματικό τύπο και δίνει αποτελέσματα σε μια κλίμακα από 0-7 (IOOC, 1984). Συνήθως, οι ελαιοκαλλιεργητές κρίνουν με βάση την εμπειρία, η οποία βασίζεται κυρίως στην αλλαγή του χρώματος του ελαιόκαρπου από πρασινοκίτρινο σε μελανοϊώδες (Di Giovacchino, 1996). Μερικές φορές υπεισέρχονται ωστόσο και άλλοι παράγοντες, όπως τα καιρικά φαινόμενα, η εξασφάλιση του αναγκαίου εργατικού δυναμικού κα., που μεταβάλλουν το χρόνο της συγκομιδής (Petrakis, 2006). Η συγκομιδή γίνεται με τα χέρια ή με χρήση μηχανικών μέσων (ραβδιά, ειδικά μηχανήματα) που είναι σε θέση να μην πληγώσουν τον καρπό.

### **1.7.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕΧΡΙ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Η μεταφορά του καρπού απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να περιοριστούν στο ελάχιστο δυνατό οι τραυματισμοί του και να γίνεται επαρκής αερισμός του. Σε αντίθεση

περίπτωση παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, είτε πρόκειται για το ελαιόλαδο είτε για την επιτραπέζια ελιά. Το προτεινόμενο μέσο είναι τα ανοιχτά πλαστικά κιβώτια που επιτρέπουν την ελεύθερη διακίνηση του αέρα. Ο καρπός είναι καλό να υποστεί την επεξεργασία άμεσα προκειμένου να περιοριστεί η αλλοίωση του (Petraakis, 2006). Η μικρή δυναμικότητα πολλών ελαιοτριβείων σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή, καθιστά, συχνά αδύνατη την άμεση επεξεργασία, με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η αποθήκευσή του για ορισμένες ημέρες. Η αποθήκευση αυτή πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που να καθιστούν αδύνατη την έναρξη αλλοιώσεων εξαιτίας χημικών και βιοχημικών δράσεων.

### **1.7.3. ΤΡΟΦΟΔΟΣΙΑ - ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ - ΠΛΥΣΙΜΟ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟ**

Ο ελαιόκαρπος μεταφέρεται στη λεκάνη τροφοδοσίας, απ' όπου οδηγείται στο αποφυλλωτήριο με τη βοήθεια μεταφορικής ταινίας. Η απομάκρυνση των φύλλων της ελιάς είναι απαραίτητη γιατί η συνέκθλιψή τους με τον καρπό έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή ελαιολάδου με πικρή γεύση και έντονο πράσινο χρώμα λόγω εμπλουτισμού με χλωροφύλλη. Η τελευταία δρα ως φωτοευαισθητοποιητής και επιταχύνει την οξειδωση του ελαιολάδου παρουσία φωτός. Το πλύσιμο έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς απομακρύνει τις ξένες ύλες που μεταφέρει ο ελαιόκαρπος (σκόνη, χώμα, κ.α.).

### **1.7.4. ΈΚΘΛΙΨΗ**

Αποτελεί το πρώτο κύριο στάδιο της διαδικασίας παραλαβής του ελαιολάδου και αποσκοπεί στην καταστροφή των κυτταρικών δομών στον ελαιόκαρπο. Στο στάδιο αυτό, οι σταγόνες του ελαίου περιβάλλονται από μια μεμβράνη που είναι θετικά και αρνητικά φορτισμένη και συμβάλλει στη διατήρηση του ελαίου με τη μορφή γαλακτώματος. Η σταθερότητα του τελευταίου εξαρτάται από το μέγεθος των σταγονιδίων του. Όσο μικρότερο είναι αυτό, τόσο πιο σταθερό είναι το γαλάκτωμα. Ένα μικρό ποσοστό του ελαίου είναι δεσμευμένο στο κολλοειδές σύστημα που δημιουργείται από τις πηκτίνες της ελαιόπαστας (Petraakis, 2006).

Στα κλασσικού τύπου ελαιουργεία χρησιμοποιούνται σπαστήρες από πέτρα (stone crushers). Στα νέου τύπου ελαιουργικά συγκροτήματα συνεχούς φάσης (φυγοκεντρικά, μικτά) χρησιμοποιούνται μεταλλικοί σπαστήρες (metal crushers) που είναι οδοντωτοί (toothed crushers) ή τύπου σφύρας (hammer). Επειδή ενδέχεται να εμπλουτισθεί το έλαιο με ίχνη μετάλλου που εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση, οι σπαστήρες πρέπει να έχουν κατασκευασθεί από ανοξείδωτο χάλυβα. Αξίζει να τονιστεί

ότι το είδος του σπαστήρα που θα χρησιμοποιηθεί καθορίζεται από την ποικιλία του ελαιόκαρπου και τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η έκθλιψη για να παραληφθεί έλαιο με τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. με εντονότερη ή λιγότερο έντονη γεύση, υψηλότερη ή χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες).

#### **1.7.5. ΜΑΛΑΞΗ**

Συντελεί στη συνένωση των μικρών σταγονιδίων του ελαίου, ώστε το έλαιο να διαχωρίζεται πιο αποτελεσματικά από την υδατική φάση. Η μάλαξη είναι απαραίτητη γιατί αυξάνει την απόδοση σε έλαιο. Μετά την έκθλιψη οι σταγόνες ελαίου που έχουν μικρή διάμετρο είναι ελάχιστες (20 %), το ποσοστό τους όμως αυξάνεται ραγδαία (80 %) στο τέλος της μάλαξης (Di Giovacchino, 1996).

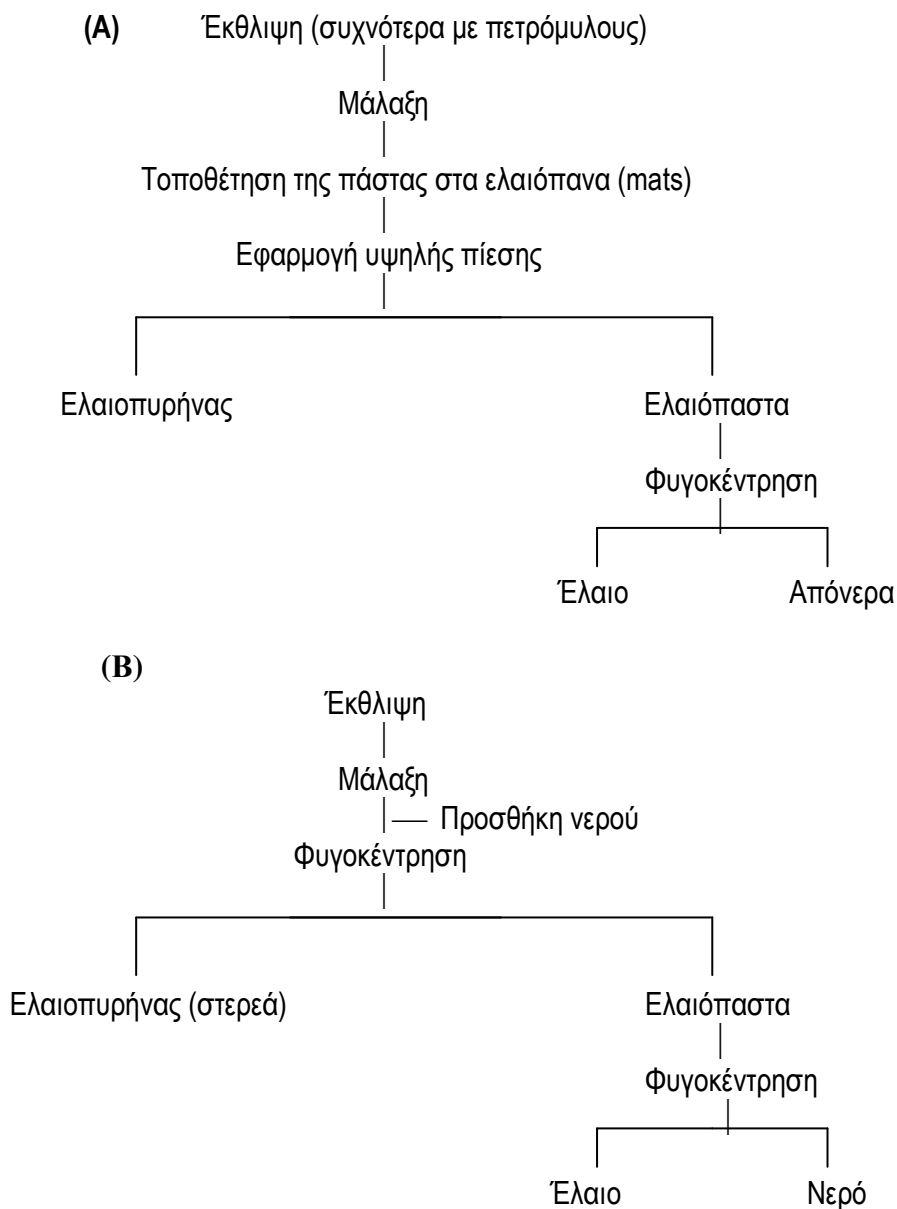
Η διεργασία της μάλαξης γίνεται σε ειδικούς μαλακτήρες οι οποίοι έχουν διπλά τοιχώματα μεταξύ των οποίων κυκλοφορεί ζεστό νερό για τη θέρμανση της ελαιοζύμης. Έτσι διευκολύνεται η έξοδος του ελαιολάδου από τα φυτικά κύτταρα ενώ η θερμοκρασία ρυθμίζεται με χρήση θερμοστάτη. Η καλή βιομηχανική πρακτική επιβάλλει μια ρύθμιση των συστημάτων έκθλιψης και μάλαξης ώστε να αποτρέπεται ο σχηματισμός «σκληρής» πάστας και να είναι δυνατή η μάλαξη σε χαμηλές θερμοκρασίες για να προστατευθεί το έλαιο από την οξείδωση. Εντονότερη έκθλιψη επιβάλλεται όταν ο καρπός έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες. Η θερμοκρασία του νερού στο μαλακτήρα δεν πρέπει να είναι υψηλότερη από 45°C. Η θερμοκρασία της ελαιοπάστας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τους 27°C όταν επιδιώκεται η παραλαβή εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (Petraakis, 1994).

#### **1.7.6. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ**

Στα κλασικά συγκροτήματα όπου εφαρμόζεται υψηλή πίεση στην ελαιοζύμη, το έλαιο διαχωρίζεται μηχανικά σε υδραυλικές πρέσες (σε πιέσεις που μπορεί να ανέλθουν ακόμη και σε 400 atm). Η τεχνική αυτή είναι η παλαιότερη και η χρήση της σήμερα είναι πολύ περιορισμένη. Στην περίοδο 1970-80 τα κλασικά συγκροτήματα αντικαταστάθηκαν σε μεγάλο βαθμό από τα φυγοκεντρικά συγκροτήματα τριών φάσεων, ενώ πιο πρόσφατη είναι η χρήση των φυγοκεντρικών συγκροτημάτων δυο φάσεων (Σχήμα 1.6). Για το διαχωρισμό του ελαίου από την ελαιοζύμη χρησιμοποιείται και η τεχνική της συνάφειας.

Συγκρότημα τριών φάσεων. Στο συγκρότημα αυτό προστίθεται στη φυγόκεντρο απόχυσης (decanter) άφθονο νερό (περίπου το 40-60 % του βάρους της ελαιοπάστας)

θερμοκρασίας 28-35°C. Μετά τη φυγοκέντρωση προκύπτουν τρεις φάσεις. Η ελαιώδης φάση, τα υγρά του καρπού (vegetation water) διαλυμένα στο επιπλέον νερό που προστέθηκε (η φάση αυτή είναι και τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου) και τα στερεά του καρπού (πούλπα). Μειονέκτημα των συγκροτημάτων αυτού του τύπου είναι τα αυξημένα απόβλητα του ελαιοτριβείου, η αυξημένη κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας και η απομάκρυνση σε μεγαλύτερο βαθμό πολύτιμων ησσόνων συστατικών του ελαιολάδου, όπως οι πολικές φαινόλες, μαζί με τα απόβλητα.



**Σχήμα 1.6.** Διαγραμματική απεικόνιση την παραγωγής ελαιολάδου με τη χρήση (A) κλασσικού πιεστηρίου και (B) φυγοκεντρικού συγκροτήματος τριών φάσεων.

Συγκρότημα δυο φάσεων. Στο συγκρότημα αυτό δεν προστίθεται νερό στη φυγόκεντρο απόχυσης. Μετά τη φυγοκέντρωση προκύπτουν δυο φάσεις, το έλαιο (40 %) και η υγρή πούλπα (60 % νερό). Η ανάκτηση του ελαίου είναι χαμηλότερη στα συγκροτήματα δυο φάσεων σε σχέση με αυτή στα συγκροτήματα τριών φάσεων, αλλά το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται είναι υψηλότερης ποιότητας (πλουσιότερο σε πολικές φαινόλες και ο-φαινόλες που συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητά του). Παράλληλα, μειώνονται κατά πολύ τα υγρά απόβλητα (απόνερα) του ελαιοτριβείου, παράγεται όμως μια μεγάλη ποσότητα υγρής «πούλπας» ή “alpeorujjo” (όπως είναι γνωστή στην ισπανική γλώσσα) που η διαχείρισή της είναι δύσκολη από οικονομική και οικολογική άποψη (Petraakis, 2006).

Συγκροτήματα διαχωρισμού με την αρχή της συνάφειας. Τα συγκροτήματα αυτά αποτελούνται από χαλύβδινα κωνικά ελάσματα που βυθίζονται στην ελαιοζύμη. Εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς μεταξύ της επιφανειακής τάσης του ελαίου και της επιφανειακής τάσης του νερού, τα σταγονίδια του ελαίου προσκολλώνται στα ελάσματα με την επίδραση των δυνάμεων συνάφειας. Το πιο επιτυχημένο συγκρότημα, που πρωτοπαρουσιάστηκε το 1972 και από τότε βελτιώνεται συνεχώς, είναι το συγκρότημα «Sinolea» όπου σε συνεχή διεργασία συνδυάζεται ο διαχωρισμός με συνάφεια με τη φυγοκέντρωση. Το ελαιόλαδο που παραλαμβάνεται είναι υψηλής ποιότητας αφού έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ολικές φαινόλες και εξαιρετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά επειδή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς προσθήκη νερού.

Συμπερασματικά, με βάση την ποιότητα των ελαιόκαρπων (π.χ. οι ιταλικές ελιές είναι πλουσιότερες από τις ελληνικές σε πολικές φαινόλες), το σύστημα θραύσης που θα χρησιμοποιηθεί και το χρόνο μάλαξης, είναι δυνατό να παραληφθεί ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες. Η χρήση άλλων μεθόδων για τη βελτίωση της ποιότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, π.χ. με χρήση πηκτινολυτικών και κυτταρινολυτικών ενζύμων, δεν είναι αποδεκτή από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, αφού το ελαιόλαδο παράγεται εξ' ορισμού μόνο με χρήση φυσικών και μηχανικών μέσων.

#### **1.7.7. ΔΙΑΥΓΑΣΗ**

Το προϊόν που λαμβάνεται από τα συγκροτήματα δυο ή τριών φάσεων χρειάζεται ένα περαιτέρω διαχωρισμό για την καλύτερη απομάκρυνση των τελευταίων μικρών ποσοτήτων νερού και των αιωρούμενων σωματιδίων (Εικόνα 1.1). Αυτό μπορεί

να γίνει με παραμονή σε δεξαμενές που έχει το μειονέκτημα της συσσώρευσης σωματιδίων στον πυθμένα τους λόγω καθίζησης. Υπάρχει όμως η δυνατότητα επιτάχυνσης του χρόνου κατακάθισης κατά 10.000 φορές με χρησιμοποίηση αυτοκαθαριζόμενων φυγοκέντρων τύπου «disc stack», που είναι γνωστές ως «διαυγαστές» ή clarifiers (Petrakis, 2006).

### 1.7.8. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Η αποθήκευση του ελαιολάδου αμέσως μετά την παραλαβή του επιβάλλεται να γίνεται σε ανοξείδωτες δεξαμενές σε συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας οξυγόνου – αζώτου και ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Αυτό βέβαια δεν είναι πρακτικά δυνατό αφού τα πιο πολλά ελαιοτριβεία – τυποποιητήρια δεν έχουν δεξαμενές που να πληρούν αυτές τις προδιαγραφές. Το έλαιο παραμένει στις δεξαμενές για αρκετά μεγάλο χρόνο (τουλάχιστον 45 ημέρες ή σε κάποιες περιπτώσεις έως και τρεις μήνες) ώστε να κατακαθίσουν τα αιωρούμενα σωματίδια και να διαυγάσει (Boskou, 2006c). Στο στάδιο αυτό γίνεται και η αποπίκραση λόγω σταδιακής υδρόλυσης των πικρών γλυκοζιτών. Η διαύγηση επιταχύνεται με διήθηση όταν οι ανάγκες της αγοράς είναι μεγάλες.



**Εικόνα 1.1.** Θολερότητα ελαιολάδου αμέσως μετά την έξοδο από το φυγοκεντρικό διαχωριστήρα.

### **1.7.9. ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Το διαυγές ελαιόλαδο είναι η μόνη αποδεκτή από τους πιο πολλούς καταναλωτές μορφή του τυποποιημένου προϊόντος. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία μια διήθηση, κατά κανόνα πριν την εμφιάλωση. Μεγάλος χρόνος αποθήκευσης στις δεξαμενές διευκολύνει τη διήθηση η οποία γίνεται με διάφορους τρόπους. Ο παλαιότερος και οικονομικότερος τρόπος, που χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα είναι η διήθηση με χρήση υδρόφιλου βάμβακα. Η συνηθέστερη λύση για ένα σύγχρονο τυποποιητήριο είναι η χρησιμοποίηση φιλτρόπρεσσας με πολλαπλά φίλτρα κυτταρίνης που συγκρατούν τα αιωρούμενα στερεά συστατικά και μικρές ποσότητες νερού. Κοινή πρακτική είναι και η χρήση πυριτικών ορυκτών ως διηθητικά μέσα (filter aids).

Η διήθηση, όπως και η καθίζηση, εκτός από τη διαύγηση, έχει και ορισμένα άλλα πλεονεκτήματα. Τα φίλτρα, ως υδρόφιλα, συγκρατούν το νερό, που υπάρχει στο ελαιόλαδο που έχει μόλις παραληφθεί, με προσρόφηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διηθημένο έλαιο να περιέχει ίχνη μόνο υγρασίας (<0,05 %). Το νερό που συγκρατείται από τα φίλτρα περιέχει συχνά μέταλλα (Fe, Zn, Mg, Cu, Cr κ.α) και πιθανώς ίχνη φυτοφαρμάκων. Έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις μετάλλων και φυτοφαρμάκων είναι σε σημαντικό βαθμό μειωμένες στο διηθημένο ελαιόλαδο (Castillo *et al.*, 1999; Roca *et al.*, 2004; Angioni *et al.*, 2006).

## **1.8. ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

### **1.8.1. ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

Το θολό (απόδοση στα ελληνικά του όρου “cloudy” ή “veiled”) ελαιόλαδο είναι το ελαιόλαδο που έχει παραληφθεί πρόσφατα από τις ελιές μετά τη φυγοκέντρηση και το διαχωρισμό των φάσεων, και δεν έχει διαυγάσει (Εικόνα 1.1). Στην πράξη αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν που έχει εμπορικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία, ενώ ενδιαφέρει και τους καταναλωτές επειδή για την οικιακή χρήση του δεν απαιτείται η μεσολάβηση τυποποιητών.

Το θολό ελαιόλαδο μπορούν να προμηθευτούν πολλοί καταναλωτές απευθείας από τα ελαιοτριβεία και έχει παρόμοια σύσταση με το διαυγές ελαιόλαδο που διατίθεται στο εμπόριο. Διακινείται συνήθως μη συσκευασμένο (χύμα) και καταναλίσκεται από τις οικογένειες των ιδιοκτητών του ελαιοτριβείων ή συσκευάζεται για ειδικούς πελάτες οι οποίοι θεωρούν αυτή τη μορφή ελαιολάδου ως ανώτερης αξίας προϊόν που πλεονεκτεί

ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έναντι του διαυγούς ελαιολάδου που διατίθεται στο εμπόριο.

Το θολό ελαιόλαδο που αφορά στην παρούσα διατριβή, διαφέρει από το λεγόμενο «αδιήθητο ελαιόλαδο», το οποίο διαφημίζεται και πωλείται από επώνυμες εταιρείες, κυρίως του εξωτερικού. Οι εταιρείες αυτές συσκευάζουν σε βιομηχανική κλίμακα το υπερκείμενο διαυγές μέρος του ελαίου των δεξαμενών κατακάθισης (βλ. παρ. 1.8.2).

Το θολό ελαιόλαδο έχει ένα μικρό ποσοστό υγρασίας και μια χαμηλή περιεκτικότητα σε αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα στερεά συστατικά (Α.Σ.Σ.), πολύ μικρότερη από 0,1 % που έχει θεσπισθεί ως το ανώτατο όριο σύμφωνα με τις προδιαγραφές ποιότητας του ΙΟΟC. Καταναλίσκεται ως έχει από την αρχή της μεταφοράς σε μικρές δεξαμενές οικιακής χρήσης στις οποίες γίνεται η κατακάθιση με βραδύ ρυθμό.

Η ημιδιαφανής όψη του θολού ελαιολάδου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν πρέπει να συγχέεται με το «θόλωμα του ελαιολάδου» δηλαδή τη μετατροπή ενός διαυγούς δείγματος σε θολό κατά την αποθήκευσή του σε χαμηλές θερμοκρασίες (<10°C). Το θόλωμα αυτό οφείλεται στην πήξη (στερεοποίηση) ορισμένων τριγλυκεριδίων που περιέχουν στο μόριό τους στεατικό ή παλμιτικό οξύ.

Το θολό ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται από τους Lercker *et al.* (1994) ως αιώρημα – σύστημα διασποράς (suspension – dispersion system) επειδή περιέχει μικρή ποσότητα νερού σε διασπορά, καθώς και στερεά σωματίδια σε αιώρηση. Χαρακτηρίζεται επίσης ως γαλάκτωμα «λεπτής υφής» (fine emulsion) από τους Bianco *et al.* (1998). Η περιεκτικότητα σε νερό παίζει μεγάλο ρόλο στην ποιότητα του θολού ελαιολάδου. Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό φαίνεται να παρέχει προστασία έναντι της οξειδωσης παρόλο που παρουσία νερού δρουν οξειδωτικά ένζυμα (βλ. παρ. 1.9.2 και 1.9.3). Σε μελέτη με μοντέλα γαλακτωμάτων που είχαν διαφορετική περιεκτικότητα σε νερό που αφορούσε στην οξειδωσή τους σε διάφορες συνθήκες αποδείχθηκε ότι η παρουσία του νερού σε συγκέντρωση 3 % συμβάλλει στην επιβράδυνση της οξειδωτικής αλλοίωσης (Ambrosone *et al.*, 2002). Η μελέτη αυτή, όπως και άλλες μελέτες για την οξειδωτική σταθερότητα των γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Ambrosone *et al.*, 2006a; Ambrosone *et al.*, 2006b) αφορούσαν ωστόσο σε γαλακτώματα που περιείχαν νερό σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1,5 και 5 % ή και περισσότερο (όπως το «λαδολέμονο», Paraskevoπούλου *et al.*, 2005), ποσοστό που είναι αρκετά υψηλότερο από αυτό που εμφανίζουν τα δείγματα θολού ελαιολάδου.

Μελέτες του ελαιολάδου από φυσικοχημική άποψη αλλά με διαφορετικό αντικειμενικό σκοπό έγιναν από τους Papadimitriou *et al.* (2005). Οι ερευνητές αυτοί χρησιμοποίησαν ελαιόλαδο για να παρασκευάσουν μικρογαλακτώματα με γαλακτωματοποιητή το σύστημα λεκιθίνη-προπανόλη (lecithin-based w/o microemulsions). Το σύστημα αυτό μελετήθηκε και ως φορέας ενζύμων που έχουν κάποιο τεχνολογικό ενδιαφέρον (λιποξυγενάση) και διαπιστώθηκε ότι η χρήση του ελαιολάδου στα μικρογαλακτώματα παρέχει ένα καλό ενζυμικό περιβάλλον εξαιτίας της παρουσίας σε αυτό αμφίφιλων μορίων (Papadimitriou *et al.* 2005; Papadimitriou *et al.* 2007). Ωστόσο και σε αυτή τη περίπτωση, τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν είχαν υψηλή, σχετικά, περιεκτικότητα σε νερό.

Οι Beauchamp *et al.* (2005) διαπίστωσαν ότι το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο που έχει παραληφθεί πρόσφατα από τις ελιές περιέχει ένα παράγωγο της τυροσόλης, την «ελαιοκανθάλη», με φαρμακολογικές ιδιότητες ίδιες με το φαρμακευτικό σκεύασμα Ibuprofen<sup>®</sup>, ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στις αρκετές ομοιότητες που έχουν στη δομή τους οι δυο ενώσεις. Η παρουσία της ελαιοκανθάλης σχετίζεται και με τη στυφή αίσθηση που αφήνει στο λαιμό. Αυτή η διαπίστωση έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο που έχει παραληφθεί πρόσφατα από τις ελιές και τις πιθανές ευεργετικές στην υγεία επιπτώσεις που έχει η κατανάλωσή του.

### **1.8.2. Η ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Το θολό ελαιόλαδο δεν διατίθεται κατά κανόνα συσκευασμένο στην αγορά, ενώ οι καταναλωτές προτιμούν κυρίως τα συσκευασμένα παρθένα ελαιόλαδα που είναι διαυγή, επειδή η θολότητα μπορεί να θεωρηθεί από τους μη ειδικούς καταναλωτές ως ένδειξη κακής ποιότητας ή αλλοίωσης του προϊόντος.

Ωστόσο, οι καταναλωτές που κατάγονται από ελαιοπαραγωγικές περιοχές ή έχουν κάποια σχέση με ελαιοπαραγωγούς ή έχουν κάποια έφεση σε περισσότερο «φυσικά» προϊόντα, προτιμούν το θολό ελαιόλαδο ως πιο «οικολογικό» από το τυποποιημένο ή ακόμα ως προϊόν με ανώτερη βιολογική αξία.

Όσον αφορά στη νομοθεσία, το θολό ελαιόλαδο καλύπτεται γενικότερα από τη νομοθεσία για το φυσικό ελαιόλαδο. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών περιείχε διάταξη (άρθρο 71, παρ. 1), μέχρι και στην έκδοση του έτους 1995, που δήλωνε ρητά ότι «το ελαιόλαδο που διατίθεται στο εμπόριο πρέπει να είναι διαυγές

στους 20°C». Στην έκδοση του έτους 1996, το άρθρο αυτό τροποποιήθηκε (απόφαση του Ανώτατου Χημικού Συμβουλίου 172/95, ΦΕΚ 661/95 Τ.β').

Υπάρχουν πολλές εταιρείες που ειδικεύονται στο εμπόριο ακατέργαστου, μη διηθημένου ελαιολάδου που έχει διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. γλυκό ή φρουτώδες). Συνήθης πρακτική είναι να προέρχεται το έλαιο αυτό από πράσινους ελαιόκαρπους πρώιμης συγκομιδής (αγουρέλαιο). Συνήθως, το ελαιόλαδο αυτό διαφημίζεται ως προϊόν που έχει παραληφθεί μετά από “άλεση σε μύλο από πέτρα” ή ως “ψυχρής έκθλιψης” ελαιόλαδο, για να δοθεί έμφαση στην παραδοσιακή διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε κατά την παραγωγή του. Το προϊόν θεωρείται ιδανικό για χρήση σε εστιατόρια και γενικά καταστήματα εστίασης τύπου gourmet (Eliki Olive Oil LLC, 2007; Pietro DeMarco Importers Inc., 2007, Pacific Sun Olive Oil, 2007; La Tienda, 2007).



**Εικόνα 1.2.** Συσκευασίες θολού και αδιάθητου ελαιολάδου που διατίθεται στις αγορές του εξωτερικού. ΠΗΓΗ: Delicias de España, 2006.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι στη βιβλιογραφία υπάρχουν πατέντες για παραλαβή ελαιολάδου από ελιές σε μικρή κλίμακα έτσι ώστε να μπορεί κάποιος να προσφέρει άμεσα ή ως δώρο στους φίλους του ελαιόλαδο που παράγεται εκείνη τη χρονική στιγμή (Ferrari Tractor CIE, 2007).

### **1.8.3. ΤΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

Η χημική σύσταση, η φυσικοχημική κατάσταση και οι βιοχημικές και άλλες μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο θολό ελαιόλαδο, έχουν σημασία και για τη βιομηχανία αφού το ελαιόλαδο μετά την παραλαβή του μεταφέρεται σε μεγάλες

δεξαμενές όπου παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα για να διαυγάσει. Στο διάστημα αυτό, που μπορεί να ανέλθει ακόμη και σε μερικούς μήνες, ενδέχεται να υποβαθμισθεί η ποιότητά του εξαιτίας οξειδωτικών (Petrakis, 2006) ή υδρολυτικών μεταβολών (Fregarane *et al.*, 2006). Η παραμονή του προϊόντος στις δεξαμενές για διάστημα που μπορεί να φτάσει ακόμη και σε μερικούς μήνες έχει επιπρόσθετα ένα οικονομικό κόστος. Από την άλλη πλευρά, έχει παρατηρηθεί ότι ένα πρόωρο φιλτράρισμα και εμφιάλωση ενέχει τον κίνδυνο εκ νέου εμφάνισης θολώματος στη φιάλη. Το τελευταίο είναι μη αποδεκτό από την πλειοψηφία των καταναλωτών που περιμένουν (προτιμούν) ένα διαυγές ελαιόλαδο. Επιθυμία της κάθε βιομηχανίας είναι να συνδυάσει τις δυο αυτές παραμέτρους (χρόνος παραμονής – αποτελεσματική διαύγαση). Το βιομηχανικό θολό ελαιόλαδο που αναφέρεται σε αυτή τη παράγραφο δεν έχει σχέση με το «βιομηχανικό» ή «βιομηχανοποιήσιμο ελαιόλαδο» που αναφέρει ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (Γενικό Χημείο του Κράτους, 2004) και ο Κανονισμός 1989/03 (EC, 2003).

## **1.9. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ**

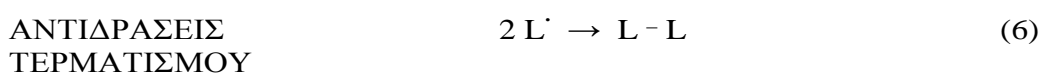
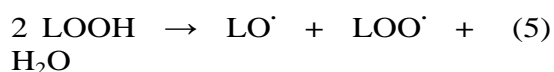
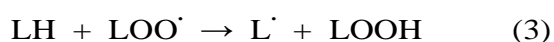
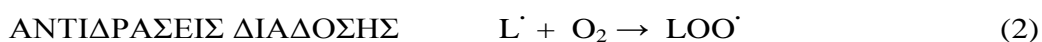
Οι οξειδωτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στο ελαιόλαδο κατά την αποθήκευση οφείλονται κυρίως σε χημική οξείδωση. Η ενζυμική οξείδωση, στην οποία οφείλεται κυρίως η ανάπτυξη του χαρακτηριστικού αρώματος του ελαιολάδου, λαμβάνει χώρα κατά την έκθλιψη του ελαιόκαρπου και τη μάλαξη της ελαιοζύμης.

### **1.9.1. ΧΗΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ**

Η συνήθης οξείδωση των ελαίων είναι αποτέλεσμα οξειδωτικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα παρουσία ή απουσία φωτός. Η οξείδωση απουσία φωτός είναι γνωστή ως αυτοξείδωση (Frankel, 1998). Η αντίδραση των τριακυλογλυκερολών με το μοριακό οξυγόνο προϋποθέτει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών με απομάκρυνση ατόμου υδρογόνου από άτομο άνθρακα που βρίσκεται σε  $\alpha$ -θέση ως προς ένα διπλό δεσμό στο μόριο ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος. Το ελαιόλαδο είναι ανθεκτικό στην αυτοξείδωση εξαιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και της παρουσίας, σ' αυτό, φυσικών αντιοξειδωτικών (Boskou, 1996). Πρωτογενή προϊόντα της αυτοξείδωσης είναι τα υδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία είναι σχετικά ασταθείς ενώσεις και διασπώνται προς νέες ρίζες που

συμμετέχουν με τη σειρά τους σε μια αλυσιδωτή αντίδραση η οποία συνεχίζεται με ταχύτερο ρυθμό (Shahidi, 1998; Yanishlieva, 2001).

Ο μηχανισμός της αυτοξειδωσης είναι αρκετά περίπλοκος και παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.7. Η αλληλουχία των αντιδράσεων περιλαμβάνει τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό (De Man, 1990; Frankel, 1998; Gordon, 2001). Η διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων των ακόρεστων λιπαρών οξέων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό και μεγάλου αριθμού πτητικών οργανικών ενώσεων (δευτερογενή προϊόντα) με μικρό σχετικά αριθμό ατόμων άνθρακα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη δυσάρεστη οσμή και γεύση που παρουσιάζουν οι οξειδωμένες λιπαρές ύλες. Οι ενώσεις αυτές είναι κυρίως αλδεΐδες. Τα υδροϋπεροξειδία των ακόρεστων λιπαρών οξέων μπορούν επίσης να επηρεάσουν έμμεσα το χρώμα και την υφή των τροφίμων (Shahidi, 1998; Gordon, 2001).



### Σχήμα 1.7. Ο μηχανισμός αυτοξειδωσης

Ορισμένα μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός επιταχύνουν τη διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων (προ-οξειδωτική δράση). Πηγές των μετάλλων αυτών είναι οι μεταλλικές επιφάνειες με τις οποίες έρχεται σε επαφή το ελαιόλαδο κατά την παραλαβή του και την αποθήκευσή του σε δεξαμενές. Το οξυγόνο που απαιτείται για να λάβουν χώρα οι αντιδράσεις της αυτοξειδωσης μπορεί να βρίσκεται στον υπερκείμενό του χώρο (head space) εντός της δεξαμενής ή του μέσου συσκευασίας. Για το λόγο αυτό, η

αποθήκευση ή η εμφιάλωσή του σε συνθήκες πολύ χαμηλής πίεσης (κενό) ή σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου (N<sub>2</sub>) αυξάνουν τη διατηρησιμότητα.

Το φως και μια υψηλή θερμοκρασία αποθήκευσης παρέχουν την απαιτούμενη για την έναρξη της αυτοοξειδωσης ενέργεια. Ωστόσο, η οξειδωση παρουσία φωτός (φωτοοξειδωση) χωρεί με μηχανισμό που διαφέρει από αυτόν της αυτοοξειδωσης και οδηγεί σε πολύ ταχύτερη υποβάθμιση της ποιότητας του ελαιολάδου. Σ' αυτό συμβάλλει και η παρουσία στο ελαιόλαδο συστατικών που δρουν ως φωτοευαίσθητοποιητές όπως π.χ. οι χλωροφύλλες (Hall III & Cuppett, 1993). Γενικότερα, η χημική οξειδωση επηρεάζει τόσο το χρώμα όσο και τη θρεπτική αξία του ελαιολάδου καθώς προκαλεί μεταβολές στη σύστασή του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο και μια μείωση στα επίπεδα ή πλήρη καταστροφή των λιποδιαλυτών βιταμινών (Gordon, 2001).

### **1.9.2. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Για τις οξειδωτικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα διάφορα στάδια της παραλαβής και της συντήρησης του ελαιολάδου υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία που περιλαμβάνει πρωτότυπες δημοσιεύσεις, εκτεταμένα άρθρα επισκόπησης και κεφάλαια σε βιβλία (Boskou, 1996; Tsimidou, 1998; Velasco & Dobarganes, 2002; Boskou, 2006). Σημαντικοί λόγοι για το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών είναι η μεγάλη βιολογική και εμπορική αξία του και το περιεχόμενό του σε φυσικά αντιοξειδωτικά. Η σχετική βιβλιογραφία για το θολό ελαιόλαδο είναι όμως περιορισμένη.

Οι Lercker *et al.* (1994) μελέτησαν ένα συγκεκριμένο θολό ελαιόλαδο από την περιοχή της Περούτζια της Ιταλίας και διαπίστωσαν ότι αυτό ήταν πιο σταθερό πριν από τη διήθησή του (εμφάνιζε μεγαλύτερο χρόνο επαγωγής). Οι ερευνητές εξήγησαν τη διαφορά αυτή με βάση τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πολικών φαινολών στο αδιάηθτο δείγμα. Επίσης θεώρησαν ότι τα αιωρούμενα συστατικά του συστήματος παίζουν το ρόλο του ρυθμιστή οξύτητας (acidity buffer) διότι δεσμεύουν τα προερχόμενα από την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών ελεύθερα λιπαρά οξέα και έτσι τα τελευταία δεν δρουν ως προ-οξειδωτικά μέσα. Διαπίστωσαν επίσης ότι το υλικό (κλάσμα) που βρίσκεται σε διασπορά στο αιώρημα περιέχει πολικές φαινόλες και αζωτούχες ενώσεις και διατύπωσαν την άποψη ότι η αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα μπορεί να οφείλεται σε πολυμερισμένες μορφές των πολικών φαινολών που ενδεχομένως εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση. Όλα αυτά δεν είναι όμως επαρκώς τεκμηριωμένα από πειραματική άποψη. Πιο πρόσφατα, οι Frega *et al.* (1999)

μελέτησαν δείγματα παρθένου ελαιολάδου παραδοσιακής παραγωγής (freshly produced artisanal oils) που ήταν θολά. Όταν διήθησαν τα ίδια δείγματα παρατήρησαν μείωση του χρόνου επαγωγής με τη μέθοδο Rancimat που αποδόθηκε στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια. Στα σωματίδια αυτά αποδόθηκε ένας διπλός σταθεροποιητικός ρόλος έναντι της οξειδωσης και έναντι της υδρόλυσης. Ωστόσο, οι πιο πάνω ερευνητές δεν προχώρησαν σε διερεύνηση της φύσης των στερεών σωματιδίων και της φυσικοχημικής κατάστασης του θολού ελαιολάδου.

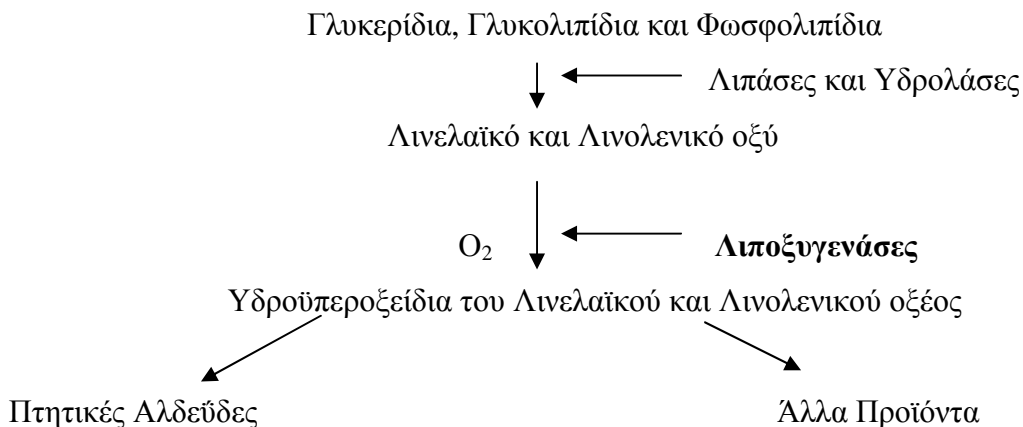
Οι Brenes *et al.* (2001) χρησιμοποίησαν δείγματα ελαιολάδου που παραλήφθηκαν σε βιομηχανική κλίμακα από καρπούς των ισπανικών ποικιλιών Arbequina, Hojiblanca και Picual. Τα δείγματα αυτά, αφού διηθήθηκαν και αφυδατώθηκαν στο εργαστήριο, τοποθετήθηκαν σε φιάλες. Η αποθήκευση του μη διηθημένου ελαιολάδου είχε ως αποτέλεσμα, σύμφωνα με τους πιο πάνω ερευνητές, την ταχύτερη οξειδωτική αλλοίωσή του (υψηλότερες τιμές αριθμού υπεροξειδίων,  $K_{232}$  κ.α.) και μια ταχύτερη υδρόλυση των σύνθετων φαινολικών συστατικών, κάτι που φαίνεται παράδοξο λόγω της απομάκρυνσης του νερού, αν και το διηθημένο διαυγές ελαιόλαδο έχει διαπιστωθεί ότι περιέχει μια μικρή ποσότητα νερού, χαμηλότερη από 0,1 %. Ανάλογα συμπεράσματα έχουν προκύψει και από την έρευνα των Fregarane *et al.* (2006) οι οποίοι χρησιμοποίησαν ελαιόλαδο που παρασκευάστηκε σε βιομηχανική κλίμακα και εμφιαλώθηκε στο εργαστήριο.

Τα παραπάνω δείχνουν τις αντιφάσεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Αυτές μπορεί να οφείλονται στη χρησιμοποίηση τελείως διαφορετικών πρώτων υλών και στην πραγματοποίηση της έρευνας με διαφορετικό αντικειμενικό στόχο αν ληφθεί υπόψη ότι στις μεταγενέστερες δημοσιεύσεις δεν γίνεται μνεία των προγενέστερων. Επομένως, το ερώτημα αν το θολό ελαιόλαδο είναι πράγματι πιο ανθεκτικό από το διηθημένο στην οξειδωση και κάτω από ποιες συνθήκες παραμένει στην ουσία αναπάντητο σε κάποιο βαθμό.

### **1.9.3. ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ**

Οφείλεται στην καταλυτική δράση ορισμένων οξειδωτικών ενζύμων όπως οι φαινολοξειδάσες (PolyPhenol Oxidase ή PPO) και οι λιποξυγενάσες ή λιποξειδάσες (LOX). Η δράση των τελευταίων προϋποθέτει συνήθως την παρουσία ελεύθερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που στην περίπτωση του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό και, κυρίως, το λινολενικό οξύ. (Gordon, 2001). Η πορεία της ενζυμοκαταλυόμενης οξειδωσης των οξέων αυτών φαίνεται στο Σχήμα 1.8. Οι λιποξυγενάσες διακρίνονται

σε λιποξυγενάσες τύπου A, B και Γ. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν υποκυτταρικά συστατικά των καρπών των φυτών και συμμετέχουν στη φυσιολογία τους (ελαιοσώματα κ.α.).



**Σχήμα 1.8.** Καταλυτική δράση λιποξυγενάσης (Gardner, 1989).

Η ενζυμική οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διαφέρει από την αυτοοξείδωσή τους αφού μπορεί να λάβει χώρα με μεγάλη ταχύτητα ακόμη και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (0°C ή χαμηλότερες). Για το λόγο αυτό αποτελεί την κύρια αιτία της οξειδωτικής τάγγισης του λίπους στα καταψυγμένα υψηλής λιποπεριεκτικότητας τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζονται λόγω της καταλυτικής δράσης των λιποξυγενασών διασπώνται στη συνέχεια λόγω της καταλυτικής δράσης άλλων ενζύμων που απαντούν στα φυτά, π.χ. των λυασών των υδροϋπεροξειδίων, προς αλδεύδες ή βινυλαλκοόλες/κετόνες που έχουν χαρακτηριστική οσμή (Σχήμα 1.8). Στα φυτά σχηματίζονται κυρίως τα υδροϋπεροξειδία του λινελαϊκού και του λινολενικού οξέος στα οποία, οι διπλοί δεσμοί βρίσκονται σε συζυγία *cis-trans* (Ridolfi *et al.*, 2002). Από την ενζυμική αποικοδόμηση των υδροϋπεροξειδίων αυτών εξαιτίας της δράσης λυασών σχηματίζονται πτητικές αλδεύδες με πέντε και έξι άτομα άνθρακα που συνεισφέρουν στο άρωμα του ελαιολάδου (Σχήμα 1.8).

Στο ελαιόλαδο έχει διαπιστωθεί η δράση λιποξυγενάσης (Γεωργαλάκη, 1999). Η λιποξυγενάση εκτιμάται ότι μεταφέρεται με μηχανικό τρόπο από τον ελαιοκάρπο στο ελαιόλαδο. Το ένζυμο αυτό είναι σχετικά θερμοάντοχο και για το λόγο αυτό η μεταφορά του στο ελαιόλαδο δεν συνοδεύεται από μεταβολή της δραστηριότητάς του

παρότι έχει προηγηθεί μια ήπια θερμική επεξεργασία κατά τη μάλαξη της ελαιοζύμης (έως και 40°C) (Γεωργαλάκη, 1999).

Η Γεωργαλάκη (1999) μελέτησε και τα χαρακτηριστικά της λιποξυγενάσης (LOX) που ανιχνεύτηκε στο ελαιόλαδο, δηλαδή τα κινητικά χαρακτηριστικά της καταλυτικής δράσης της, τη βέλτιστη τιμή pH στην οποία εμφανίζει τη μέγιστη καταλυτική δράση της, την ενεργότητά της και την ικανότητά της να συμβάλλει στο σχηματισμό συγκεκριμένων στερεοϊσομερών των υδροϋπεροξειδίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η μελέτη των επιπτώσεων που έχουν η περίοδος συγκομιδής και οι συνθήκες στις οποίες γίνεται η παραλαβή του ελαίου (θερμοκρασία μάλαξης, τρόπος διαχωρισμού του ελαίου από την ελαιοζύμη) στα χαρακτηριστικά του ενζύμου έδειξε ότι η δραστηριότητά του ήταν μειωμένη στους 45°C σε σχέση με αυτή στους 30°C, καθώς και κατά τη συγκομιδή σε πρώιμα στάδια ωρίμανσης. Αναφορικά με τον τρόπο διαχωρισμού του ελαίου από την ελαιοζύμη διαπιστώθηκε ότι η ενζυμική ενεργότητα ήταν μάλλον αυξημένη στην περίπτωση διαχωρισμού στο κλασσικό σύστημα. Το έτος παραγωγής φάνηκε να παίζει κάποιο ρόλο, καθώς η σύσταση των ελαιοκαρπων επηρεάζεται από παράγοντες όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, η προσβολή από μικροοργανισμούς ή έντομα, ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της συγκομιδής και της παραλαβής του ελαίου και οι συνθήκες αποθήκευσής τους. Η λιποξυγενάση του ελαιολάδου βρέθηκε ότι καταλύει το σχηματισμό του 13-υδροϋπεροξειδίου του λινελαϊκού οξέος κατά την οξείδωση του ελεύθερου λιπαρού οξέος (Georgalaki *et al.*, 1998b).

Εκτός της λιποξυγενάσης, ενεργότητα φαινολοξειδάσης έχει επίσης παρατηρηθεί στο ελαιόλαδο από τη Γεωργαλάκη (1999) και τους Vaglimigli *et al.* (2001). Οι τελευταίοι έχουν αναπτύξει, μάλιστα, μια μέθοδο προσδιορισμού της ενεργότητας της PPO στις ελιές, τις ελαιόπαστες και τα παρθένα ελαιόλαδα.

Η αλλοίωση των λιπαρών υλών μπορεί να οφείλεται και σε οξείδωση των χαμηλού μοριακού βάρους κορεσμένων λιπαρών οξέων που αποικοδομούνται προς μεθυλοκετόνες λόγω της καταλυτικής δράσης ενζύμων τα οποία απαντούν σε ορισμένους μύκητες. Οι μύκητες αυτοί σχηματίζουν υφές σε λιπώδη υποστρώματα (Belitz *et al.*, 2004). Η αλλοίωση αυτή είναι πρακτικά αδύνατη στην περίπτωση του ελαιολάδου που δεν περιέχει χαμηλού μοριακού βάρους κορεσμένα λιπαρά οξέα.

## **1.10. ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ**

### **1.10.1. ΛΙΠΟΛΥΣΗ**

Λιπόλυση είναι η υδρόλυση των ακυλογλυκερολών προς ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη παρουσία νερού. Ο ρυθμός υδρόλυσης παρουσία νερού (χημική υδρόλυση) είναι βραδύς, επιταχύνεται όμως όταν συνυπάρχουν ένζυμα όπως οι λιπάσες των ακυλογλυκερολών (ενζυμική υδρόλυση). Επειδή τα λιπολυτικά ένζυμα καταστρέφονται με τη θέρμανση, οι μεταβολές που σχετίζονται με τη λιπόλυση παρατηρούνται όταν το τρόφιμο ή το έλαιο δεν έχει θερμανθεί. Για το λόγο αυτό, η λιπόλυση επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την υγρασία και τη δράση των λιπολυτικών ενζύμων.

Η χημική υδρόλυση σε προϊόντα όπως το ελαιόλαδο, το οποίο αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από λιπίδια, δεν αποτελεί ιδιαίτερο πρόβλημα. Τεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ενζυμική υδρόλυση που λαμβάνει χώρα στο στάδιο της επεξεργασίας της ελιάς που οφείλεται στην καταλυτική δράση λιπασών ενδογενούς ή εξωγενούς προέλευσης. Εξωγενείς λιπάσες είναι κυρίως αυτές που η παρουσία τους στον ελαιόκαρπο οφείλεται π.χ. σε επιμόλυνση λόγω επαφής του με το χώμα (Noguchi & Niki, 1999). Για παράδειγμα, η όψιμη συγκομιδή του ελαιόκαρπου και η παραμονή του στο έδαφος ή στα δίχτυα συλλογής, μετά από φυσιολογική πτώση, έχει ως αποτέλεσμα την αισθητή αύξηση της οξύτητας του ελαιολάδου. Αυτό παρατηρείται εξαιτίας της δράσης των ενδογενών λιπασών, που όπως και άλλα ένζυμα, βρίσκονται στο εσωτερικό των καρπών, και των λιπασών από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των «κτυπημένων» καρπών.

### **1.10.2. ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΓΛΥΚΟΖΙΤΩΝ**

Εκτός από τις λιπάσες, στο ελαιόλαδο έχουν βρεθεί και άλλα υδρολυτικά ένζυμα με μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον. Τα ένζυμα αυτά είναι κυρίως γλυκοζιτάσες και συμβάλλουν στην αποπίκραση του ελαιολάδου με την πάροδο του χρόνου που οφείλεται στη σταδιακή υδρόλυση της ελαιοευρωπαϊνης από τις ενδογενείς γλυκοζιτάσες του ελαιόκαρπου (Amiot *et al.*, 1989; Montedoro *et al.*, 1993; Angerosa *et al.*, 1995; Botia *et al.*, 2001). Οι τελευταίες είναι εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία καταλύουν τη διάσπαση των γλυκοζιτών που έχουν στο μόριό τους β-D γλυκοζιτικό δεσμό.

### **1.10.3. ΥΔΡΟΛΥΣΕΙΣ ΟΦΕΙΛΟΜΕΝΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ**

Οι μεταβολές που οφείλονται στην καταλυτική δράση ενδογενών ή εξωγενών ενζύμων που παραμένουν, ενδεχομένως σε ίχνη, στο διαυγές παρθένο ελαιόλαδο είναι διαφορετικές από αυτές που παρατηρούνται στο θολό ελαιόλαδο και οφείλονται στη δράση των ενζύμων διαφόρων μικροοργανισμών που βρίσκονται σ' αυτό λόγω της παρουσίας του νερού. Για το θέμα αυτό υπάρχουν περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα από τις μελέτες μιας, μόνο, ομάδας Ιταλών ερευνητών οι οποίοι εξέτασαν ελαιόλαδο που είχε παραληφθεί πρόσφατα από τον ελαιόκαρπο στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της παραγωγής του στο ελαιοτριβείο και της αποθήκευσής του σε δοχεία από ανοξείδωτο χάλυβα των 100 kg και θερμοκρασία 15°C. Οι ερευνητές αυτοί (Ciafradini & Zullo, 2002a; 2002b; Ciafradini *et al.*, 2004) διαπίστωσαν την παρουσία διαφόρων ζυμομυκήτων (*Candida wackerauii*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Williopsis californica* και *Candida boidini*). Τα ένζυμα κάποιων από αυτούς βρέθηκε ότι μπορούν να υδρολύσουν την ελαιοευρωπαϊνή λόγω της ικανότητάς τους να καταλύουν τη διάσπαση β-D-γλυκοζιτικών δεσμών. Οι πιο πάνω ζυμομύκητες θεωρήθηκε ότι αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας του ελαιολάδου και ότι μεταφέρονται με μηχανικό τρόπο κατά την επεξεργασία του ελαιόκαρπου, μέσω των στερεών συστατικών και των μικροσταγονιδίων του νερού, στο ελαιόλαδο πρόσφατης έκθλιψης. Από τους ίδιους ερευνητές διαπιστώθηκε επίσης η παρουσία μυκήτων του γένους *Aspergillus* σε ελαιόλαδο που είχε παραληφθεί πρόσφατα από ελαιόκαρπο σε ελαιοτριβείο.

## **1.11. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Ο ελαιόκαρπος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, περιέχει πολλά ένζυμα, κυρίως λιπάσες, φαινολοξειδάσες, λιποξυγενάσες, λυάσες των υδροϋπεροξειδίων και ισομεράσες (Morales & Przybylski, 2000). Η ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και υδρολυτικών δράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα αυτά έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο για τη φυσιολογία του καρπού όσο για την ποιότητα του ελαιολάδου που θα παραχθεί. Έχει διαπιστωθεί ότι τα ένζυμα αυτά συμβάλλουν στην αλλοίωση του ελαιόκαρπου, τόσο κατά την ωρίμανση και την αποθήκευσή του όσο και στη διάρκεια της επεξεργασίας του, ιδίως κατά τη μάλαξη της ελαιοζύμης (Goupy *et al.*, 1991; Angerosa *et al.*, 1998;

Morales *et al.*, 1999; Salas & Sánchez, 1999), που έχει ως συνέπεια την υποβάθμιση της ποιότητας του ελαιολάδου.

Οι ανεπιθύμητες ενζυμικές δράσεις μπορούν να περιοριστούν με την εφαρμογή κανόνων Καλής Γεωργικής Πρακτικής (GAP), Καλής Υγιεινής Πρακτικής (GHP) και Καλής Βιομηχανικής Πρακτικής (GMP) στη διάρκεια της καλλιέργειας, της συγκομιδής, της αποθήκευσης και της επεξεργασίας του ελαιόκαρπου, καθώς και της τυποποίησης του ελαιολάδου. Αυτό δεν είναι πάντα εφικτό επειδή οι δράσεις αυτές είναι σύνθετες. Για παράδειγμα, η ταυτόχρονη έκθλιψη του μεσοκαρπίου και του ενδοσπερμίου της ελιάς έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ενζύμων στο πυρηνέλαιο (orujo). Τα ένζυμα αυτά συμβάλλουν στην αλλοίωση του ελαίου κατά την αποθήκευση (Boskou, 1996; Kiritsakis, 1998). Η παραπάνω διαδικασία συμβάλλει όμως στην ανάπτυξη του αρώματος και σε αναβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτήρων του ελαιολάδου (Olias *et al.*, 1993; Morales *et al.*, 1996; Ridolfi *et al.*, 2002). Για τους παραπάνω λόγους, τα ένζυμα αυτά δεν μπορούν να αποκλειστούν από την παραγωγική διαδικασία (Tsimidou, 2006).

Είναι φανερό, λοιπόν, γιατί στα ενδιαφέροντα των ερευνητών περιλαμβάνονται σήμερα και οι μεταβολές που καταλύονται από οξειδωτικά και υδρολυτικά ένζυμα τόσο στον ελαιόκαρπο όσο και στο ελαιόλαδο (Williams *et al.*, 2000; Briante *et al.*, 2002).

## 2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ – ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

---

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του θολού ελαιολάδου το οποίο ως μια μορφή φυσικού παρθένου ελαιολάδου διαφέρει στη σύσταση και την εμφάνιση από το διηθημένο παρθένο ελαιόλαδο. Το ελαιόλαδο αυτό καταναλίσκεται ως έχει από τις οικογένειες των ιδιοκτητών των ελαιοτριβείων και των ελαιοπαραγωγών, καθώς και από καταναλωτές που το θεωρούν ανώτερης ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο. Σημειώνεται ότι η κατηγορία αυτή του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου δεν είναι νομοθετημένη από την εθνική και την ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Οι βασικές του διαφορές από το εξαιρετικά παρθένο τυποποιημένο ελαιόλαδο είναι η παρουσία μικρού ποσοστού υγρασίας και αιωρούμενων σωματιδίων (Α.Σ.Σ.). Οι παράμετροι αυτές διαφοροποιούν τη φυσικοχημική του κατάσταση και ενδεχομένως ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και βιοχημικής δράσης που συνδέεται με τη παρουσία ενζύμων.

Πιο συγκεκριμένα στην εργασία αυτή διερευνήθηκαν:

- Η περιεκτικότητα σε ολικές πολικές φαινόλες και η επίδρασή τους στην σταθερότητα του θολού ελαιολάδου.
- Η φυσικοχημική κατάσταση που χαρακτηρίζει το θολό ελαιόλαδο.
- Τα επίπεδα και η φύση ησόνων συστατικών που δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς π.χ. φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες.
- Η παρουσία μικροοργανισμών (χαρακτήρας, πληθυσμός) και οι βιοχημικές τους δράσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ποιότητα του ελαιολάδου.

## **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

### **3.1. ΥΛΙΚΑ**

#### **3.1.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Η προμήθεια των δειγμάτων του ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή έγινε από εταιρείες εμπορίας ελαιολάδου, ελαιοπαραγωγικούς συνεταιρισμούς και μεμονωμένα ελαιοτριβεία των περιοχών Χαλκιδικής, Κρήτης, Καλαμάτας, Άρτας και Δράμας κατά τις ελαιοκομικές περιόδους 2003-2004, 2004-2005 και 2005-2006. Τα δείγματα αυτά, που παραλήφθηκαν μετά το στάδιο της φυγοκέντρωσης και πριν το στάδιο της αποθήκευσης η οποία αποσκοπεί στη διαύγασή τους, ήταν στην πλειοψηφία τους θολά ή μερικώς θολά. Αγοράστηκαν επίσης δείγματα από το λιανικό εμπόριο. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν είκοσι (20).

**Διήθηση:** Η διήθηση των θολών δειγμάτων έγινε στο εργαστήριο, απουσία φωτός, με χρήση διπλού πτυχωτού ηθμού κυτταρίνης. Η ποσότητα του δείγματος που διηθούνταν κάθε φορά ήταν μικρή (50 g).

**Αποθήκευση:** Τα δείγματα αποθηκεύονταν μετά την παραλαβή τους σε καταψύκτη (-18°C), τοποθετημένα σε μικρά γυάλινα φιαλίδια (5, 10, 50, 100 g) στα οποία είχε διαβιβασθεί άζωτο και αποψύχονταν λίγο πριν την εξέτασή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

##### **3.1.1.1. Δείγματα που υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική εξέταση**

Επιλέχθηκαν τέσσερα δείγματα θολού ελαιολάδου που είχαν παραληφθεί πρόσφατα από καρπούς εσοδείας 2005-6 τα οποία είχαν συγκομισθεί από περιοχές της Χαλκιδικής (δύο δείγματα), της Δράμας (ένα δείγμα) και της Άρτας (ένα δείγμα), καθώς και ένα δείγμα διηθημένου παρθένου ελαιολάδου του εμπορίου (μάρτυρας). Η δειγματοληψία των δειγμάτων θολού ελαιολάδου έγινε σε ασηπτικές συνθήκες αμέσως μετά την παραγωγή και λίγο πριν την αποθήκευσή τους. Αυτά τοποθετήθηκαν σε προαποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια των 100 mL. Η ποσότητα κάθε δείγματος διαμοιράστηκε σε πέντε διαφορετικές φιάλες επειδή αποφασίστηκε να γίνει η επώαση-

αποθήκευση του κάθε δείγματος σε ειδικό θερμοστατικό θάλαμο (25°C) για έξι διαφορετικά χρονικά διαστήματα (0, 15, 30, 45, 60, 90 ημέρες).

### **3.1.2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

#### **3.1.2.1. Διαλύτες**

Χρησιμοποιήθηκαν ακετόνη, κ-προπανόλη, εξάνιο, πετρελαϊκός αιθέρας, τριχλωρομεθάνιο και διαιθυλαιθέρας της εταιρείας Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain), μεθανόλη και βενζυλική αλκοόλη της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany), και τετραϋδροφουράνιο (THF), ισοοκτάνιο (spectranal), αιθανόλη και διοξάνιο της εταιρείας Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Στην ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης χρησιμοποιήθηκαν υψηλής καθαρότητας προπανόλη-2 και εξάνιο της εταιρείας Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). Για την παρασκευή όλων των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό διπλής απόσταξης. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις με τη φασματοσκοπία NMR ήταν δευτεριωμένο τριχλωρομεθάνιο  $CDCl_3$  της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

#### **3.1.2.2. Αντιδραστήρια**

Χρησιμοποιήθηκαν χημικά αντιδραστήρια τα οποία είχαν την καθαρότητα που απαιτούσε η κάθε επιμέρους ανάλυση, όπως φαινολοφθαλεΐνη, φαινόλη, ουρία, γλυκίνη, γλουταρική αλδεΐδη, αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, ιωδιούχο κάλιο, άνυδρο θειϊκό νάτριο, διμεθυλαρσενικό νάτριο (Sodium dimethylarsenate.  $(CH_3)_2AsNaO_2$ ), οξικό οξύ, νιτρικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και θειικό οξύ της εταιρείας Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν άνυδρο ανθρακικό νάτριο, μυρμηκικό οξύ, επταμολυβδενικό αμμώνιο και μεταβαναδικό αμμώνιο της εταιρείας Riedel-de Haën (Seelze, Germany), αντιδραστήριο Bradford με βάση τη χρωστική Coomassie Blue G, ακρυλαμίδιο και *bis*-ακρυλαμίδιο, υπερθειϊκό αμμώνιο, θειϊκός χαλκός, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), υδροξείδιο του κασίου και οξείδιο του μαγνησίου της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), φορμαλδεΐδη της εταιρείας Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain), τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED) και 1,4-διθειοθρεϊτόλη (DDT) της εταιρείας Invitrogen (Paisley, Scotland), β-μερκαπτοαιθανόλη της εταιρείας Applichem GmbH (Darmstadt, Germany), και νιτρικός άργυρος, καυστικό κάλιο, γλυκερόλη, κυανούν της βρωμοθυμόλης, άμυλο, βορικό οξύ και θειοθειϊκό νάτριο της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).

### 3.1.3. ΚΑΘΑΡΕΣ ΟΥΣΙΕΣ – ΠΡΟΤΥΠΑ

Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, προκειμένου να υπολογισθεί με εφαρμογή της μεθόδου Folin-Ciocalteu η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικές φαινόλες, χρησιμοποιήθηκε καφεϊκό οξύ καθαρότητας 98 % (Riedel-de Haën, Seelze, Germany). Για τον προσδιορισμό της οξύτητας χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 1 mol/L (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain). Για τη ρύθμιση των σταθερών αγωγιμότητας των ηλεκτροδίων της συσκευής Rancimat χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα χλωριούχου καλίου 0,1 mol/L, (συνόδευε τη συσκευή). Για τον προσδιορισμό του αριθμού υπεροξειδίων χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,1 mol/L (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain). Για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, προκειμένου να υπολογισθεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες με εφαρμογή της μεθόδου Bradford χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη (αλβουμίνη) βόειου ορού (BSA) της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς προκειμένου να υπολογισθεί με εφαρμογή χρωματομετρικών μεθόδων η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φωσφόρο και του αδιάλυτου στερεού υπολείμματος (Α.Σ.Σ.) των δειγμάτων σε ολικά σάκχαρα χρησιμοποιήθηκαν δισόξινο φωσφορικό κάλιο της εταιρείας Riedel-de Haën (Seelze, Germany) και γλυκόζη της εταιρείας Fluka (Buchs, Switzerland), αντίστοιχα.

Για τη διαπίστωση της ικανότητας των μικροοργανισμών να προκαλούν υδρόλυση γλυκοζιτών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπος γλυκοζίτης της π-νιτροφαινόλης (pNPG) της εταιρείας Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) και ελαιοευρωπαϊνή της εταιρείας Extrasynthese (Geney, France).

Τα φωσφολιπίδια του ελαιολάδου ταυτοποιήθηκαν κατά την υδροχρωματογραφική ανάλυση με χρήση φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Τα φωσφολιπίδια αυτά και επιπροσθέτως το φωσφατιδικό οξύ, η φωσφατιδυλογλυκερόλη και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), χρησιμοποιήθηκαν και για την ταυτοποίηση των φωσφολιπιδίων κατά την ανάλυσή τους με φασματοσκοπία NMR.

Κατά την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες μοριακής μάζας (ProSieve Protei non stained Markers, Cambrex, USA) που είχαν μοριακή μάζα 225, 156, 100, 75, 50, 35, 25, 15, 10 και 5 KDa.

### **3.1.4. ΗΘΜΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Για τη διήθηση των ελαιολάδων χρησιμοποιήθηκαν απλοί ηθμοί κυτταρίνης (Riedel-de Haën, Seelze, Germany με διάμετρο πόρων 11  $\mu\text{m}$ ). Για τη διήθηση υπό κενό χρησιμοποιήθηκαν χωνί Büchner και ηθμός κυτταρίνης Whatman Grade 1 ή Whatman 541 (Whatman Ltd., Maidstone, UK) με διάμετρο πόρων 11  $\mu\text{m}$ . Κατά την εφαρμογή της μεθόδου της ξήρανσης κρίσιμου σημείου (Critical Point Drying, CPD) χρησιμοποιήθηκε ηθμός μεμβράνης κατασκευασμένος από οξική κυτταρίνη με διάμετρο πόρων 0,20 cm (ALBET, Barcelona, Spain).

Στη μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα και αντιδραστήρια της εταιρείας Oxoid (Basingstoke, UK). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν υπόστρωμα για την ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) ή το Plate Count agar (PCA), υπόστρωμα για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, το MRS (de Man Rogosa Sharp) agar και ειδικά υποστρώματα για την ανάπτυξη ζυμομυκήτων και μυκήτων όπως το Sabouraud (SAB) και το Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE). Στο δεύτερο (OGYE) χρησιμοποιήθηκαν και τα αντιβιοτικά gentamicin και chloramphenicol. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν γλυκόζη, πεπτόνη, χλωριούχο νάτριο και άγαρ-άγαρ της εταιρείας Oxoid (Basingstoke, UK). Για την αναγνώριση των ζυμομυκήτων χρησιμοποιήθηκε το kit βιοχημικών δοκιμών API 32 C AUX (Biomérieux, France). Οι πλάκες TLC που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πυριτίου και πάχους 0,28 mm της εταιρείας Merck (Darmstadt, Germany).

### **3.2. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές και όργανα του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος: φασματοφωτόμετρο UV-Vis διπλής δέσμης U-2000 Hitachi (Tokyo, Japan), συσκευή μέτρησης οξειδωτικής σταθερότητας λιπαρών υλών Rancimat 679 (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland), συσκευή ομογενοποίησης Ultra Turrax (IKA Instruments, UK), φυγόκεντρος model SV11, (Firlabo. Lyon, France), περιστροφικός εξατμιστής κενού model RE 111 (Büchi, Switzerland), υδρόλουτρο model 461 με υδραντλία κενού model 169 (Büchi, Switzerland), συσκευή λυοφιλίωσης Christ, alpha 1-2 (Osterode, German) και περιστρεφόμενος εξατμιστής κενού της εταιρείας Büchi (Flawil, Switzerland).

Επίσης χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) αποτελούμενο από αντλία: Shimadzu FCV-10AL/LC 10 ADI (Shimadzu Laboratories Instruments, Tokyo, Japan, στήλη Alltech Econoshere Silica 5μ, εσωτερικής διαμέτρου 5,6mm και μήκους 20cm (Alltech Inc., Deerfield, Illinois, USA) και ανιχνευτή: Shimadzu SPD 10 ACV. Επίσης από το ίδιο Εργαστήριο προέρχονταν ο φούρνος πύρωσης model MR-170 (Heraeus, Hanau, Germany), ο ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός, ακρίβειας 0,0001 g, model AB 204-S (Metler-Toledo GmbH, Greifensee, Germany), ο ηλεκτρονικός ζυγός, ακρίβειας 0,001 g, model BC 180 (ORMA, Milano, Italy), η συσκευή ανακίνησης κωνικών φιαλών (Mk X incubator shaker, LH Engineering, UK), ο θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας Agimatic 243 (P Selecta, Valencia, Spain) και ο κυκλομίκτης Vortex Miximatic (Jencons Bedfordshire, UK).

Στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος έγινε χρήση της συσκευής ηλεκτροφόρησης κάθετης ανάπτυξης πάχους 1,5mm και μήκους 14cm που κατασκευάστηκε στο Ινστιτούτο Max-Planck Μοριακής Γενετικής του Βερολίνου, και της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών model TE-70 Semi-Dry Blotter της εταιρίας Hoeffer Scientific (San Francisco, CA). Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν: μικροφυγόκεντρος Minispin (Eppendorf, Hamburg, Germany), υπερφυγόκεντρος Sorvall RC-SB (Sorvall. Instruments, Newtown, CT, USA) και συσκευή ξήρανσης υπό κενό SpeedVac SC100 (Savant, London, UK).

Στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές: συσκευή εκτίμησης πυκνότητας αιωρήματος μικροοργανισμών (Dencimat, Biomérieux, France), στερεοσκόπιο Zasilacz type 1-6/50 (Telos, Krakow, Poland) και επωαστικοί κλίβανοι Incupigit (Selecta S.A., Barcelona, Spain).

Το φασματόμετρο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού Bruker AMX 500 (Rheinstetten, Germany) ανήκει στο Εργαστήριο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Κρήτης.

Στο Εργαστήριο Οπτικής και Ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου της Λεόν χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές: οπτικό μικροσκόπιο Nikon EX2 (Tokyo, Japan), εξοπλισμένο με διάφορους φακούς (100x, 40x, 20x, 10x) και ψηφιακή κάμερα Nikon (Tokyo, Japan) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL model JSM-6480LV (Jeol Technics Ltd, Tokyo, Japan) εφοδιασμένο με λογισμικό SEM (Scanning Electronic Microscopy) Control, User Interface version 7.07 (Jeol Technics Ltd, Tokyo, Japan) και ειδική ψηφιακή κάμερα. Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν ο ξηραντήρας κρίσιμου

σημείου model CPD 030 (Bal-Tec Corp, Middlebury, CT) και η συσκευή επίστρωσης μεταλλικού φιλμ σε μεμβράνες (metallizer) Sputter Coater SCD 004 (Balzers, Nordenstadt, Germany).

Η συσκευή ποσοτικού προσδιορισμού νερού Orion AF4 Coulometric Karl Fisher titrator (Boston, USA) και το θολερόμετρο Dinko D-112 turbidimeter (Barcelona, ES) ανήκουν στον εξοπλισμό του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου της Λεόν.

### **3.3. ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.3.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ**

##### **3.3.1.1. Προσδιορισμός της οξύτητας, του αριθμού υπεροξειδίων και των ειδικών φασματοσκοπικών σταθερών $K_{232}$ , και $K_{270}$ .**

Εφαρμόστηκαν οι επίσημες μέθοδοι που περιλαμβάνονται στον Κανονισμό ΕΕ 2568/91 (Επίσημη Εφημερίδα της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1991). Η επαναληψιμότητα των μεθόδων ήταν: για την οξύτητα:  $\bar{x} \pm CV \% = 0,35 \pm 2,1 \%$  (n=6), τον αριθμό υπεροξειδίων:  $10,9 \pm 2,3 \%$  (n=6) και τις σταθερές  $K_{232}$ :  $1,61 \pm 3,1 \%$  (n=6)  $K_{270}$ :  $0,26 \pm 3,0 \%$  (n=6).

##### **3.3.1.2. Προσδιορισμός της οξειδωτικής σταθερότητας με χρήση συσκευής Rancimat**

Αρχικά έγινε ρύθμιση των σταθερών αγωγιμότητας των ηλεκτροδίων με διάλυμα χλωριούχου καλίου 0,001 mol/L το οποίο παρασκευάστηκε με χρήση προτύπου διαλύματος 0,1 mol/L. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων για κάθε θέση της συσκευής με τοποθέτηση του ίδιου δείγματος και στις τρεις θέσεις της (η εργασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές). Από τη σύγκριση των μέσων όρων των τιμών της περιόδου επαγωγής, με εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης one-way ANOVA (όριο εμπιστοσύνης 95 %), προέκυψε ότι οι τιμές από τις τρεις διαφορετικές θέσεις του οργάνου δεν εμφάνιζαν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν ικανοποιητική (CV=5,9 %, n=9) αλλά ο προσδιορισμός του χρόνου επαγωγής για κάθε δείγμα αποφασίσθηκε να γίνει τρεις φορές για στατιστικούς λόγους.

Στα δοχεία μέτρησης της αγωγιμότητας μεταφέρθηκαν 60 mL δισαποσταγμένου νερού, ενώ στους υποδοχείς 2,5 g ελαίου. Τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 120°C και η ροή του αέρα ρυθμίστηκε στα 20 L/h. Ο χρόνος επαγωγής (induction time) εκφράζεται με την τιμή OSI (Oil Stability Index), βιβλιογραφική αναφορά μεθόδου Rancimat υπολογίστηκε σε ώρες (h) με τη βοήθεια του οργάνου Rancimat (Hadorn & Zürcher, 1974; Läubli & Bruttel, 1986).

### **3.3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΗΞΣΟΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ**

#### **3.3.2.1. Προσδιορισμός ολικών φαινολών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu**

Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης ζυγίστηκαν 5 g δείγματος θολού ή διηθημένου ελαιολάδου και προστέθηκαν 5 mL εξανίου και 5 mL μίγματος μεθανόλης-νερού (60:40, v/v). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3.500 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο. Το πολικό κλάσμα παραλήφθηκε προσεκτικά από την κάτω στιβάδα του σωληναρίου με τη βοήθεια μικροσιφονίου. Ποσότητα 0,2 mL από το πολικό κλάσμα αραιώθηκε με νερό εντός ογκομετρικής φιάλης των 10 mL, προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και, μετά την παρέλευση τριών λεπτών, 1 mL κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου. Το περιεχόμενο της φιάλης συμπληρώθηκε με νερό και η φιάλη τοποθετήθηκε σε σκοτεινό χώρο. Μετά από παρέλευση ακριβώς μιας ώρας μετρήθηκε σε φασματόμετρο UV-Vis η απορρόφηση του περιεχομένου της φιάλης στα 725 nm έναντι λευκού δείγματος (Gutfinger, 1981; Tsimidou *et al.*, 1992). Κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με τη βοήθεια διαλυμάτων καφεϊκού οξέος και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν συμβατικά σε mg καφεϊκού οξέος/kg ελαίου (caffeic acid equivalents, CAE). Οι τιμές που δίνονται είναι ο μέσος όρος τριών προσδιορισμών. Έγινε έλεγχος της επαναληψιμότητας της μεθόδου:  $\bar{x} \pm CV \% = 108,8 \pm 4,2 \% (n=6)$ .

Στην περίπτωση του προσδιορισμού πολικών φαινολών στο υπόλειμμα του ηθμού μετά τη διήθηση δηλαδή στα Α.Σ.Σ. (βλ. Πίνακας 4.4) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Ορισμένη ποσότητα θολού ελαιολάδου (40 g) διηθήθηκε υπό κενό σε χωνί Büchner με διηθητικό χαρτί Whatmann grade 1 και μετά το πέρας της διήθησης ο ηθμός πλύθηκε με πετρελαϊκό αιθέρα για την απομάκρυνση των λιπιδίων και εκχυλίστηκε με 5 mL μίγματος μεθανόλης-νερού (60:40, v/v). Έπειτα τηρήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παραπάνω.

### 3.3.2.2. Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου και, εμμέσως, φωσφολιπιδίων

Βασίζεται στην αποτέφρωση του δείγματος και το χρωματομετρικό προσδιορισμό των ορθο-φωσφορικών στην τέφρα με εφαρμογή της μεθόδου 2.421 της IUPAC (1987). Σε κάψα πορσελάνης ζυγίζεται ορισμένη ποσότητα ελαιολάδου (20-40 g), προστίθενται 0,2 g MgO και το μίγμα απανθρακώνεται με χρήση λύχνου Bunsen. Η κάψα μεταφέρεται στη συνέχεια σε φούρνο όπου το περιεχόμενό της αποτεφρώνεται στους 1000°C για 30 λεπτά. Η τέφρα, που πρέπει να έχει λευκό έως υπόλευκο χρώμα, διαλύεται σε 5 mL διαλύματος νιτρικού οξέος (6 mol/L). Στην κάψα προστίθενται ακολούθως και κατά σειρά 10 mL διαλύματος μολυβδενικού αμμωνίου (5 % w/v) και 10 mL διαλύματος βαναδικού αμμωνίου (1,25 % w/v), και μετά από παρέλευση 20 λεπτών μετρίεται η απορρόφηση του περιεχομένου της στα 470 nm έναντι λευκού δείγματος. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με τη βοήθεια διαλυμάτων δισόξινου φωσφορικού καλίου και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ολικού φωσφόρου/kg ελαίου. Για να υπολογισθεί η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια πολλαπλασιάζεται η περιεκτικότητα σε ολικό φωσφόρο με το συντελεστή 25,3 (βλ. παρ. 4.4.1). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν:  $\bar{x} \pm CV \% = 2,41 \text{ mg P/kg} \pm 4,8 \% (n=6)$ .

### 3.3.2.3. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Σε ορισμένη ποσότητα δείγματος θολού ή διηθημένου ελαιολάδου (40-120 g), που έχει αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται επαρκής ποσότητα ψυχρής ακετόνης (4°C). Το μίγμα αφήνεται σε χώρο με θερμοκρασία 2-4°C για τουλάχιστον 30 λεπτά και στη συνέχεια διηθείται σε χωνί Büchner με χρήση ηθμού Whatman Grade 1 σε συνθήκες ελαττωμένης πίεσης. Ακολουθεί έκπλυση του υπολείμματος στον ηθμό αρχικά με τετραϋδροφουράνιο (THF) και στη συνέχεια με διοξάνιο. Τα υγρά των εκπλύσεων ενώνονται μετά τη συλλογή τους και απομακρύνονται οι διαλύτες σε ρεύμα αζώτου.

Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (0,2 mol/L), που έχει τιμή pH 8,5, εντός φιαλιδίου με τη βοήθεια κυκλομίκτη για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το φιαλίδιο φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο Eppendorf για 10 λεπτά με επιτάχυνση 13 g. Στο υπερκείμενο, που περιέχει τις πρωτεΐνες του δείγματος και μεταφέρεται ποσοτικώς σε φιαλίδιο, προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου Bradford και μετά την παρέλευση 15 ακριβώς λεπτών μετρίεται η απορρόφηση στα 725 nm (Bradford, 1976). Η καμπύλη αναφοράς έγινε με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin) και βρέθηκε γραμμική σε συγκεντρώσεις

0,05 έως 10 mg/mL πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg BSA/kg ελαίου (μέσος όρος τριών προσδιορισμών). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 0,05 mg/kg ελαίου. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκε σε δυο επίπεδα:  $\bar{x} \pm CV \% = 0,20 \pm 12,7 \% (n=4)$  και  $1,0 \pm 6,1 \% (n=4)$ .

### **3.3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΟ ΑΙΘΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (Α.Σ.Σ.) ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Ca 3-47 της American Oil Chemists Society (AOCS, 1998). Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL διαλύονται 50 g θολού ελαιολάδου σε 150 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Το διάλυμα διηθείται σε χωνί Büchner με χρήση προξηραμένου και προζυγισμένου ηθμού Whatman Grade 1 υπό πίεση. Το υπόλειμμα στον ηθμό πλένεται εξαντλητικά με πετρελαϊκό αιθέρα και ξηραίνεται σε πυριαντήριο (105°C) για δυο τουλάχιστον ώρες, ζυγίζεται εκ νέου και από τη διαφορά στο βάρος υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικά (εκφράζεται σε mg/kg). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου βρέθηκε:  $\bar{x} \pm CV \% = 0,012 \pm 11 \% (n=6)$ . Για κάθε μέτρηση έγιναν τρεις προσδιορισμοί και λήφθηκε ο μέσος όρος.

### **3.3.4. ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΕ ΠΕΤΡΕΛΑΪΚΟ ΑΙΘΕΡΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ (Α.Σ.Σ.) ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

#### **3.3.4.1. Απομόνωση των Α.Σ.Σ. από «μούργα» ελαιολάδου**

Μεγάλη ποσότητα (~1 kg) ιζήματος (λήφθηκε από δεξαμενή ελαιοτριβείου της περιοχής της Άρτας στην οποία αποθηκεύεται ελαιολάδο αμέσως μετά την παραλαβή του), αναμείχθηκε με διπλάσια ποσότητα πετρελαϊκού αιθέρα. Το μίγμα διηθήθηκε με χρήση διπλού πτυχωτού ηθμού και έπειτα έγινε σχολαστική έκπλυση του ηθμού με διαλύτη ώστε από τα αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικά του ιζήματος και τον ηθμό να απομακρυνθούν πλήρως τα λιπίδια (3-4 φορές). Ο ηθμός ξηράνθηκε σε πυριαντήριο κενού (30°C) για 48 ώρες και το ξηρό στερεό υπόλειμμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο στο οποίο διαβιβάζεται άζωτο πριν τοποθετηθεί στον καταψύκτη (-28°C). Από την ποσότητα που απομονώθηκε (~10 g), προέκυψαν δείγματα Α.Σ.Σ. για τους παρακάτω προσδιορισμούς.

#### **3.3.4.2. Προσδιορισμός ολικών σακχάρων**

Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο φαινόλης - θειικού οξέος, (Debois *et al.*, 1956). Το ξηρό στερεό υπόλειμμα Α.Σ.Σ. διαλύεται σε 10 mL αιθανόλης 80 % (v/v) θερμοκρασίας 60-70°C εντός κυλινδρικού φιαλιδίου (Be Miller & Low, 1999) για την όσο το δυνατόν πιο πλήρη παραλαβή των σακχάρων. Η διαλυτοποίηση γίνεται με χρήση κυκλομίκτη και ακολουθεί η εκχύλιση των σακχάρων με χρήση συσκευής ανακίνησης κωνικών φιαλών για δυο ώρες. Το μίγμα φυγοκεντρείται ή διηθείται και το υπερκείμενο αραιώνεται σε αναλογία 1:100 με το διαλύτη. Ποσότητα 1 mL από το τελικό διάλυμα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου προστίθενται 0,5 mL διαλύματος φαινόλης 1 % (w/v) και 2,5 mL πυκνού θειικού οξέος. Η απορρόφηση του έγχρωμου συμπλόκου που προκύπτει μετρείται στα 490 nm. Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με χρήση διαλυμάτων γλυκόζης και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g ολικών σακχάρων ανά 100 g Α.Σ.Σ. Έγιναν τέσσερις προσδιορισμοί και δίνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν : CV % = 4,1 (n=4).

#### **3.3.4.3. Προσδιορισμός ολικών φαινολών**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu χωρίς να προηγηθεί το στάδιο της εκχύλισης των φαινολών. Αρχικά διαλυτοποιούνται 0,5 g ξηρού στερεού υπολείμματος Α.Σ.Σ. σε 10 mL μίγματος μεθανόλης-νερού (60:40) και ακολουθεί καλή ανάμιξη του μίγματος για 15 λεπτά σε κυκλομίκτη. Στη συνέχεια ακολουθείται η μέθοδος που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.2.1.).

#### **3.3.4.4. Προσδιορισμός τέφρας**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 930.30 της Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2003). Ζυγίζονται 0,2 g ξηρού στερεού υπολείμματος με ακριβείας 0,1 mg που αποτεφρώνονται όπως περιγράφεται στην επίσημη μέθοδο. Το αποτέλεσμα δίνεται σε g/100 g Α.Σ.Σ. (μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων) και η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν: CV % = 2,3 (n=4).

#### **3.3.4.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνών**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Ποσότητα 0,2 g του ξηρού στερεού υπολείμματος πλένεται διαδοχικά με 10 mL THF και 10 mL διοξάνιου. Τα εκπλύματα ενώνονται και απομακρύνονται οι διαλύτες με διαβίβαση αζώτου. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε Tris-HCl (0,2 mol/L) σε

τιμή pH 8.5 και ακολουθεί ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.2.3). Το αποτέλεσμα δίνεται σε g /100 g Α.Σ.Σ. (μέσος όρος τεσσάρων μετρήσεων, επαναληψιμότητα της μεθόδου: CV % = 7,3 για n=4).

#### **3.3.4.6. Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου και, εμμέσως, φωσφολιπιδίων**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.2.2) με χρήση 0,2 g ξηρού στερεού υπολείμματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g P ή σε g φωσφολιπιδίων ανά 100 g Α.Σ.Σ..

#### **3.3.4.7. Προσδιορισμός ακατέργαστων ινών (crude fibre)**

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 962.09 του AOAC (2003). Ποσότητα 0,5 g ξηρού στερεού υπολείμματος τοποθετείται σε κωνική φιάλη όπου προστίθενται 100 mL ζέοντος διαλύματος NaOH 1,25 % (w/v). Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και διατηρείται υπό συνεχή ανάδευση σε βρασμό για 30 λεπτά. Στη συνέχεια διηθείται «εν θερμώ» υπό κενό με χρήση προξηραμένου και προζυγισμένου ηθμού Whatman 541 ελεύθερου τέφρας. Τα στερεά του ηθμού διαλύονται σε 100 mL ζέοντος διαλύματος θειικού οξέος 1,25 % (w/v). Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και διατηρείται υπό συνεχή ανάδευση σε βρασμό για 30 λεπτά. Ακολούθως διηθείται «εν θερμώ» υπό κενό με χρήση νέου ηθμού Whatman 541. Ο ηθμός πλένεται από τρεις φορές κάθε φορά διαδοχικά με βραστό νερό, αιθέρα και αιθανόλη και αποτεφρώνεται σε πυριαντήριο. Από τη διαφορά βάρους του ηθμού υπολογίστηκαν οι ακατέργαστες ίνες. Το αποτέλεσμα ανάγεται σε επί τοις εκατό σε Α.Σ.Σ. Ο προσδιορισμός έγινε τρεις φορές (CV %=15,3 %, n=3).

### **3.3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ**

#### **3.3.5.1. Απομόνωση φωσφολιπιδίων από το ελαιόλαδο με εκχύλιση**

Εφαρμόστηκε η μέθοδος που περιγράφεται στις εργασίες των Nomikos *et al.*, (2002) και Galanos & Karoulas (1962) που τροποποιήθηκε στο Εργαστήριο (Βογιατζή, 2006). Ορισμένη ποσότητα ελαιολάδου (100 g) διαλύθηκε σε τετραπλάσια περίπου ποσότητα πετρελαϊκού αιθέρα (450 mL). Το μίγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστικό χωνί όπου προστέθηκε 100 mL αιθανόλης 87 % (v/v). Με δεδομένο ότι οι δυο διαλύτες έχουν διαφορετική πολικότητα, σχηματίστηκαν δυο στιβάδες, η αιθανολική-πολική στιβάδα και η υπερκείμενη μη πολική στιβάδα του πετρελαϊκού αιθέρα. Παραλήφθηκε η αιθανολική και η υπερκείμενη στιβάδα πλύθηκε τέσσερις φορές με 100 mL

αιθανόλης 87 % (v/v). Στη συνέχεια τα ενωμένα αιθανολικά εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε άλλο διαχωριστικό χωνί όπου πλύθηκαν με ακόμα 250 mL ποσότητα πετρελαϊκού αιθέρα και η αιθανολική στοιβάδα που προέκυψε συμπυκνώθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλιώθηκε μέχρι ξηρού.

### **3.3.5.2. Ανάλυση φωσφολιπιδίων με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης**

Χρησιμοποιήθηκε η επίσημη υγροχρωματογραφική μέθοδος κανονικής φάσης της IUPAC (1992), που εφαρμόζεται για την εξακρίβωση της σύστασης της λεκιθίνης. Η κινητή φάση αποτελούνταν από το διαλύτη A, μίγμα κ-εξανίου και 2-προπανόλης (1:1, v/v) και το διαλύτη B, ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ανιόντων με τιμή pH 4,2. Η έκλουση ήταν ισοκρατική (94 % διαλύτης A) με ροή 1,7 mL/min. Για την ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ως εξωτερικό πρότυπο φωσφατιδυλοχολίνη (99,5 %). Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα που περιείχαν φωσφατιδυλοχολίνη σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10 και 500 mg/kg ( $n=10$ ,  $r^2 = 0,98$ ).

### **3.3.5.3. Ανάλυση φωσφολιπιδίων με τεχνικές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)**

Πριν τη λήψη του φάσματος NMR ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Ορισμένη ποσότητα δείγματος (ελαιόλαδο ή Α.Σ.Σ.) διαλύθηκε σε μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (2:1, v/v). Ακολούθησε ανατάραξη του διαλύματος με υδατικό διάλυμα EDTA-Cs<sup>+</sup> 1 mol/L (ανά 1 mL μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης που χρησιμοποιήθηκε, προστίθενται 0,2 mL διαλύματος EDTA). Το μίγμα αφέθηκε για μερικές ώρες σε ηρεμία. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών σε περιστροφικό εξατμιστή κενού, το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε CDCl<sub>3</sub> σε αναλογία 1:30 και οδηγήθηκε στο φασματόμετρο NMR για τη λήψη του φάσματος. Όλα τα παραπάνω έγιναν για να απομακρυνθούν από το δείγμα τα κατιόντα που έχουν παραμαγνητικές και διαμαγνητικές ιδιότητες. Το διάλυμα EDTA-Cs<sup>+</sup> παρασκευάστηκε με τιτλοδότηση διαλύματος EDTA με διάλυμα CsOH. (Sotirhos *et al.*, 1986; Meneses & Glonek, 1988; Meneses *et al.*, 1989).

Στην περίπτωση της ανάλυσης των αδιάλυτων σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικών του ελαιολάδου (Α.Σ.Σ.), η παραπάνω διαδικασία έγινε και για την παραλαβή των φωσφολιπιδίων από το ξηρό στερεό υπόλειμμα. Για το λόγο αυτό, πριν την προσθήκη του EDTA, προηγήθηκε καλή ανάδευση του μίγματος του δείγματος με

τους διαλύτες για περίπου δυο ώρες. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό σε χωνί Büchner, και τελικά το διήθημα αναταράχθηκε με το διάλυμα EDTA-Cs<sup>+</sup>.

Τα φάσματα ελήφθησαν σε φασματόμετρο NMR Bruker AMX 500 λειτουργικής συχνότητας 500,1 MHz για το πρωτόνιο και 202,3 MHz για το φώσφορο και ήταν υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν 25±1°C. Οι τυπικές παράμετροι για τα φάσματα <sup>31</sup>P-NMR ήταν: εύρος παλμού 90° 12,5 μs, φασματικό εύρος 10 ppm, εύρος συχνότητας 202,3 Hz, χρόνος αναμονής 4,5 sec, αριθμός δεδομένων (data points) 16 K. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 4000 FIDs (ελεύθερη επαγωγική απόσβεση) και να αυξηθεί η ευαισθησία. Πριν από το μετασχηματισμό Fourier, η FID πολλαπλασιάστηκε με μια εκθετική συνάρτηση με εκθέτη lb = 3 Hz. Τα φάσματα ελήφθησαν με την τεχνική αποσύζευξη αντίστροφης εισόδου (inverse gated decoupling), για την καταστολή του πυρηνικού φαινομένου NOE (Nuclear Overhauser Enhancement), δηλαδή της αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου μεταξύ των πυρήνων του φωσφόρου 31 και των γειτονικών πρωτονίων στο μόριο μιας ένωσης.

### **3.3.6. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

#### **3.3.6.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από το ελαιόλαδο**

Ποσότητα θολού ή διηθημένου ελαιολάδου (40 ή 80 g), διαλύεται σε 100 mL ψυχρής ακετόνης και εφαρμόζεται η μέθοδος που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.2.3). Το στερεό υπόλειμμα που παραλαμβάνεται εκχυλίζεται σε κυκλομίκτη με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mmol/L), pH 8,5 για δυο ώρες. Το υπερκείμενο υγρό φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο στις 10,000 στροφές ανά λεπτό.

#### **3.3.6.2. Απομόνωση πρωτεϊνών από τα Α.Σ.Σ.**

Ποσότητα 0,5 g Α.Σ.Σ. ζυγίζεται σε μια φιάλη Eppendorf των 1,5 mL. Στη φιάλη προστίθενται 0,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που έχει τιμή pH 7,5 και περιέχει Tris-HCL (50 mmol/L), ουρία (2 mol/L) και SDS (0,1 %, w/v), και ακολουθεί πολύ καλή ανάμιξη-εκχύλιση για δυο ώρες με χρήση κυκλομίκτη. Το υπερκείμενο υγρό φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο.

#### **3.3.6.3. Απομόνωση πρωτεϊνών από το μεσοκάρπιο της ελιάς**

Ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο και περιγράφεται στην πτυχιακή εργασία του φοιτητή Α. Δούγκα (Δούγκας, 2006). Στην εργασία αυτή

μελετήθηκαν διάφορες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την απομόνωση των πρωτεϊνών και προτείνεται η χρησιμοποίηση αυτής που έδωσε τα πιο καλά αποτελέσματα μετά από κατάλληλη τροποποίηση. Η μέθοδος αυτή έχει σε γενικές γραμμές ως εξής:

Το μεσοκάρπιο ελαιόκαρπων Άρτας λυοφιλιώθηκε, απολιπώθηκε για έξι ώρες με πετρελαϊκό αιθέρα υπό ανάδευση και κονιοποιήθηκε με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Στη συνέχεια πλύθηκε διαδοχικά με ψυχρή ακετόνη (δυο φορές), διάλυμα τριχλωροξικού οξέος 10 % (πέντε φορές) και ακετόνη (μέχρις ότου το υπερκείμενο υγρό καταστεί άχρωμο). Ακολούθως κονιοποιήθηκε εκ νέου προς λεπτότερη σκόνη, 0,2 g της οποίας μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL όπου προστέθηκαν 1-2 mL ρυθμιστικού διαλύματος και περιείχε Tris-HCl (20 mmol/L), ουρία (2 mol/L), pH 8 και χλωριούχο νάτριο (50 μmol/L). Μετά από παρατεταμένη ανάδευση-εκχύλιση (24 ώρες), το μίγμα φυγοκεντρήθηκε, παραλήφθηκε το υπερκείμενο υγρό και ακολούθησε η καταβύθιση των πρωτεϊνών με προσθήκη διαλύματος τριχλωροξικού οξέος 5 % (w/v). Το ίζημα διαλύθηκε σε πολύ μικρό όγκο μίγματος που αποτελούνταν από ρυθμιστικό διάλυμα που είχε τιμή pH 8 και περιείχε Tris-HCl (200 mmol/L) και ουρία (6 mol/L) και ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % w/v SDS, 1 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v γλυκερόλη, 0,02 % κυανού της βρωμοφαινόλης και τιμή pH 6,8) σε αναλογία όγκων 3:1 (v/v).

#### **3.3.6.4. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έγινε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS (Sodium docetyl sulphate ή μετά νατρίου άλας τουθειϊκού δωδεκυλίου σε πηκτή επιστοιβαξής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Το θεωρητικό υπόβαθρο της μεθόδου δίνεται παρακάτω (βλ. παρ. 4.3.2.1).

Σε ορισμένη ποσότητα πρωτεϊνών ή πεπτιδίων διαλυτοποιημένων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mmol/L) σε pH 8,5 προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli σε αναλογία όγκων 3:1 (v/v). Πριν την επιστοιβαξή τους τα δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για τρία έως πέντε λεπτά με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τη δημιουργία των συμπλόκων πρωτεΐνης-SDS.

Οι συνθήκες και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την SDS-ηλεκτροφόρηση είναι τα ακόλουθα :

- Πηκτή επιστοιβαξης : 5 % w/v ακρυλαμίδιο,  
0,17 % w/v bis-ακρυλαμίδιο  
0,5 % w/v SDS  
0,125 mol/L Tris-HCl pH 6,8  
0,08 % w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
0,2 % v/v TEMED
- Πηκτή διαχωρισμού : 12 % w/v ακρυλαμίδιο  
0,4 % w/v bis-ακρυλαμίδιο  
0,5 % SDS  
0,375 mol/L Tris-HCl pH 8,9  
0,08 % w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
0,2 % v/v TEMED
- Διάλυμα ηλεκτροδίων : 25 mmol/L Tris  
0,192 mol/L γλυκίνη  
0,1 % w/v SDS pH 8,9

Κατά την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε αρχικά ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης 35 mA και τάσης 140 V προκειμένου να καταστεί περατή η πηκτή επιστοιβαξης (5 % ακρυλαμίδιο). Στη συνέχεια αυξήθηκε η ένταση του ρεύματος σε 40 mA ώστε να καταστεί περατή η πηκτή διαχωρισμού. Οι πηκτές επιστοιβαξης και διαχωρισμού περιείχαν ως εκκινητή υπερθειικό αμμώνιο (APS) και ως φωτοχημικό καταλύτη N,N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), σε συγκεντρώσεις 0,08 % και 0,20 %, αντίστοιχα. Η διάρκεια της διαδικασίας διαχωρισμού ήταν δυο έως τρεις ώρες.

### 3.3.6.5. Στερέωση και βαφή πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμιδίου

Με Coomassie Brilliant Blue : Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού η πηκτή στερεοποιήθηκε σε μίγμα μεθανόλης-νερού-οξικού οξέος, 50:38:12 (v/v/v) για 30 λεπτά και βάφθηκε με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 % (w/v) μέχρι την επίτευξη του επιθυμητού βαθμού χρώσης. Το διάλυμα αποχρωματισμού ήταν μίγμα μεθανόλης-νερού-οξικού οξέος, 50:40:10 (v/v/v).

Με νιτρικό άργυρο (AgNO<sub>3</sub>) : Στις περιπτώσεις που έγινε βαφή με χρήση νιτρικού αργύρου ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Blum *et al.* (1987) και τους Sørensen *et al.* (2002). Κατά τη μέθοδο αυτή η στερέωση των πρωτεϊνών στην πηκτή γίνεται σε διάλυμα 50 % μεθανόλης-12 % οξικού οξέος (ο

ελάχιστος χρόνος είναι δυο ώρες). Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 15 λεπτών με 50 % αιθανόλη και μια πλύση των 20 λεπτών με 30 % αιθανόλη. Μετά την πλύση για ένα λεπτό σε νερό η πηκτή εμβαπτίζεται για ένα λεπτό σε διάλυμα 0,02 % θειοθειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Το θειοθειικό νάτριο απομακρύνεται με τρεις πλύσεις των 20 δευτερολέπτων σε νερό. Στη συνέχεια η πηκτή εμβαπτίζεται για 20 λεπτά σε διάλυμα 0,2 % w/v νιτρικού αργύρου στο οποίο έχει προστεθεί 0,028 % v/v φορμαλδεΰδη και ξεπλένεται δυο φορές με νερό. Η εμφάνιση των ζωνών γίνεται στο διάλυμα εμφάνισης (6 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,0185 % v/v φορμαλδεΰδη και 0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Μετά την εμφάνιση των ζωνών των πρωτεϊνών η αντίδραση σταματά με την εμβάπτιση της πηκτής σε 50 % μεθανόλη 12 % οξικό οξύ για 10 λεπτά. Η πηκτή διατηρείται σε απιονισμένο νερό.

Η μοριακή μάζα των επιμέρους πρωτεϊνών υπολογίστηκε μετά από σύγκριση με τις πρότυπες πρωτεΐνες. (256 – 5 kDa).

#### **3.3.6.6. Δοκιμή πρωτεϊνάσης σε πρωτεϊνικά κλάσματα**

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρωτεϊνική φύση των μεγαλομορίων που ανιχνεύθηκαν στην SDS-PAGE, έγινε επώαση των εκχυλισμάτων με πρωτεϊνάση  $\text{K}^+$ , μια μη εξειδικευμένη πρωτεάση.

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα αραιώθηκαν στα 100  $\mu\text{L}$  με ρυθμιστικό διάλυμα που είχε τιμή pH 7,5 και περιείχε Tris-HCl (100 mmol/L), ουρία (2 mol/L) και SDS (0,5 % w/v) και χωρίστηκαν στη μέση. Στα πρώτα πρωτεϊνικά διαλύματα (πρώτο μισό) προστέθηκαν 6  $\mu\text{L}$  διαλύματος πρωτεϊνάσης  $\text{K}^+$  (1,2 mg/L) και ακολούθησε επώαση για 12 ώρες στους 37°C. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την πρότυπη αλβουμίνη αυγού. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα που έμειναν (δεύτερο μισό - δείγματα μάρτυρες) δεν προστέθηκε το ένζυμο αλλά επώαστηκαν όπως τα πρώτα. Όλα τα δείγματα διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και η πηκτή βάφηκε με νιτρικό άργυρο όπως περιγράφηκε παραπάνω,

#### **3.3.6.7. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή SDS σε μεμβράνη**

Η μεταφορά των πρωτεϊνών (western blotting) από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF (Immobilon), βασίζεται στην κίνηση των πρωτεϊνών, από την πηκτή προς τη μεμβράνη (Neal Burnette, 1981). Η διαδικασία έχει ως εξής:

Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-PAGE, έγινε εμβάπτιση τόσο της πηκτής, όσο και της μεμβράνης, στο διάλυμα της μεταφοράς

(transfer buffer). Αυτό αποτελούνταν από Tris 12,5 mmol/L,  $H_3BO_3$ , 12,5 mmol/L, SDS 0,02 % w/v, DTT 0,5 mmol/L. Η μεμβράνη PVDF “ενεργοποιήθηκε” με μεθανόλη 100 % για ένα λεπτό, πριν την εμφάνιση στο διάλυμα της μεταφοράς. Στη συσκευή της ηλεκτρομεταφοράς τοποθετήθηκε πρώτα ένα φύλλο Whatmann, διαβρεγμένο στο πιο πάνω ρυθμιστικό διάλυμα, η μεμβράνη, η πηκτή και τέλος άλλο ένα φύλλο Whatmann. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε στην πάνω πλευρά της ανόδου και η πηκτή στην πλευρά της καθόδου. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε η επαφή μεταξύ της πηκτής και της μεμβράνης να ήταν άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων, που θα παρεμπόδιζαν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η ηλεκτρομεταφορά έγινε με ρεύμα σταθερής έντασης 80mA, για μια ώρα.

### **3.3.7. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

#### **3.3.7.1. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε νερό και μέτρηση θολερότητας**

Οι προσδιορισμός νερού έγινε με τη τιτλοδοτική μέθοδο Karl Fisher (AOCS, Ca 2e-55, 1998) στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου της Λεόν (Ισπανία). Η θολερότητα μετρήθηκε με θολερόμετρο το οποίο βαθμονομήθηκε με χρήση κατάλληλων προτύπων 10, 20, 50, 100, 200, 500 NTU.

#### **3.3.7.2. Εξέταση στο μικροσκόπιο**

Εξετάστηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων ( $n=30$ ) σε διαφορετικά στάδια της αποθήκευσής τους με χρησιμοποίηση οπτικού μικροσκοπίου. Επίσης εξετάστηκε το στερεό υπόλειμμα του πυθμένα των δοχείων των δειγμάτων μετά από μακρά αποθήκευση.

Για να εκτιμηθεί η συμπεριφορά των σταγονιδίων του νερού στη διάρκεια της αποθήκευσης και να διευκρινιστεί η φύση του θολώματος, τέσσερα δείγματα θολού ελαιολάδου (δείγματα «Χαλκιδική 5», «Χαλκιδική 6», «Δράμα» και «Άρτα 2») αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) και περιοδικά (ανα δύο ημέρες στην αρχή και ανά επτά ημέρες στη συνέχεια) εξετάζονταν στο μικροσκόπιο. Δείγμα λαμβάνονταν τόσο από το μέσο του φιαλιδίου όσο και από τον πυθμένα του. Η εμφάνιση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

### 3.3.7.3. Προσδιορισμός του χρόνου καθίζησης

Δείγματα ελαιολάδου από διάφορες περιοχές, που είχε μόλις παραληφθεί από τις ελιές, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό χώρο. Τα δείγματα αυτά εξετάζονταν μακροσκοπικά, όσο συχνά κρίθηκε αυτό απαραίτητο, και φωτογραφίζονταν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή. Ο χρόνος για την πλήρη διαύγασή τους υπολογίστηκε από το χρόνο που απαιτήθηκε ώστε να διαυγάσει πλήρως το υπερκείμενο του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα σε όλη τη μάζα του όπως αυτό διαπιστώθηκε με οπτική εξέταση και με ψηφιακή επεξεργασία των φωτογραφιών.

### 3.3.7.4. Παρασκευή γαλακτωμάτων νερού σε ελαιόλαδο (w/o) και εκτίμηση της φυσικοχημικής σταθερότητάς τους

Το ελαιόλαδο ξηράνθηκε αρχικά με επαρκή ποσότητα θειϊκού νατρίου και στη συνέχεια διηθήθηκε δυο φορές από απλό πτυχωτό ηθμό. Ακολούθως, ποσότητα 40 g από το διηθημένο ελεύθερο νερού ελαιόλαδο αναμίχθηκε με κατάλληλη ποσότητα νερού που προστέθηκε στάγδην σε συνθήκες έντονης μηχανικής ανάδευσης για να παρασκευασθούν γαλακτώματα που περιέχουν νερό με συγκέντρωση 0,25 %, 0,5 %, 1,0 % και 2,0 % (**πρώτη σειρά** γαλακτωμάτων). Χρησιμοποιήθηκε χρωματισμένο με κόκκινη χρωστική νερό, για την καλύτερη παρατήρηση των γαλακτωμάτων. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε για ένα λεπτό στις 24.000 στροφές ανά λεπτό με χρησιμοποίηση συσκευής ομογενοποίησης.

Για τη μελέτη της επίδρασης των Α.Σ.Σ. του ελαιολάδου παρασκευάστηκαν όπως και προηγουμένως γαλακτώματα νερού σε έλαιο τα οποία περιείχαν Α.Σ.Σ. σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε ορισμένη ποσότητα ελαιολάδου προστέθηκαν πριν ή μετά την ανάμιξη του με την κατάλληλη ποσότητα νερού (0,25 % ή 0,50 %) Α.Σ.Σ. σε συγκέντρωση 40 ή 120 mg/kg και ακολούθησε η ομογενοποίηση (**δεύτερη σειρά** γαλακτωμάτων).

Για τη μελέτη της επίδρασης των φωσφολιπιδίων στη σταθερότητα γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο παρασκευάστηκαν γαλακτώματα τα οποία περιείχαν φωσφατιδυλοχολίνη σε συγκέντρωση 50 και 150 mg/kg (**τρίτη σειρά**). Για να διαλυθεί η καθαρή φωσφατιδυλοχολίνη στο ελαιόλαδο προηγήθηκε διαλυτοποίησή της στην αναγκαία ποσότητα τριγλωρομεθανίου (μερικά mL), προσθήκη του διαλύματος αυτού στο ελαιόλαδο με τη βοήθεια ενός μικροσιφωνίου και εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου για μισή ώρα και σε συνθήκες μαγνητικής ανάδευσης. Το δείγμα του ελαιολάδου που επιλέχθηκε είχε πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια (18

mg/kg) για να περιορισθεί στον ελάχιστο δυνατό βαθμό η επίδραση του υποστρώματος. Τα γαλακτώματα που παρασκευάστηκαν με το εμπλουτισμένο με τη φωσφατιδυλοχολίνη ελαιόλαδο περιείχαν νερό σε συγκέντρωση 0,25 % και 0,50 %. Αυτά μεταφέρθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Για να αξιολογηθεί η σταθερότητά τους μετρήθηκε ο χρόνος που ήταν αναγκαίος για την πλήρη διαύγαση όλης της μάζας του υπερκείμενου ελαίου στο δοκιμαστικό σωλήνα.

### **3.3.8. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

#### **3.3.8.1. Παρατήρηση κυτταρικών υπολειμμάτων ελιάς και μικροοργανισμών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**

Έγινε μόνο σε στερεά δείγματα επειδή δεν υπήρχε η δυνατότητα να γίνει σε υγρά δείγματα. Για το σκοπό αυτό ήταν απαραίτητη η ξήρανση των δειγμάτων με την εφαρμογή μιας ειδικής μεθόδου που είναι γνωστή ως «ξήρανση κρίσιμου σημείου» (Critical Point Drying, CPD) και διατηρεί το δείγμα ως έχει σε υγρή μορφή («παγώνοντας» το χρόνο όπως σε μια φωτογραφία). Δείγματα ελαιολάδου από περιοχή πλησίον του πυθμένα των φιαλιδίων σε διαφορετικές περιόδων αποθήκευσης ξηράθηκαν ακολουθώντας την εξής διαδικασία: Τα δείγματα (κυρίως στερεά σωματίδια) αρχικά επιστρώθηκαν με χρήση διαλύματος γλουταρικής αλδεΐδης (2,5 %) και διαλύματος τεταρτοξειδίου του οσμίου ( $OsO_4$ ) σε ηθμό μεμβράνης από οξική κυτταρίνη. Έπειτα, η ξήρανση των δειγμάτων (critical point drying) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικής συσκευής ξήρανσης. Το υπερκείμενο του ηθμού επιστρώθηκε με ειδικό μεταλλικό φιλμ για να αυξηθεί η αγωγιμότητα του σε ειδική συσκευή. Μετά την κατεργασία τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electronic Microscopy – SEM) και φωτογραφήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού του οργάνου (SEM Control software, v 7.07 Jeol Technics LTD, Tokyo, Japan).

Η παραπάνω εργασία έγινε με τη βοήθεια του τεχνικού Antonio Sánchez Rodriguez στο Εργαστήριο Οπτικής και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου της Λεόν (Ισπανία).

#### **3.3.8.2. Άμεση καταμέτρηση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών**

Τα δείγματα ελαιολάδου που είχαν παραληφθεί πρόσφατα ( $t=0$ ) εξετάστηκαν για να διαπιστωθεί μια ενδεχόμενη παρουσία μικροοργανισμών στη διάρκεια χρονικού διαστήματος 90 ημερών που είναι ο αναγκαίος για τη διαύγασή τους χρόνος. Τα στάδια

της εξέτασης ήταν ο ενοφθαλμισμός δείγματος του ελαιολάδου σε τρυβλία με διάφορα υποστρώματα και η επώασή τους στην κατάλληλη θερμοκρασία και κατάλληλο χρόνο για την καταμέτρηση και τέλος την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Για το σκοπό αυτό, ποσότητα 0,2 mL ελαιολάδου, η οποία παραλήφθηκε τόσο από το πάνω μέρος, όσο και από τον πυθμένα του φιαλιδίου αποθήκευσης, ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της επίστρωσης στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού μέσου σε τρυβλίο. Χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά μέσα για την ανάπτυξη των μεσόφιλων αερόβιων βακτηρίων (ολική μεσόφιλη χλωρίδα ή OMX), των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των μυκήτων και του συνόλου των ζυμομυκήτων και των μυκήτων. Τα μέσα αυτά ήταν:

- α) **PCA** για την OMX (επώαση για πέντε ημέρες στους 28°C).
- β) **MRS** για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (επώαση για πέντε ημέρες στους 32°C).
- γ) **SAB** για τους ζυμομύκητες και τους μύκητες (επώαση για επτά ημέρες στους 28°C).
- δ) **OGYE** για τους μύκητες (επώαση για επτά ημέρες στους 28°C).

Για την καταμέτρηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών μέσω της μέτρησης των αποικιών εφαρμόστηκαν οι κανόνες της APHA (Apha, 2000).

Ο χρόνος  $t=0$  του πειράματος ήταν και ο πραγματικός χρόνος ζωής των δειγμάτων θολού ελαιολάδου. Κάθε καταμέτρηση έγινε τρεις φορές (τρία διαφορετικά τρυβλία) και εκτιμήθηκε ο μέσος όρος των τιμών.

### **3.3.8.3. Απομόνωση ζυμομυκήτων από το θολό ελαιόλαδο**

Οι αποικίες των ζυμομυκήτων παραλήφθηκαν μετά την ανάπτυξή τους από τα υποστρώματα SAB και OGYE με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους κατά την παρατήρηση σε στερεοσκόπιο. Τα στελέχη ανακαλλιιεργήθηκαν και επανελέγχθηκαν με παρατήρηση στο στερεοσκόπιο μέχρις ότου ληφθεί μια καθαρή αποικία. Οι επιλεγμένες αποικίες, αφού επώαστηκαν για τρεις ημέρες στους 28°C, διατηρήθηκαν στους 4°C σε υπόστρωμα που αποτελείται από εκχύλισμα ζυμών (yeast extract) 0,5 %, γλυκόζη 0,5 %, πεπτόνη 0,10 % και άγαρ 0,18 % (υπόστρωμα συντήρησης).

### **3.3.8.4. Αναγνώριση των ζυμομυκήτων με τη χρήση API 20C-AUX και των μυκήτων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου**

Τα στελέχη των ζυμομυκήτων, μετά την ανακαλλιιεργεία τους σε θρεπτικό μέσο OGYE παρουσία οξυτετρακυκλίνης (1 %), ελέγχθηκαν ως προς τη μορφολογία τους μετά από χρώση με κυανό του μεθυλίου και παρατήρηση σε μικροσκόπιο 100x με

καταδυτικό φακό. Τα ανακαλλιεργημένα στελέχη αναπτύχθηκαν εκ νέου σε SAB (24-36 ώρες στους 22°C), επιλέχθηκε μια ποσότητα από την καλλιέργεια και αραιώθηκε με φυσιολογικό ορό μέχρι Mc Farland 2 σε συσκευή εκτίμησης μικροβιακού πληθυσμού Densimat. Ποσότητα 100  $\mu$ L από το παραπάνω εναιώρημα, τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε ειδικό κυπέλλο που περιείχε 7 mL ειδικού μέσου ανάπτυξης (C-medium), που αποτελείται από θειϊκό αμμώνιο (5 g), δισόξινο φωσφορικό κάλιο (0,31 g), όξινο φωσφορικό κάλιο (0,45 g), όξινο φωσφορικό νάτριο (0,92 g), χλωριούχο νάτριο (0,1 g), χλωριούχο ασβέστιο (0,05 g), θειϊκό μαγνήσιο (0,2 g), ιστιδίνη (0,005 g), θρυπτοφάνη (0,02 g), μεθειονίνη (0,02 g), άγαρ (0,5 g), διάλυμα βιταμινών (1 mL), διάλυμα ιχνοστοιχείων (10 mL) και νερό (1000 mL) με τιμή pH από 6,4 έως 6,8. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 20 φορές, όσα ήταν και τα υποστρώματα προς ζύμωση. Στο μίγμα επιστρώθηκε η ταινία των υποστρωμάτων του API 20 C-AUX και ακολούθησε επώαση στους 28°C για 48-72 ώρες σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, γινόταν σύγκριση των κυπελίων του κάθε ενός υποστρώματος με αυτό του μάρτυρα (δεν περιείχε ζυμώσιμο υπόστρωμα). Το κυπέλλο, που ήταν πιο θολό από το κυπέλλο του μάρτυρα, θεωρούνταν ότι σε αυτό ο εν λόγω μικροοργανισμός μεταβόλισε το συγκεκριμένο υπόστρωμα (θετική αντίδραση). Ο επτανήφιος κωδικός που προέκυπτε από την ανάγνωση του προφίλ των θετικών και των αρνητικών αποτελεσμάτων της επώασης με τη χρήση του λογισμικού APILAB (Biomérieux, France), οδήγησε στην ταυτοποίηση του είδους των ζυμομυκήτων με το σχετικό, πάντα, στατιστικό σφάλμα.

Οι μύκητες αναγνωρίστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο με φακούς 20x και 40x με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και τη χρήση βιβλιογραφικών δεδομένων (Παντίδου, 1976).

### **3.3.8.5. Ενζυμικές δράσεις των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από το θολό ελαιόλαδο**

#### **3.3.8.5.1. Ανίχνευση λιπολυτικής δράσης**

Η λιπολυτική δράση των ζυμομυκήτων διαπιστώθηκε με τη μέθοδο που έχουν αναπτύξει οι Marquina *et al.* (1992). Παρασκευάζεται υγρό θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη (0,4 %), πεπτόνη (1,0 %), χλωριούχο νάτριο (0,4 %) και άγαρ (2,0 %). Το μέσο αυτό αναμιγνύεται, πριν πήξει, με ελαιόλαδο (στάγδην προσθήκη σε αναλογία 5 %) με χρησιμοποίηση κατάλληλου αναδευτήρα. Στη συνέχεια γίνεται η γαλακτωματοποίηση με χρήση ομογενοποιητή στις 24000 στροφές ανά λεπτό για δύο

λεπτά. Το γαλάκτωμα, αφού αποστειρωθεί, μεταφέρεται σε τρυβλία, όπου εμβολιάζονται οι αποικίες των ζυμομυκήτων με την τεχνική της επίστρωσης για κάθε στέλεχος. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία 25°C για 10 ημέρες, στο κάθε τρυβλίο προστίθεται διάλυμα θειϊκού χαλκού, μέχρις ότου υπερχειλίσει, που απορρίπτεται μετά από την παρέλευση ενός λεπτού. Ο κυανός χρωματισμός των αποικιών υποδηλώνει λιπολυτική δράση.

#### **3.3.8.5.2. Ανίχνευση δράσης β-γλυκοσιδάσης**

Η δράση β-γλυκοσιδάσης, εκτιμήθηκε σύμφωνα με τους Kengen *et al.* (1993). Μια αποικία ζυμομυκήτων αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH=7) και β-γλυκοζιτη της π-νιτροφαινόλης (pNPG) σε συγκέντρωση 0,4 % (w/v). Η επώαση γίνεται σε ειδικά τρυβλία Tissue Culture Plate (TCP). Μετά από επώαση για 20 λεπτά στους 30°C ελέγχεται το χρώμα του αιωρήματος του τρυβλίου TCP. Κίτρινος χρωματισμός σημαίνει ότι ο εν λόγω ζυμομύκητας εμφανίζει δράση β-γλυκοσιδάσης.

#### **3.3.8.5.3. Ανίχνευση δράσης φαινολοξειδάσης**

Η δράση φαινολοξειδάσης εκτιμήθηκε με βάση την ικανότητα των ζυμομυκήτων να οξειδώνουν την πυροκατεχόλη προς την έγχρωμη βενζοκινόνη (Bergmeyer, 1974). Μια αποικία ζυμομυκήτων εμβολιάζεται σε 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH=7). Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 180 λεπτά, φυγοκέντρωση και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαυγούς υπερκειμένου υγρού στα 398 nm.

#### **3.3.8.5.4. Ανίχνευση υδρολυτικής δράσης επί της ελαιοευρωπαϊνης**

Η υδρόλυση της ελαιοευρωπαϊνης από τους ζυμομύκητες που απομονώθηκαν ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σύμφωνα με τη μέθοδο των Ciafardini & Zullo (2002a). Μια αποικία ζυμομυκήτων εμβολιάζεται σε 0,2 mL θρεπτικού μέσου Sabouraud το οποίο περιέχει ελαιοευρωπαϊνή σε συγκέντρωση 0,1 % (w/v). Ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 28°C για επτά ημέρες (σε αεροστεγή συσκευασία), φυγοκέντρωση για πέντε λεπτά στα 10 g και ανάπτυξη του υπερκειμένου υγρού σε πλάκα TLC, επιστρωμένη με πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (πάχος στιβάδας 0,26 mm), με μίγμα που αποτελείται από κ-προπανόλη, βενζυλική αλκοόλη, μυρμηκικό οξύ 88 % και νερό σε αναλογία 50:72:20:20. Η πλάκα παρατηρήθηκε στο υπεριώδες

φως (254 nm) και κατόπιν ψεκάστηκε με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu να εμφανιστούν οι κηλίδες. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ελαιοευρωπαϊνή υδρολύθηκε έγινε σύγκριση της κηλίδας της στην πλάκα TLC σε δείγματα που επωάστηκαν παρουσία μικροοργανισμών και απουσία τους (μάρτυρες). Απουσία κηλίδας θεωρούνταν ως ένδειξη υδρόλυσης.

### **3.3.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**

Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε σε παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμές. Όλοι οι τύποι παραμετρικών δοκιμών βασίζονται στην υπόθεση ότι τα δεδομένα μέσα σε μια ομάδα μετρήσεων προέρχονται από πληθυσμούς κανονικής κατανομής. Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν κατά Zolman (1993) ώστε να προσεγγίσουν την κανονική κατανομή (loge, log10 ή sqrt). Ειδικότερα, το t-test χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η επίδραση της διήθησης στις μεταβλητές (πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, πολυφαινόλες κ.α.) ενώ το Mann-Whitney U-test χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο των μη παραμετρικών δεδομένων. Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, έγινε με εφαρμογή της one-way ANOVA με έλεγχο της πραγματικής σημαντικής διαφοράς του Tukey, σε 95 % όρια εμπιστοσύνης (Μπάτζιος, 1999). Η μηδενική υπόθεση του ελέγχου ήταν  $H_0: \mu_A = \mu_B$  και η εναλλακτική  $H_A: \mu_A \neq \mu_B$ , όπου οι συμβολισμοί  $\mu_A$  και  $\mu_B$  υπονοούν ένα οποιοδήποτε ζεύγος μέσων για σύγκριση. Όταν η πιθανότητα p είναι μικρότερη του επιπέδου 0,05 ισχύει η εναλλακτική υπόθεση, ότι ένας τουλάχιστον μέσος όρος διαφέρει από τους άλλους. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πακέτο SPSS for Windows (v. 13).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

### 4.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ – ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Οι παράμετροι ποιότητας των 21 δειγμάτων ελαιολάδων (θολά ή διηθημένα από ελαιοτριβεία ή το λιανικό εμπόριο) που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Στο πάνω μέρος του πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εξέτασης των δειγμάτων που ήταν σε θολή κατάσταση κατά την παραλαβή τους. Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν για να εκτιμηθεί η ποιότητά τους τόσο πριν διηθηθούν όσο και μετά τη διήθησή τους. Διαπιστώθηκε ότι οι διαφορές στις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ , οξύτητα, αριθμό υπεροξειδίων) ήταν αμελητέες.

Στο κάτω μέρος του πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εξέτασης των δειγμάτων που ήταν διαυγή (τρία εμπορικά δείγματα και τρία δείγματα που παραλήφθηκαν απευθείας από ελαιοτριβεία) για διαφόρους λόγους (καθίζηση σε δεξαμενές πριν τη δειγματοληψία που έγινε χωρίς προηγούμενη διήθηση, τυποποίηση σε βιομηχανική κλίμακα, παραλαβή σε διαυγή μορφή λόγω των συνθηκών επεξεργασίας τους π.χ. χρήση ζεστού νερού κατά τη μάλαξη ή φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές και υψηλή θερμοκρασία).

Επειδή η επαναληψιμότητα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εξέταση των δειγμάτων όπως φαίνεται στο πειραματικό μέρος (βλ. παρ. 3.3.1) κρίθηκε ικανοποιητική ( $CV \% < 10$ ), έγιναν δυο μετρήσεις κάθε παραμέτρου. Για το λόγο αυτό δίνεται στον πίνακα ο μέσος όρος των δυο μετρήσεων.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.1 και με βάση τα όρια για τις επιμέρους παραμέτρους ποιότητας του ελαιολάδου σύμφωνα με τον Κανονισμού 2568/91 και της τροποποίησή του (1989/03) της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (EC, 1991; 2003), προκύπτει ότι τα δείγματα πληρούσαν τις προδιαγραφές των ελαιολάδων της κατηγορίας «εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο», με εξαίρεση το δείγμα «Χαλκιδική 5» το οποίο πληρούσε τις προδιαγραφές των ελαιολάδων της κατηγορίας «παρθένο ελαιόλαδο».

**Πίνακας 4.1.** Παράμετροι ποιότητας των 21 εξετασθέντων δειγμάτων ελαιολάδου

A/A	ΌΝΟΜΑ ΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ	A. Υ. (meq O <sub>2</sub> /kg)	ΟΞΥΤΗΤΑ %	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ
----- ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΟΛΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ -----							
1	<b>Άρτα 1</b>	Μη συσκευασμένο	8,2	0,35	1,61	0,16	Εξ. Παρθένο
2	<b>Άρτα 2</b>	Μη συσκευασμένο	10,2	0,39	1,69	0,17	Εξ. Παρθένο
3	<b>Χαλκιδική 1</b>	Μη συσκευασμένο	10,6	0,30	1,83	0,25	Εξ. Παρθένο
4	<b>Χαλκιδική 2</b>	Μη συσκευασμένο	5,9	0,32	1,75	0,20	Εξ. Παρθένο
5	<b>Χαλκιδική 3</b>	Μη συσκευασμένο	7,8	0,41	1,85	0,26	Εξ. Παρθένο
6	<b>Χαλκιδική 4</b>	Μη συσκευασμένο	9,1	0,35	1,71	0,22	Εξ. Παρθένο
7	<b>Χαλκιδική 6</b>	Μη συσκευασμένο	10,1	0,30	1,70	0,14	Εξ. Παρθένο
8	<b>Χαλκιδική 7</b>	Μη συσκευασμένο	10,1	0,40	1,62	0,15	Εξ. Παρθένο
9	<b>Δράμα 1</b>	Μη συσκευασμένο	13	0,70	1,67	0,23	Εξ. Παρθένο
10	<b>Καλαμάτα 1</b>	Μη συσκευασμένο	10,9	0,51	1,85	0,26	Εξ. Παρθένο
11	<b>Κρήτη 1</b>	Μη συσκευασμένο	14,3	0,60	1,91	0,29	Εξ. Παρθένο
12	<b>Κρήτη 2</b>	Μη συσκευασμένο	7,7	0,49	1,49	0,09	Εξ. Παρθένο
13	<b>Κρήτη 3</b>	Μη συσκευασμένο	10,3	0,26	1,60	0,17	Εξ. Παρθένο
14	<b>Κρήτη 4 (εμπορικό 1) †</b>	Συσκευασμένο	12,5	0,50	1,81	0,23	Εξ. Παρθένο
15	<b>Κρήτη 6 (εμπορικό 2) †</b>	Συσκευασμένο	8,0	0,53	1,95	0,29	Εξ. Παρθένο
----- ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΥΓΗ ΜΟΡΦΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΛΑΒΗ -----							
16	<b>Κρήτη 5</b>	Μη συσκευασμένο	12,0	0,10	-	-	Εξευγενισμένο (σύμφωνα με δήλωση)
17	<b>Κρήτη 7 (εμπορικό 3) ‡</b>	Μη συσκευασμένο μετά από κατακάθιση	9,1	0,44	1,70	0,21	Εξ. Παρθένο
18	<b>Καλαμάτα 2</b>	Μη συσκευασμένο μετά από κατακάθιση	8,0	0,66	1,73	0,24	Εξ. Παρθένο
19	<b>Χαλκιδική 5</b>	- // -	9,1	1,10	1,85	0,26	Παρθένο
20	<b>Λέσβος (εμπορικό 4) ‡</b>	Συσκευασμένο	14,1	0,59	1,90	0,28	Εξ. Παρθένο
21	<b>Μάρτυρας (εμπορικό 5) ‡</b>	Συσκευασμένο	13,1	0,71	1,69	0,24	Εξ. Παρθένο

† Δείγματα ελαιολάδου με την επιγραφή «βιολογικό ελαιόλαδο»..

‡ Δείγματα ελαιολάδου που είχαν υποστεί βιομηχανική διήθηση πριν την τυποποίηση.

## **4.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΘΟΛΟΥ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΜΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. παρ.1.9.2), στη βιβλιογραφία υπάρχουν ασάφειες σχετικά με την επίδραση που έχει η διήθηση στην οξειδωτική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου. Επειδή η οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου είναι σημαντική τόσο από τεχνολογική όσο και από διατροφική άποψη, αρχικός στόχος της διατριβής ήταν να διευκρινιστεί η επίδραση της διήθησης στη σταθερότητα (η σχέση σταθερότητας και διήθησης). Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε η οξειδωτική σταθερότητα με τη μέθοδο Rancimat σε οκτώ δείγματα θολού ελαιολάδου πριν και μετά τη διήθησή τους και τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με την περιεκτικότητα των δειγμάτων αυτών σε πολικές φαινόλες.

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.2, ο δείκτης οξειδωτικής σταθερότητας OSI (Oil Stability Index) ήταν μεγαλύτερος στα δείγματα θολού ελαιολάδου πριν τη διήθηση. Η ελάττωση της οξειδωτικής σταθερότητας μετά τη διήθηση δεν ήταν όμως μεγάλη (<10 %). Η στατιστική επεξεργασία έδειξε μια στατιστικώς μη σημαντική διαφορά. Επειδή η ελάττωση αυτή, σύμφωνα με τους Lercker *et al.* (1994), μπορεί να οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης των πολικών φαινολών στο διηθημένο έλαιο, στα ίδια δείγματα, προσδιορίστηκαν και οι πολικές φαινόλες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, τα επίπεδα των οποίων παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 4.2. Όλες οι αναλύσεις έγιναν στα δείγματα αμέσως μετά τη μεταφορά τους στο Εργαστήριο και πριν την αποθήκευσή τους ( $t=0$ ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα των θολών αδιήθητων δειγμάτων σε πολικές φαινόλες ήταν υψηλότερη από αυτή των αντίστοιχων διηθημένων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Lercker *et al.* (1994) και Sacchi *et al.* (1995). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μια στατιστικώς σημαντική μείωση στα επίπεδα των πολικών φαινολών μετά τη διήθηση ( $p=0,03<0,05$ ).

Επίσης προσδιορίστηκαν οι πολικές φαινόλες και στα υπόλοιπα δείγματα που εξετάστηκαν στα πλαίσια της διατριβής (Πίνακας 4.3). Δύο από αυτά (Χαλκιδική 4, Κρήτη 3) επίσης είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες πριν από τη διήθηση, επιβεβαιώνοντας τις παραπάνω παρατηρήσεις, χωρίς ωστόσο να έχει προσδιοριστεί ο δείκτης σταθερότητας OSI.

**Πίνακας 4.2.** Δείκτης οξειδωτικής σταθερότητας (OSI) και περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες ορισμένων δειγμάτων θολού παρθένου ελαιολάδου πριν και μετά τη διήθησή τους.

A/ A	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ (mgCAE/kg)	ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ OSI (h)
1	Άρτα 1	Θολό	109	5,7
2	Άρτα 1	Διηθημένο	89	5,4
3	Χαλκιδική 1	Θολό	165	12,0
4	Χαλκιδική 1	Διηθημένο	161	11,2
5	Χαλκιδική 2	Θολό	199	8,9
6	Χαλκιδική 2	Διηθημένο	195	9,5
7	Χαλκιδική 3	Θολό	195	11,6
8	Χαλκιδική 3	Διηθημένο	173	10,8
9	Καλαμάτα 1	Θολό	217	9,3
10	Καλαμάτα 1	Διηθημένο	171	8,8
11	Κρήτη 1	Θολό	318	9,5
12	Κρήτη 1	Διηθημένο	167	8,5
13	Κρήτη 2	Θολό	221	12,9
14	Κρήτη 2	Διηθημένο	181	12,1
15	Κρήτη 4	Θολό	190	9,0
16	Κρήτη 4	Διηθημένο	171	8,0

Η υψηλότερη περιεκτικότητα του αδιήθητου θολού ελαιολάδου σε πολικές φαινόλες υποδηλώνει ότι ένα μέρος τους απομακρύνεται κατά τη διήθηση. Το υπόλειμμα στον ηθμό, όπως διαπιστώθηκε, αποτελείται από στερεά σωματίδια, που έχουν συνήθως πράσινο ή καφέ χρώμα (ένδειξη πολυμερισμού) και αιωρούνται στο θολό ελαιόλαδο πρόσφατης έκθλιψης ή έχουν κατακαθίσει στο λιγότερο «νεαρό» ελαιόλαδο. Τα στερεά αυτά προέρχονται από την ελιά και μεταφέρονται στο ελαιόλαδο κατά την παραλαβή του από την ελαιοζύμη. Η σύσταση του υπολείμματος αυτού εξακριβώθηκε παρακάτω (βλ. παρ. 4.5.2).

**Πίνακας 4.3.** Περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες των υπόλοιπων δειγμάτων ελαιολάδου που εξετάστηκαν.

A/A	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ (mg CAE/kg)
1	Χαλκιδική 4	Θολό	129
2	Χαλκιδική 4	Διηθημένο	99
3	Κρήτη 3	Θολό	192
4	Κρήτη 3	Διηθημένο	153
5	Καλαμάτα 2	Μη συσκευασμένο μετά από κατακάθιση	120
6	Χαλκιδική 5		32
7	Λέσβος	Συσκευασμένο διαυγές	232

Οι πολικές φαινόλες του θολού ελαιολάδου που φαίνεται να συγκρατούνται στον ηθμό δεν προσδιορίστηκαν στο σύνολό τους στο υπόλειμμα της διήθησης, όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.4 όπου διαπιστώθηκαν ανακτήσεις μικρότερες από 32 %.

**Πίνακας 4.4.** Οι ανακτήσεις των πολικών φαινολών σε υπόλειμμα ηθμού που προέκυψε από διήθηση ποσότητας 40 g τριών δειγμάτων θολού ελαιολάδου.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	ΠΟΛΙΚΕΣ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΕΣ ΣΕ mg CAE/kg ΕΛΑΙΟΥ				ΑΝΑΚΤΗΣΗ %
	Στο υπόλειμμα του ηθμού	Στο θολό ελαιόλαδο πριν τη διήθηση	Στο ελαιόλαδο με τη διήθηση	απώλεια λόγω διήθησης	
Κρήτη 1	48	318	168	150	32
Χαλκιδική 4	7	129	99	30	24
Καλαμάτα 1	5	217	171	46	12

Τα πιο πάνω δείχνουν ότι οι περισσότερες πολικές φαινόλες έχουν δεσμευθεί σε πρωτεΐνη ή έχουν πολυμερισθεί όπως αναφέρουν οι Lercker *et al.* (1994), που

υποστηρίζουν ότι το υπόλειμμα της διήθησης, του οποίου η χημική σύσταση δεν είναι γνωστή, δρα ως αντιοξειδωτικό και παρεμποδίζει την αύξηση της οξύτητας (βλ. παρ. 1.9.2.).

Σχετικά με τη σύσταση του πολικού κλάσματος σε επιμέρους φαινόλες, φαίνεται ότι αυτή μεταβάλλεται μετά από τη διήθηση και κυρίως μετά την αποθήκευση, όπως αποδείχθηκε σε παλιότερη μελέτη που έγινε στο Εργαστήριο (Γεωργίου, 2000). Πειραματικά ευρήματα των Sacchi *et al.* (1995) δείχνουν ότι μετά τη διήθηση μειώνεται η περιεκτικότητα σε ο-διφαινόλες σύμφωνα με τα πρακτικά του συνεδρίου όπου ανακοινώθηκε η παραπάνω εργασία. Ωστόσο τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν με περαιτέρω δημοσιεύσεις.

Η οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου είναι γνωστό ότι σχετίζεται, σε γενικές γραμμές, γραμμικά με την περιεκτικότητά του σε πολικές φαινόλες (Papadopoulos & Boskou, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1999; Aparicio *et al.*, 1999; Ranalli *et al.*, 2000; Blekas *et al.*, 2002; Servili & Montedoro, 2002; Salvador *et al.*, 2003; Psomiadou *et al.*, 2003). Αυτό επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα διατριβή. Ωστόσο, ο δείκτης οξειδωτικής σταθερότητας (OSI) που προσδιορίστηκε είναι ένας συμβατικός δείκτης της αντοχής ενός δείγματος ελαιολάδου στην οξείδωση. Αυτός επηρεάζεται και από την παρουσία άλλων κατηγοριών αντιοξειδωτικών όπως τοκοφερολών, φωσφολιπιδίων κ.α. (Wan, 1995).

Συμπερασματικά, η αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου μπορεί μερικώς να αποδοθεί στην ελαφρώς υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες σε σχέση με το διηθημένο ελαιολάδο. Στη σταθερότητα του ενδέχεται όμως να συνεισφέρουν και άλλα ήσσονα συστατικά ή / και η φυσικοχημική κατάσταση του θολού ελαιολάδου. Όπως έχει αναφερθεί (βλ. παρ. 1.8.1), υπάρχουν άλλωστε μελέτες σύμφωνα με τις οποίες τα έλαια που βρίσκονται σε μορφή w/o γαλακτώματος είναι πιο ανθεκτικά στην οξείδωση (Ambrosone *et al.*, 2002; Ambrosone *et al.*, 2006a).

### **4.3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΦΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

#### **4.3.1. ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΘΟΛΑ ΚΑΙ ΔΙΗΘΗΜΕΝΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ**

Διερευνήθηκε η πιθανότητα να οφείλεται η αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα των θολών ελαιολάδων στην παρουσία περισσότερων πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων,

συστατικών που έχουν αναφερθεί ως αντιοξειδωτικά (βλ. παρ. 1.5.3.1 και 1.5.3.2). Για το λόγο αυτό επιδιώχθηκε ο προσδιορισμός τους στα θολά ελαιόλαδα, πριν και μετά τη διήθησή τους.

Επειδή τα επίπεδα των πρωτεϊνών στα ελαιόλαδα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (βλ. παρ. 1.5.3.1.) ποικίλουν, επιλέχθηκε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών με εφαρμογή κατάλληλης μεθόδου. Η επιλογή της έγινε με γνώμονα την αξιοπιστία και την πρακτικότητά της. Μετά από δοκιμές επιλέχθηκε να εφαρμοστεί μια μέθοδος που περιλαμβάνει την απομόνωση πρωτεϊνών μετά από καταβύθιση με ακετόνη, τη διαλυτοποίησή τους σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και τον χρωματομετρικό προσδιορισμό τους με τη χρήση του αντιδραστήριου Bradford (Coomassie Blue). Επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mmol/L) σε pH=8,5 επειδή αφενός διαλυτοποιεί – εκχυλίζει στο μέγιστο δυνατό βαθμό τις πρωτεΐνες και αφετέρου δεν παρεμποδίζει τον προσδιορισμό τους όταν χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Bradford. Προτιμήθηκε η εφαρμογή της τροποποιημένης Bradford (ανάμιξη δείγματος και αντιδραστήριου σε αναλογία όγκων 1:1 αντί 1:30) επειδή τα επίπεδα των πρωτεϊνών στα ελαιόλαδα είναι πολύ χαμηλά, ώστε να περιοριστούν τα σφάλματα.

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου σε 10 δείγματα θολών ελαιολάδων πριν και μετά τη διήθησή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται και τέσσερα δείγματα διαυγούς ελαιολάδου. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν ότι περιείχαν πρωτεΐνες σε επίπεδα μεταξύ 0,05 και 2,40 mg/kg ελαίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα αδιήθητα θολά ελαιόλαδα ήταν πλουσιότερα σε ολικές πρωτεΐνες σε σχέση με τα διηθημένα, χωρίς ωστόσο οι διαφορές στα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών να κρίνονται ως στατιστικώς σημαντικές ( $p > 0,05$ ).

Τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα ελαιολάδου που εξετάστηκαν, (στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλότερα από 1 mg/kg ελαίου) είναι σε συμφωνία με αυτά που έχουν αναφερθεί από τους Hidalgo *et al.* (2001). Οι ερευνητές αυτοί, που χρησιμοποίησαν υγροχρωματογραφική μέθοδο, αναφέρουν συγκεντρώσεις ολικών πρωτεϊνών που κυμαίνονται από 0,07 έως 0,51 mg/kg. Αυτές διαφέρουν σημαντικά από τις συγκεντρώσεις τιμών (κατά μέσο όρο 370 mg/kg) που έχουν αναφερθεί από τους Georgalaki *et al.* (1998a) και Γεωργαλάκη (1999). Η παρουσία στο παρθένο ελαιόλαδο, πρωτεϊνών και μετά τη διήθηση του είναι γνωστή και στη βιβλιογραφία (Hidalgo *et al.*, 2001; Hidalgo *et al.*, 2002). Πρωτεΐνες (lectins) έχουν ανιχνευτεί και σε άλλα φυτικά έλαια και κυρίως στο σογιέλαιο (Klurferd & Kritchevsky, 1987). Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες, αν και είναι κατά κανόνα υδρόφιλες ενώσεις,

είναι συστατικά του ελαιολάδου. Η συμπεριφορά τους αυτή θα οφείλεται τόσο στη φύση τους όσο και στην ιδιαίτερα μικρή συγκέντρωσή τους στο έλαιο.

**Πίνακας 4.5.** Πρωτεϊνικό περιεχόμενο των δειγμάτων θολού και διαυγούς ελαιολάδου που εξετάστηκαν.

<i>A/A</i>	<i>ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i>	<i>ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i>	<i>ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (mg/kg)</i>
1	Άρτα 1	Θολό	0,15
2	Άρτα 1	Διηθημένο	0,15
3	Χαλκιδική 1	Θολό	0,20
4	Χαλκιδική 1	Διηθημένο	0,10
5	Χαλκιδική 2	Θολό	0,30
6	Χαλκιδική 2	Διηθημένο	0,30
7	Χαλκιδική 3	Θολό	0,30
8	Χαλκιδική 3	Διηθημένο	0,30
9	Χαλκιδική 4	Θολό	0,15
10	Χαλκιδική 4	Διηθημένο	0,05
11	Καλαμάτα 1	Θολό	0,40
12	Καλαμάτα 1	Διηθημένο	0,20
13	Κρήτη 1	Θολό	1,50
14	Κρήτη 1	Διηθημένο	0,60
15	Κρήτη 2	Θολό	2,40
16	Κρήτη 2	Διηθημένο	0,60
17	Κρήτη 3	Θολό	0,30
18	Κρήτη 3	Διηθημένο	0,15
19	Κρήτη 4	Θολό	1,20
20	Κρήτη 4	Διηθημένο	0,50
21	Καλαμάτα 2	Διαυγές	1,00
22	Χαλκιδική 5	Διαυγές	0,05
23	Λέσβος	Διαυγές	0,65
24	Κρήτη 5	Διαυγές	0,10

Εξάλλου, το γεγονός ότι τα θολά ελαιόλαδα είναι πλουσιότερα σε πρωτεΐνες πριν τη διήθησή τους υποδηλώνει ότι το «υλικό εν αιωρήσει», δηλαδή το Α.Σ.Σ., πρέπει να περιέχει πρωτεΐνες (βλ. παρ. 4.5.2).

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παρουσία πρωτεϊνών σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να συνεισφέρει στη μεγαλύτερη οξειδωτική σταθερότητα των μη διηθημένων ελαιολάδων (Zamora *et al.*, 2001; Hidalgo *et al.*, 2001). Τα επίπεδα τους, όμως, είναι τόσο χαμηλά που δεν αναμένεται να παίζουν ρόλο στην οξειδωτική σταθερότητα του ελαιολάδου ούτε στη διατροφική αξία. Δεν είναι όμως σαφές αν συνεισφέρουν στη φυσικοχημική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου, δεδομένου ότι είναι, γενικά, καλοί γαλακτωματοποιητές (βλ. παρ. 4.5.3).

### **4.3.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ**

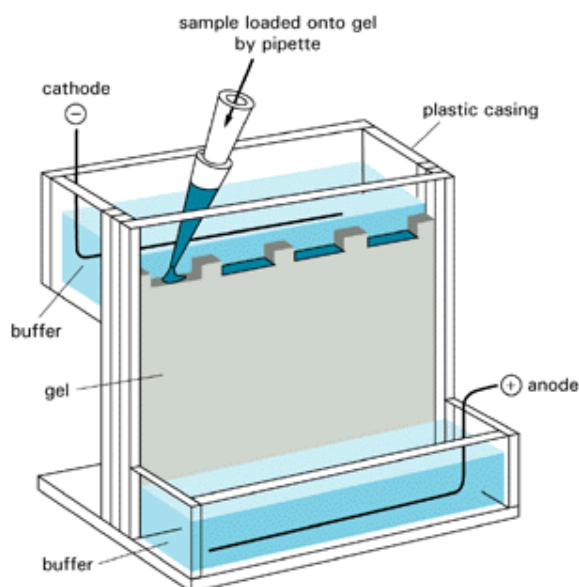
#### **4.3.2.1. Θεωρητικό μέρος: Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου**

Κατά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται, καθώς κινούνται σε ηλεκτρικό πεδίο, μέσα από τους πόρους μιας πηκτής. Τα πλεονεκτήματα του πολυακρυλαμίδιου είναι η αντοχή του σε υψηλή θερμοκρασία, η χημική αδράνεια και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που εξασφαλίζει. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου σχηματίζονται με τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) και του N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιου (bis-ακρυλαμίδιου) ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) σε αναλογία 30:1 w/w. Το bis-ακρυλαμίδιο χρησιμεύει στη δημιουργία γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμίδιου. Έτσι σχηματίζεται ένα τρισδιάστατο πολυμερές πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από το βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμίδιου. Ο πολυμερισμός γίνεται με μηχανισμό ελευθέρων ριζών. Μια ουσία που προκαλεί τη δημιουργία των ελευθέρων ριζών είναι το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) το οποίο προστίθεται μαζί με τον καταλύτη, N,N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού (Schägger & von Jagow, 1987).

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει απουσία ή παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (denaturing agents), όπως το ανιονικό απορρυπαντικό SDS (με νάτριο άλας θειϊκού δωδεκυλίου) ή η ουρία. Όταν η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από μη

αποδιατακτικές συνθήκες, διατηρούνται οι ανώτερες διαμορφώσεις των πρωτεϊνών και τα μόρια τους παραμένουν ενεργά. Στην περίπτωση που η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα, αποδιατάσσονται οι τυχόν υπομονάδες των πρωτεϊνών, η κάθε υπομονάδα ή πρωτεΐνη αποκτά τυχαία διαμόρφωση και διαχωρίζονται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης μπορεί να είναι συνεχές ή ασυνεχές (βλ. διπλανό σχήμα). Στο συνεχές σύστημα χρησιμοποιείται το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα τόσο στην πηκτή όσο και στα δοχεία των ηλεκτροδίων. Στο ασυνεχές σύστημα χρησιμοποιούνται δυο πηκτές: η πηκτή επιστοιβάξης και η πηκτή διαχωρισμού. Το διάλυμα ηλεκτροδίων είναι το ίδιο με το διάλυμα της πηκτής



διαχωρισμού. Η σύσταση και το pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων καθώς επίσης και το μέγεθος των πόρων των δυο πηκτών επιλέγονται έτσι ώστε οι πρωτεΐνες των δειγμάτων να συμπυκνώνονται στην πηκτή επιστοιβάξης (χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου) και στη συνέχεια να διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος στην πηκτή διαχωρισμού (υψηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου).

### **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-ηλεκτροφόρηση)**

Με τη μέθοδο αυτή, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τη μοριακή τους μάζα λόγω της παρουσίας του ανιοντικού απορρυπαντικού SDS (άλας νατρίου του θειϊκού δωδεκυλίου). Το SDS είναι αρνητικά φορτισμένο και δεσμεύεται στις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τη δημιουργία επιμηκών μορίων με αρνητικό φορτίο. Το ποσό του SDS που δεσμεύεται ανά μονάδα βάρους πρωτεΐνης είναι 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης και είναι αρκετά σταθερό. Έτσι το φορτίο του συμπλόκου πρωτεΐνης-SDS είναι συνάρτηση του μεγέθους της πρωτεΐνης και η

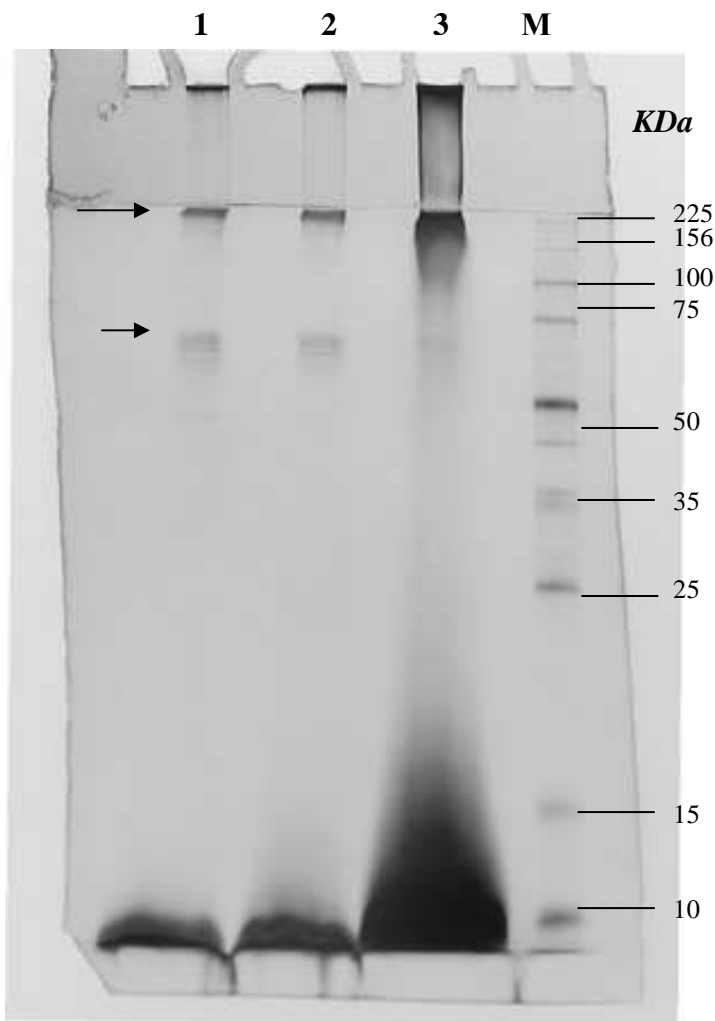
ηλεκτροφορητική της κινητικότητα κάτω από τις συνθήκες αυτές εξαρτάται αποκλειστικά από τη μοριακή της μάζα. Η κινητικότητα ( $R_f$ ) μιας πρωτεΐνης στην SDS ηλεκτροφόρηση είναι γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της μοριακής της μάζας. Η σχέση αυτή δεν ισχύει απόλυτα στις περιπτώσεις πρωτεϊνών που είναι πολύ βασικές ή πολύ όξινες και πρωτεΐνες με μεγάλο ποσοστό γλυκοσυλίωσης. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύουν μικρότερα ποσά SDS ανά μονάδα βάρους και κινούνται πιο αργά στην πηκτή διαχωρισμού με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλότερη φαινόμενη μοριακή μάζα από την πραγματική (Laemmli, 1970).

#### **4.3.2.2. Πειραματικό μέρος: διερεύνηση της φύσης του πρωτεϊνικού κλάσματος του ελαιολάδου**

Μετά από αρκετές προσπάθειες για την απομόνωση των πρωτεϊνών από δείγμα ελαιολάδου με εφαρμογή διαφόρων μεθόδων, επιλέχθηκε η μέθοδος της καταβύθισης του με χρήση ακετόνης που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.6.1). Μικροποσότητες πρωτεϊνών, που απομονώθηκαν από 40 και 80 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Καλαμάτα 1» ( $t=0$ ), διαχωρίστηκαν με εφαρμογή της τεχνικής ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE).

Στην πηκτή διαπιστώθηκε η παρουσία δυο πρωτεϊνικών ζωνών όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1. Η εμφάνιση έγινε με τη μέθοδο του νιτρικού αργύρου που έχει την αναγκαία ευαισθησία ενώ επιδιώχθηκε και η εμφάνιση με χρήση Coomassie Blue. Παρατηρήθηκε ότι όσο μεγαλύτερη ήταν η συγκέντρωση του δείγματος τόσο εντονότερη ήταν και η εμφάνιση μιας εκτεταμένης διάχυσης των ζωνών (“smearing”).

Η πρώτη ζώνη αντιστοιχούσε σε μεμονωμένη πρωτεΐνη ή συσσωματώματα πρωτεϊνών με μοριακή μάζα 225 kDa. Η ζώνη αυτή ήταν ανεξάρτητη της προέλευσης του δείγματος και εντονότερη όσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα του ελαιολάδου από την οποία είχαν παραληφθεί οι πρωτεΐνες (Εικόνα 4.1). Η ζώνη που αντιστοιχούσε σε πρωτεΐνη με μοριακή μάζα 225 kDa εμφανίστηκε στην ίδια θέση και για τα τρία δείγματα θολού ελαιολάδου που εξετάστηκαν («Καλαμάτα 1», «Άρτα 1», «Χαλκιδική 2») καθώς για τα αντίστοιχα διηθημένα τους όπως φαίνεται στις Εικόνες 4.1 και 4.2. Αυτό αποτελεί μια ένδειξη ότι η ζώνη αυτή είναι πιθανώς χαρακτηριστική του ελαιολάδου.



**Εικόνα 4.1.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών δειγμάτων θολού ελαιολάδου με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12 %). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.

Διαδρομή 1: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 40 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Καλαμάτα 1».

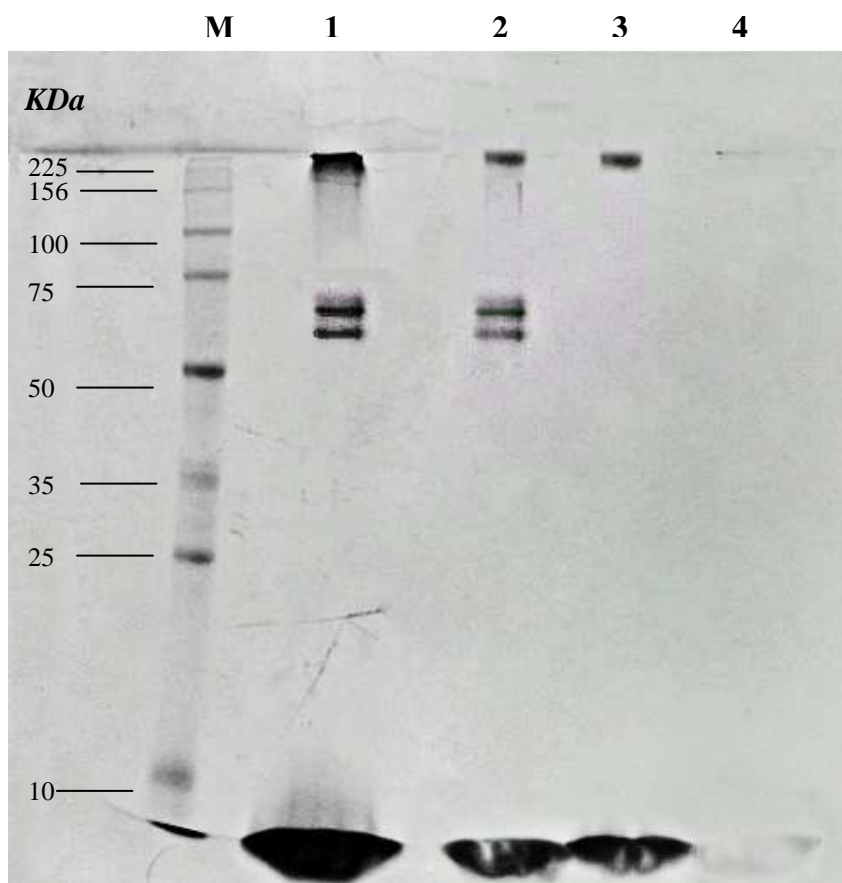
Διαδρομή 2: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 40 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Καλαμάτα 1».

Διαδρομή 3: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 80 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Καλαμάτα 1».

Διαδρομή M: Πρωτεΐνες (μάρτυρες) με γνωστή μοριακή μάζα.

Η δεύτερη ζώνη, που αντιστοιχούσε σε πρωτεΐνες με μοριακή μάζα 50 - 70 kDa, εμφανίστηκε στα περισσότερα δείγματα ελαιολάδου. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται και

μια ομάδα δυο ευδιάκριτων ζωνών που απέχουν μερικά kDa μεταξύ τους. Επειδή η ομάδα ζωνών 50-70 KDa δεν εμφανίστηκε σε τυφλά δείγματα εικάζεται ότι πρόκειται για πρωτεΐνες του ελαιολάδου και όχι για πρωτεΐνες πρόσμιξης.



**Εικόνα 4.2.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών από δείγματα θολού ελαιολάδου με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (12 %). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.

Διαδρομή M: Πρωτεΐνες με γνωστή μοριακή μάζα (μάρτυρες).

Διαδρομή 1: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 80 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Καλαμάτα 1».

Διαδρομή 2: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 40 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Χαλκιδική 2».

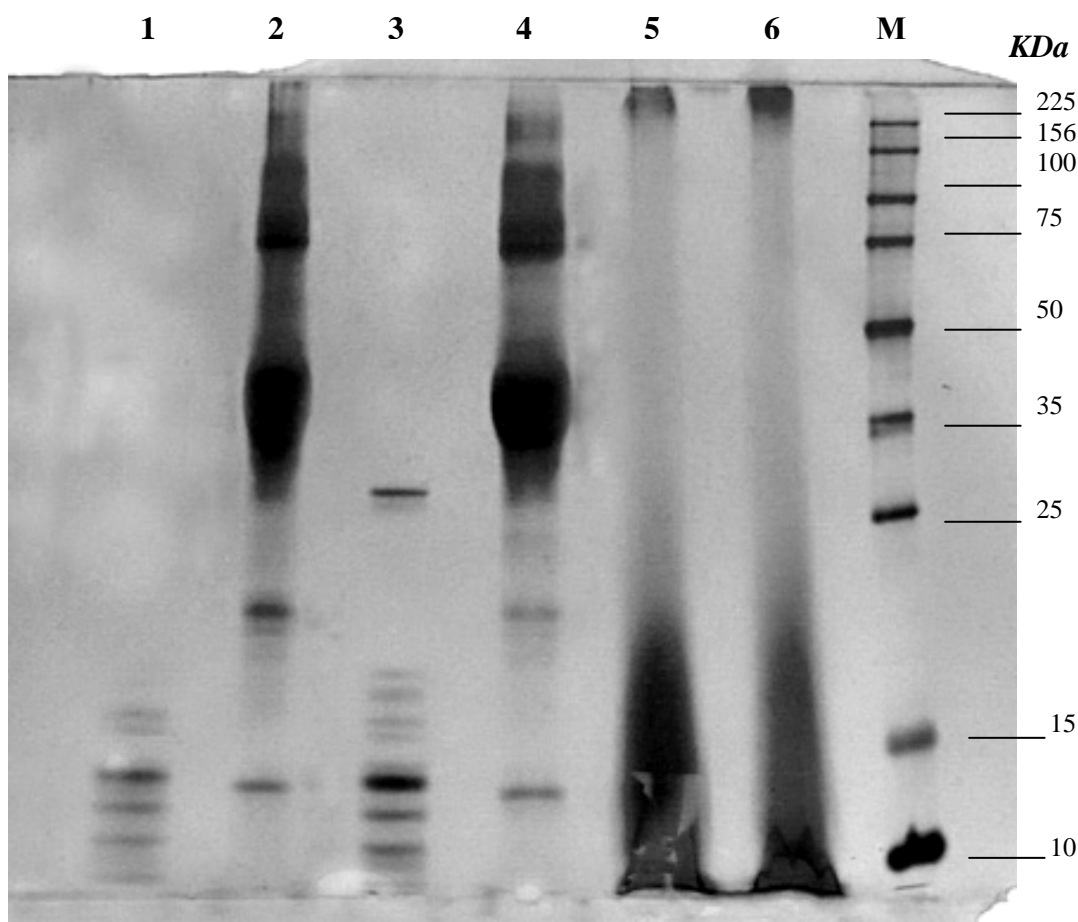
Διαδρομή 3: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 40 g δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1».

Διαδρομή 4: Τυφλό δείγμα.

Προκειμένου να αναλυθούν οι εν λόγω πρωτεΐνες σε επίπεδο πρωτοταγούς ακολουθίας, οι ζώνες που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση ηλεκτρομεταφέρθηκαν από την πηκτή, όπως έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.6.7), σε μεμβράνες PVDF (μεμβράνες πολυβινυλιδενοφοριδίου) και στάλθηκαν για ανάλυση δομής με φασματοσκοπία μαζών στο Kihara Institute for Biological Research στην Yokohama της Ιαπωνίας (σε συνεργάτες της Αναπλ. Καθηγήτριας Θ. Χολή-Παπαδοπούλου). Επειδή η πρώτη προσπάθεια απέτυχε, έγινε μια ακόμη προσπάθεια και οι ζώνες με τις πρωτεΐνες που αποκόπηκαν από την πηκτή και στάλθηκαν για δεύτερη φορά στο ίδιο εργαστήριο. Πρέπει να σημειωθεί ότι έχουν αναπτυχθεί τεχνικές με την εφαρμογή των οποίων η εξακρίβωση της πρωτοταγούς ακολουθίας πρωτεϊνών με φασματοσκοπία μαζών είναι δυνατή μετά από θραυσματοποίηση των καθηλωμένων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πρωτεϊνών, διαχωρισμό των πεπτιδίων που σχηματίζονται με on line HPLC και ταυτοποίηση της μοριακής τους μάζας. Τα πεπτίδια είναι προϊόντα ενζυμικής πρωτεόλυσης του δείγματος με θρυψίνη (το ένζυμο αυτό υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς βασικών αμινοξέων). Η περίπτωση επομένως κατά την οποία δεν σχηματίζονται πεπτίδια, όπως στο δείγμα που εξετάστηκε, θα μπορούσε να αποδοθεί στην απουσία βασικών αμινοξέων στην πρωτεΐνη που μελετάται.

Κατά την εξέταση του δεύτερου δείγματος (οι ζώνες που ήταν καθηλωμένες στην πηκτή) δεν διαπιστώθηκε ο σχηματισμός πεπτιδίων που θα επέτρεπε την εξακρίβωση της μοριακής τους μάζας και στη συνέχεια της πρωτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι οι πρωτεΐνες των δειγμάτων θολού ελαιολάδου που αναλύθηκαν δεν περιέχουν, ενδεχομένως, βασικά αμινοξέα και επομένως δεν είναι δυνατή η εξακρίβωση της αμινοξικής τους ακολουθίας ή ότι περιέχουν και άλλες προσθετικές ομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δράση του ενζύμου (θρυψίνη) που χρησιμοποιήθηκε. Το τελευταίο είναι γνωστό ως φαινόμενο επικάλυψης ή masking effect (Basha, 1988).

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες ή τα συσσωματώματα πρωτεϊνών με μοριακή μάζα 225 kDa δεν υδρολύθηκαν ούτε από το ισχυρό πρωτεολυτικό ένζυμο πρωτεϊνάση  $K^+$  όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3. Είναι φανερό ότι το ένζυμο υδρολύει την πρότυπη αλβουμίνη αυγού, όπως φαίνεται στις διαδρομές 1-2, 3-4 της Εικόνας 4.3, αλλά αδυνατεί να υδρολύσει τις πρωτεΐνες (225 kDa) του θολού ελαιολάδου (διαδρομές 5, 6).



**Εικόνα 4.3.** Δοκιμή δράσης πρωτεϊνάσης  $K^+$  σε πρωτεΐνες του δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2» και σε πρότυπη πρωτεΐνη του αυγού με τη βοήθεια της SDS-PAGE (12%). Εμφάνιση με  $AgNO_3$ .

Διαδρομή 1: αλβουμίνη αυγού σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl / 0,2mol/L ουρίας μετά από επώαση με πρωτεϊνάση  $K^+$ .

Διαδρομή 2: αλβουμίνη αυγού σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl / 0,2mol/L ουρίας χωρίς επώαση με πρωτεϊνάσης  $K^+$

Διαδρομή 3: αλβουμίνη αυγού σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl μετά από επώαση με πρωτεϊνάση  $K^+$ .

Διαδρομή 4: αλβουμίνη αυγού σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl χωρίς επώαση με πρωτεϊνάσης  $K^+$ .

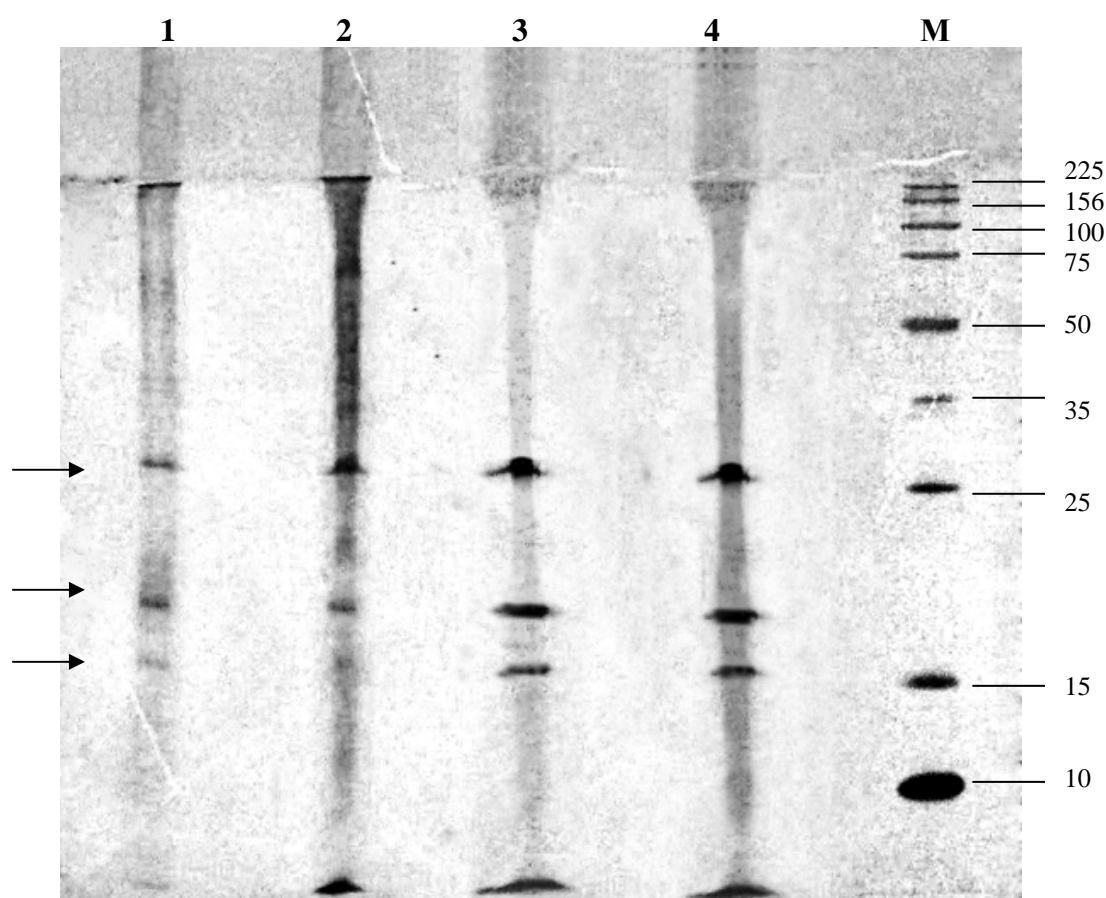
Διαδρομή 5: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία από 40 g θολού ελαιολάδου μετά από επώαση με πρωτεϊνάση  $K^+$  σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl, 0,2mol/L ουρία.

Διαδρομή 6: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία από 40 g θολού ελαιολάδου χωρίς επώαση με πρωτεϊνάση  $K^+$  σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mol/L Tris-HCl , 0,2mol/L ουρία,

Διαδρομή 7: Πρωτεΐνες (μάρτυρες) με γνωστή μοριακή μάζα.

Τέλος, έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν με ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες του ελαιολάδου με τις πρωτεΐνες των Α.Σ.Σ. του ελαιολάδου καθώς και του μεσοκαρπίου της ελιάς. Τα δείγματα αυτά προέκυψαν μετά από κατεργασία όπου έχει ήδη περιγραφεί (βλ. παρ. 3.3.6.2 και 3.3.6.3) με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του Α. Δρούγκα (2006).

Στην Εικόνα 4.4 διακρίνονται τρεις καθαρές ζώνες που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες με μοριακή μάζα ~ 35-15 kDa. Αυτές οι ζώνες εμφανίζονται και στα τέσσερα δείγματα αλλά πολύ πιο καθαρά στα αραιότερα δείγματα.



**Εικόνα 4.4.** Διαχωρισμός πρωτεϊνών μεσοκαρπίου ελαιόκαρπων και Α.Σ.Σ. δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» με την τεχνική SDS-PAGE (12%). Εμφάνιση με νιτρικό άργυρο.

Διαδρομή 1: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 2 g Α.Σ.Σ. (αραιό)

Διαδρομή 2: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 2 g Α.Σ.Σ. (πυκνό)

Διαδρομή 3: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 2 g μεσοκαρπίου (αραιό)

Διαδρομή 4: Δείγμα που προέκυψε από κατεργασία 2 g μεσοκαρπίου (πυκνό)

Διαδρομή M: μάρτυρες

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ή πολυπεπτιδίων του ελαιολάδου που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής δεν ήταν ικανοποιητικός. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί ή στη φύση των πρωτεϊνών ή στις αναπόφευκτες προσμίξεις τους. Συγκεκριμένα, μια πρωτεΐνη που υπάρχει σε ένα λιπόφιλο περιβάλλον, όπως αυτό του ελαιολάδου, πρέπει πρωτίστως να είναι αρκετά υδρόφοβη (αν και στο θολό ελαιόλαδο απαντά ένα μικρό ποσοστό νερού). Κατά δεύτερο λόγο, «λιπόφιλες προσμίξεις», που μεταφέρθηκαν στο δείγμα κατά την απομόνωσή του, αλληλεπιδρούν με τις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να προσδώσουν έναν ισχυρότερο υδρόφοβο χαρακτήρα και επομένως να καταστήσουν την περαιτέρω ταυτοποίηση τους ακόμη πιο δύσκολη.

Με τον όρο «λιπόφιλες προσμίξεις» εννοούνται ίχνη λιπιδίων ή ορισμένες φαινολικές ενώσεις (π.χ. το άγλυκο μέρος της ελαιοευρωπαϊνης) ή πολυσακχαρίτες (στην περίπτωση των δειγμάτων Α.Σ.Σ. και μεσοκαρπίου) που παραλαμβάνονται στο δείγμα μαζί με το πρωτεϊνικό κλάσμα. Ενδέχεται οι προσμίξεις του δείγματος να αλληλεπιδρούν μη ειδικά με υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών και να σχηματίζουν σύμπλοκα. Για παράδειγμα, στη βιβλιογραφία αναφέρεται η δυνατότητα σχηματισμού ενός συμπλόκου μεταξύ πολικών φαινολών και πρωτεΐνης (ligand) και έχουν προταθεί μάλιστα διάφορα μοντέλα (Spencer *et al.*, 1988). Οι Lercker *et al.* (1994) αναφέρονται στις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και πολικών φαινολών στο ίζημα του ελαιολάδου που οδηγούν στο σχηματισμό ενός συμπλόκου που ονομάζεται πολυμερίνη (polymerin). Είναι φανερό ότι αν τα παραπάνω συμβαίνουν, θα επηρεάσουν τις ιδιότητες των πρωτεϊνών, π.χ. δεν θα έχουν τη διαμόρφωση που χρειάζεται για το σωστό διαχωρισμό τους κατά τη SDS-PAGE ή δεν θα πρωτεολύονται στον ίδιο βαθμό. Στο φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται η διάχυση των πρωτεϊνικών ζωνών κατά την ηλεκτροφόρηση και η αδυναμία ενζυμικής υδρόλυσής τους.

Επίσης η χαμηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα (είναι χαρακτηριστικό ότι η χρώση των ζωνών με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιήθηκε σχεδόν αποκλειστικά εις βάρος αυτής με Coomassie Blue) σε συνδυασμό με την παρουσία της εκτεταμένης διάχυσης (που φαίνεται να είναι χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών του ελαιολάδου και της ελιάς γενικότερα (βλ. Γεωργαλάκη, 1999) δυσχεραίνουν την ανάλυση και καθιστούν την ταυτοποίησή τους ιδιαίτερα δύσκολη.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3, οι πρωτεΐνες ή τα συσσωματώματα πρωτεϊνών με μοριακή μάζα που αντιστοιχεί σε 225 Kda δεν υδρολύονται ενζυμικά. Αναφορικά

με το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, ο Huang (1992) δηλώνει ότι οι ελαιοσίνες είναι πολύ ανθεκτικές στην υδρόλυση και μόνο η θρυψίνη είναι ικανή να προκαλέσει μερική υδρόλυση που οδηγεί στη συσσωμάτωσή τους. Η πρωτεΐνωση  $K^+$  χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα επειδή είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο αναγνωρίζει όλους τους πεπτιδικούς δεσμούς ανεξάρτητα από τα αμινοξέα που εμπλέκονται στο σχηματισμό τους. Η θρυψίνη, η οποία όπως προαναφέρθηκε έχει χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση των ελαιοσινών, αναγνωρίζει μόνο τα βασικά αμινοξέα, αλλά στην περίπτωση που τα «προσιτά» στο ένζυμο αμινοξέα είναι δεσμευμένα δεν είναι δυνατή η πρωτεόλυση. Επειδή ήταν άγνωστη η αλληλουχία των αμινοξέων στην προς μελέτη πρωτεΐνη, επιλέχθηκε ένα ένζυμο, όπως η πρωτεΐνωση  $K^+$ , προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί τουλάχιστον ο παράγοντας της εξειδίκευσης, όπως στην περίπτωση της θρυψίνης.

Τα αποτελέσματα από τη διερεύνηση της φύσης των πρωτεϊνών του ελαιολάδου συμφωνούν σε ορισμένα σημεία με τη βιβλιογραφία (Huang, 1992; Ross *et al.*, 1993; Tzem *et al.*, 1990; Huang, 1996). Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, οι ελαιοσίνες που ανιχνεύονται στο μεσοκάρπιο και στο ενδοκάρπιο της ελιάς έχουν χαρακτηριστεί ως υδρόφοβες πρωτεΐνες και επομένως, σε μια πρώτη προσέγγιση, και οι πρωτεΐνες που ανιχνεύτηκαν στο ελαιολάδο ενδέχεται να ανήκουν σε μια παρόμοια κατηγορία αναφορικά με την υδροφοβικότητα τους. Σχετικά με την κατάταξη των πρωτεϊνών με τη μοριακή τους μάζα, στα δείγματα ελαιολάδου δεν φαίνεται να ανιχνεύονται πεπτιδία χαμηλού μοριακού βάρους (4,6 kDa) όπως στις εργασίες των Hidalgo *et al.* (2001; 2002) παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η ίδια μέθοδος απομόνωσης. Πλησιέστερα στις μοριακές μάζες που ανιχνεύονται στην προκειμένη εργασία είναι εκείνες που αναφέρονται από τους Georgalaki *et al.* (1998a), οι οποίοι ανιχνεύουν πρωτεϊνικές ζώνες στα 10-40, ~70 kDa συνοδευόμενες από «συσσωματώματα» (225 KDa) τα οποία δεν εισέρχονται στην πηκτή διαχωρισμού πιθανόν λόγω υψηλής μοριακής μάζας.

Εξάλλου, στο μεσοκάρπιο της ελιάς και στα Α.Σ.Σ. του ελαιολάδου διαπιστώθηκε η παρουσία διαφορετικών πρωτεϊνικών ζωνών. Κατά την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού κλάσματος παρατηρήθηκαν ζώνες πρωτεϊνών με μοριακή μάζα 35-25 kDa και 25-10 kDa που προσομοιάζουν τις ελαιοσίνες (βλ. παρ. 1.6.2). Οι ζώνες αυτές ανιχνεύτηκαν επίσης με εμφάνιση με τη λιγότερο ευαίσθητη μέθοδο του Coomassie Blue. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα Α.Σ.Σ. είναι υψηλότερη σε σχέση με αυτή στο ελαιολάδο, αλλά χαμηλότερη σε σχέση με αυτή στο μεσοκάρπιο. Τα αποτελέσματα αυτά για τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο μεσοκάρπιο

και τα Α.Σ.Σ. βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της Γεωργαλάκη (1999) και Georgalaki *et al.* (1998a) και εν μέρει με αυτά των Hidalgo *et al.* (2002).

#### **4.4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΙ ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ**

##### **4.4.1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΩΝ**

Μια κατηγορία ησσόνων συστατικών που συμβάλλει στην οξειδωτική σταθερότητα των ελαίων είναι αυτή των φωσφολιπιδίων με την προϋπόθεση ότι τα λιπίδια αυτά βρίσκονται σε μια ικανοποιητική συγκέντρωση. Χημικώς δρουν ως δευτεροταγή αντιοξειδωτικά (Pokorný *et al.*, 1992; Pokorný & Korczak, 2001). Τα φωσφολιπίδια αυξάνουν τη δραστηριότητα των συμβατικών αντιοξειδωτικών π.χ. των τοκοφερολών (βλ. παρ.1.5.3.1).

Στην παρούσα διατριβή, έγινε μια προσπάθεια έμμεσης εκτίμησης των επιπέδων των φωσφολιπιδίων σε μια σειρά θολών ή διηθημένων δειγμάτων ελαιολάδων και ενός δείγματος εξευγενισμένου ελαιολάδου από την περιεκτικότητά τους σε φωσφόρο. Για τον προσδιορισμό των φωσφορικών ανιόντων χρησιμοποιήθηκε η βαναδομολυβδενική μέθοδος που είναι η πρότυπη μέθοδος της IUPAC (σε διάφορους τύπους δειγμάτων) (IUPAC, 1987).

Ο συντελεστής που επιλέχθηκε για τη μετατροπή του φωσφόρου σε φωσφολιπίδια ήταν ίσος με 25,3. Ο συντελεστής αυτός υπολογίστηκε συμβατικά με βάση την εργασία των Alter & Gutfinger (1982) οι οποίοι προσδιόρισαν τη σχετική αναλογία των κυριότερων φωσφολιπιδίων στο ελαιολάδο. Υπολογίστηκε η εκατοστιαία αναλογία του φωσφόρου που περιέχεται σε κάθε ένα από αυτά, με βάση τη μοριακή τους μάζα, και με τους κατάλληλους υπολογισμούς προέκυψε ο συντελεστής 25,3. Ο συντελεστής αυτός διαφέρει ελάχιστα από το συντελεστή 26 που χρησιμοποιεί η IUPAC στην επίσημη μέθοδό της (IUPAC, 1987) είναι όμως αρκετά χαμηλότερος από το συντελεστή 30 που προτείνει η επίσημη μέθοδος της American Oil Chemists Society (AOCS, Ca 12-55, 1998).

Η περιεκτικότητα σε φώσφορο και φωσφολιπίδια 10 δειγμάτων θολού ελαιολάδου, 10 δειγμάτων που προέκυψαν από διήθηση τους, δυο διαυγών εμπορικών δειγμάτων και ενός δείγματος εξευγενισμένου ελαιολάδου δίνεται στον Πίνακα 4.6.

**Πίνακας 4.6.** Περιεκτικότητα δειγμάτων ελαιολάδου σε στοιχειακό φωσφόρο και φωσφολιπίδια

<i>A/A</i>	<i>ΔΕΙΓΜΑ</i>	<i>ΕΙΔΟΣ</i>	<i>ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΣ (mg/kg)</i>	<i>ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ (mg/kg)</i>
1	Άρτα 1	Θολό	2,4	61,7
2	Άρτα 1	Διηθημένο	2,2	56,5
3	Χαλκιδική 1	Θολό	4,1	106,2
4	Χαλκιδική 1	Διηθημένο	3,4	87,1
5	Χαλκιδική 2	Θολό	3,2	82,3
6	Χαλκιδική 2	Διηθημένο	2,0	52,6
7	Χαλκιδική 3	Θολό	2,1	54,6
8	Χαλκιδική 3	Διηθημένο	0,8	21,1
9	Χαλκιδική 4	Θολό	3,7	95,1
10	Χαλκιδική 4	Διηθημένο	0,9	23,0
11	Καλαμάτα 1	Θολό	6,0	156,0
12	Καλαμάτα 1	Διηθημένο	4,8	124,2
13	Κρήτη 1	Θολό	17,2	447,2
14	Κρήτη 1	Διηθημένο	1,2	31,8
15	Κρήτη 2	Θολό	1,8	46,2
16	Κρήτη 2	Διηθημένο	1,3	34,0
17	Κρήτη 3	Θολό	4,4	113,9
18	Κρήτη 3	Διηθημένο	3,0	78,0
19	Κρήτη 6	Θολό	1,3	34,6
20	Κρήτη 6	Διηθημένο	1,2	25,3
21	Κρήτη 7	Διαυγές εμπορικό	1,4	36,2
23	Λέσβος	Διαυγές εμπορικό	1,2	31,1
24	Κρήτη 5	Εξευγενισμένο	1,4	36,4

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.6, υπάρχει σαφής διαφορά στα επίπεδα των φωσφολιπιδίων μεταξύ θολού και διηθημένου δείγματος, στοιχείο που δείχνει ότι τα θολά ελαιόλαδα πρώτης διαλογής, που δεν έχουν υποστεί κανενός είδους επεξεργασία,

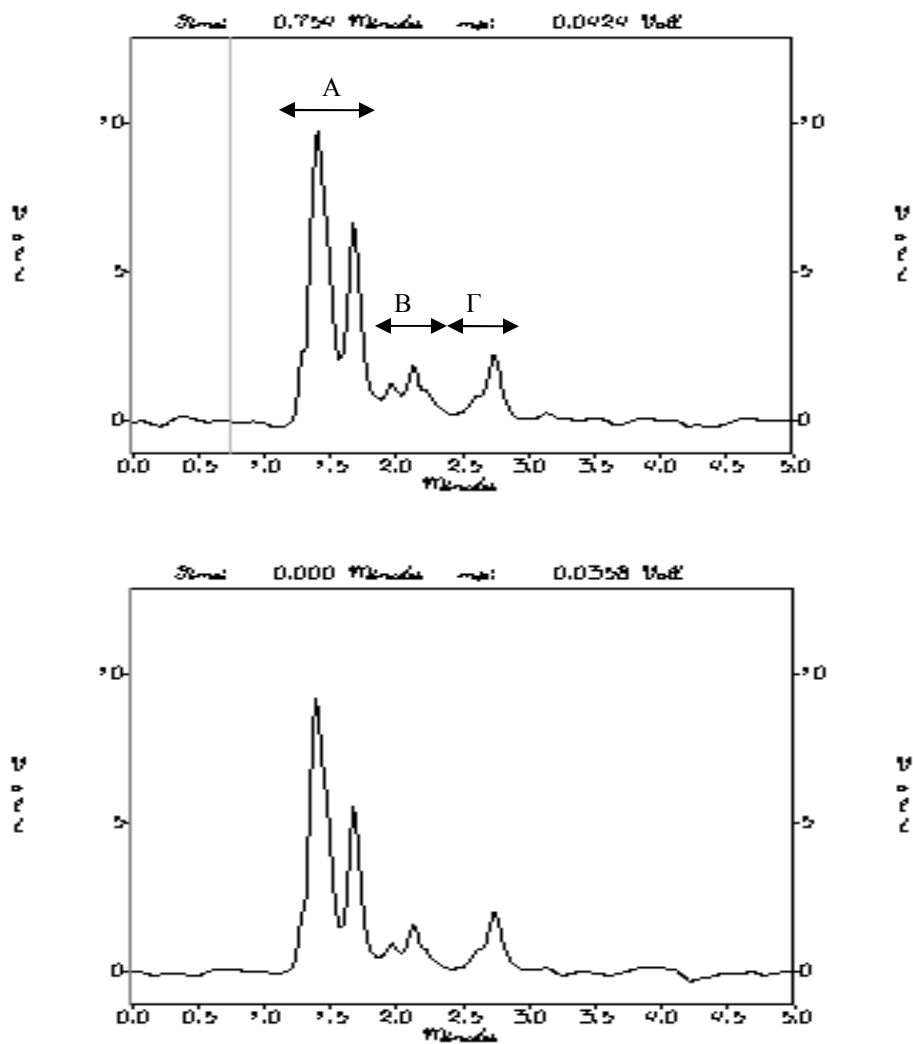
έχουν γενικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια. Η πολύ υψηλή συγκέντρωση τους στο δείγμα «Κρήτη 1» πρέπει να αποδοθεί στην υψηλή συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών (Α.Σ.Σ. - σ.σ. 450 mg/kg – βλ. Πίνακα 4.10). Το δείγμα αυτό που συλλέχθηκε απευθείας από τη φυγόκεντρο, είχε υγρασία 1,31 % (Πίνακας 4.9) με αποτέλεσμα να μην ανταποκρίνεται στο χαρακτηρισμό «παρθένο ελαιόλαδο».

Τα θολά ελαιόλαδα είχαν, σε όλες τις περιπτώσεις, υψηλότερη περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια σε σχέση με τα αντίστοιχα διηθημένα, ένδειξη ότι κατά τη διήθηση συγκρατείται στο υπόλειμμα μέρος των φωσφολιπιδίων. Ωστόσο, η απώλεια αυτή των φωσφολιπιδίων αξιολογήθηκε ως στατιστικώς μη σημαντική ( $p=0,072>0,05$ ). Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα Α.Σ.Σ. (αδιάλυτα στερεά συστατικά του υπολείμματος) περιέχουν και φωσφολιπίδια εκτός από πολικές φαινόλες και πρωτεΐνες. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα περισσότερα φωσφολιπίδια βρίσκονται σε λιποδιαλυτές μορφές αφού προσδιορίζονται και μετά τη διήθηση, το δε ποσοστό ανάκτησης είναι περίπου 90 %. Τα επίπεδα των φωσφολιπιδίων, σε αντίθεση με αυτά των πρωτεϊνών, είναι σε αρκετά υψηλότερα επίπεδα στο ελαιόλαδο (κατά μέσο όρο 65 mg/kg) και η παρουσία τους μπορεί να συνεισφέρει στην οξειδωτική σταθερότητά του.

#### **4.4.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HPLC).**

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ανάλυσης που επιλέχθηκε αποτελεί τμήμα της επίσημης μεθόδου της IUPAC για το διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων της εμπορικής λεκιθίνης (καθαρότητα σε φωσφατιδυλοχολίνη: 40 %), αλλά και άλλων προϊόντων όπως το σογιέλαιο (Carelli *et al.*, 1997; Balazs *et al.*, 1996; Avalli & Contarini, 2005). Στο ελαιόλαδο δεν έχει δοκιμαστεί η μέθοδος αυτή, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία.

Στο Σχήμα 4.1 φαίνεται το χρωματογράφημα ενός δείγματος ελαιολάδου μετά από ανάλυση με HPLC. Τα επιμέρους φωσφολιπίδια εκλούστηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα (λιγότερο από πέντε λεπτά). Τα υπόλοιπα συστατικά που συνυπήρχαν στο δείγμα (π.χ. πολικές φαινόλες, κ.α.) δεν φάνηκε να παρεμποδίζουν είτε λόγω της πολύ μικρής απορρόφησής τους στο επιλεγμένο μήκος κύματος είτε λόγω της υψηλότερης πολικότητάς τους (εκλούνται πολύ αργότερα).



**Σχήμα 4.1.** Υγροχρωματογραφήματα ενός δείγματος θολού ελαιολάδου («Άρτα 2») πριν και μετά τη διήθησή του.

Το προφίλ των φωσφολιπιδίων στα δείγματα θολού και διηθημένου δείγματος ελαιολάδου ήταν παρόμοιο ενώ ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα ελαιολάδου δεν παρατηρήθηκαν. Στα χρωματογραφήματα υπήρχαν τρεις περιοχές κορυφών, που μπορούν να ομαδοποιηθούν (ομάδες A, B και Γ). Στην ομάδα A υπήρχε πάντα η κύρια κορυφή. Ωστόσο ο υγροχρωματικός διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός. Ο διαχωρισμός των προτύπων στις ίδιες συνθήκες έδειξε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη συνεκλούνται ( $RT_1 = RT_2 = 1,2$  min), αν και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη εκλύεται πριν από την φωσφατιδυλοχολίνη. Η κύρια κορυφή στα χρωματογραφήματα ήταν αυτή που

αντιστοιχεί σε ένα ή και στα δυο πρότυπα φωσφολιπίδια. Αυτό προέκυψε από την παρατήρηση ότι το μέγεθος της κύριας κορυφής αυξανόταν με προσθήκη γνωστής ποσότητας των δυο προτύπων στο δείγμα (spiking). Επιπλέον, ο χρόνος έκλυσης της κορυφής των προτύπων δεν συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα στα δείγματα σπορέλαιου και εμπορικής λεκιθίνης (IUPAC, 1992; Carelli *et al.*, 1997) παρόλο που χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο ανάλυσης. Μεταβολές στην ταχύτητα της κινητής φάσης δεν βελτίωσαν αισθητά το διαχωρισμό.

Για να αποκλειστεί η πιθανότητα παρεμποδίσεων εξαιτίας της φύσης του δείγματος (ελαιολάδο) στο διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων κατά την εφαρμογή του συγκεκριμένου αναλυτικού πρωτοκόλλου, αναλύθηκε επιπροσθέτως ένα δείγμα ακατέργαστου σογιέλαιου και ένα δείγμα εμπορικής λεκιθίνης. Στο δείγμα του σογιέλαιου ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για την απομόνωση των φωσφολιπιδίων, ενώ στο δείγμα της εμπορικής λεκιθίνης δεν έγινε καμιά προκατεργασία. Ωστόσο, οποιαδήποτε περαιτέρω σύγκριση καλό είναι να αποφεύγεται καθώς τα φωσφολιπίδια του σογιέλαιου έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπαρά οξέα σε σχέση με αυτή του ελαιολάδου.

Τα δυο αυτά δείγματα εμφάνισαν παρόμοιο προφίλ φωσφολιπιδίων με εκείνο του ελαιολάδου (τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα).

Επειδή ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων δεν ήταν ικανοποιητικός, δεν ήταν δυνατή η ποσοτική εκτίμηση των επιμέρους φωσφολιπιδίων. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά φωσφολιπίδια και τα επίπεδά τους συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων με εφαρμογή της χρωματομετρικής μεθόδου. Οι κορυφές των χρωματογραφημάτων ολοκληρώθηκαν κατά ομάδες (Α, Β και Γ) και με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε ομάδες φωσφολιπιδίων και σε ολικά φωσφολιπίδια ως φωσφατιδυλοχολίνη (mg/kg ελαίου).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 4.7 η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ολικά φωσφολιπίδια όπως υπολογίστηκε μετά την εφαρμογή της υγροχρωματογραφικής μεθόδου διαφέρει αρκετά από αυτή που υπολογίστηκε μετά την εφαρμογή της χρωματομετρικής μεθόδου, αν και είναι της ίδιας τάξης μεγέθους. Το μεγαλύτερο ποσοστό προέρχεται από την ομάδα Α. Επίσης, λόγω πολικότητας, η φωσφατιδυλοχολίνη, που στα δείγματα της εργασίας εκλύεται πρώτη, εκλύεται τελευταία οπότε οι κορυφές στις ομάδες Β και Γ δεν αναμένεται να ανήκουν στα γνωστά φωσφολιπίδια (η σειρά έκλυσης που εμφανίζεται στη βιβλιογραφία είναι: PE,

PA, PI, PC - IUPAC, 1992; Carelli *et al.*, 1997). Τα παραπάνω ενισχύουν την υπόθεση ότι τα φωσφολιπίδια εκλούνται ποσοτικά πολύ νωρίς, εντός των χρόνων συγκράτησης της ομάδας A (1,215-1,865 min).

**Πίνακας 4.7.** Σύσταση φωσφολιπιδικού κλάσματος του δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2».

<b>ΦΩΣΦΟ- ΛΙΠΙΔΙΑ</b>	<b>ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗΣ ΚΟΡΥΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΔΕΙΓΜΑ ΩΣ ΕΧΕΙ</b>	<b>ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΗΘΗΣΗ</b>
<b>Ομάδα Α</b> (RT= <b>1,215 – 1,865</b> )	<i>Peak Area</i>	1278209	1276899
	<i>Area %</i>	81,9	78,9
	PL (mg/kg)	164	160
<b>Ομάδα Β</b> (RT= <b>1,870 – 2,518</b> )	<i>Peak Area</i>	117257	139463
	<i>Area %</i>	7,4	8,9
	PL (mg/kg)	2,3	3,2
<b>Ομάδα Γ</b> (RT = <b>(2,520 – 3,000)</b> )	<i>Peak Area</i>	187052	202186
	<i>Area %</i>	11,9	12,2
	PL (mg/kg)	5,3	6,1
<i>ΟΛΙΚΑ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΑ (mg/kg)</i>		171,6 (86,5)	169,6 (84,1)

Στην παρένθεση δίνεται η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια που υπολογίστηκε με την εφαρμογή της χρωματομετρικής μεθόδου μετά τον προσδιορισμό του ολικού φωσφόρου (βλ. παρ. 3.3.2.2).

Ο υγροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων αποτελεί ένα γενικότερο πρόβλημα το οποίο αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία. Ενδεικτικό είναι ότι σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη, οι Jiménez *et al.* (2007) προσπάθησαν να διαχωρίσουν τα φωσφολιπίδια και τις πολικές φαινόλες με εφαρμογή μεθόδου HPLC αντίστροφης φάσης. Ο διαχωρισμός ήταν φτωχός και πολλά διαχωρισθέντα συστατικά δεν ταυτοποιήθηκαν συμπεριλαμβανομένου και αυτού που αντιστοιχούσε στην κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος.

### 4.4.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ <sup>31</sup>P-NMR.

#### 4.4.3.1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική που έχουν στην διάθεσή τους οι χημικοί για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών. Τα τελευταία χρόνια η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση και ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων (Belton *et al.*, 1995). Συγκεκριμένα η φασματοσκοπία <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C NMR εφαρμόστηκε επιτυχώς στην ανάλυση του ελαιολάδου και αποκάλυψε νέα στοιχεία για τη δομή ενώσεων που σχετίζονται με την ποιότητά του (Sacchi *et al.*, 1996; Sacchi *et al.*, 1997).

Η φασματοσκοπία NMR παρέχει έναν «χάρτη» του όλου ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο (Skoog *et al.*, 2002). Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο στο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}}$$

Στην ουσία, οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τα περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο πεδίο να μην είναι το ίδιο για κάθε πυρήνα. Έτσι, δεδομένου ότι κάθε χημικά διακριτό άτομο υδρογόνου σε ένα μόριο εμφανίζει κατά κανόνα τη δική του μοναδική απορρόφηση, κατά την εφαρμογή του <sup>1</sup>H-NMR υπολογίζεται πόσα είδη μη ισοδύναμων υδρογόνων υπάρχουν και σε συνδυασμό με την περιοχή απορρόφησης τους στο φάσμα είναι εφικτός και ο προσδιορισμός της τάξης του άνθρακα (-CH, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>) ή των χαρακτηριστικών ομάδων που περιέχουν άτομα H και μπορεί να υπάρχουν σε ένα οργανικό μόριο. Αντίθετα, με την φασματοσκοπία <sup>13</sup>C NMR επιτρέπεται η απαρίθμηση των μη ισοδύναμων ανθράκων ενός μορίου, ενώ και στην περίπτωση αυτή, ανάλογα με τα στοιχεία που είναι συνδεδεμένο ένα άτομο C (συνήθως H, N, O), απορροφούν σε χαρακτηριστικές συχνότητες του φάσματος. Συνδυασμός των δύο παραπάνω φασμάτων μπορεί να δώσει μια ικανοποιητική προσέγγιση για την δομή ενός μορίου.

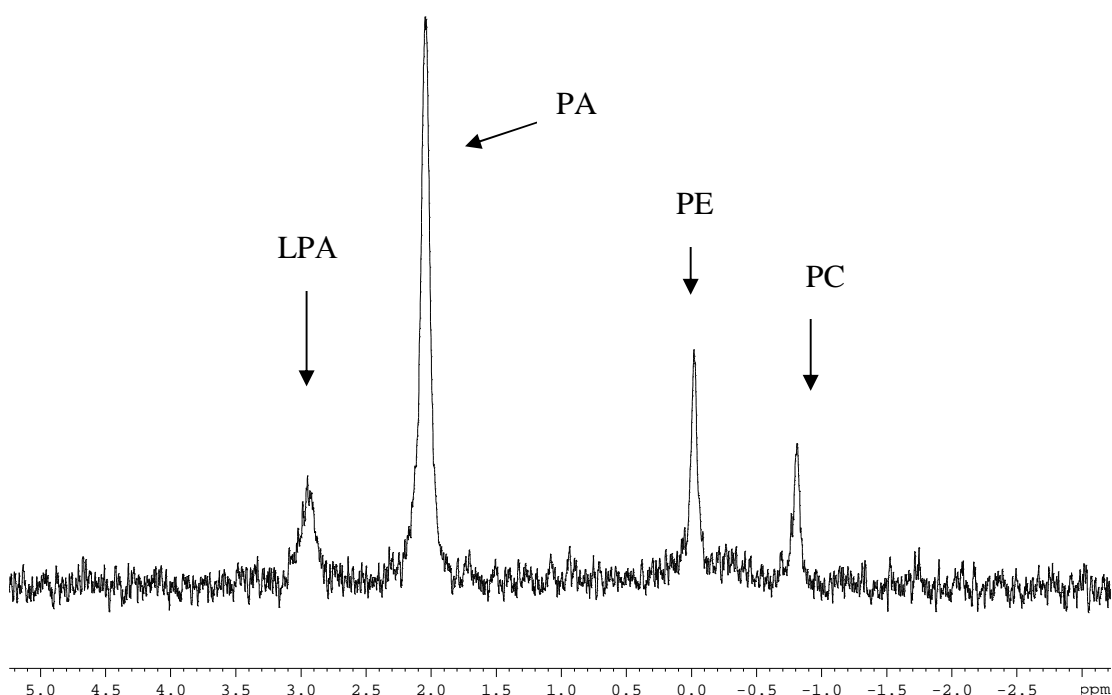
Τα τελευταία χρόνια, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που καθιστούν δυνατή τη συλλογή πρόσθετων πληροφοριών από τα φάσματα  $^{13}\text{C}$  NMR. Ανάμεσα στις πιο χρήσιμες από αυτές είναι και η επονομαζόμενη DEPT-NMR (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), με την οποία καθίσταται εφικτή η αναγνώριση σημάτων που οφείλονται σε  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ , ή τεταρτοταγείς άνθρακες. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ο αριθμός των υδρογόνων που βρίσκονται συνδεδεμένα σε κάθε άνθρακα (Sanders & Hunter, 1994; Mc Murry, 1998).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω τεχνικές η τεχνική  $^{31}\text{P}$ -NMR είναι λιγότερο διαδεδομένη. Με την τεχνική αυτή μελετώνται οι απορροφήσεις των πυρήνων του φωσφόρου 31 κάτω από την επίδραση μαγνητικού πεδίου. Οι διαφορετικοί πυρήνες διαφοροποιούνται ανάλογα με το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, με ανάλογο τρόπο όπως και αυτοί των υδρογόνων. Λόγω του μεγάλου εύρους των χημικών μετατοπίσεων (περίπου 1000 ppm) και της υψηλής φυσικής αφθονίας του πυρήνα φώσφορος-31, τα φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR χαρακτηρίζονται από υψηλή διακριτική ικανότητα και ευαισθησία. Όταν τα προς μελέτη μόρια δεν περιέχουν φώσφορο γίνεται φωσφιτυλίωση με ειδικά αντιδραστήρια όπως το 2-γλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο (Spyros & Dais, 2000). Όταν τα μόρια περιέχουν εν γένει φώσφορο (π.χ. τα φωσφολιπίδια) δεν χρειάζεται κάτι ανάλογο αλλά η ανάλυσή τους αναμένεται να παρουσιάζει περισσότερες δυσκολίες. Και στις δυο περιπτώσεις είναι απαραίτητο να εξαλειφθούν τα μαγνητικά φαινόμενα που προκαλούν οι προσμίξεις μετάλλων του δείγματος διότι αυτά προκαλούν διεύρυνση των κορυφών στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR και μειώνουν την ευαισθησία του πειράματος NMR. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με συμπλοκοποίηση των μετάλλων με EDTA. Για τη λήψη ποσοτικών φασμάτων  $^{31}\text{P}$ -NMR, θα πρέπει να αποκλειστεί επίσης η αλληλεπίδραση NOE (Nuclear Overhauser Effect) μεταξύ του πυρήνα του φωσφόρου και γειτονικών πρωτονίων των μορίων διότι το φαινόμενο NOE προκαλεί μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών με αποτέλεσμα να μην είναι τα αντίστοιχα φάσματα ποσοτικά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η τεχνική inverse gated decoupling (αποσύζευξη αντίστροφης εισόδου). Σύμφωνα με αυτήν, ο αποσυζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάκτησης του σήματος, ενώ παραμένει κλειστός σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος.

#### 4.4.3.2. Πειρατικό μέρος: εξέταση των δειγμάτων

Οι αντικειμενικές δυσκολίες που παρατηρήθηκαν κατά τον υγροχρωματικό διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων οδήγησαν στην αναζήτηση λύσεων με εφαρμογή άλλων ενόργανων αναλυτικών τεχνικών όπως η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Ο πυρήνας που μελετήθηκε ήταν αυτός του φωσφόρου-31 που απαντά στο ελαιόλαδο σχεδόν αποκλειστικά στα φωσφολιπίδια (βλ. Σχήμα 1.2)

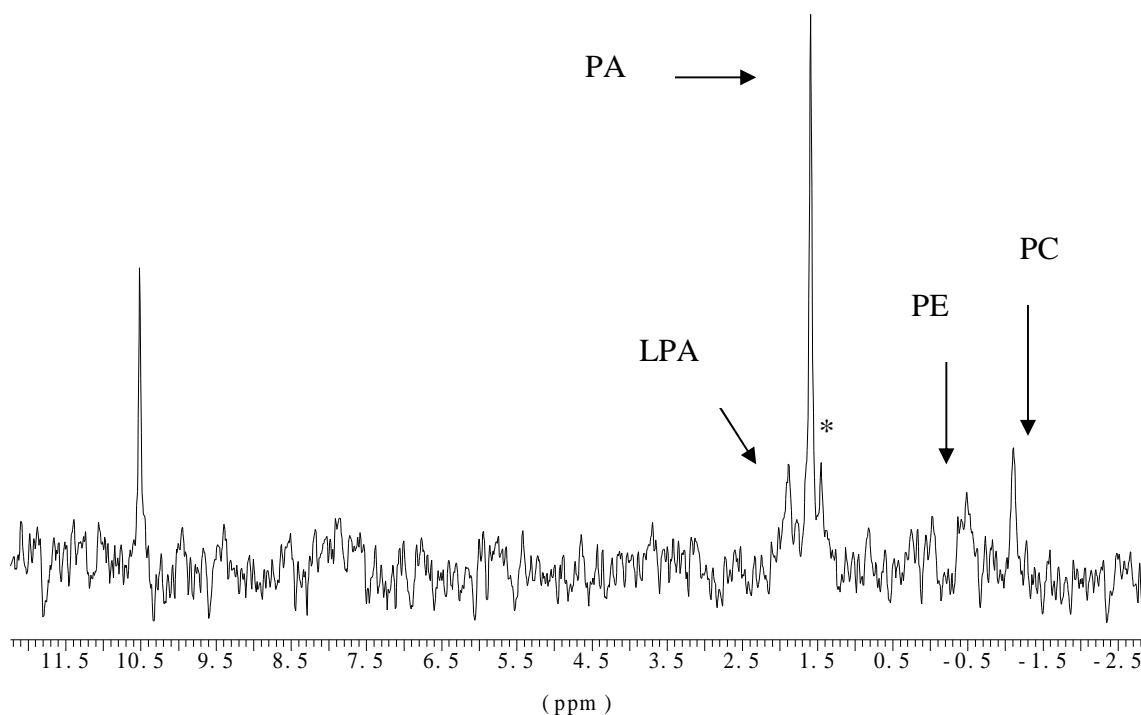
Στο Σχήματα 4.2 και 4.3 παρουσιάζονται τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( $^{31}\text{P}$ -NMR) δυο δειγμάτων θολού ελαιολάδου πρόσφατης έκθλιψης ( $t=0$ ).



**Σχήμα 4.2.** Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος δείγματος θολού ελαιολάδου «Χαλκιδική 5» σε λειτουργική συχνότητα 203,2 Hz.

Όπως εξηγήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, ο πυρήνας φωσφόρου των διάφορων επιμέρους φωσφολιπιδίων εμφανίζει σήματα με διαφορετική χημική μετατόπιση στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Τα σήματα των φωσφολιπιδίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα «Χαλκιδική 5» ήταν αυτά: του φωσφατιδικού οξέος, (PA) (σε μεγαλύτερη αναλογία),

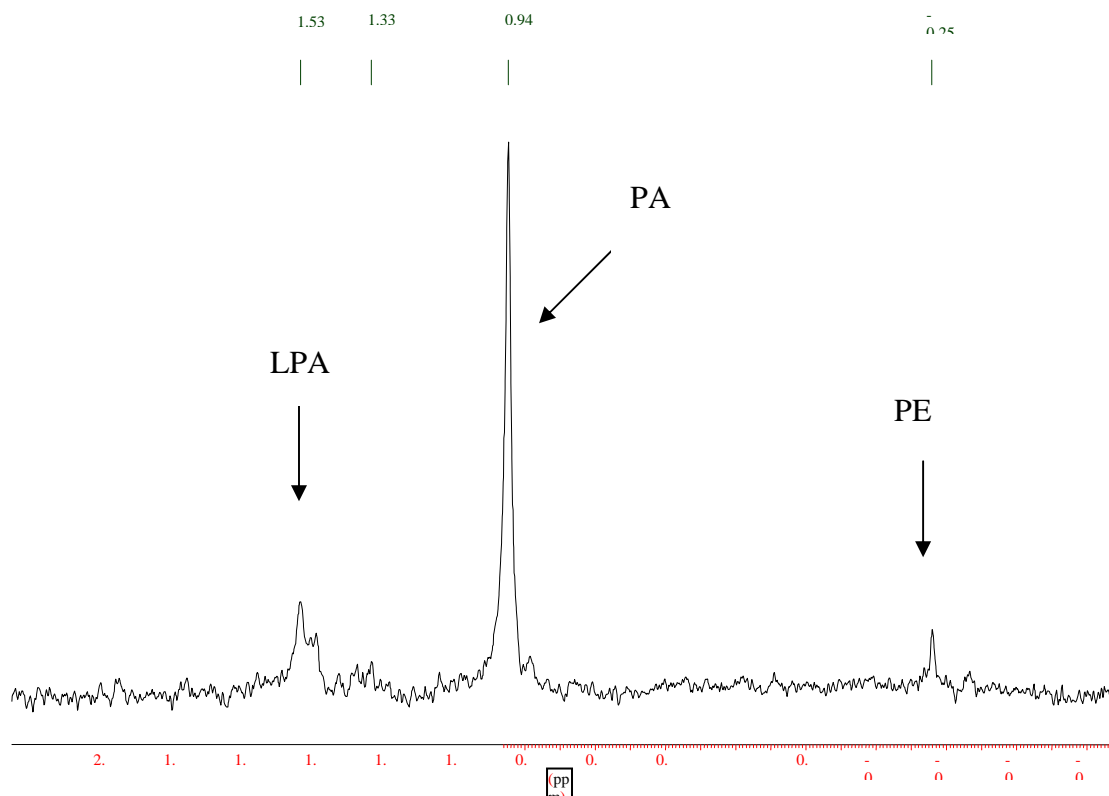
της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) και του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA).



**Σχήμα 4.3.** Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος δείγματος θολού ελαιολάδου «Δράμα» (B) σε λειτουργική συχνότητα 203,2 Hz.

Η ανάλυση με φασματοσκοπία NMR του δείγματος θολού ελαιολάδου «Δράμα» (Σχήμα 4.3) έδειξε ότι το φωσφατιδικό οξύ ήταν επίσης το κύριο φωσφολιπίδιο. Το σήμα του φωσφατιδικού οξέος (PA) συνοδεύεται στο δείγμα από μια μικρότερη κορυφή (επισημαίνεται με αστερίσκο). Αυτό ενδέχεται να οφείλεται σε διαφοροποίηση των λιπαρών οξέων που απαντούν εστεροποιημένα στις θέσεις 1 και 2 του μορίου του PA. Πιο συγκεκριμένα, το ασθενές σήμα αποδόθηκε σε μόριο φωσφατιδικού οξέος στο οποίο τα δυο υδροξύλια της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένα με ακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ το ισχυρό σήμα ανήκει σε μόριο φωσφατιδικού οξέος στο οποίο το ένα υδροξύλιο της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένο με ακόρεστο λιπαρό οξύ, ενώ το άλλο είναι εστεροποιημένο με κορεσμένο λιπαρό οξύ. Το παραπάνω προκύπτει από σύγκριση των φασμάτων με αυτών της βιβλιογραφίας και πιο συγκεκριμένα μιας μελέτης για τη συμπεριφορά πρότυπης λεκιθίνης στο φάσμα NMR (Dielh, 2001). Η κορυφή στα 10,5 ppm ήταν άγνωστης προέλευσης, δεν εμφανίστηκε σε άλλο δείγμα και ήταν πιθανότητα ανόργανος φωσφόρος.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 4.4, όπου παρουσιάζεται το φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR των Α.Σ.Σ. ενός δείγματος θολού ελαιολάδου, αυτά περιείχαν επίσης το φωσφατιδικό οξύ σε μεγαλύτερη συγκέντρωση απ' ό,τι τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια.



**Σχήμα 4.4.** Φάσμα 203,2 Hz  $^{31}\text{P}$  NMR του φωσφολιπιδικού κλάσματος των αδιάλυτων σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικών (Α.Σ.Σ.) ενός δείγματος ελαιολάδου.

Η τεχνική NMR έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη φύση των φωσφολιπιδίων του ελαιολάδου παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία απομόνωσης με την υγρή χρωματογραφία στα δείγματα που αναλύθηκαν. Διαπιστώθηκε ότι το ελαιόλαδο περιέχει κυρίως φωσφατιδικό οξύ και σε μικρότερες ποσότητες φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη και λυσο-φωσφατιδικό οξύ. Φωσφατιδυλοϊνσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα δείγματα. Τα ευρήματα, αν και αφορούν σε μικρό αριθμό δειγμάτων, συμφωνούν μόνον εν μέρει με αυτά της βιβλιογραφίας (Alter & Gutfinger 1982; Nomikos *et al.*, 2002; Boukhchina *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007), τα οποία, ωστόσο, δεν συμφωνούν μεταξύ τους. Μεμονωμένα έχει αναφερθεί η παρουσία όλων αυτών των

φωσφολιπιδίων, αλλά σε καμιά περίπτωση δεν ανιχνεύτηκαν και τα τέσσερα φωσφολιπίδια όπως στα δείγματα ελαιολάδου που εξετάστηκαν. Στα δείγματα που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής διαπιστώθηκε ότι το φωσφατιδικό οξύ ήταν το κυρίαρχο φωσφολιπίδιο ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται η φωσφατιδυλοχολίνη (Alter & Gutfinger, 1982), η φωσφατιδυλογλυκερόλη (Boukhchina *et al.*, 2004) ή η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (Jiménez *et al.*, 2007) ως το κυρίαρχο φωσφολιπίδιο.

Συμπερασματικά, η τεχνική NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της σύστασης του φωσφολιπιδικού κλάσματος του ελαιολάδου καθώς έχει καλή διαχωριστική ικανότητα, καλή επαναληψιμότητα και σχετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης παρά το μεγάλο χρόνο ανάλυσης (περίπου δυο με τρεις ώρες για κάθε δείγμα) και φαίνεται να δίνει μια διέξοδο στα αναλυτικά προβλήματα και τις δυσκολίες που παρουσιάζει η υγρή χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης. Επιπλέον, η τεχνική NMR μπορεί να προσφέρει ολοκληρωμένες μελέτες για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιμέρους φωσφολιπιδίων του θολού και διηθημένου ελαιολάδου.

## 4.5. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

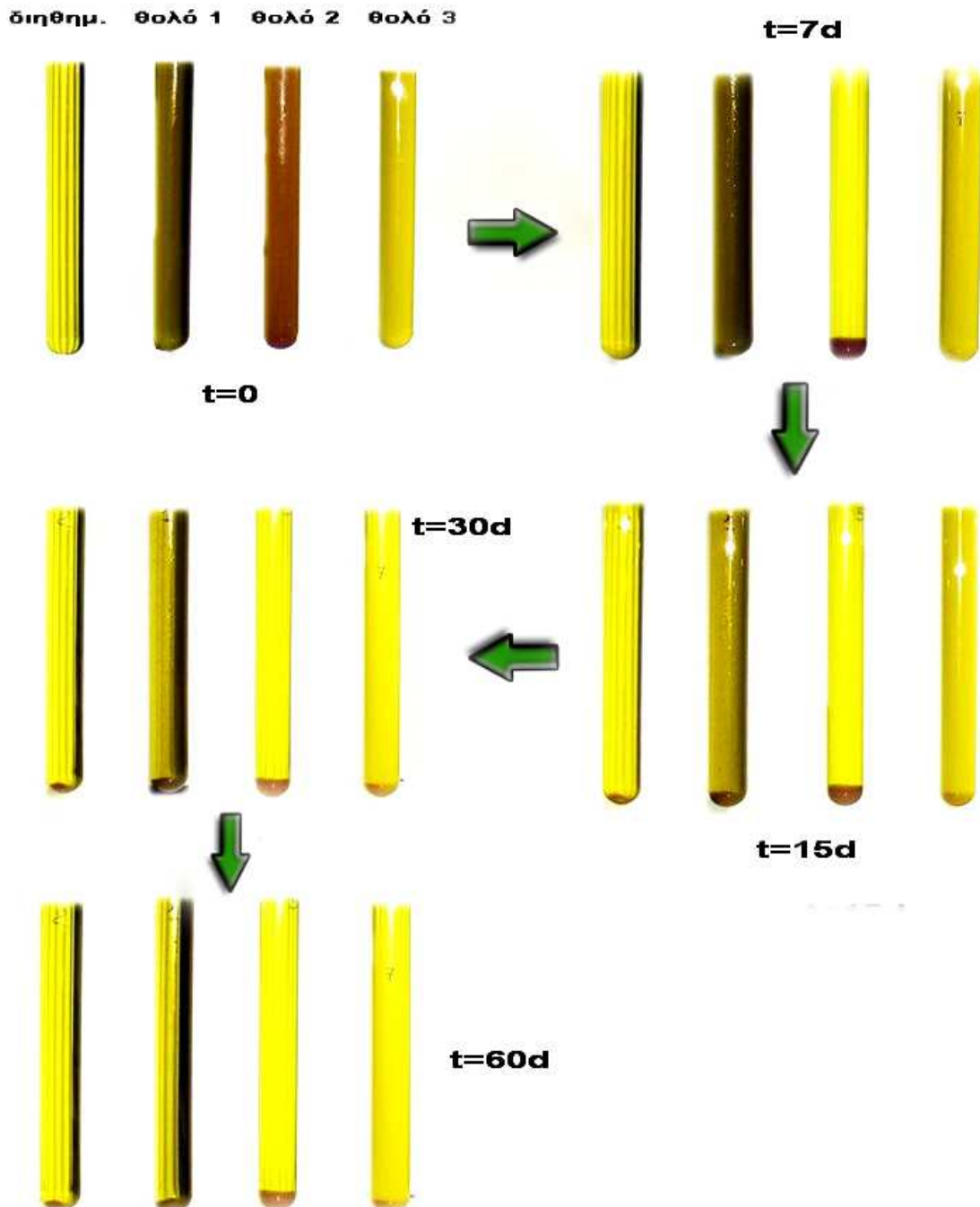
### 4.5.1. ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ

Εννέα δείγματα θολού ελαιολάδου, ένα δείγμα τυποποιημένου ελαιολάδου και ένα δείγμα διηθημένου στο Εργαστήριο θολού ελαιολάδου τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) και παρατηρήθηκε η καθίζηση σε σχέση με το χρόνο. Στον Πίνακα 4.8 αναφέρεται ο χρόνος που απαιτήθηκε για τη διαύγαση των δειγμάτων και παρατίθενται ορισμένα σχόλια για την αρχική κατάσταση των δειγμάτων.

**Πίνακας 4.8.** Χρόνοι διαύγασης δειγμάτων θολού και διηθημένου ελαιολάδου.

<i>ΌΝΟΜΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</i>	<i>ΕΙΔΟΣ</i>	<i>ΔΙΑΥΓΑΣΗ (ημέρες)</i>	<i>ΣΧΟΛΙΑ</i>
Άρτα 1	Θολό	50 – 60	Πολύ θολό
Χαλκιδική 1	Θολό	5 – 10	Λίγο θολό
Χαλκιδική 2	Θολό	60 – 70	Πολύ θολό
Χαλκιδική 3	Θολό	50 – 60	Πολύ θολό
Χαλκιδική 4	Θολό	70 – 90	Πάρα πολύ θολό
Καλαμάτα 1	Θολό	10 – 20	Πολύ θολό
Κρήτη 1	Θολό	5 – 7	Πάρα πολύ θολό
Κρήτη 4	Συσκευασμένο θολό	15 – 20	Λίγο θολό
Κρήτη 6	Ελαιόλαδα	10 – 15	Λίγο θολό
Λέσβος	τυποποιημένα	0	διαυγές
Άρτα 1*	Διηθημένο στο εργαστήριο	0	

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.5, όπου παρουσιάζονται τρία από τα εννέα δείγματα θολού ελαιολάδων, η διαύγαση ήταν σταδιακή από την επιφάνεια προς τον πυθμένα του περιέκτη.



**Εικόνα 4.5.** Φωτογραφίες δειγμάτων ελαιολάδου σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα αποθήκευσης (διηθημένο: «Άρτα 1», θολό 1: «Άρτα 1», θολό 2: «Κρήτη 1», θολό 3: «Καλαμάτα 1»).

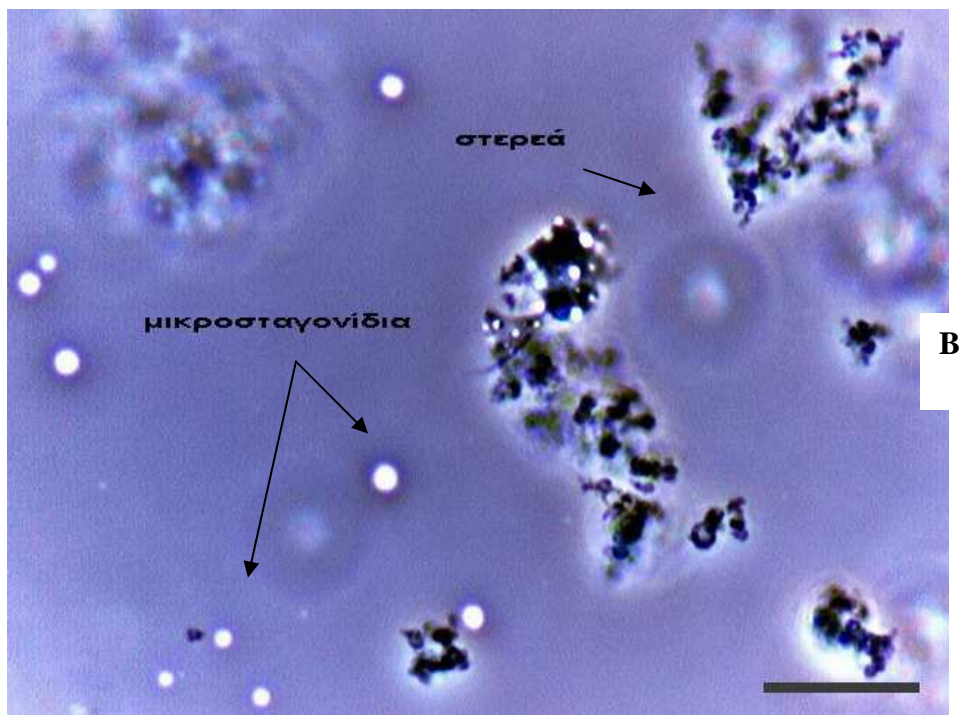
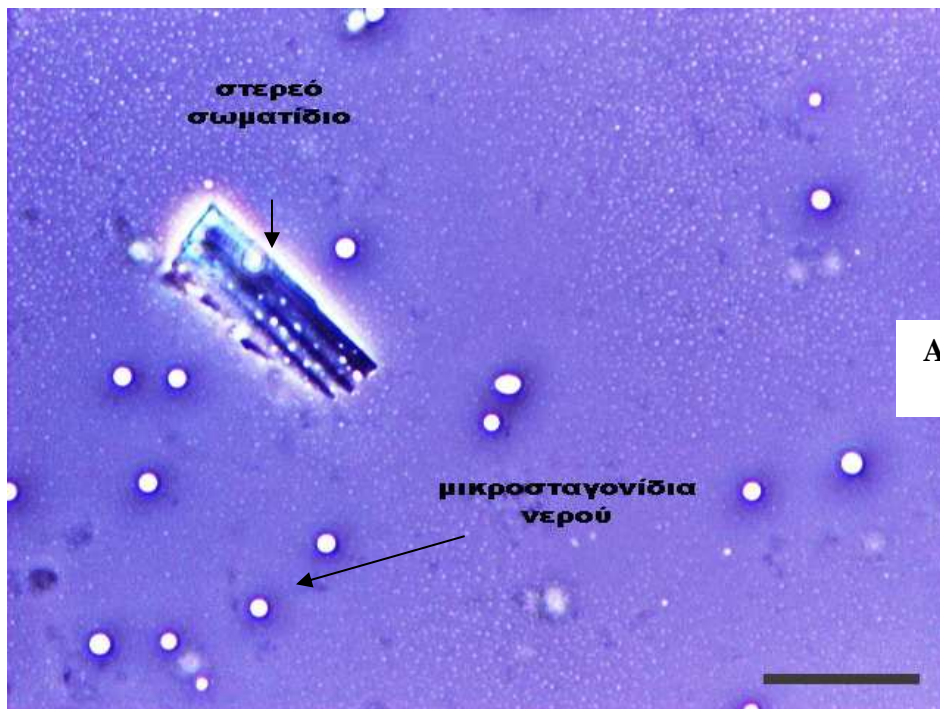
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι χρόνοι διαύγασης ήταν διαφορετικοί από δείγμα σε δείγμα και κυμάνθηκαν από λίγες ημέρες έως αρκετές βδομάδες (Πίνακας 4.8.). Η διακύμανση των χρόνων διαύγασης, ενδέχεται να εξαρτάται από την παραγωγική διαδικασία που εφαρμόστηκε κατά την παραλαβή του ελαιολάδου (είδος και λειτουργία σπαστήρα, θερμοκρασία και χρόνος μάλαξης της ελαιοζύμης, ταχύτητα λειτουργίας φυγοκέντρου).

Από την οπτική παρατήρηση των δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα του στερεού υπολείμματος διαφοροποιούνταν από δείγμα σε δείγμα και ήταν ανάλογο της αρχικής τους θολότητας. Το υπόλειμμα στο πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα (ίζημα) είχε πράσινο χρώμα που μετατρέπονταν σε καστανό όσο επιμηκύνονταν η αποθήκευση. Αυτό, σύμφωνα με το Lercker και τους συνεργάτες του (1994), υποδηλώνει πολυμερισμό των πολικών φαινολών και πιθανή σύζευξη τους με πρωτεΐνες. Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το καστανό χρώμα σχετίζεται με την οξείδωση των χρωστικών του ελαιολάδου, της χλωροφύλλης και της φαιοφυτίνης.

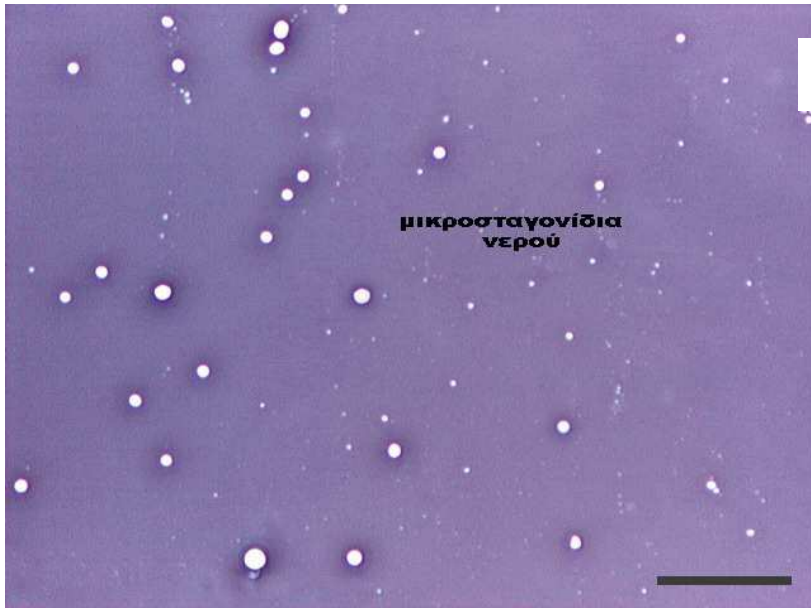
Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο των δειγμάτων θολού ελαιολάδου έδειξε ότι σε όλα τα δείγματα υπήρχαν τόσο μικροσταγονίδια νερού όσο και στερεά σωματίδια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6Α. Παρατηρήθηκαν επίσης αρκετά συσσωματώματα σταγονιδίων νερού και στερεών σωματιδίων (Εικόνα 4.6Β, 4.8Β) που υποδηλώνει πως υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των σωματιδίων ευνοεί τη συγκράτηση μεγαλύτερων ποσοτήτων νερού.

Τα μικροσταγονίδια είχαν διάμετρο 1-2,5  $\mu\text{m}$  και σε κάποιες περιπτώσεις έως 5  $\mu\text{m}$ . (Εικόνα 4.6). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7, η συγκέντρωση των μικροσταγονιδίων αυξάνεται στον πυθμένα του δοχείου αποθήκευσης με την πάροδο του χρόνου παραμονής του ελαίου. Όταν το έλαιο έχει πλέον διαυγάσει (Εικόνα 4.7Γ), τα σταγονίδια νερού έχουν μεταφερθεί ποσοτικά στον πυθμένα και δεν ανιχνεύονται με το μικροσκόπιο στο υπερκείμενο του δείγματος.

Η διάμετρος των σταγονιδίων στον πυθμένα του δοχείου βρέθηκε να είναι ελαφρώς αυξημένη στον πυθμένα του δοχείου επειδή τα σταγονίδια συγχωνεύονται προς μεγαλύτερα σταγονίδια και καθιζάνουν ταχύτερα στην διάρκεια της αποθήκευσης (αλληλεπιδράσεις σταγονιδίου – σταγονιδίου). Για παράδειγμα, η μέση διάμετρος ( $d_{3,2}$ ) τους σε δυο δείγματα θολού ελαιολάδου («Χαλκιδική 2», «Χαλκιδική 3») χωρίς προηγούμενη αποθήκευση ( $t=0$ ) ήταν 2,1  $\mu\text{m}$  και 1,9  $\mu\text{m}$ , αντίστοιχα. Στα διηθημένα έλαια δεν ανιχνεύτηκαν σταγονίδια.

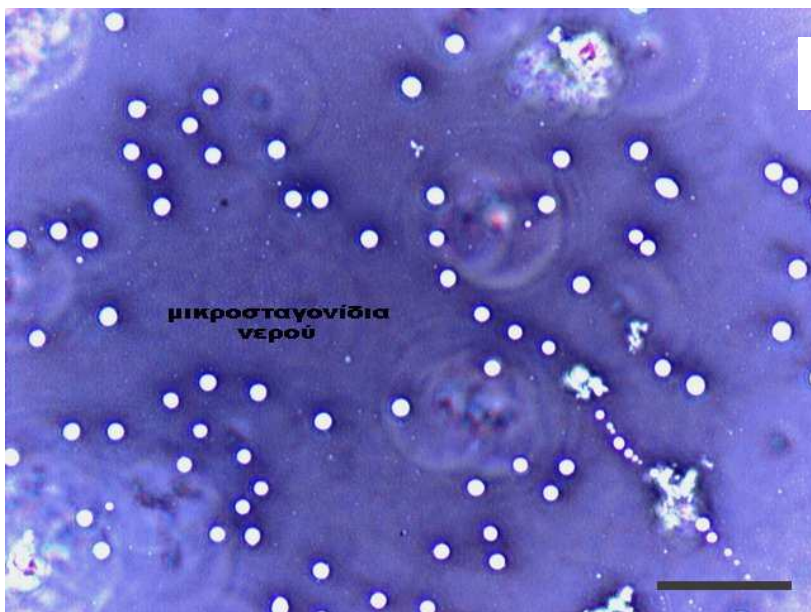


**Εικόνα 4.6.** Φωτογραφίες θολού ελαιολάδου ( $t=0$ ) σε οπτικό μικροσκόπιο 400x. A: δείγμα «Χαλκιδική 4» και B: δείγμα «Άρτα 1» (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10  $\mu\text{m}$ )



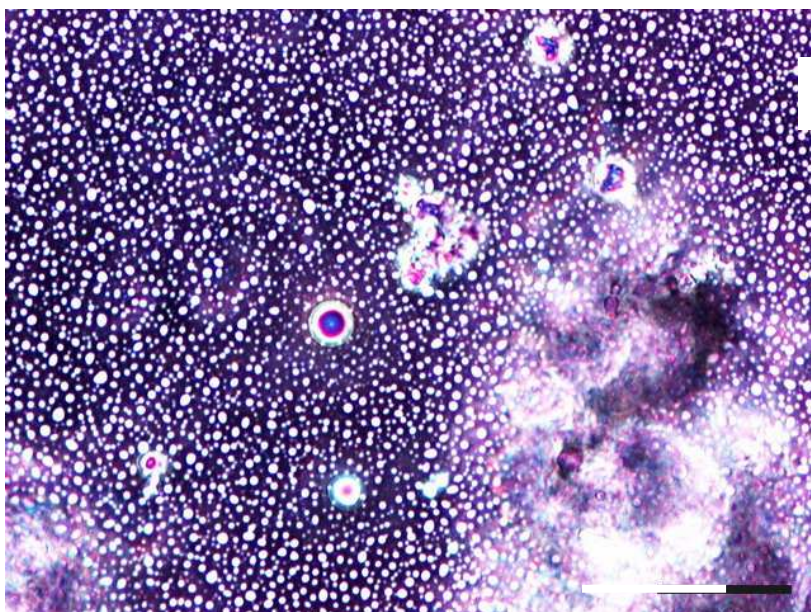
**A**

**Εικόνα 4.7.**  
 Φωτογραφίες του δείγματος θολού ελαιολάδου «Δράμα», με οπτικό μικροσκόπιο (400 x), σε διαφορετικές χρόνους αποθήκευσης (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10 μm).



**B**

**A.** στην αρχική κατάσταση ( $t=0$ )  
**B.** μετά από 10 ημέρες αποθήκευσης  
**Γ.** μετά από 45 ημέρες αποθήκευσης



**Γ**

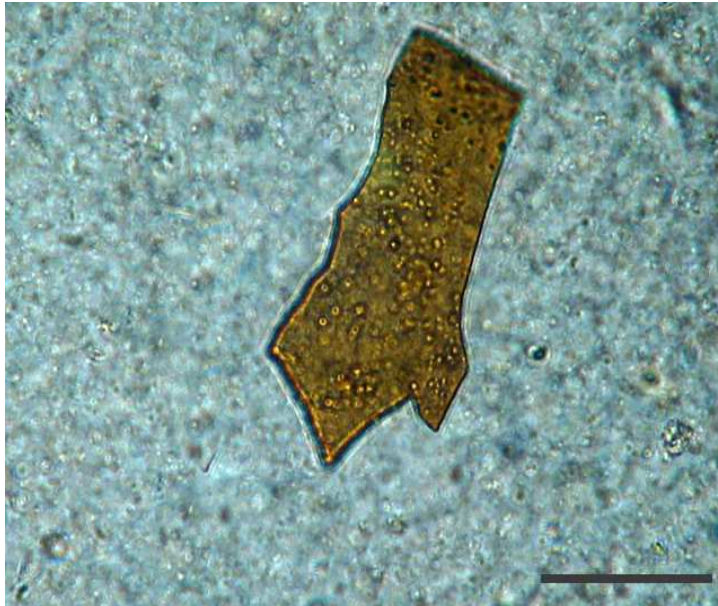
Εφόσον τα μικροσταγονίδια νερού έχουν συγκεκριμένο μέγεθος και βρίσκονται σε διασπορά στην ελαιώδη φάση, το θολό ελαιολάδο μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (water-in-oil emulsion ή w/o) που έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό.

Στον Πίνακα 4.9 δίνονται η περιεκτικότητα σε νερό και η θολερότητα 12 δειγμάτων θολού ελαιολάδου, ενός δείγματος διηθημένου θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» (1<sup>ο</sup> πρότυπο ελέγχου ή μάρτυρας) και ενός εμπορικού δείγματος του ελαιολάδου «Κρήτη 7» (2<sup>ο</sup> πρότυπο). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων θολού ελαιολάδου σε νερό βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,17 έως 0,49 %, ενώ αυτή των προτύπων ήταν αρκετά χαμηλότερη (~0,05 %). Το δείγμα «Κρήτη 1», όπως αναφέρθηκε, είχε ιδιαίτερα χαρακτηριστικά (πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε στερεά συστατικά, πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια) που δικαιολογούν την πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (1,31 %). Η περιεκτικότητα σε νερό διαπιστώθηκε ότι συσχετίζεται με τη θολερότητα ( $r^2 = 0,75$ ). Μεγάλο μέρος του νερού συγκρατείται στον ηθμό κατά τη διήθηση με αποτέλεσμα το διηθημένο έλαιο να είναι διαυγές.

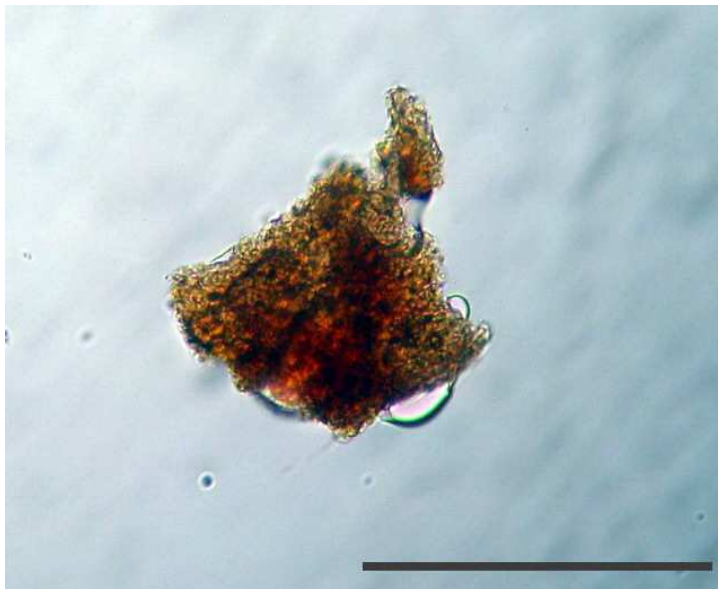
**Πίνακας 4.9.** Περιεκτικότητα σε νερό και θολερότητα δειγμάτων θολού και διαυγασμένου ελαιολάδου.

<i>A/A</i>	<i>ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ</i>	<i>ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΝΕΡΟ (%)</i>	<i>ΘΟΛΕΡΟΤΗΤΑ (NTS)</i>
1	Άρτα 1	0,24	58,2 ± 1,3
2	Άρτα 2	0,33	157,4 ± 8,1
3	Δράμα	0,17	175,7 ± 12,9
4	Χαλκιδική 2	0,15	51,2 ± 3,3
5	Χαλκιδική 3	0,49	82,4 ± 4,9
8	Χαλκιδική 6	0,19	138,4 ± 13,1
9	Χαλκιδική 7	0,16	42,1 ± 6,7
10	Καλαμάτα 1	0,25	180,6 ± 10,1
11	Κρήτη 1	1,31	308,5 ± 13,1
12	Κρήτη 2	0,35	155,5 ± 6,9
13	Άρτα 1*	0,05	<10
14	Κρήτη 7	0,05	<10

Τα στερεά σωματίδια, που απαντούν σε διασπορά στο θολό ελαιόλαδο, καθιζάνουν στη διάρκεια της αποθήκευσης και στο έλαιο που έχει διαυγάσει απαντούν στο ίζημα. Παρατήρηση με τη βοήθεια μικροσκοπίου σε διάφορους χρόνους αποθήκευσης των δειγμάτων θολού ελαιολάδου έδειξε ότι τα σωματίδια έχουν ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος που κυμαίνεται από 2 έως 400  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 4.6 και 4.8).



(A)



(B)

**Εικόνα 4.8.** Φωτογραφίες των στερεών σωματιδίων σε δείγματα θολού ελαιολάδου. (A) πριν την αποθήκευση ( $t=0$ ), (B) μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10  $\mu\text{m}$ ).

Τα στερεά σωματίδια προέρχονται κυρίως από το σάρκωμα της ελιάς και είναι υπολείμματα των κυτταρικών δομών του μεσοκαρπίου που μεταφέρονται στο ελαιόλαδο κατά την παραλαβή του (ατελής φυγοκεντρικός διαχωρισμός). Κατά την αποθήκευση, τα στερεά σωματίδια καταβυθίζονται με τη μορφή συσσωματώματος επειδή έχουν διαφορετικό ειδικό βάρος από αυτό του ελαίου, στον πυθμένα του δοχείου. Στο συσσωμάτωμα εγκλωβίζεται ένα μέρος των μικροσταγονιδίων του νερού (Εικόνα 4.6 και 4.8).

Με βάση τα προαναφερθέντα, το θολό ελαιόλαδο μπορεί να χαρακτηριστεί ως σύστημα διασποράς μικροσταγονιδίων νερού στο έλαιο (γαλάκτωμα) και στερεών σωματιδίων (αιώρημα), εύρημα που συμφωνεί με αυτό των Lercker *et al.* (1994).

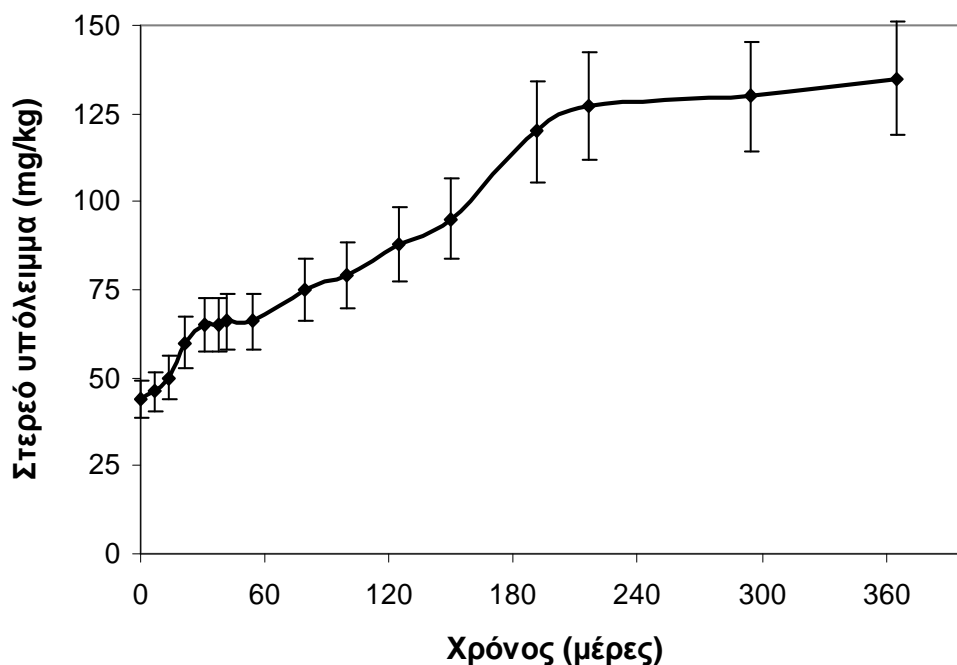
#### 4.5.2. ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ Α.Σ.Σ. ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥΣ

Τα αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα συστατικά (Α.Σ.Σ.) του ελαιολάδου προσδιορίστηκαν με σταθμική μέθοδο σε 10 δείγματα θολού ελαιολάδου που είχε παραληφθεί πρόσφατα ( $t=0$ ). Τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε g /100 g ελαίου δίνονται στον Πίνακα 4.10. Με εξαίρεση το δείγμα «Κρήτη 1» η περιεκτικότητα των υπόλοιπων δειγμάτων σε Α.Σ.Σ. βρέθηκε να κυμαίνεται από 10 μέχρι 460 mg/kg ελαίου.

**Πίνακας 4.10.** Περιεκτικότητα δειγμάτων θολού ελαιολάδου σε Α.Σ.Σ.

A/A	ΔΕΙΓΜΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	Α.Σ.Σ. (σε g /100 g ελαίου)
1	Χαλκιδική 2	0,004
2	Χαλκιδική 3	0,004
3	Χαλκιδική 4	0,046
4	Χαλκιδική 6	0,001
5	Χαλκιδική 7	0,001
6	Δράμα	0,030
7	Κρήτη 1	0,190
8	Κρήτη 6	0,024
9	Καλαμάτα 1	0,012
10	Άρτα 1	0,004
11	Άρτα 2	0,003

Η μεταβολή της περιεκτικότητας σε Α.Σ.Σ. δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» στη διάρκεια ετήσιας αποθήκευσης φαίνεται στο Σχήμα 4.5.

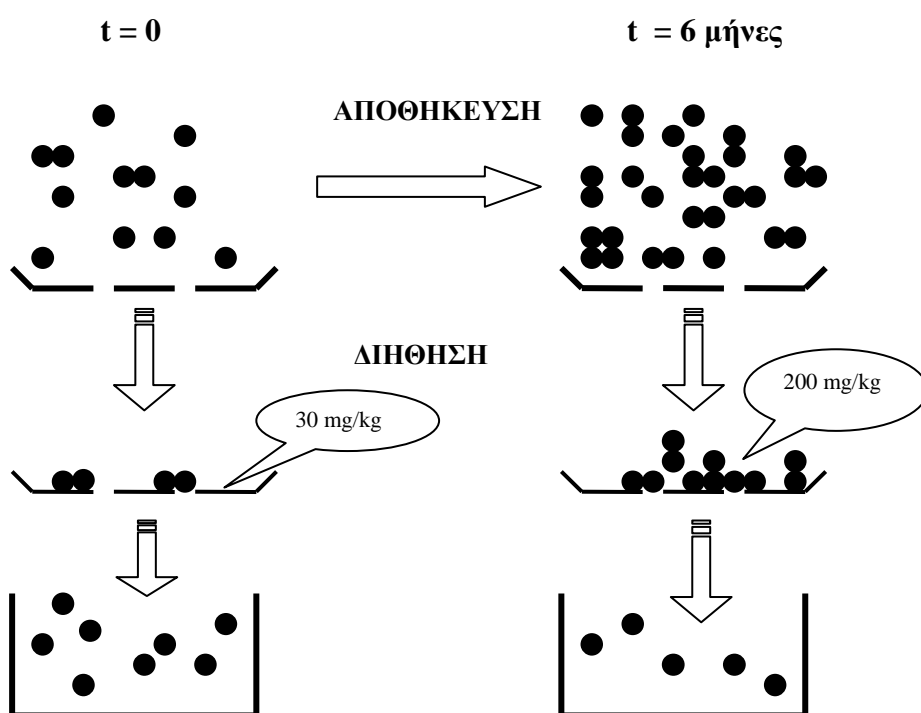


**Σχήμα 4.5.** Μεταβολή της περιεκτικότητας σε Α.Σ.Σ. δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 1» στη διάρκεια ετήσιας αποθήκευσής του (οι κάθετες γραμμές αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση της κάθε μέτρησης).

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η συγκέντρωση των Α.Σ.Σ. αυξάνεται στη διάρκεια της αποθήκευσης. Η τάση αυτή υποδηλώνει ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ σταγονιδίων νερού και στερεών σωματιδίων κάτι το οποίο είχε διαπιστωθεί και κατά την εξέταση στο μικροσκόπιο (Εικόνα 4.6B, 4.8B). Η φαινομενική αύξηση της συγκέντρωσης που παρατηρείται οφείλεται στη συνεχή αύξηση του μεγέθους των στερεών συσσωματωμάτων στη διάρκεια της αποθήκευσης σε σχέση με τους πόρους του ηθμού που το ελαιόλαδο διηθείται. Η εξήγηση του φαινομένου δίνεται στο Σχήμα 4.6. Ο πόροι του ηθμού Whatman Grade 1 έχουν διάμετρο 11  $\mu\text{m}$  (Whatman, Poole, UK) και έτσι επιτρέπουν μόνο τη διόδο των σωματιδίων που έχουν μικρότερη διάμετρο. Τέτοια σωματίδια, όπως παρατηρήθηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου, υπάρχουν στο θολό ελαιόλαδο από την αρχή της αποθήκευσης του. Όσο η αποθήκευση επιμηκώνεται, τα στερεά συγκεντρώνονται στον πυθμένα του δοχείου και το έλαιο διαυγάζεται. Έτσι, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα

και λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων του νερού και μεταξύ των σταγονιδίων του νερού και των στερεών σωματιδίων, ένα ολόενα και αυξανόμενο ποσοστό των συσσωματωμάτων αποκτά μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό των πόρων του ηθμού (11  $\mu\text{m}$ ) και κατακρατείται.

Στη βιομηχανία, χρησιμοποιούνται ηθμοί με μεγαλύτερη διάμετρο πόρων (30-40  $\mu\text{m}$ ) με αποτέλεσμα σε ορισμένες περιπτώσεις όπου το έλαιο να θολώνει μετά την εμφιάλωση. Πρακτικώς αυτό σημαίνει ότι απαιτείται επαρκής χρόνος «ωρίμανσης» μέσα στις δεξαμενές αποθήκευσης για να είναι επιτυχής η διαύγαση με κατακάθιση.



**Σχήμα 4.6.** Προτεινόμενο μοντέλο για την εξήγηση της αύξησης της συγκέντρωσης των Α.Σ.Σ. στη διάρκεια της αποθήκευσης θολού ελαιολάδου.

Η σύσταση των αδιάλυτων σε πετρελαϊκού αιθέρα συστατικών του στερεού υπολείμματος (Α.Σ.Σ.) που απομονώθηκαν από ένα δείγμα «μούργας ελαιολάδου» δίνεται στον Πίνακα 4.11. Τα Α.Σ.Σ., κατά σειρά φθίνουσας περιεκτικότητας, ήταν: αναφομοίωτα συστατικά, σάκχαρα, φωσφολιπίδια, πολικές φαινόλες, ανόργανες ύλες (κυρίως μέταλλα) και πρωτεΐνες σε ίχνη. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές μέθοδοι γι' αυτό τα αποτελέσματα δεν είναι απολύτως ακριβή. Για

παράδειγμα, η περιεκτικότητα σε πολικές φαινόλες όπως προσδιορίζεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu μπορεί να είναι μικρότερη από την αναγραφόμενη στον Πίνακα 4.11 λόγω της παρουσίας στο δείγμα αναγόντων σακχάρων (Singleton *et al.*, 1999).

**Πίνακας 4.11.** Χημική σύσταση των Α.Σ.Σ. που παραλήφθηκαν από δείγμα «μούργας» ελαιολάδου.

<b>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</b>	<b>ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΕ</b>	<b>g/100 g Α.Σ.Σ. (%)</b>
<b>Σάκχαρα</b>	Φαινόλης – θεϊκού οξέος	15,0 ± 0.8
<b>Φωσφολιπίδια</b> (αδιάλυτα σε πετρελαικό αιθέρα)	Χρωματομετρική (μέσω του φωσφόρου)	12,5 ± 0.5
<b>Ανόργανες Ύλες</b>	Σταθμική (προσδιορισμός τέφρας)	5,3 ± 0.1
<b>Πολικές φαινόλες</b>	Folin-Ciocalteu	4,7 ± 0.1
<b>Πρωτεΐνες</b>	Bradford	0,1 ± 0.0
<b>Ακατέργαστες ίνες</b>	Weender	2,5 ± 0,2
<b>Άλλα συστατικά</b> (κυρίως αναφομοίωτα συστατικά )	Από υπολογισμούς (βλ. κείμενο)	~62,5

Ο ελαιοκαρπος αποτελείται, κατά προσέγγιση (βλ. παρ. 1.6.1) από νερό (65 %), έλαιο (20 %) και άλλα συστατικά (15 %) εκ των οποίων 40-50 % είναι αναφομοίωτα συστατικά. Στα συστατικά αυτά περιλαμβάνονται επίσης και σάκχαρα, πολικές φαινόλες, ανόργανες ύλες και πρωτεΐνες. Κατά την παραλαβή του ελαιολάδου μικρό μέρος των συστατικών αυτών διαλύεται στο νερό που περιέχεται στο θολό ελαιολάδο πρόσφατης έκθλιψης και αποτελεί τα Α.Σ.Σ. του ελαιολάδου. Η συγκέντρωση των ακατέργαστων ινών των Α.Σ.Σ. του δείγματος βρέθηκε να είναι πολύ χαμηλή (~2,5 %) επειδή στις ακατέργαστες ίνες, εξ' ορισμού, δεν περιλαμβάνονται όλοι οι αναφομοίωτοι πολυσακχαρίτες, η λιγνίνη και άλλες συγγενείς ουσίες που αποτελούν τα αναφομοίωτα συστατικά. Για το λόγο αυτό, τα λοιπά συστατικά του Πίνακα 4.11 θεωρείται ότι είναι αναφομοίωτα συστατικά.

Από φυσικοχημική άποψη, η περιεκτικότητα του θολού και του διηθημένου ελαιολάδου σε πρωτεΐνες είναι χαμηλή έως πολύ χαμηλή. Επομένως προκύπτει το

ερώτημα κατά πόσο οι πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη φυσικοχημική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου. Η αναλογία γαλακτωματοποιητή (πρωτεΐνη) προς υδατική φάση (νερό) στο δείγμα θολού ελαιολάδου «Κρήτη 2» είναι 1:1000 (2,5 mg/kg περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και 0,25 % περιεκτικότητα σε νερό). Αν ληφθεί υπόψη ότι το μέσο μέγεθος σταγονιδίων  $d_{3,2}$  είναι περίπου 2  $\mu\text{m}$  στο συγκεκριμένο δείγμα (παρατήρηση στο μικροσκόπιο) τότε η συνολική επιφάνεια  $S_T$  των 100 g γαλακτώματος είναι 1  $\text{m}^2$  (Walstra, 1983).

*ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ:*  $S_T = (\text{mL νερού σε 100 g γαλακτώματος}) \times (6 / d_{3,2})$

Στη βιβλιογραφία γίνεται δεκτό ότι για να σταθεροποιηθούν τα σταγονίδια του νερού από τις πρωτεΐνες, η συγκέντρωση των τελευταίων πρέπει να είναι τουλάχιστον 1 ή 2  $\text{mg}/\text{m}^2$  (Dickinson & Parkinson, 2004). Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι πολύ χαμηλή και υπολογίζεται ότι η θεωρητική ποσότητα της πρωτεΐνης ανά μονάδα επιφάνειας (σ. κάλυψη) των σταγονιδίων του νερού ανέρχεται μόλις σε 0,25  $\text{mg}/\text{m}^2$ . Η τιμή αυτή μπορεί να είναι ακόμη μικρότερη αφού η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών δεν απαντά μόνο στο γαλάκτωμα (όπως θεωρείται στον υπολογισμό), καθώς ένα κλάσμα της περιέχεται στα Α.Σ.Σ.

Γενικά, οι πρωτεΐνες, ενώ είναι ισχυροί γαλακτωματοποιητές όταν απαντούν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις στα γαλακτώματα ελαίου σε νερό (o/w), δεν αναμένεται να έχουν σημαντική δράση στα θολά ελαιολάδα (γαλακτώματα νερού σε έλαιο ή w/o). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, λόγω της φύσης τους (μορφές μερικώς διαλυτές στο έλαιο), θα μπορούσαν να έχουν κάποια μικρή συνεισφορά στη φυσικοχημική σταθερότητα. Ωστόσο, η πολύ μικρή ποσότητα στην οποία απαντούν και η περιορισμένη δυνατότητα τους να καλύψουν πλήρως την επιφάνεια των σταγονιδίων, περιορίζει κατά πολύ την όποια συνεισφορά τους.

#### **4.5.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΘΟΛΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

Προκειμένου να διευκρινισθεί ο ρόλος της συγκέντρωσης του νερού, των αδιάλυτων σε πετρελαϊκό αιθέρα στερεών συστατικών (Α.Σ.Σ.) και των φωσφολιπιδίων (ως ήσσονα συστατικά με γαλακτωματοποιητική δράση) στη φυσικοχημική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν μοντέλα θολού ελαιολάδου με τη μορφή γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο. Παρασκευάστηκαν 12 διαφορετικά γαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o) που περιείχαν νερό (0,25 %, 0,50 %, 1 % και 2 %), Α.Σ.Σ. (40 και 120  $\text{mg}/\text{kg}$  ελαίου) και φωσφατιδυλοχολίνη (50 και 150  $\text{mg}/\text{kg}$ ).

**Πίνακας 4.12.** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πρότυπων γαλακτωμάτων με ή χωρίς προσθήκη Α.Σ.Σ.

A/A	ΝΕΡΟ (%)	Α.Σ.Σ. (mg/kg)	ΜΕΣΗ ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ $d_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )	ΠΛΗΡΗΣ ΔΙΑΥΓΑΣΗ (ημέρες)
<i>1<sup>η</sup> σειρά : Γαλακτώματα χωρίς προσθήκη Α.Σ.Σ.</i>				
<b>1</b>	2,00	-	2,25	$10 \pm 2^a$
<b>2</b>	1,00	-	1,60	$45 \pm 7^b$
<b>3</b>	0,50	-	1,27	$60 \pm 8^c$
<b>4</b>	0,25	-	1,25	$25 \pm 5^d$
<i>2<sup>η</sup> σειρά: Γαλακτώματα με προσθήκη Α.Σ.Σ</i>				
<b>5</b>	0,25	40	1,16	$60 \pm 6^a$
<b>6</b>	0,25	120	Δεν προσδιορίστηκε	$70 \pm 8^a$
<b>7</b>	0,50	40	1,31	$85 \pm 9^a$
<b>8</b>	0,50	120	1,24	$120 \pm 10^b$
<b>9</b>	0,50	-	1,63	$65 \pm 10^a$
<b>10</b>	0,25	-	1,17	$30 \pm 5^c$

Οι κοινοί εκθέτες αναφέρονται σε δείγματα που δεν διαφέρουν σημαντικά ως προς τη φυσικοχημική τους σταθερότητα. Επίπεδο σημαντικότητας 95 %.

Στην πρώτη σειρά γαλακτωμάτων, που δεν περιείχε Α.Σ.Σ., η χρήση ομογενοποιητή ήταν ικανή για να δημιουργηθεί και να συντηρηθεί ένα γαλάκτωμα ακόμη και χωρίς προσθήκη κάποιου γαλακτωματοποιητή (Πίνακας 4.12 - **1<sup>η</sup> σειρά**). Αυτό γίνεται επειδή το ελαιόλαδο έχει από τη φύση του υψηλό ιξώδες ενώ περιέχει ως ήσσονα συστατικά λιποδιαλυτούς γαλακτωματοποιητές όπως μονο- και διγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και γαλακτοζυλογλυκερίδια (Kiosseoglou & Kouzounas, 1993; Bianco *et al.*, 1998). Το φυσικοχημικά σταθερότερο γαλάκτωμα που παρασκευάστηκε ήταν αυτό που περιείχε 0,50 % ποσοστό νερό πιθανότατα γιατί αυτό είχε τα μικροσταγονίδια νερού με το κατάλληλο μέγεθος που ενσωματώθηκαν καλύτερα στην λιπαρή φάση. Η διαφορά στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων που περιείχαν 0,50 % και 0,25 % νερό βρέθηκε στατιστικώς σημαντική. Είναι γνωστό ότι όσο μικρότερα είναι τα σταγονίδια νερού ενός γαλακτώματος τόσο βραδύτερη είναι η καθίζησή τους στον πυθμένα του δοχείου αποθήκευσης. Το γαλάκτωμα που περιείχε 0,25 % νερό, παρόλο που είχε  $d_{3,2}$

παρόμοια με αυτή του γαλακτώματος που περιείχε 0,50 % νερό, δεν είχε ανάλογη φυσικοχημική σταθερότητα.

Στην δεύτερη σειρά γαλακτωμάτων (Πίνακας 4.12 – **2<sup>η</sup> σειρά**) μελετήθηκε η επίδραση των Α.Σ.Σ. στη σταθερότητα των γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο. Τα Α.Σ.Σ. προστέθηκαν στα γαλακτώματα σε ρεαλιστικές συγκεντρώσεις (βλ. Πίνακα 4.9). Βρέθηκε ότι η προσθήκη Α.Σ.Σ. συμβάλλει σε σημαντική αύξηση ( $p < 0,05$ ) της σταθερότητας, καθώς επιμηκύνεται ο αναγκαίος χρόνος για τη διαύγαση, σε σχέση με αυτή των προτύπων γαλακτωμάτων ελέγχου. Ειδικότερα, η προσθήκη Α.Σ.Σ. σε υψηλή συγκέντρωση (120 mg/kg) στο γαλάκτωμα που περιείχε 0,50 % νερό είχε ως αποτέλεσμα να παραμείνει θολό για πολύ περισσότερο χρόνο από κάθε άλλο γαλάκτωμα. Μια εξήγηση είναι ότι τα Α.Σ.Σ. ενισχύουν τη σταθερότητα επειδή περιέχουν γαλακτωματοποιητές (φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες), όπως έχει ήδη αναφερθεί.

**Πίνακας 4.13.** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρότυπων γαλακτωμάτων με ή χωρίς προσθήκη πρότυπης φωσφατιδυλοχολίνης (PC).

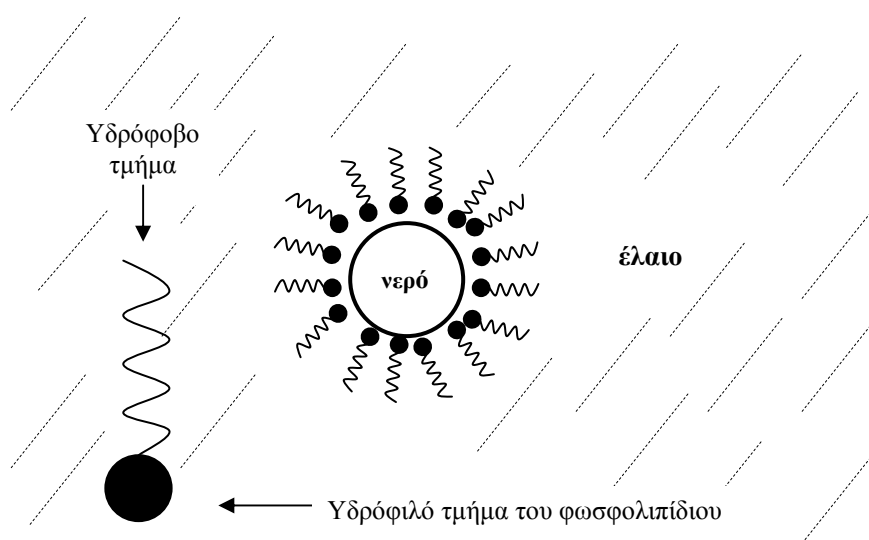
A/A	ΝΕΡΟ (%)	ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟ-ΧΟΛΙΝΗΣ (mg/kg)	ΜΕΣΗ ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ $d_{3,2}$ (μm)	ΠΛΗΡΗΣ ΔΙΑΥΓΑΣΗ (ημέρες)
<i>3<sup>η</sup> σειρά – Γαλακτώματα με προσθήκη φωσφατιδυλοχολίνης</i>				
1	0,25	40	1,24	35 ± 2 <sup>c</sup>
2	0,25	150	-	Διαυγές
3	0,50	40	1,25	65 ± 5 <sup>a</sup>
4	0,50	150	-	Διαυγές
5	0,50	-	1,27	60 ± 6 <sup>a</sup>
6	0,25	-	1,25	25 ± 5 <sup>c</sup>

Οι κοινοί εκθέτες αναφέρονται σε δείγματα που δεν διαφέρουν σημαντικά ως προς τη φυσικοχημική τους σταθερότητα. Επίπεδο σημαντικότητας 95 %.

Τα πρότυπα γαλακτώματα προσεγγίζουν περισσότερο ένα δείγμα θολού ελαιολάδου αν προστεθεί σε αυτά εκτός από ποσότητα Α.Σ.Σ. και ποσότητα φωσφολιπιδίων δεδομένου ότι τα τελευταία απαντούν τόσο στο ελαιόλαδο όσο και στα Α.Σ.Σ. Στον Πίνακα 4.13 αναφέρονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μιας **τρίτης**

**σειράς** γαλακτωμάτων τα οποία περιείχαν φωσφατιδυλοχολίνη. Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι καλός γαλακτωματοποιητής και αποτελεί συστατικό του φωσφολιπιδικού τμήματος του ελαιολάδου (Alter & Gutfinger, 1982; Boukchina *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007).

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ότι η προσθήκη της φωσφατιδυλοχολίνης δεν επιδρά ούτε θετικά ούτε αρνητικά στην φυσικοχημική σταθερότητα των γαλακτωμάτων (στατιστικώς μη σημαντική διαφορά,  $p < 0,05$ ). Αυτό εξηγείται από τη μικρή διαφορά στο μέσο μέγεθος  $d_{3,2}$  του γαλακτώματος που περιέχει φωσφολιπίδια σε σχέση με αυτό του μάρτυρα (Πίνακας 4.13). Μάλιστα, όταν προστέθηκε η φωσφατιδυλοχολίνη σε συγκέντρωση 150 mg/kg στο γαλάκτωμα, προκάλεσε σε δυο περιπτώσεις την πλήρη διαύγασή τους (τρεις επαναλήψεις). Μετά από παρατήρηση του γαλακτώματος στο μικροσκόπιο, βρέθηκε ότι αυτό δεν περιείχε σταγονίδια νερού. Αυτό που προφανώς συνέβη ήταν ότι η διάμετρος των σταγονιδίων μειώθηκε τόσο όταν προστέθηκε η φωσφατιδυλοχολίνη που το νερό διαλυτοποιήθηκε στο εσωτερικό των μυκήλιων. Τα μυκήλια αυτά ονομάζονται «αντίστροφα μυκήλια» (Dickinson & McClements, 1996), δεν είναι σε θέση να σκεδάσουν το φως και για το λόγο αυτό τα γαλακτώματα που προκύπτουν δεν είναι θολά (Σχήμα 4.7). Παρόμοια φαινόμενα διαύγασης με την προσθήκη γαλακτωματοποιητή σε γαλακτώματα νερού σε έλαιο έχουν αναφερθεί πρόσφατα και από άλλους ερευνητές (Ambrosone *et al.*, 2006a; Ambrosone *et al.*, 2006b).



**Σχήμα 4.7.** Τα αντίστροφα μυκήλια (reversed micelles) στα γαλακτώματα νερού σε έλαιο.

Τα παραπάνω πρέπει να αποδοθούν στην ιδιομορφία του γαλακτώματος (πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό), η οποία δεν επιτρέπει μια περαιτέρω ενίσχυση της γαλακτωματοποιητικής ικανότητας των φωσφολιπιδίων.

Το θολό ελαιόλαδο φαίνεται να είναι, με βάση τα προαναφερθέντα, ένα σύστημα διασποράς στερεών σωματιδίων και σταγονιδίων νερού στο έλαιο που εν μέρει απαντούν σε συσσωματωμένη μορφή, μια ιδιαίτερη φυσικοχημική κατάσταση. Το νερό διαχωρίζεται σταδιακά από το έλαιο και εγκλωβίζεται λόγω αλληλεπιδράσεων, στα περισσότερο υδρόφιλα και σαφώς μεγαλύτερα με μέγεθος, στερεά σωματίδια του ελαιόκαρπου που σχηματίζουν το αιώρημα. Το σύστημα αυτό, λόγω της βαρύτητας, καθιζάνει με την πάροδο του χρόνου. Το αιώρημα περιέχει ουσίες που μπορούν να παίξουν το ρόλο του γαλακτωματοποιητή και να σταθεροποιήσουν για περισσότερο χρόνο το γαλάκτωμα αυτό που δημιουργείται κατά την παραλαβή του ελαιολάδου από την συνύπαρξη των δυο φάσεων (νερού και ελαίου). Εκτός των συστατικών αυτών, το ελαιόλαδο έχει σε διαλυτές μορφές και άλλες ουσίες (μονο- και διγλυκερίδια, γαλακτόζυλο παράγωγα, διαλυτά φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες) που είναι ικανά από μόνα τους να σταθεροποιήσουν το γαλάκτωμα.

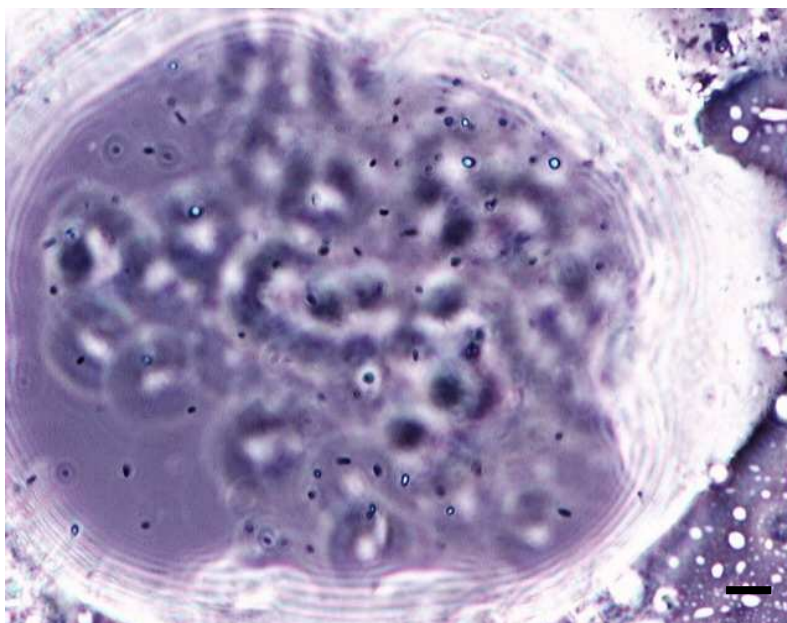
Όσον αφορά στην επίδραση που έχει η φυσικοχημική κατάσταση στην οξειδωτική σταθερότητα, αυτή δεν μελετήθηκε λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης του νερού. Στη βιβλιογραφία (Ambrosone et al. 2002; Ambrosone *et al.*, 2006a; Ambrosone *et al.*, 2006b) αναφέρεται κάποια θετική επίδραση αλλά αφορά σε συνθήκες που δεν είναι ρεαλιστικές (πρότυπο γαλάκτωμα που περιέχει 3 % νερό).

## **4.6. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΟ ΘΟΛΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ**

### **4.6.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ**

Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική εξέταση ήταν τα θολά ελαιόλαδα «Χαλκιδική 1», «Χαλκιδική 2», «Άρτα 2», «Δράμα» καθώς και ένα εμπορικό δείγμα συσκευασμένου ελαιολάδου (βλ. υλικά και μέθοδοι). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων αυτών σε νερό δεν ξεπέρασε το 0,50 % (Πίνακας 4.10). Η παρουσία, ωστόσο, του νερού στα επίπεδα αυτά επαρκεί για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που τυχόν υπάρχουν, με την προϋπόθεση ότι η τιμή της ενεργότητας νερού δεν είναι χαμηλότερη από 0,65. Η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ) μετρήθηκε σε προγενέστερα δείγματα σε ερευνητικό κέντρο του εξωτερικού και βρέθηκε μεταξύ 0,7

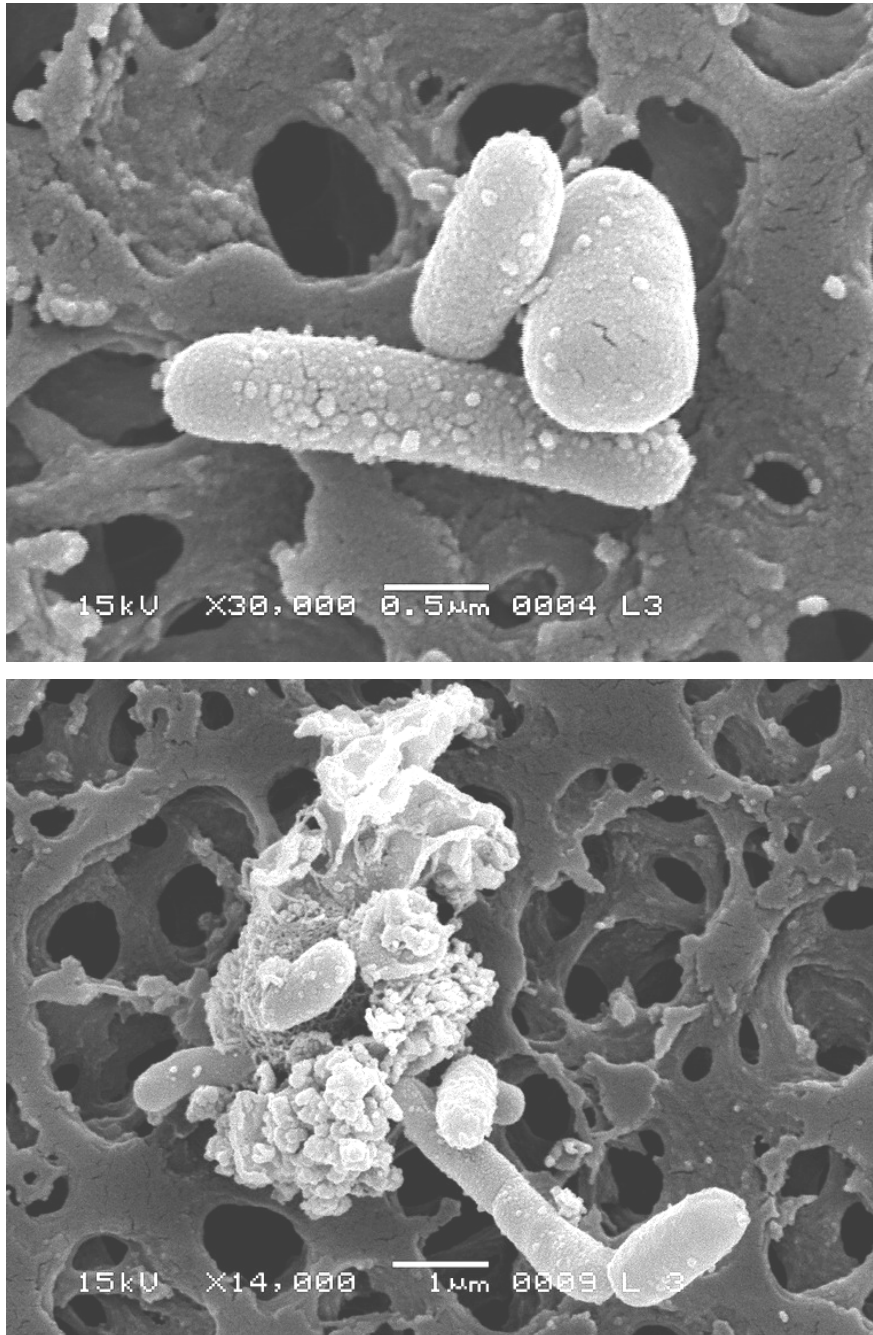
έως 0,8. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε ανάλογες τιμές  $a_w$  μπορούν να αναπτυχθούν ορισμένα είδη βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μυκήτων (Jay, 2000). Πάντως η μέτρηση της ενεργότητας νερού σε λιπαρές ύλες όπως το βούτυρο και το ελαιόλαδο, δεν είναι ακριβής (APHA, 1992; Decacon, 2006).



**Εικόνα 4.9.** Φωτογραφία καταβυθισμένου (μετά από αποθήκευση 30 ημερών) δείγματος θολού ελαιολάδου «Άρτα 2» σε οπτικό μικροσκόπιο (400x) από περιοχή πλησίον του πυθμένα του δοχείου όπου η συγκέντρωση νερού είναι υψηλή (η γραμμή στο κάτω μέρος των φωτογραφιών αντιστοιχεί σε 10  $\mu\text{m}$ ).

Ο έλεγχος με οπτικό μικροσκόπιο των δειγμάτων θολού ελαιολάδου, επιβεβαίωσε την παρουσία σ' αυτά μικροοργανισμών. Στο δείγμα «Άρτα 2» μετά από αποθήκευσή του για 15, 30 ή περισσότερες ημέρες, παρατηρήθηκαν μικροοργανισμοί πλησίον του πυθμένα των δοχείων. Οι μικροοργανισμοί βρίσκονταν σε περιοχές όπου απαντούσαν μεγάλα σταγονίδια νερού (Εικόνα 4.9) και παρουσίαζαν κινητικότητα. Η παραπάνω οπτική παρατήρηση ήταν μια πρώτη απόδειξη, ότι στο ελαιόλαδο μπορούν να επιβιώσουν μικροοργανισμοί. Λόγω της μορφολογίας τους (μέγεθος  $\sim 1 \mu\text{m}$ , ραβδοειδής μορφή), οι μικροοργανισμοί αυτοί έμοιαζαν με βακτήρια. Όταν το ίδιο δείγμα («Άρτα 2») υποβλήθηκε σε ειδικού τύπου ξήρανση (CPD, βλ. παρ. 3.3.8.1.) και

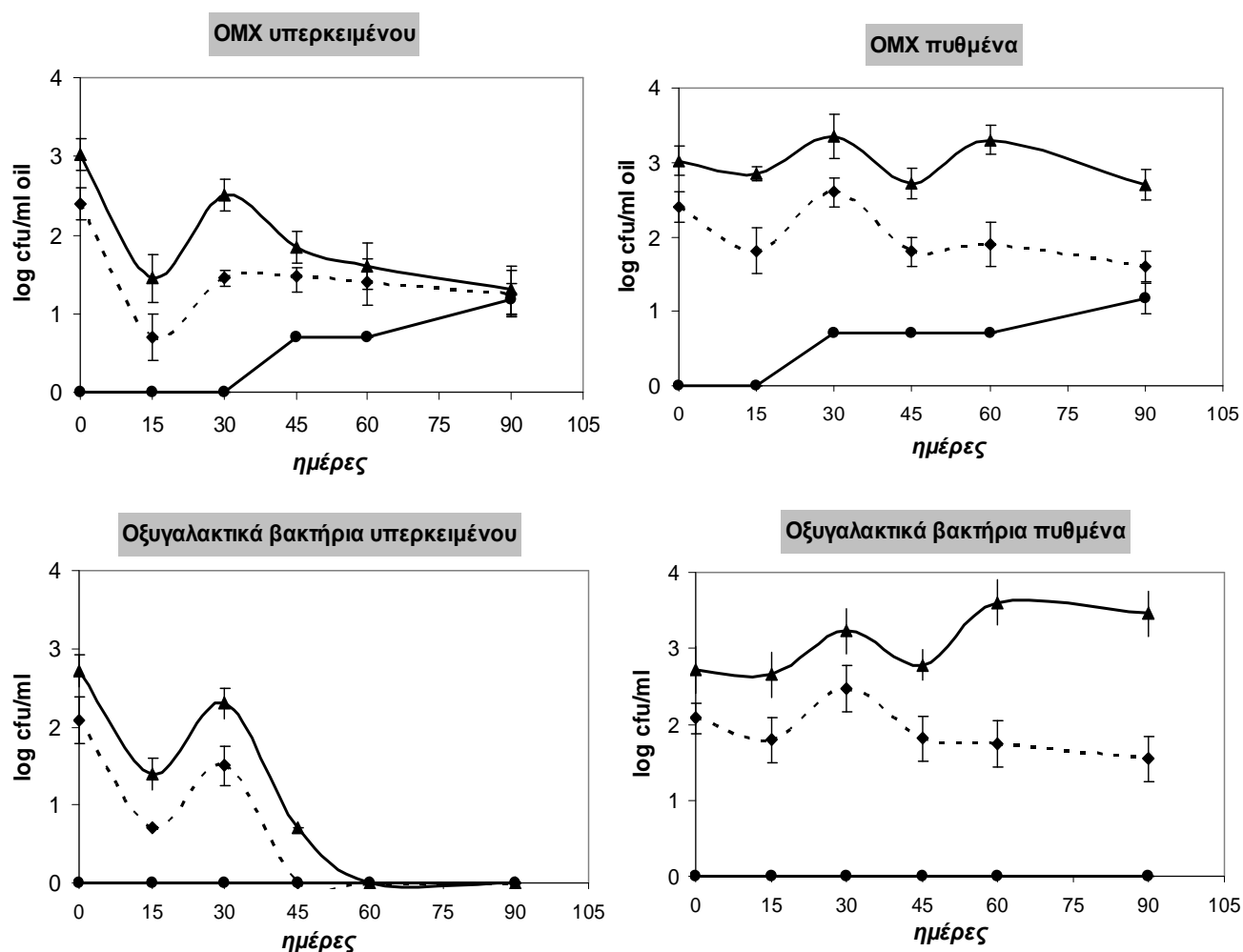
εξετάστηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Εικόνα 4.10) επιβεβαιώθηκε η παραπάνω παρατήρηση.



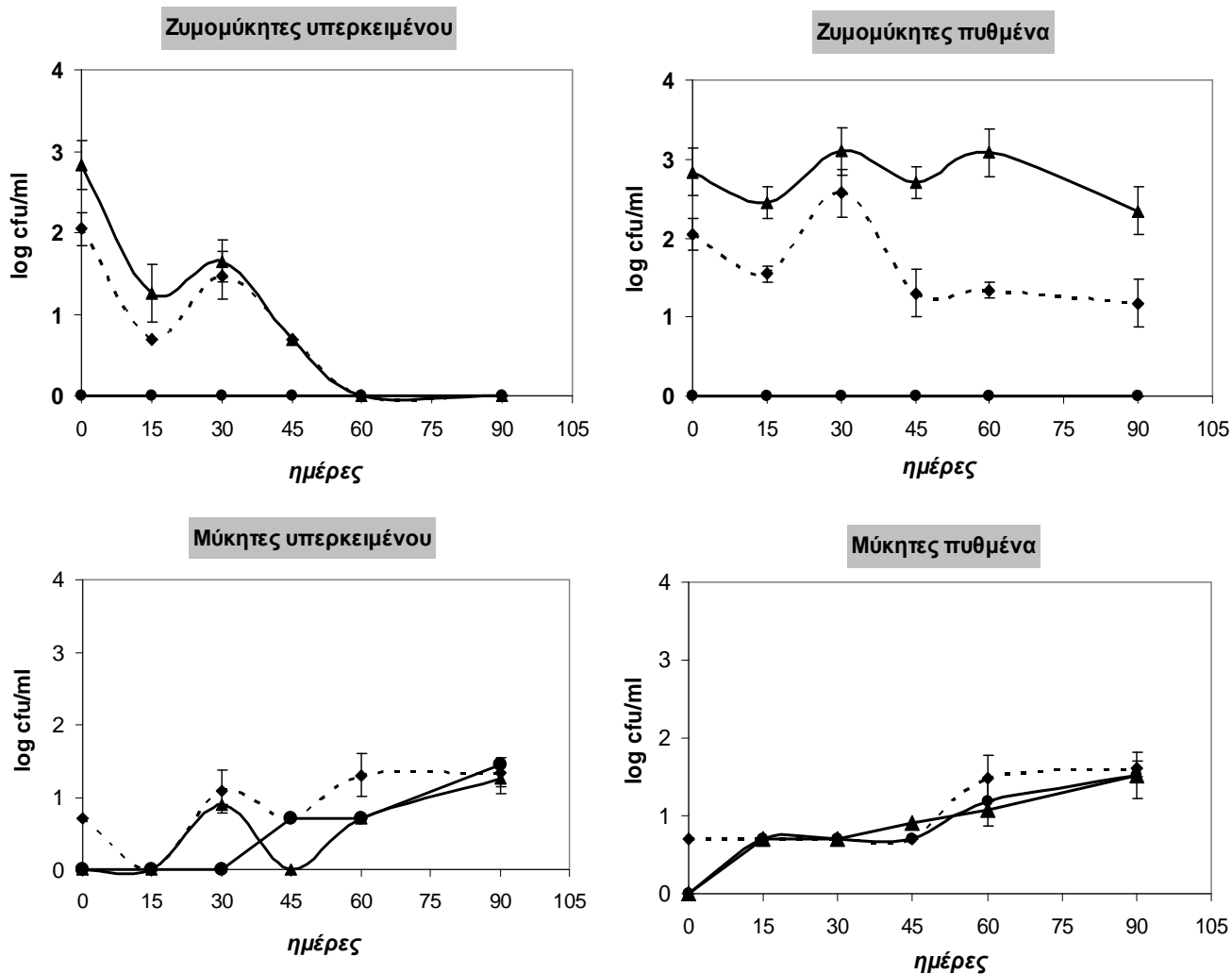
**Εικόνα 4.10.** Φωτογραφίες βακτηρίων από το ίζημα στον πυθμένα φιαλιδίου που αποθηκεύτηκε το δείγμα ελαιολάδου «Άρτα 2» (t=90 ημέρες) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).

#### 4.6.2. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ

Στα Σχήματα 4.8 και 4.9 που ακολουθούν παρουσιάζεται η συμπεριφορά του πληθυσμού των μικροοργανισμών που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα θολού ελαιολάδου τα οποία αποθηκεύτηκαν για χρονικό διάστημα τριών μηνών (90 ημερών). Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα δείγματα θολού ελαιολάδου αλλά στα γραφήματα παρουσιάζονται τα ευρήματα για τα δυο από αυτά ως τα πιο αντιπροσωπευτικά. Επίσης εξετάστηκε και ένα εμπορικό δείγμα ελαιολάδου που είχε το ρόλο του μάρτυρα.



**Σχήμα 4.8.** Μεταβολές στον πληθυσμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε δυο δείγματα θολού ελαιολάδου (—■— : «Χαλκιδική 1», - -▲- - : «Άρτα 2») και ένα εμπορικό δείγμα ελαιολάδου (—●— : εμπορικό 4) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται δείγματα από το υπερκείμενο ενώ στη δεύτερη από τον πυθμένα των φιαλιδίων.



**Σχήμα 4.9.** Μεταβολές στον πληθυσμό των ζυμομυκήτων και των μυκήτων σε δυο δείγματα θολού ελαιολάδου (—■—,--▲--) και 1 εμπορικό δείγμα ελαιολάδου (—●—) στη διάρκεια της αποθήκευσης. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζονται δείγματα από το υπερκείμενο ενώ η δεύτερη από τον πυθμένα των φιαλιδίων.

Γενικά ο πληθυσμός των μικροοργανισμών βρέθηκε να είναι χαμηλότερος από  $10^3$  cfu/mL ελαίου, πληθυσμός που θεωρείται αρκετά χαμηλός, αλλά δικαιολογείται διότι το ελαιόλαδο δεν είναι ευνοϊκό μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Ειδικότερα, ο πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο υπερκείμενο των δειγμάτων θολού ελαιολάδου πριν την αποθήκευση ( $t=0$ ) κυμάνθηκε από 2 έως 3 logs. Στη διάρκεια της αποθήκευσης ο πληθυσμός τους μειώθηκε στο υπερκείμενο των δειγμάτων με σαφή μεταβολή (σ.σ διακύμανση, βλ. Σχήμα 4.8 και 4.9). Αντιθέτως, ο πληθυσμός τους στα δείγματα ελαίου

που παραλήφθηκαν από τον πυθμένα του φιαλιδίου παρουσίασε σταθεροποιητικές και στη συνέχεια πτωτικές τάσεις.

Εκτός από βακτήρια, στα δείγματα θολού ελαιολάδου ανιχνεύτηκαν μύκητες. Ο πληθυσμός τους ήταν στο επίπεδο του 1 log και έδειξε μικρή αύξηση κατά την αποθήκευση, ειδικότερα στα δείγματα που παραλήφθηκαν από τον πυθμένα του φιαλιδίου. Οι μύκητες που αναγνωρίστηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου ανήκαν στα γένη *Helicosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* και *Aspergillus*. Τέλος, ανιχνεύτηκαν και ζυμομύκητες σε πληθυσμό που κυμάνθηκε από 0,8 έως 2 log, ο οποίος μειώθηκε στην πορεία του χρόνου στο υπερκείμενο των δειγμάτων και τελικά δεν ανιχνεύτηκε μετά από 45 ημέρες αποθήκευσης. Αντιθέτως, στα δείγματα ελαίου που παραλήφθηκαν από τον πυθμένα του φιαλιδίου ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων παρέμεινε στα αρχικά επίπεδα μέχρι το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (90 ημέρες).

Η παρουσία μικροοργανισμών στο ελαιόλαδο μπορεί να αποδοθεί στην επιδερμική μικροχλωρίδα του και στο χειρισμό του ελαιόκαρπου από τη συλλογή του στον ελαιώνα μέχρι την επεξεργασία του στο ελαιουργείο. Κατά την αποθήκευση, η αργή και συνεχής μετακίνηση των σταγονιδίων του νερού και των Α.Σ.Σ. στο κάτω μέρος του φιαλιδίου συντελεί στη μεταφορά της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας, λόγω καθίζησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον προσδιορισμό ολοένα και χαμηλότερων πληθυσμών στο υπερκείμενο έλαιο, όπου παρατηρείται μείωση στη μονάδα του χρόνου, και ολοένα και υψηλότερων πληθυσμών στο πυθμένα, όπου παρατηρείται φαινομενική αύξηση (Σχήμα 4.8 και 4.9). Οι μεταβολές στον πληθυσμό των μικροοργανισμών στο υπερκείμενο των δειγμάτων που παρατηρήθηκε αρχικά (15-45 ημέρες) πιθανώς οφείλονται στη διαφορετική ταχύτητα καταβύθισης των μικροσταγονιδίων νερού ανάλογα με το μέγεθός τους (1-5 μm),

Στον πυθμένα των φιαλιδίων των δειγμάτων, όπου τα μικροσταγονίδια νερού και τα ζυμώσιμα σάκχαρα και άλλοι πολυσακχαρίτες (που προέρχονται από την καθίζηση των Α.Σ.Σ.) αφθονούν, υπάρχει υποψία ανάπτυξης μικροοργανισμών για μικρό χρονικό διάστημα, λόγω και της ύπαρξης διαλυμένου αέρα στη μάζα του ελαίου. Ωστόσο, όπως ειπώθηκε, το φαινόμενο της αύξησης των πληθυσμών οφείλεται στην προσμέτρηση λόγω της καταβύθισης της αρχικής χλωρίδας και όχι στην ανάπτυξη.

Ο εξαιρετικά χαμηλός πληθυσμός των μυκήτων τόσο στα δείγματα του θολού όσο και στο δείγμα εμπορικού ελαιολάδου δεν επηρεάζει την ποιότητα και την υγιεινή του ελαιολάδου, τουλάχιστον όταν τηρούνται οι κανόνες της Ορθής Βιομηχανικής

Πρακτικής. Η ανίχνευση μυκήτων στον πυθμένα των φιαλιδίων δικαιολογείται από το γεγονός ότι τα σπόρια των μυκήτων καταβυθίζονται λόγω βάρους στον πυθμένα όπου παραμένουν ανενεργά εξαιτίας των αναερόβιων συνθηκών. Αυτά, όμως, πολλαπλασιάζονται όταν καλλιεργηθούν στα ειδικά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται όταν επιδιώκεται η καταμέτρησή τους. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορεί να οφείλεται στην έκθλιψη αλλοιωμένων ελαιόκαρπων.

#### 4.6.3. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Με τη βοήθεια του πρότυπου συστήματος βιοχημικών δοκιμών API 32C AUX ταυτοποιήθηκαν έξι διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων (*Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. albicans 1* και *Rhodotoula mucilaginososa 2*). Το πιο διαδεδομένο είδος (*Candida guilliermondii*) εντοπίστηκε σε όλα τα δείγματα.

**Πίνακας 4.14.** Βιοχημικές δοκιμές του API 32 C-AUX για την αναγνώριση των ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από το ελαιόλαδο.

ZYMOΜΥΚΗΤΕΣ	G L U	G L Y	2 K G	A R A	X Y L	A D O	X L T	G A L	I N O	S O R	M D G	N A G	C E L	L A C	M A L	S A C	T R E	M L Z	R A F
<i>Candida guilliermondii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida lusitaniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Candida famata</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Candida albicans 1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Rhodotoula Mucilaginososa2</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Οι συντμήσεις του παραπάνω πίνακα δίνονται παρακάτω: GLU: γλυκόζη, GLY: γλυκερόλη, 2KG: 2-κετο-D- γλυκονικό οξύ, ARA: L-αραβινόζη, XYL: D-ξυλόζη, ADO: ριβιτόλη, XLT: ξυλιτόλη, GAL: γαλακτόζη, INO: ινοσιτόλη, SOR: σορβιτόλη, MDG: μέθυλο-D-γλυκόζη, NAG N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη, CEL: κελλοβιόζη, LAC: λακτόζη, MAL: μαλτόζη, SAC: σακχαρόζη, TRE: τρεχαλόζη, MLZ: μελιζιτόζη, RAF: ραφφινόζη.

Στον Πίνακα 4.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμών (επώσεις σε διάφορα υποστρώματα) για την αναγνώριση των έξι ειδών ζυμομυκήτων. Το προφίλ των επώσεων έδωσε με τη βοήθεια ειδικής βιβλιοθήκης του API (APILAB, Biomérieux, France) το αποτέλεσμα της ταυτοποίησης. Αυτό συνοδεύεται πάντα από ένα ποσοστό αβεβαιότητας σύμφωνα με τον παρασκευαστή (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

Τα παραπάνω είδη των ζυμομυκήτων ελέγχθηκαν ως προς τις βιοχημικές ιδιότητες που έχουν επίδραση στην ποιότητα του ελαιολάδου (Πίνακας 4.15). Δυο από αυτά (*Candida guilliermondii* και *C. lusitaniae*) διαπιστώθηκε ότι μπορούν να υδρολύσουν τον β-D γλυκοζιτικό δεσμό ενός πρότυπου γλυκοζίτη, όπως η π-νιτροφαινολογλυκερόλη (pNPG). Ωστόσο, όταν ως γλυκοζίτης χρησιμοποιήθηκε η ελαιοευρωπαϊνή, κανένα από τα δυο αυτά είδη ζυμομυκήτων δεν μπόρεσε να υδρολύσει το παράγωγο αυτό της υδροξυτυροσόλης στις συνθήκες της δοκιμής (βλ. παρ. 3.3.8.5). Αυτή η αδυναμία μπορεί να οφείλεται και στην ισχυρή αντιμικροβιακή δράση της ελαιοευρωπαϊνης *in vitro* (Ghisalberti, 1998). Λιπολυτικές και φαινολοξειδικές ιδιότητες βασιζόμενες σε πρότυπες ενζυμικές δοκιμές δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα είδη.

**Πίνακας 4.15.** Δοκιμές ενζυμικών δράσεων σε είδη ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα θολού ελαιολάδου

<i>Ενζυμική δράση</i> <i>Είδη ζυμομυκήτων</i>	<i>B-γλυκοσιδάσης</i>	<i>Λιπάσης</i>	<i>Φαινολοξειδάσης</i>
<i>CANDIDA GUILLERMONDII</i>	+	-	-
<i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i>	-	-	-
<i>CANDIDA LUSITANIAE</i>	+	-	-
<i>CANDIDA FAMATA</i>	-	-	-
<i>CANDIDA ALBICANS 1</i>	-	-	-
<i>RHODOTOULA</i> <i>MUCILAGINOSA 2</i>	-	-	-

Τα πειραματικά αυτά δεδομένα διαφέρουν από τα αποτελέσματα των Ciafardini & Zullo (2002a; 2000b) και Ciafardini *et al.* (2006) οι οποίοι αναγνώρισαν άλλα είδη ζυμομυκήτων και διαφορετική συμπεριφορά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης

(κάποια είδη τους εμφάνισαν και λιπολυτική δράση), αλλά σε ελαιόλαδο βιομηχανικής κλίμακας αποθηκευμένο σε δεξαμενές πριν από την επεξεργασία.

Η παρουσία των συγκεκριμένων ειδών ζυμομυκήτων αναφέρεται για πρώτη φορά στο ελαιόλαδο. Το γεγονός ότι αυτά τα είδη δεν αναφέρονται στις μελέτες των Ciafardidi & Zullo (2002a; 2000b) μπορεί να αποδοθεί στις συνθήκες παραγωγής του ελαιολάδου, στην ποικιλία του ελαιόκαρπου και στο μικροπεριβάλλον του ελαιώνα (π.χ. το έδαφος κ.α.). Επιμόλυνση του ελαιολάδου με ζυμομύκητες από το περιβάλλον του ελαιοτριβείου είναι επίσης πιθανή.

Διάφορα είδη του γένους της *Candida* έχουν στο παρελθόν συσχετιστεί με την ελιά και το περιβάλλον στο οποίο καλλιεργείται. Οι ζυμομύκητες *Candida salmanticensis*, *C. aurangiensis* και *C. oregonensis* έχουν εντοπιστεί στα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (alpechin). Οι ζυμομύκητες *C. membranifaciens*, *C. oleophila* και *C. parapsilosis* έχουν εντοπιστεί σε ελιές ενώ ο ζυμομύκητας *Rhodotula Mucilaginosa* 2 έχει απομονωθεί από δείγμα εδάφους ελαιώνα (Barnett *et al.*, 2000).

Τα δείγματα θολού ελαιολάδου που εξετάστηκαν έδειξαν ότι το προϊόν αυτό που είναι προσφιλές σε μια μερίδα καταναλωτών, έχει ένα σχετικώς μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με το τυποποιημένο παρθένο ελαιόλαδο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί (βακτήρια, ζυμομυκητες, μύκητες) παρατηρήθηκε ότι επιβιώνουν για κάποιο χρονικό διάστημα στα δείγματα. Ορισμένα είδη ζυμομυκήτων του γένους *Candida* που εντοπίστηκαν σε ένα από τα δείγματα θεωρούνται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Stratford *et al.*, 2000; Stratforf, 2006) ως δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί για τον άνθρωπο όταν ο πληθυσμός τους είναι υψηλότερος από 600 cfu/mL στο τρόφιμο. Ωστόσο, στα δείγματα θολού ελαιολάδου που εξετάστηκαν, οι ζυμομύκητες αυτοί βρέθηκαν σε χαμηλούς πληθυσμούς με αποτέλεσμα να μη θεωρούνται επικίνδυνοι. Αυτό ενισχύεται από το δεδομένο ότι αυτός ο χαμηλός μικροβιακός πληθυσμός μειώνεται διαρκώς στο υπερκείμενο έλαιο στη διάρκεια της αποθήκευσης λόγω της χαμηλής και φθίνουσας περιεκτικότητάς του σε νερό και λόγω της ειδικής αντιμικροβιακής δράσης των πολικών φαινολών του ελαιολάδου (Kubo *et al.*, 1995; Keceli *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2006; 2007). Συνεπώς, φαίνεται ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών και η φύση τους δεν επηρεάζουν δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την εν γένει ποιότητα του φυσικού αυτού προϊόντος.

Στην ελληνική και την ευρωπαϊκή νομοθεσία δεν έχουν θεσπιστεί όρια για τον πληθυσμό των μικροοργανισμών στο ελαιόλαδο και ούτε είναι επιβεβλημένο να γίνει κάτι τέτοιο. Είναι όμως φανερό ότι η υιοθέτηση των κανόνων Καλής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής (GHP, GMP) ή του συστήματος ποιότητας Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) θα μπορούσε να ελέγξει αποτελεσματικά τον πληθυσμό τους (Pardo *et al.*, 2002).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

Κύριος στόχος της διατριβής ήταν η μελέτη των ιδιοτήτων του θολού ελαιολάδου που καταναλίσκεται από ένα μέρος καταναλωτών που το θεωρούν ως πιο οικολογικό και μεγαλύτερης βιολογικής αξίας. Ειδικότερα, μελετήθηκε η σταθερότητα του στην αυτοξειδωση που συσχετίστηκε με την παρουσία ησσόνων συστατικών όπως πολικών φαινόλων, φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών. Μελετήθηκε ακόμα η φυσικοχημική του κατάσταση και η διαδικασία της διαύγασης που έχει σημασία για τη βιομηχανία, με βάση κάποιες φυσικοχημικές παραμέτρους. Εξετάστηκε, τέλος, το θολό ελαιολάδου και ως προς την παρουσία μικροοργανισμών, καθώς και των πιθανών βιοχημικών δράσεων που μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητά του.

Από τα αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Η **οξειδωτική σταθερότητα** του θολού ελαιολάδου οφείλεται, εν μέρει, στην αυξημένη περιεκτικότητα του μη διηθημένου ελαίου σε **πολικές φαινόλες**.
2. Η περιεκτικότητα του θολού ελαιολάδου σε **πρωτεΐνες** είναι πολύ χαμηλή (0,1 – 2,4 mg/kg ελαίου) και μειώνεται ελαφρώς ή καθόλου μετά τη διήθησή του. Οι πρωτεΐνες δεν φαίνεται να έχουν συνεισφορά στην οξειδωτική και στη φυσικοχημική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου. Όσον αφορά στη διερεύνηση της χημικής σύστασης του κλάσματος των πρωτεϊνών, αυτή είναι πολύ δύσκολη λόγω κυρίως της πολύ χαμηλής συγκέντρωσής τους και της πιθανής αλληλέπιδρασής τους με τις πολικές φαινόλες με σχηματισμό κάποιου δεσμού άγνωστης φύσεως. Οι πρωτεΐνες του ελαιολάδου είναι κατά πάσα πιθανότητα **υδρόφοβα συσσωματώματα πρωτεϊνών** και πεπτιδίων που έχουν μοριακή μάζα 225 KDa με άλλα συστατικά όπως πολικές φαινόλες. Γι' αυτό το λόγο δεν είναι δυνατή η περαιτέρω διερεύνηση της επιμέρους δομής και φύσης

τους. Σε κάποια δείγματα θολού ελαιολάδου υπάρχουν σε χαμηλότερη αναλογία και πρωτεΐνες που έχουν μοριακή μάζα 50 – 70 KDa οι οποίες προσομοιάζουν τις ελαιοσίνες του μεσοκαρπίου.

3. Τα **φωσφολιπίδια** που είναι μια τάξη ησσόνων συστατικών με σημαντικό ρόλο, βρίσκονται σε επίπεδα που κυμαίνονται από 21 έως 124 mg/kg ελαίου. Αυτά, λόγω της φύσης τους, είναι εν δυνάμει αντιοξειδωτικά και σταθεροποιητές της φυσικοχημικής κατάστασης του θολού ελαιολάδου. Η εμπειρία από την ανάλυση των φωσφολιπιδίων είναι ότι η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία με στήλες τόσο κανονικής όσο και αντίστροφης φάσης παρουσιάζουν σοβαρές δυσκολίες. Γι' αυτό σημαντική είναι η συνεισφορά στη λύση του προβλήματος της φασματοσκοπίας NMR. Τα επιμέρους φωσφολιπίδια που διαπιστώθηκε ότι απαρτίζουν το φωσφολιπιδικό κλάσμα ήταν το **φωσφατιδικό οξύ**, το λυσοφωσφατιδικό οξύ, η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη.
4. Τα πειραματικά δεδομένα για τη **φυσικοχημική κατάσταση** του θολού ελαιολάδου έδειξαν ότι παρά τη μικρή περιεκτικότητα σε νερό το σύστημα μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα **γαλάκτωμα – αιώρημα**. Ειδικότερα, το θολό ελαιολάδου είναι ένα σύστημα διασποράς στερεών σωματιδίων και σταγονιδίων νερού, που εν μέρει απαντούν σε συσσωματωμένη μορφή, λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας των στερεών σωματιδίων που προέρχονται από τα φυτικά μέρη του καρπού στο έλαιο. Τα στερεά σωματίδια (Α.Σ.Σ.) αποτελούνται κυρίως από αναφομοίωτα συστατικά (δομικοί πολυσακχαρίτες και άλλα συστατικά), περιέχουν όμως και φωσφολιπίδια, σάκχαρα, φαινόλες και πρωτεΐνες και βρέθηκε ότι αυξάνουν τη φυσικοχημική σταθερότητα των πρότυπων γαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που παρασκευάστηκαν.
5. Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε **Αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα Στερεά Συστατικά (Α.Σ.Σ.)** φαινομενικώς **αυξάνεται** κατά την αποθήκευση διότι ανάλογα με το χρόνο της διήθησης δημιουργούνται συσσωματώματα μεταξύ των στερεών σωματιδίων με μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό των πόρων του ηθμού. Η αύξηση αυτή έχει σημασία για τη **Βιομηχανία**, κυρίως σε ότι αφορά την εμφιάλωση του ελαιολάδου (κίνδυνος επανεμφάνισης θολώματος στη φιάλη).

6. Τα δείγματα θολού ελαιολάδου που εξετάστηκαν περιείχαν διάφορους **μικροοργανισμούς** σε πληθυσμό όχι υψηλότερο από 3 log cfu/mL ελαίου. Η φύση τους (κυρίως ζυμομύκητες του γένους *Candida*, βακτήρια και λίγοι μύκητες) φαίνεται ότι **δεν επηρεάζει** δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την εν γένει ποιότητα του φυσικού αυτού προϊόντος. Ωστόσο ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στην εφαρμογή των κανόνων Καλής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής κατά την παραγωγή και την τυποποίησή του.

Στην Ελλάδα διακινείται και καταναλίσκεται μη τυποποιημένο ελαιόλαδο μέρος του οποίου είναι θολό. Η μορφή αυτή είναι για πολλούς καταναλωτές, ένα πιο φυσικό και πιο οικολογικό προϊόν με μεγαλύτερη βιολογική αξία. Τα πιο πάνω αποκτούν ιδιαίτερη σημασία αν λάβει κανείς υπόψη τις σύγχρονες τάσεις στην παραλαβή του ελαιολάδου (παραλαβή σε μικρής δυναμικότητας ελαιουργεία ή με χρήση μικρής κλίμακας οικιακών ελαιοτριβείων στα οποία το ελαιόλαδο παράγεται και καταναλίσκεται άμεσα ή συσκευάζεται σε φιάλες και δωρίζεται).

## **Προτάσεις για μελλοντική εργασία**

Η αυξημένη σταθερότητα του θολού ελαιολάδου στην οξειδωση μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη περιεκτικότητά του σε πολικές φαινόλες και σε φωσφολιπίδια και, ενδεχομένως, στη φυσικοχημική κατάστασή του. Ωστόσο ορισμένα θέματα χρήζουν περισσότερης έρευνας:

- Περαιτέρω διερεύνηση της αντοχής στην αυτοοξείδωση του θολού ελαιολάδου και ανάλυση των διαφορών στο προφίλ των πολικών φαινολών πριν και μετά τη διήθησή του ενόψει και των νέων δεδομένων για τη σύσταση του κλάσματος των πολικών φαινολών (σεκοϊριδιειδή, λιγνάνες, φλαβονοειδή, υδροξυ-ισοχρωμάνες). Το κλάσμα αυτό έχει σημασία όχι μόνο για τη προστασία ενάντια στην αυτοοξείδωση αλλά για τη βιολογική αξία και στην ποιότητα του προϊόντος.

- Διερεύνηση του ρόλου των επιμέρους πολικών φαινολών στην παρεμπόδιση αντιδράσεων οξειδωσης που καταλύονται από ένζυμα λόγω και της παρουσίας του νερού (αυξημένης πιθανότητα ενζυμικών δράσεων).
- Διερεύνηση της φύσης των συστατικών των Α.Σ.Σ., κυρίως αυτών που μπορεί να είναι πολυμερή φαινολών ή σύμπλοκα φαινολών-πρωτεϊνών, και έχουν ειδικό ενδιαφέρον για τη Βιομηχανία. Επειδή η συγκέντρωση των Α.Σ.Σ. αυξάνεται με την παραμονή του ελαίου, θα μπορούσαν να αναζητηθούν μια ή περισσότερες παράμετροι ώστε να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τον καθορισμό του κατάλληλου χρόνου παραμονής του ελαίου στις δεξαμενές αποθήκευσης πριν τη διήθηση.
- Διερεύνηση της φύσης των πρωτεϊνών του μεσοκαρπίου της επιτραπέζιας ελιάς, το οποίο είναι πλουσιότερο σε πρωτεΐνες σε σχέση με το ελαιόλαδο.

## 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Το ελαιόλαδο παρομοιάζεται συχνά με ένα «ζωντανό οργανισμό». Από τη στιγμή της παραλαβής του μέχρι τη στιγμή της κατανάλωσης λαμβάνουν χώρα πολλές χημικές και βιοχημικές δράσεις. Οι δράσεις αυτές έχουν σημασία, τόσο για την οξειδωτική σταθερότητά του όσο και έναντι των μεταβολών της φυσικοχημικής του κατάστασης. Οι μεταβολές αυτές έχουν, επίσης, σημασία για τη συσκευασία και την παραμονή του θολού προϊόντος στις δεξαμενές πριν την εμφιάλωση. Το θολό ελαιόλαδο, ο «φρέσκος» αδιάθιτος χυμός της ελιάς, είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν της παραγωγικής διαδικασίας πριν την τελική διήθηση και συσκευασία του ελαιολάδου που μπορεί, όμως, να καταναλωθεί ως έχει από ένα ειδικό αγοραστικό κοινό που το προτιμά για τα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του και τη μεγαλύτερη βιολογική του αξία. Τα ήσσονα συστατικά στο θολό ελαιόλαδο που επηρεάζουν την οξειδωτική του σταθερότητα και τη φυσικοχημική του κατάσταση καθώς και η παρουσία μικροοργανισμών που το διαφοροποιούν από τις άλλες μορφές ελαιολάδου αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας διατριβής. Η αυξημένη οξειδωτική σταθερότητα του θολού ελαιολάδου οφείλεται, εν μέρει, στην αυξημένη περιεκτικότητα του ελαίου σε πολικές φαινόλες πριν τη διήθησή του. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες είναι πολύ χαμηλή (0,5-2 mg/kg ελαίου). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν αναμένεται να συνεισφέρουν στην οξειδωτική και στη φυσικοχημική σταθερότητά του. Τα φωσφολιπίδια που απαντούν σε συγκεντρώσεις περίπου 100 mg/kg μπορούν να δράσουν ως πρωτοταγή αντιοξειδωτικά ή ως συνεργοί αντιοξειδωτικών. Ως προς τη φυσικοχημική του κατάσταση, το θολό ελαιόλαδο είναι ένα σύστημα διασποράς στερεών σωματιδίων και σταγονιδίων νερού (αιώρημα και γαλάκτωμα, αντίστοιχα) που εν μέρει απαντούν σε συσσωματωμένη μορφή στο έλαιο. Τα στερεά σωματίδια αδιάλυτα σε πετρελαϊκό αιθέρα (Α.Σ.Σ.) αποτελούνται κυρίως από αναφομοίωτα συστατικά αλλά και φωσφολιπίδια, σάκχαρα, φαινόλες και πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητα σε Α.Σ.Σ. αυξάνεται κατά την αποθήκευση, επειδή πιθανότατα ευνοείται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων που έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό των πόρων του ηθμού. Η αύξηση αυτή έχει σημασία για τη Βιομηχανία (κίνδυνος επανεμφάνισης θολώματος στη

φιάλη). Το θολό ελαιόλαδο περιέχει διάφορους μικροοργανισμούς σε πληθυσμό χαμηλότερο από 2 log cfu/mL ελαίου. Η φύση τους (κυρίως ζυμομύκητες, βακτήρια και λίγοι μύκητες) δεν επηρεάζουν δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την εν γένει ποιότητα του φυσικού αυτού προϊόντος. Ωστόσο ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στην εφαρμογή των κανόνων Καλής Υγιεινής και Βιομηχανικής Πρακτικής κατά την παραγωγή και την τυποποίησή του.

## 7. ABSTRACT

---

Olive oil is frequently described as a “living organism”. From the moment of its production until its consumption, a series of chemical and biochemical reactions take place. These reactions are of particular importance for its oxidative stability and the physicochemical state and have an impact in the olive oil’s storing and bottling practice. Cloudy olive oil, the unfiltered fresh olive juice, is an intermediate in olive oil production prior to final filtration and bottling; it can be sold separately to special consumers who prefer it for its unique organoleptic characteristics and its biological value. The minor components of cloudy olive oil that affect its oxidative and physicochemical stability and the presence of microorganisms that discriminate it from the other forms of olive oil, was the aim of this PhD thesis. The increased oxidative stability of cloudy olive oil was partially due to the increased content of total phenols of the oil prior to filtration. Protein content in the same oils was relatively small (0.5-2 mg/kg) and is not expected to influence the oxidative and physicochemical stability. Phospholipids that might have the role of antioxidants or antioxidant’s synergists and can influence the oil’s physicochemical state, was around 100 mg/kg. The physicochemical state of cloudy olive oil is a system of dispersion of solid particles and micro-droplets of water (suspension and emulsion, respectively) partly appearing in the coagulated form. The solid particles (insoluble in petroleum ether matter) were mainly composed of non digestible material and, secondarily, of phospholipids, carbohydrates, polar phenols and proteins. The insoluble to petroleum ether matter continuously increased during storage possibly due to the formation of coagulation products with a size larger than the filter pores. This could be of interest for the Industry since sometimes commercially available olive oil exhibits re-clouding in the bottle during storage if early filtration is applied. Cloudy olive oil has a low population of microorganisms but their concentration (<2 log cfu/ml of oil) and their nature (mainly yeasts of *Candida* genera and bacteria and moulds) did not adversely influence the organoleptic characteristics and the overall quality of this natural product. However, the application of GMP and GHP is considered desirable.

## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Alter, M. & Gutfinger, T. Phospholipids in several vegetable oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1982**, 59, 14-18.
- Ambrosone, L., Angelico, G. Cinelli, G., Di Lorenzo, V. & Ceglie, A. The role of water in the oxidation process of extra virgin olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2002**, 79, 577-581.
- Ambrosone, L., Mosca, M. & Ceglie, A. Oxidation of water emulsified olive oils. *Food Hydrocolloids*, **2006a**, 20, 1080-1086.
- Ambrosone, L., Mosca, M. & Ceglie, A. Susceptibility of water-emulsified extra virgin olive oils to oxidation. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2006b**, 83, 165-170.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A. & Macchie, J.J. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, **1989**, 28, 67-69.
- Andrikopoulos, N., Hassapidou, M. & Manouka, A. The tocopherol content of Greek olive oils. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **1989**, 46, 503-509.
- Angerosa F., Lanza B. & Marsilio, V. Biogenesis of fusty defect in virgin olive oils. *Grasas y Aceites*, **1996**, 47, 142-150.
- Angerosa, F., D' Alessandro, N., Basti C. & Vito, R. Biogeneration of volatile compounds in virgin olive oil: their evolution in relation to malaxation time. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1998**, 46, 2940-2944.
- Angerosa, F., d' Alessandro, N., Konstantinou, P. & Di Giacinto, L. GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1995**, 43, 1802-1807.
- Angioni, A., Cabitza, M., Russo, M.T. & Caboni, P. Influence of olive cultivars and period of harvest on the contents of Cu, Cd, Pb, and Zn in virgin olive oils. *Food Chemistry*, **2006**, 99, 525-529.
- AOAC. Official Methods of Analysis, 17h Ed., Association of Official Analytical Chemists, Vols. I & II, AOAC International, Arlington, Virginia, 2003, Method 962.09, Method 930.30.

- AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society International 5<sup>th</sup> Edition, AOCS Press: Champaign, Illinois, USA, 1998, Vol II, Method Ca 3-47., Method Ca 12-55..
- Aparicio, R. & Luna, G. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2002**, 104, 614-627.
- Aparicio, R. & Morales, M.T. Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1998**, 46, 1116-1122.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A. & Gutiérrez, F. Effect on various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **1999**, 47, 4150-4155.
- APHA. Measurement of water activity (Aw) and acidity. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, 3<sup>rd</sup> Ed., Washington DC, USA, 1992, pp. 135-154.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Ed. American Public Health Association, Washington DC, USA, 2000, pp. 1-50.
- Avalli, A. & Contarini, G. Determination of Phospholipids in Dairy Products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1071, 185–190.
- Balazs, P.E., P.L. Schmitt P.L. & B.F. Szuhaj, B.F. High Performance Liquid Chromatographic separations of soy phospholipids. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1996**, 73, 193-197.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. Yeasts: characteristics and identification, 3<sup>rd</sup> ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK 2000, pp. 1-250.
- Basha, S. Two-dimensional Electrophoresis – Separation of Proteins. In: *Methods for Protein Analysis* (Cherry, J. & Barford, R., eds.). American Oil Chemists' Society, American Oil Chemists' Society Meeting. Illinois, USA, 1988, Ch. 6, pp. 70-79.
- Be Miller, J. & Low, N. Carbohydrate analysis, In: *Food Analysis*, (Nielsen, S.S. ed.) Aspen, USA, 1999, pp. 167-187.
- Beauchamp, G.K., Keast, R.S., Morel, D., Lin, J. Pika, J., Han Q., Lee, C., Smith, A.B., Breslin, A.S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, **2005**, 437 45-46.
- Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. Food Chemistry 3rd revised. Springer Berlin, Heidelberg, Germany, 2004, pp. 157-244.

- Belton, P.S., Delgadilo, I., Gil, A.M. & Webb, G.A., (Eds.). *Magnetic Resonance in Food Science*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1995.
- Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, Academic Press, New York, USA, 1974, pp. 2066-2072.
- Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M. & Marra, C. Presence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxyl-isochromans. *Food Chemistry*, **2001**, 77, 405-411.
- Bianco, R., Mazzei A., Melchioni, C., Scarpati M.L., Romeo, G. & Uccella, N. (). Microcomponents of olive oil. Part II: Digalactosyldiacylglycerols from *Olea europaea*. *Food Chemistry*, **1998**, 62, 343-346.
- Blekas, G. & Boskou, D. Phytosterols and stability of frying oils. In: *Frying of Food*, Boskou, D., Elmadfa, I. (eds.), Technomic Publishing Co, Inc., Lancaster, UK, 1999, pp. 205-222.
- Blekas, G., Psomiadou E., Tsimidou, M. & Boskou, D. On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2002**, 104, 340-346.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **1987**, 8, 93-99.
- Bonanome, A., Pagnan, A., Biffanti, S., Opportuno, A., Sorgato, F., Dorella, M., Maiorino, M. & Ursini, F. Effect of Dietary Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids on the Susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arteriosclerosis & Thrombosis*, **1992**, 12, 529-533.
- Boskou, D. & Vlachopoulou, I. On the level of sterol esters in olive oil. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **1986**, 19, 156-157.
- Boskou, D. Non-nutrient Antioxidants and Stability of Frying Oils. In: *Frying of Food*, Boskou, D., Elmadfa, I. (eds.), Technomic Publishing Co, Inc., Lancaster, UK, 1999, pp. 183-204.
- Boskou, D. *Olive Oil: Chemistry and Technology*. D. Boskou (Ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1996.
- Boskou, D. Storage and Packing. In: *Olive Oil: Chemistry & Technology*. D. Boskou (Ed.), 2<sup>nd</sup> Edition, AOCS Press: Champaign, Illinois, USA, 2006c, pp.233-242.

- Boskou, D., Blekas G. & Tsimidou, M. Olive Oil Composition. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. (Ed.) D. Boskou, 2<sup>nd</sup> Edition, AOCS Press: Champaign, Illinois, USA, 2006, pp.41-72.
- Boskou, D., Blekas, G. & Tsimidou, M. Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curent Topics in Nutraceutical Research* **2005**, 3, 125-136.
- Boskou, D., Blekas, G. & Tsimidou, M. Polar phenolic compounds. In: *Olive oil: chemistry and technology*. D. Boskou (Ed.), 2<sup>nd</sup> ed., AOCS Press: Champaign, Illinois, USA, 2006a, pp. 73-92.
- Boskou, D., Stefanou, G. & Konstandinidis, M. Tetracosanol and Hexacosanol Content of Greek Olive Oils. *Grasas y Aceites*, **1983**, 34, 402-404.
- Botía, J.M, Ortuño A, Benavente García O., Báidez A.G., Frías J., Marcos D. & Del Río J.A. Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: their influence on olive oil quality. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2001**, 49, 355 -358.
- Boukhchina, K., Sebai, A., Cherif, H., Kallel, P. & Mayer, M. Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils by LC-MS and LC-MS-MS. *Canadian Journal of Chemistry*, **2004**, 82, 1210-1215.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, 72, 48-54.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P. & Garrido, A. Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2001**, 49, 5609-5614.
- Briante, R., Febbraio, F. & Nucci, R. Antioxidant Properties of Low Molecular Weight Phenols Present in the Mediterranean Diet. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2003**, 51, 6975-6981.
- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F. & Nucci, R. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea*. *Plant Science*, **2002**, 162, 791-798.
- Bruni, U., Cortesi, N. & Fiorino, P. Influence of agricultural, cultivar and area of origin on characteristics of virgin olive oil and on characteristics of virgin olive oil and on levels of some of its minor components *Olivae*, 1994, 53, 28-34.

- Calapaj, R., Chiricosta, S., Saija G. & Binova V. Evaluation of Gas Chromatographic and spectrophotometric analytical results to check the presence of seed oils in olive oil samples. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1993**, 70, 585-594.
- Camera, L. & Angerosa, F. The higher alcohols of olive oil. Their development with the progressive ripening of the olives. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1978**, 55, 138-146,
- Caputo, R., Mangoni L. & Monaco, P & Previtiera, L. New triterpenes in husks of *Olea europaea*. *Phytochemistry*, **1974**, 13, 1551-1552.
- Carelli, A., Bredan, M. & Crapiste, G. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1997**, 74, 511-514.
- Carrasco Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D. & Fernández Gutiérrez, A. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2005**, 53, 8918-8925.
- Caruso, D., Visioli, F., Patelli, R., Galli, C & Galli, G. Urinary Excretion of Olive Oil Phenols and Their Metabolites in Humans. *Metabolism*, **2001**, 50, 1426-1428.
- Castillo, J.R., Jiménez, M.S. & Ebdon, L. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **1999**, 14, 1515–1518.
- Cert, A., Alba, J., Pérez Camino, C., Ruiz-Gómez, A., Hidalgo F. & Moreda, W. Influence of extraction methods on the characteristics and minor components of extra virgin olive oil. *Olivae*, **1999**, 79, 41-50.
- Christoforidou, S., Dais, P., Tseng, L-H. & Spraul M. Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2005**, 53, 4667-4679.
- Ciafardini, G. & Zullo B.A. Microbiological activity in stored olive oil. *Intentional Journal of Food Microbiology*, **2002a**, 75, 111-118.
- Ciafardini, G., Cioccia G., Peca G. & Zullo B.A Transfer of selected yeasts to oil through olive inoculation. *Italian Journal of Food Science*, **2004**, 1, 105-111,

- Ciafardini, G., Zullo B.A., & Iride A. Lipase production by yeasts from virgin olive oil. *Food Microbiology*, **2006**, *23*, 60-67.
- Ciafardini, G., Zullo B.A.: Survival of micro-organisms in extra virgin olive oil during storage. *Food Microbiology*. **2002b**, *19*, 105-109.
- Cinquanta, L., Esti, M. & Di Matteo, M. Oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2001**, *78*, 1197-1202.
- Codex Alimentarius Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils, CODEX STAN 33-33-1981 (Rev.2-2003)
- Crea, R., HIDROX, Proprietary hydroxytyrosol, Creagri Inc., Hayward, USA. [www.creagri.com/hidroX/5](http://www.creagri.com/hidroX/5), (accessed 1/10/2005).
- De la Puerta, R., Ruiz Gutierrez, V. & Hout, J.R. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, **1999**, *57*, 445-449.
- De Man, M. Principles of Food Chemistry, 2<sup>nd</sup> edition. London, UK, 1990.
- Debois, M., Gilles K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry*, **1956**, *28*, 350-356.
- Decagon Devices Inc. AquaLab model CX-2, Operator's Manual, Pullman, Washington USA, 2006.
- Delicias de España. <http://store.deliciasdeespana.com/images> (accessed 11-1-2006). Miami.
- Di Giovacchino, L. Olive harvesting and olive oil extraction. In: *Olive oil. Chemistry and Technology*. (Ed. Boskou D.). AOCS Press. Champaign, Illinois. USA, 1996, pp: 12-41.
- Dickinson, E. & McClements, D.J. Surfactant micelles in: *Advances in Food Colloids* Blackie, Academic & Professional, UK, 1996, pp. 248-265
- Dickinson, E. & Parkinson E.L. Heat induced aggregation of milk protein-stabilized emulsion's sensitivity to processing and composition. *International Dairy Journal*, **2004**, *14*, 635-645.
- Dielh, B.W.K. High resolution NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2001**, *103*, 830-834

- EC Regulation No 282/3-2-1998. Amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Communities*, **1998**, L 28/4-2-1998, 5-8.
- EC Regulation no. 1989/13-11-2003. On the characteristics of olive oils and olive pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Communities*, **2003**, L295/13-11-2003, 57-76.
- EC Regulation no. 2568/1-7-1991. On the characteristics of olive oils and olive pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, **1991**, L 248/5-9-1991, 1-83.
- Eliki Olive Oil LLC, <http://www.elikioliveoil.com/ungreekoloil.html> (accessed 30-10-2007). Los Angeles, USA
- Ferdando Diez, M.J., de Castro y Ramos, R., Garrido Fernandez A., et al. *Bioteología de la aceituna de mesa*, Consejo Superior de Investigación, Instituto de la Grasa, Madrid, Sevilla, Spain, 1985.
- Ferrari Tractor CIE, [www.ferrari-tractors.com/small\\_scale\\_olive\\_oil\\_\\_productio.htm](http://www.ferrari-tractors.com/small_scale_olive_oil__productio.htm) (accessed 30-10-2007). California. USA.
- Food and Drug Administration (FDA). FDA Allows Qualified Health Claim to Decrease Risk of Coronary Heart Disease regarding olive oil. CFSAN/Office of Nutritional Products, Labeling and Dietary Supplements, 2004.
- Fooks, R. Το βιβλίο της ελιάς (μετάφραση). Εκδόσεις Ψύχαλου. Αθήνα. 1997, σελ 1-75.
- Frankel, E.N. Lipid oxidation. The Oily Press, Dundee, UK, 1998, pp. 13-22, 55-72.
- Frega N., Bocci, F. & Lercker, G. Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1992**, 69, 447-455.
- Frega, N., Bocci, F. & Lercker, G. High resolution GC determination of diacylglycerols in common vegetable oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1993**, 70, 175-177.
- Frega, N., Mozzon, M. & Lercker, G. () Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1999**, 76, 325-329.
- Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J. & Salvador, M.D. Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2006**, 108, 134–142.

- Galanos, D.S. & Kapoulas, V.M. Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *Journal of Lipid Research*, **1962**, 3, 134.
- Garcia, A., Brenes, M., Martinez, F., Alba, J., García, P. & Garrido, A HPLC Evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2001**, 78, 625-629.
- Gardner, H.W. How the lipoxygenase pathway affects the organoleptic properties of fresh fruit and vegetables. In: *Flavor chemistry of lipid foods*. (Eds: Min, D.B. & Smouse T.H.). AOCS Press. Champaign, Illinois. 1989, pp: 98-103.
- Garrido Fernandez, A., Fernandez Diez, M.J. & Adams, M.R. Table olives. Production and processing. Chapman & Hall, London, UK, 1997, pp. 12-13, 100-101, 187-189.
- Georgalaki, M.D., Bachmann, A., Sotiroudis, T.G, Xenakis, A., Porzel, A. & Feussner, I. Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Fett/Lipid*, **1998b**, 100, 554-560.
- Georgalaki, M.D., Sotiroudis, T.G. & Xenakis, A. The presence of oxidizing activities in virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1998a**, 75, 155-159
- Ghisalberti, E. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. *Phytomedicine*, **1998**, 5, 147-149
- Gordon, M.H. Measuring antioxidant activity. In *Antioxidants in Food*. Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2001, Ch. 4, pp. 71-84.
- Goupy, P., Fleuriet, A., Amiot, M.J. & Macheix, J.J. Enzymatic browning, oleuropein content and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1991**, 39, 92-95.
- Grob, K., Lanfranchi, M., & Mariani, C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1990**, 67, 626-634.
- Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1981**, 58, 966-968.
- Gutierrez Rosales, F. & Arnaud, T. Contribution of polyphenols on the oxidative stability of virgin olive oil. *24th World Congress ISF Berlin, Proceedings 2001*, pp. 61-62,
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, A. & Albi, M.A. Effect of olive ripeness on the

- oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **1999**, *47*, 121-127.
- Hadorn, H. & Zürcher, K. Zur bestimmung der oxydationsstabilitat von olen und fetten. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **1974**, *70*, 57-65.
- Hall III, C. & Cuppett, S. The effects of bleached and unbleached rosemary oleoresins on light-sensitized oxidation of soybean oil. *Journal of Ameican Oil Chemists Society*, **1993**, *70*, 477-482.
- Hidalgo, F., Alaiz, M. & Zamora, R. Determination of peptides and proteins in fats and oils. *Analytical Chemistry*, **2001**, *73*, 698-702
- Hidalgo, F., Alaiz, M. & Zamora, R. Low molecule weight polypeptides in virgin and refined olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2002**, *79*, 685-689.
- Huang, A.H.C. (1992). Oil bodies and oleosins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **1992**, *43*, 177-200.
- Huang, A.H.C. Evolution of oleosins, in: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, (Eds. Williams, J.P., Khan, M.U., & Lem, N.W.), Dordrecht, Netherlands, 1997, pp. 292–294.
- Huang, A.H.C. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology*, **1996**, *110*, 1055-1061.
- Hudson, B J. & Ghovami, F.M. Phospholipids as antioxidants synergists for tocopherols in the autoxidation of edible oils. *Lebensmittel Wissenschaft & Technologie*, **1984**, *17*, 191-194.
- Hurley, J. The tree, the olive, the oil in the old and new world. Trustee Albany College of pharmacy, Trustee of Ray Rock, Tubercular Sanitarium Member State of Pharmacy. 1919.
- IOOC (International Olive Oil Council), Document *No 6*, Madrid, Spain, 1984.
- IOOC. Trade standards applying to olive oil and olive pomace oil”. COI/T.15/NC, no 3/Rev.1./5.December 2003, International Olive oil Council, Madrid, Spain, 2003.
- IUPAC. Determination of the phospholipid profile of lecithins by high performance liquid chromatography. *Pure & Applied Chemistry*, **1992**, *64*, 447-454.
- IUPAC. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 2.501, 2.505 7<sup>th</sup> edition., Paquot, C. & Haufenne, A. (Eds.). International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK, 1987.

- Jay, M.J, Loessner, M.J. & Golden, D.A. Modern Food Microbiology (7h ed.). Food Science Texts Series, Plenum, USA, 2000, Ch. 3, pp. 39-60.
- Jiménez, M S., Velarte, R. & Castillo, J.R. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. *Food Chemistry*, **2007**, *100*, 8–14.
- Kashima, M., Cha, G., Isoda, Y., Hirano, J. & Miyazawa, T. The antioxidant effects of phospholipids on Perilla oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1991**, *68*, 119-122.
- Katan, M.B. Fish & Heart Disease *New England Journal of Medicine*, **1995**. *332*, 1024-1025.
- Keceli, T. & Robinson, R.K. Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft*, **2002**, *55*, 436-440.
- Kengen, S., Luesink, E.J., Stams, A.J., & Zehnder, A.J. Purification and characterization of an extremely stable *b*-glucosidase from the hyperthermophylic archaenon *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry*, **1993**, *213*, 305– 312.
- Keys, A. Mediterranean Diet and Public Health: Personal Reflections. *American Journal of Clinical Nutrition*, **1995**, *61*, 1321S-1323S.
- Kiosseoglou, V. & Kouzounas, P. The role of diglycerides, monoglyceridies and free fatty acids in olive oil minor surface-active lipid interaction with proteins at oil-water interfaces. *Journal of DisperSIon Science and Technology*, **1993**, *14*, 527-539.
- Kiritsakis, A. K. (ed). Olive oil from the tree to the table 2<sup>nd</sup> ed.: Food and Nutrition Press Inc, Trumbull Connecticut, USA, 1998, pp. 1-348.
- Klurferd D.M. & Kritchevsky, D. Isolation and quantification of lectins from vegetable oils. *Lipids*, **1987**, *22*, 667-668.
- Kohyama, N., Nagata, T., Fujimoto, S. & Sekiya, K. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol, a phenolic compound from olives. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, **1997**, *61*, 347-350.
- Kubo, A., Lunde, C.S. & Kubo, I. Antimicrobial activity of the olive oil flavour compounds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1995**, *43*, 1629-1633.

- La Tienda.com - Extra virgin olive oil from Spain, [www.tienda.com/food/olive\\_oil.html](http://www.tienda.com/food/olive_oil.html) (accessed 30-10-2007). New York, USA.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685.
- Läubli, M.W. & Bruttel, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the Active Oxygen Method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1986**, 63, 792-795.
- Lercker, G., Frega, N., Bocci, F. & Servidio G. “Veiled” extra-virgin olive oils: dispeRSIon response related to oil stability. *Journal of American Oil Chemists Society* **1994**, 71, 657-658.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, V.F., Marques, J.F., Peinado, J. M. & Spence-Martins, L. Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters of Applied Microbiology*, **1992**, 14, 273– 279.
- Mc Murry, J. Οργανική Χημεία, Τομος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης., Ηράκλειο. 1998.
- Medina, E., De Castro, A., Romero, C. & Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *Applied Chemistry*, **2006**, 54, 4954-4961.
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M & De Castro, A. Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, **2007**, 70, 1194-1199.
- Meneses, P. & Glonek, T. High resolution <sup>31</sup>P NMR of extracted phospholipids. *Journal of Lipid Research*, **1988**, 29, 679-689.
- Meneses, P., Para, P.F., & Glonek, T. <sup>31</sup>P NMR of tissue phospholipids: a comparison of three tissue pre-treatment procedures. *Journal of Lipid Research* **1989**, 30, 458-461.
- Miró-Casas, E., Covas, M.I., Fito, M., Farré Albadalejo, M., Marrugat, J. & De la Torre, R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal Clinical Nutrition*, **2003**, 57, 186-190,
- Miró-Casas, E., Farré Albaladejo, M., Covas M.I., Rodriguez, J.O., Menoyo Colomer, E., Lamuela Raventós, R.M. & de la Torre, R. Capillary gas chromatography-

- mass spectrometry quantitative determination of hydroxy-tyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Analytical Biochemistry*, **2001**, *294*: 63-72.
- Moberger, L. Contributions at a Lipid Forum/ Sik Symposium In: *Lipid Oxidation-Biological and Food Chemical Aspects*. Marcuse, R. (Ed.), Scandinavian Forum for Lipid Research and Technology, Gotenborg, Sweden, 1986, pp.114.
- Montedoro, G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., & Macchioni A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1993**, *41*, 2228-2234.
- Morales, M., Luna, G. & Aparicio, R. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, **2005**, *91*, 293-301,
- Morales, M.T. & Przybylski, R. *Olive Oil Oxidation*. In: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Harwood, J. & Aparicio, R. (eds). Gaithersburg, Maryland, Aspen Publ. Inc, 2000, pp. 459-485.
- Morales, M.T., Angerosa, F. & Aparicio, R. Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites*, **1999**, *50*, 114-121.
- Morales, M.T., Aparicio R. & Calvente, J.J. Influence of Olive Ripeness on the Concentration of Green Aroma Compounds in Virgin Olive Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, **1996**, *11*, 171-178.
- Morchio, G., De Anreis, R. & Fedeli, E. Investigations of total sterols content in the olive oil and their variation during refining process. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1987**, *64*, 185-192.
- Morello, J., Romero M. & Motilva. M. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from arbequina, farga, and morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, *52*, 6002-6009,
- Murphy, D. J. & Cummins, I. Purification and immunogold. Localisation of the major oil body membrane protein of oilseed rape. *Plant Science*, **1989**, *60*, 47-54.
- Murphy, D. J., Sarmiento, C., Ross, J.H.E. & Herman, E. Oleosins: their subcellular targeting and role in oil-body ontogeny. In: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. Williams, J.P., Khan, M.U. & Lem (Eds.) Kluwer Academic Pub., The Nederland, 1997, pp. 289-291.
- Murphy, D.J. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progressive Lipid Research*, **1993**, *32*, 247-280.

- Napier, J.A., Stobart, A.K. & Shewry, P.R. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Molecular Biology*, **1996**, *31*, 945–956.
- Neal Burnette, W. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry*, **1981**, *112*, 195-203.
- Ninfali, P., Aluigi, G., Bacchiocca, M. & Magnani, M. Antioxidant capacity of extra virgin olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2001**, *78*, 243-247.
- Noguchi, N. & Niki, E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. Papas M.A (Ed.). CRC Press, USA, 1999, pp. 1-19.
- Nomikos, T., Karantonis, H.C., Fragopoulou, E. & Demopoulos, C.A. One-Step Separation System for the Main Phospholipids, Glycolipids and Phenolics by Normal Phase HPLC. Application to Polar Lipid Extracts from Olive and Sunflower Oils. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2002**, *25*, 137–149.
- Olías, J., Pérez, A. Ríos, J. & Sanz, L.C. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1993**, *41*, 2368-2373,
- Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B. & Bartsch, H. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, **2000**, *46*, 976-988.
- Pacific Sun Olive Oil. <http://www.pacificsunoliveoil.com> (accessed 30-10-2007). California. USA.
- Pagliarini, E., Zanoni, B. & Giovanelli, G. Predictive study on Tuscan Extra virgin olive oil under several commercial conditions. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, **2000**, *48*, 1345-1351.
- Papadimitriou, V., Sotiroidis, T.G. & Xenakis, A. Olive oil microemulsions as a biomimetic medium for enzymatic studies: oxidation of oleuropein. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2005**, *82*, 335-340.
- Papadimitriou, V., Sotiroidis, T.G. & Xenakis, A. Olive oil microemulsions: enzymatic activities and structural characteristics. *Langmuir*, **2007**, *23*, 2071-2077.

- Papadopoulou, G. & Boskou, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1991**, *68*, 669-671.
- Paraskeuopoulou, A., Boskou, D. & Kiosseoglou, V. Stabilization of olive oil-lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chemistry*, **2005**, *90*, 627-634.
- Pardo, J.E., Pérez, J.I., Andrés, M. & Alvarruiz, A. Aplicación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) en la línea de elaboración de aceite de oliva virgín. *Grasas y Aceites*, **2002**, *5*, 309-318.
- Pérez-Camino, C. & Cert, A. Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1999**, *47*, 1558-1562.
- Perrin, J. Minor components and natural antioxidants of olives and olive oils. *Revue Française des Corps Gras*, **1992**, *39*, 25-32.
- Petrakis, C. Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines for virgin olive oil Production, *Grasas y Aceites*, **1994**, *45*, 53-54,
- Petrakis, C. Olive oil extraction. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. Boskou, D. (Ed.), 2<sup>nd</sup> Edition, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2006, pp. 191-223
- Petroni, A., Blasevich, M., Salami, M., Papini, N., Montedoro, G.F. & Galli, C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, **1995**, *78*, 151-160,
- Pietro DeMarco Importers Inc., <http://www.unfilteredoliveoil.com> (accessed 30-10-2007). New York, USA.
- Pokorny, J., Davidek, J. Vierecklova, M., Ranny, M. & Sedlacek, J. Effect of phosphorylated acylglycerols on the oxidative stability of edible oils. *Nahrung*, **1990**, *34*, 719-725.
- Pokorný, J., J. Korczak: Preparation of Natural Antioxidants. In: *Antioxidants in Food*. Pokorný, J., Yanishlieva, N. & Gordon M. (Eds), Woodhead Pub. Ltd., Cambridge, UK, 2001, pp. 323-324.
- Pokorný, J., Reblova, Z., Ranny, M., Kanova, J., Panek, J. & Davidek, J. Natural lecithins and phosphorylated acylglycerols as inhibitors of autoxidation of fats and oils. *Nahrung*, **1992**, *36*, 461-465.
- Polymerou Kamilakis, A. The culture of the olive tree (Mediterranean world). In: *Olive oil*. D. Boskou (Ed.), AOCS, Champaign Illinois, USA (2006) pp. 1-12.

- Porter, W.L. Recent trends in food applications of antioxidants. In: *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Simic M.G. & Karel, M. (Eds). Plenum Press, New York, USA, 1980, pp. 295.
- Psomiadou, E. & Tsimidou, M. On the role of squalene in olive oil stability. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1999**, *47*, 4025-4032.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence & levels. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **2001**, *41*, 640-647.
- Psomiadou, E., Karakostas, K.X., Blekas, G., Tsimidou, M.Z. & Boskou, D. Proposed parameters for monitoring quality of virgin olive oil (Koroneiki cv , **2003**, *105*, 403-408.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. & Boskou, D.  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2000**, *48*, 1770-1775.
- Ranalli, A. & Angerosa, F. Integral Centrifuges for Olive Oil Extraction: the qualitative characteristics of products. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1996**, *73*, 417-422.
- Ranalli, A., Modesti, G. Patumi, M. et al. The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar. *Food Chemistry*, **2000**, *69*, 37-46.
- Rao, C., Newmark, H. & Reddy, B. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*, **1998**, *19*, 287-290.
- Reiter, B. & Lorbeer, E. Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2001**, *78*, 881-888,
- Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M. & Fontanazza, G. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2002**, *50*, 835-839.
- Roca, A., Cabrera, C., Lorenzo, M.L., & Lopez, M.C. Levels of calcium, magnesium, manganese, zinc, selenium and chromium in olive oils produced in Andalusia. *Grasas y Aceites*, **2004**, *51*, 393-399.
- Ross, J.H.E., Sanchez, J., Millan, F. & Murphy, D.J. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea Americana*). *Plant Science*, **1993**, *93*, 203-210.

- Sacchi, R. Della Medaglia, D., Spagna Musso, S. & Addeo, F. Effecto della filtrazione sulla composizione polifenolica degli oli vergini di oliva. 2<sup>o</sup> congresso nazionale de Chimica Degli Alimenti. Giardini Naxos, Italy, 24-27 March 1995, vol I, p.98.
- Sacchi, R., Patumi, M., Fontanazza, G., Barone, P., Fiordiponti, P., Mannina, L., Rossi, E. & Serge, A.L. A high-field <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance study of the minor components in virgin olive oils. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1996**, 73, 747-758.
- Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of Virgin Oil. An Overview. *Magneti Resonance Chemistry*. **1997**, 35, S133-S145.
- Salas, J. & Sánchez, J. The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperatures is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1999**, 47, 809-812.
- Salvador, M.D., Aranda, F. & Fregapane, G. Contribution of chemical components of Cornicabra virgin olive oils to oxidative stability. A study of three successive crop seasons. *Journal of American Oil Chemists Society*, **1999**, 76, 427- 432.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Gómez Alonso, S., Fregapane, G. Influence of extraction system, production year and area on the Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 2003, **80**: 359-366.
- Sánchez-Saez, J., Herce Garraleta, M. & Balea Otero, T. Identifcation of cinnamic acid ethyl ester and 4-vinylphenol in off-flavor olive oils. *Analytica Chimica Acta*, **1991**, 247, 295-297.
- Sanders, J.K.M. & Hunter, B.K. Modern NMR Spectroscopy: a guide for chemists, 2<sup>nd</sup> Ed., , Oxford University Press, New York, 1994.
- Schägger, H., von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Analytical Biochemistry*, **1987**, 166, 368-379.
- Servili, M. & Montedoro, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2002**, 104, 602-613.
- Shahidi, F. Food applications of natural antioxidants. In: *Advances in Oils and Fats, Antioxidants, and Oilseed By-Products. Vol. II*. Koseoglou, S.S., Rhee, K.C. & Wilson, R.F. (Eds.). AOCS Press. Champaign, Illinois, USA, 1998, pp. 241-245.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrated and antioxidants by means of Folin-

- Ciocalteau reagent. In: *Methods of Enzymology, Vol 299*, Academic Press, London, UK, pp 152-178.
- Skaltsounis, L. Process development for an integrated olive oil mill waste management recovering natural antioxidants and producing organic fertilizer, life ENV/GR/000671, **2004**.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002.
- Sørensen, B.K., Højrup, P. Østergård, E., Jørgensen, C.S., Enghild, J. Ryder, L.R. & Houen, G. Silver staining of proteins on electroblotting membranes and intensification of silver staining of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **2002**, *304*, 33-41.
- Sotirhos, N., Herslof, B. & Kenne, L. Quantitative analysis of phospholipids by <sup>31</sup>P-NMR. *Journal of Lipid Research*, **1986**, *27*, 386-392.
- Sotiroudis, T.G., Sotiroudis, G.T., Varkas, N. & Xenakis, A. The role of endogenous amphiphiles on the stability of virgin olive oil-in-water emulsions. *Journal of American Oil Chemists Society*, **2005**, *82*, 415-420.
- Spatoli, P. Free and lipoprotein – bound phospholipids in olive and seeds oils. *Industrial Agricultural*, **1972**, *10*, 264-249.
- Spencer, A.V., Russel, Y.C., Gaffney, M.S, Goulding, P.N., Magnolato, D., Lilley, T.H. & Haslam, E. Polyphenol complexation – some thoughts and observation. *Phytochemistry*, **1988**, *27*, 2397-2409.
- Spyros, A. & Dais, P. Application of <sup>31</sup>p NMR spectroscopy in food analysis. 1. quantitative determination of the mono and diglyceride composition of olive oils. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2000**, *48*, 802-804.
- Stratford, M. Food and beverage spoiling yeasts. In: *The Yeast Handbook*. Querol, A. & Fleet, G.H. (eds.), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany, 2006, ch. 11, pp. 335-379.
- Stratford, M., Hofman, P.D. & Cole, M.B. Fruit juices, fruit drinks and soft drinks. In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Lund, B.M. (ed.). Aspen Publishers, ...,2000, pp. 836-869.
- Tovar, M., Motilva, M. & Romero, M. Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europae* L. cv. Arbequina) grown under linear

- irrigation strategies. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2001**, *41*, 5502-5508.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. & Trichopoulos, D. Adherence to a mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*, **2003**, *348*: 2599-2608.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P. & Papas, A. Mediterranean diet. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. Papas, A.M. (ed.), CRC Press, USA, 1999, pp: 112-117.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H. & Trichopoulos, D. Cancer and mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **2000**, *9*, 869-873.
- Trichopoulou, A., Orfanos, P., Bueno-de-Mesquita, B. Norat, T., Ocké, M.C., *et al.* modified mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *British Medical Journal*, **2005**, *330*, 991.
- Tsimidou, M. Olive oil quality. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. D. Boskou (Ed.), 2<sup>nd</sup> Edition, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2006, pp. 93-111.
- Tsimidou, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, **1998**, *10*, 99-116.
- Tsimidou, M., Blekas, G. & Boskou, D. Olive Oil. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, St. Luis, USA, 2003. pp. 4252-4259.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G. & Boskou, D. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, **1992**, *44*, 52-60.
- Tzen, J., Lai, G., Chan, K. & Huang, A.H.C. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiology*, **1990**, *94*, 1282-1289.
- Vaglimigli, L., Sanjust, E., Curreli, N., Rinaldi, A. & Rescigno, A. Photometric assay for polyphenols oxidase activity in olive, olive pastes, and virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2001**, *78*, 1245-1248.
- Valavanidis, A., C. Nisiotou, Y. Papageorgiou, Kremli, I., Satravelas, N., Zinieris, N. & Zygalki, H. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after

- thermal treatment. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2004**, *52*, 2358-2365.
- Velasco, J. & Dobarganes, C. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science & Technology*, **2002**, *104*, 661-667.
- Visioli, F., Bogani, P. & Galli, C. Healthful properties of olive oil minor components. . In: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. D. Boskou (Ed.), 2<sup>nd</sup> Ed., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 2006, pp. 173-190.
- Visioli, F., & Galli, C. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Science*, 1994, *55*, 1965-1971.
- Visioli, F., Bellomo, G. & Galli, C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, **1998**, *247*, 60-64.
- Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, G. & C Galli. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, **1995**, *117*, 25-32.
- Visioli, F., Bogani, P., Grande, S. & Galli, C. Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites*, **2004**, *55*, 66-75
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli G. & Galli C. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. *Free Radical Research*, **2001**, *34*, 301-305.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Galli, G. & Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, **2000**, *468*, 159-160.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F.F. & Galli, C. Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **1999**, *47*, 3397-3401.
- Vitagliano, M. I costituenti minori degli oli vegetali. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **1961**, *35* 46-55.
- Walstra, P. Formation of emulsions. Becher, Encyclopedia of emulsion technology (vol 1), Marcel Dekker Inc, New York, USA, 1983, pp 57-128.
- Wan J.P. Accelerated stability methods. In: *Methods to Assess Quality & Stability of Oils & Fat-Containing Foods*. Warner, K. & Eskin, M (eds.). AOCS Press. Champaign, Illinois, USA, 1995, pp. 179-183.

- Williams, M., Salas, J.J. Sanchez, J. & Harwood, J.L. Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*, **2000**, 53, 13-19.
- Witztum, J.L. & Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends of Cardiovascular Medicine*, **2001**, 11, 93-102.
- Yanishlieva, N.V. (2001). Inhibiting oxidation In: *Antioxidants in Food, Practical Applications*. Pocorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. (eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, UK, pp. 22-70.
- Yuki, E. Morimoto, K., Ishikawa, Y, Noguchi, H. Inhibition effect of lecithin on the thermal oxidation of tocopherols. *Journal of Japan Oil Chemists Society*, **1980**, 27, 4525-4539.
- Zamora, R., Alaiz, M. & Hidalgo F.J. Influence of cultivar & fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition & antioxidant activity. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **2001**, 49, 4267-4270.
- Zampounis, V. (2006). Olive Oil in the World Market. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology* D. Boskou (Ed.), 2<sup>nd</sup> Edition, AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, pp. 21-40
- Zolman, J. F. Biostatistics: Experimental Design and Statistical Inference. Oxford University Press, New York, USA, 1993.
- Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο. Απόφαση Αριθμός 172/95, ΦΕΚ 661/95 Τ.β. Εφημερίδα της Κυβερνήσεως.
- Βογιατζή, Κ. Απομόνωση και προσδιορισμός φωσφολιπιδίων στο θολό και διηθημένο ελαιόλαδο. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ., Διπλωματική εργασία Θεσσαλονίκη, 2006, σελ. 1-52.
- Γεωργαλάκη, Μ. Ενζυμικές δράσεις στις ελιές και το ελαιόλαδο. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Διδακτορική διατριβή, Αθήνα, 1999, σελ. 1-233
- Γεωργίου Α. Παρθένο ελαιόλαδο πλούσιο σε πολυφαινόλες – Σταθερότητα και συνθήκες που επηρεάζουν τη σύσταση σε πολυφαινόλες στο στάδιο πριν την εμφιάλωση. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ., Μεταπτυχιακή εργασία, Θεσσαλονίκη, 2000, σελ 1-68.
- Δρούγκας Α. Διερεύνηση των πρωτεϊνών του μεσοκαρπίου της εδώδιμης και ακατέργαστης ελιάς. Διπλωματική εργασία. Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Χημείας, Θεσσαλονίκη, 2006. σελ. 1-60.

- Εγκυκλοπαίδεια της Ελαιίας, Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου, Travessera de Gracia 47-49, Βαρκελώνη, Ισπανία, 1996.
- Κυριτσάκης Α.Κ. (2007). Ελαιόλαδο:συμβατικό & βιολογικό, βρώσιμη ελιά και πάστα ελιάς, 4<sup>η</sup> έκδοση. Αγρότυπος Α.Ε., Θεσσαλονίκη, 2007.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών Κεφ. VIII, Εδώδιμα Λίπη & Έλαια (Γενικό Χημείο του Κράτους. 1992). Άρθρο 71, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα 1995.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών Κεφ. VIII, Εδώδιμα Λίπη & Έλαια (Γενικό Χημείο του Κράτους. 1995). Άρθρο 71, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα, 1996
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών Κεφ. VIII, Εδώδιμα Λίπη & Έλαια (Γενικό Χημείο του Κράτους. 2004). Άρθρο 71, Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα, 2004
- Μπαλατσούρας Δ.Γ. (1986α). Σύγχρονη ελαιοκομία. Τόμος πρώτος: το ελαιόδενδρο. Αθήνα.
- Μπαλατσούρας Δ.Γ. (1986β). Ελαιόλαδο, σπορέλαια, λίπη. Εκδόσεις Καραμπερόπουλος Α.Ε. Αθήνα.
- Μπάτζιος Χ. (1999). Στατιστική (τεύχος Α'). Εφαρμοσμένη στατιστική στην Κτηνιατρική Εκπαίδευση. Σύγχρονη παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Παντίδου, Μ.Ε. Βασικές γνώσεις μυκητολογίας, Εκδόσεις Foto Offset, Αθήνα 1976. σελ. 23-85.
-

## **9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

---













