

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

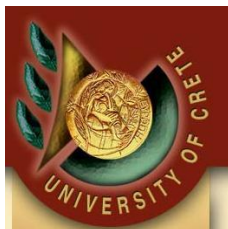
**ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

ΣΟΦΙΑ Α. ΠΑΥΛΙΔΟΥ

ΙΟΥΛΙΟΣ, 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



UNIVERSITY *of* CRETE

DEPARTMENT *of*
CHEMISTRY

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΒΙΟΕΝΕΡΓΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ**

ΣΟΦΙΑ Α. ΠΑΥΛΙΔΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΑΘ. ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ ΣΤΕΦΑΝΟΥ (Επιβλέπων)

ΚΑΘ. ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΒΕΡΒΕΡΙΔΗΣ

ΚΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΤΣΑΡΑΚΗΣ

ΙΟΥΛΙΟΣ, 2014

Εντοπισμός επιπέδων βιοενεργών ουσιών στο παρθένο ελαιόλαδο

**Η ΕΡΓΑΣΙΑ ΥΛΟΠΟΙΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ
ΓΕΩΠΟΝΩΝ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΚΡΗΤΗΣ**

*Στην οικογένειά μου που μου δίδαξε πως
Η αγάπη είναι ο μόνος τρόπος...
Στο Βασίλη που μου το επιβεβαίωσε
Στον Ιάσονα που μας πλημμύρισε από αγάπη!!!*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία, εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Τεχνολογίες Προστασίας Περιβάλλοντος» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας και τεχνολογίας τροφίμων του ΤΕΙ Κρήτης, με την επιστημονική υποστήριξη του εργαστηρίου Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή διατριβή μου, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή **κ. Ευριπίδη Στεφάνου**, καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, για την προθυμία του να αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας μου και για τις γνώσεις που μας μετέδωσε ως καθηγητής του μεταπτυχιακού προγράμματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον **κ. Φίλιππο Βερβερίδη**, καθηγητή του ΤΕΙ Κρήτης, για την υπόδειξη του θέματος της διατριβής, τις γνώσεις που απέκτησα δίπλα του, το χρόνο που διέθεσε, την ουσιαστική καθοδήγηση, τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και τις σωστές υποδείξεις του, αλλά και για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου παρείχε να εργαστώ στο εργαστήριό του στηρίζοντας υλικά την όλη προσπάθεια. Ευχαριστώ από καρδιάς τον **κ. Νικόλαο Κατσαράκη**, καθηγητή του ΤΕΙ Κρήτης, για το αμείωτο ενδιαφέρον του, την ηθική συμπαράσταση, τις ουσιαστικές συμβουλές του για τη διόρθωση του συγγράματος, τις πολύτιμες συζητήσεις μας αλλά και για τις γνώσεις που μας μετέδωσε ως καθηγητής του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Μάνο Τραντά, μεταδιδασκτορικό συνεργάτη του εργαστηρίου Βιοχημείας, για την ουσιαστική βοήθεια του, για τον χρόνο που διέθεσε όσες φορές χρειάστηκε, για την άψογη συνεργασία και την θετική του στάση. Είναι πραγματικά η ήρεμη δύναμη του εργαστηρίου! Ευχαριστώ και όλα τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και τη φιλική τους στάση.

Πολλά ευχαριστώ από καρδιάς στο Γιώργο, τον αγαπημένο μου φίλο και κουμπάρο που είναι πάντα δίπλα μου πρόθυμος να βοηθήσει σε οτιδήποτε τον χρειαστώ. Η βοήθεια του στην

παρούσα φάση ήταν ουσιαστική και πραγματικά ανεκτίμητη. Ευχαριστώ την μονάκριβη μου Σίσσυ, για την αγάπη και την συμπαράσταση της σε όλες τις δύσκολες περιόδους. Είμαι ευγνώμων στο σύζυγο μου Βασίλη που ό,τι και να γράψω δεν περιγράφει τη θυσία, την αγάπη, την υπομονή, τη συμπαράσταση, σε μια περίοδο που ταυτόχρονα με την εργασία αυτή, ήρθε στη ζωή ο γιός μας. Τον ευχαριστώ για όλα αυτά, μα περισσότερο γιατί με τη στήριξή του κατάφερα να ολοκληρώσω τη διατριβή και να παραμείνω μια ήρεμη μητέρα. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για όλα αυτά που με κάνουν να είμαι υπερήφανη που είναι οι δικοί μου γονείς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	IV
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	VI
ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	IX
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	X
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XIV
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	XV
ABSTRACT	XVII
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΛΙΓΑ ΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΙΑ.....	1
1.2 Ο ΕΛΑΙΟΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΣ ΚΛΑΔΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΜΕΣΟΓΕΙΟ	2
1.2.1 ΜΟΝΑΔΕΣ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	6
1.3 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	6
1.3.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	7
1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	9
1.4.1 ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	11
1.4.2 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	11
1.5 ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	13
1.5.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	13
1.5.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΦΑΙΝΟΛΩΝ	14
1.5.2.1 ΕΛΕΥΡΩΠΑΙΝΗ	14
1.5.2.2 ΤΥΡΟΣΟΛΗ - ΥΔΡΟΕΥΤΥΡΟΣΟΛΗ	19
1.5.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ – ΔΡΑΣΗ ΦΑΙΝΟΛΩΝ	20
1.5.3.1 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΦΑΙΝΟΛΩΝ.	22
1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	24

1.6.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	24
1.6.2	ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	25
1.7	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	27
1.7.1	ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ.....	27
1.7.2	ΤΥΠΟΙ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ.....	28
1.7.2.1	ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ ΜΕ ΜΥΛΟΠΕΤΡΕΣ–ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
1.7.2.1.1	ΠΑΡΑΛΑΒΗ, ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ ΚΑΙ ΠΛΥΣΙΜΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.....	28
1.7.2.1.2	ΑΛΕΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.....	28
1.7.2.1.3	ΜΑΛΑΞΗ ΕΛΑΙΟΖΥΜΗΣ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.....	29
1.7.2.1.4	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.....	31
1.7.2.2	ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ-ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32
1.7.2.2.1	ΠΑΡΑΛΑΒΗ, ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ ΚΑΙ ΠΛΥΣΙΜΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΕ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	32
1.7.2.2.2	ΑΛΕΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΕ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	35
1.7.2.2.3	ΜΑΛΑΞΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΕ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	35
1.7.2.2.4	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΣΕ ΔΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	36
1.7.2.3	ΕΛΑΙΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΓΚΡΟΤΗΜΑ ΤΡΙΩΝ ΦΑΣΕΩΝ-ΣΤΑΔΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	37
1.7.2.3.1	ΠΑΡΑΛΑΒΗ, ΑΠΟΦΥΛΛΩΣΗ ΚΑΙ ΠΛΥΣΙΜΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	37
1.7.2.3.2	ΑΛΕΣΗ ΣΕ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	38
1.7.2.3.3	ΜΑΛΑΞΗ ΕΛΑΙΟΖΥΜΗΣ ΣΕ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	39
1.7.2.3.4	ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ ΣΕ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	40
1.7.2.3.4.1	ΟΡΙΖΟΝΤΙΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ (TRICANTER) ΣΕ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	40
1.7.2.3.4.2	ΚΑΘΕΤΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΡΑΣ ΣΕ ΤΡΙΦΑΣΙΚΟ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟ.....	41
1.8	ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	42
1.8.1	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ.....	44
1.8.2	ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ.....	44
1.9	ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ - ΑΠΟΒΛΗΤΑ.....	45
1.9.1	ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ.....	45

1.9.2 ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ- ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	47
1.9.2.1 ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ- ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	48
1.10 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	53
2 ΥΛΙΚΑ	54
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ	54
2.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	55
2.2.1 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.....	55
2.2.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ.....	55
2.2.3 ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ (ΡΗΤΙΝΗ ΧΑΔ-7)	55
2.3 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	56
3 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	57
3.1.1 ΤΡΙΧΟΕΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (CAPILLARY ELECTROPHORESIS, CE).....	58
3.1.1.1 ΣΥΣΚΕΥΗ AGILENT G1600AX	59
3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	61
3.2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΗΛΗΣ.....	61
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	62
4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ.....	62
4.1.1 ΚΟΡΥΦΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	63
4.1.2 ΚΟΡΥΦΕΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	64
4.1.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΩΝ	67
5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ.....	79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	81

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

<u>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ</u>	<u>ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ</u>
HT	Hydroxytyrosol
T	Tyrosol
OL	Oleuropein
LOX	Lipoxygenase
COX	Cyclooxygenase
3,4-DHPEA-EDA	3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
EC50	Half maximal effective concentration
TAA-ABTS	Total antioxidant activities by ABTS
LTB4	Leukotriene B4
TXB2	Thromboxane B2
ROS	Reactive oxygen species
LDL	Low – density lipoprotein
HDL	High – density lipoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
DAD	Diode array detector
EVOO	Extra virgin olive oil
IS	Internal standard
MeOH	Methanol
NaOH	Sodium hydroxide

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Παραγωγή ελαιολάδου (σε 1000tn) στην Ελλάδα για την χρονική περίοδο 2003-2013

Εικόνα 2: Παραγωγή ελαιολάδου στην Ευρώπη (σε 1000tn) για τα έτη 2003-2013

Εικόνα 3: Κατανάλωση ελαιολάδου στην Ευρώπη για τα έτη 2003-2013

Εικόνα 4: Δομή και σύνθεση τριγλυκεριδίου

Εικόνα 5: Α. Χημική δομή του μορίου της ελευρωπαϊνης και Β. Χημική δομή του μορίου του λιγκστροζίτη

Εικόνα 6: Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι ελευρωπαϊνης

Εικόνα 7: Α. Βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής ελευρωπαϊνης στην Ο. Euroraea Β. Πιθανό Βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής των κύριων δευτερογενών ενώσεων στην Ο. Euroraea

Εικόνα 8: Α. Υδρολυτικές αντιδράσεις ελευρωπαϊνης Β. Χημικές δομές παραγώγων σεκοϊριδοειδών και φαινολικών αλκοολών στην ελιά και στο ελαιόλαδο

Εικόνα 9: Α. Χημική δομή του μορίου της τυροσόλης και γενικά χαρακτηριστικά αυτού Β. Χημική δομή του μορίου της υδροξυτυροσόλης και γενικά χαρακτηριστικά αυτού

Εικόνα 10: Ομάδα κατεχόλης της υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 11: Μυλόπετρες ελαιοτριβείου παραδοσιακού τύπου με διαδικασία αυτοματοποιημένου ελέγχου

Εικόνα 12: Πρέσες υψηλής πίεσης για τον διαχωρισμό του ελαιολάδου με χαρακτηριστικά ελαιόπανα

Εικόνα 13: Τελικός διαχωρισμός α) ελαιολάδου και β) κασίγαρου σε παραδοσιακό ελαιοτριβείο

Εικόνα 14: Εσωτερικός χώρος στον οποίο διακρίνονται οι μονάδες παραγωγής και το σύστημα αποφύλλωσης και πλυσίματος του καρπού σε διφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 15: Αποφυλλωτήριο σε διφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 16: Πλύσιμο ελαιόκαρπου σε διφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 17: Εσωτερικός χώρος διφασικού ελαιοτριβείου

Εικόνα 18: Εσωτερικός χώρος μαλακτήρα

Εικόνα 19: Τελικός διαχωρισμός ελαιολάδου σε διφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 20: Απόνερα τελικής διαδικασίας σε διφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 21: Σακιά με ελαιόκαρπο στον χώρο παραλαβής τριφασικού ελαιοτριβείου

Εικόνα 22: Πλύσιμο ελαιόκαρπου σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 23: Εσωτερικός χώρος τριφασικού ελαιοτριβείου πριν την μάλαξη

Εικόνα 24: Μάλαξη ελαιοζύμης τριφασικού συστήματος ελαιοποίησης

Εικόνα 25: Παραλαβή ελαιολάδου με φυτικά υγρά και κατσίγαρος από οριζόντιο διαχωριστήρα σε τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης

Εικόνα 26: Παραλαβή ελαιολάδου μετά τον κάθετο διαχωριστήρα σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Εικόνα 27: Μετανάστευση διαφορετικών μορίων στο διάλυμα μέσω ηλεκτρο-οσμωτικής ροής (Agilent, CE Primer.)

Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού συσκευής (Agilent, CE Description.)

Εικόνα 29: Κορυφή πρότυπης ουσίας υδροξυτυροσόλης στα 11.562 min

Εικόνα 30: Κορυφή πρότυπης ουσίας τυροσόλης στα 7.388min

Εικόνα 31: Κορυφή πρότυπης ουσίας ελευρωπαϊνης στα 9.45 min

Εικόνα 32: Χαρακτηριστικό Φάσμα (HT) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 210 nm

Εικόνα 33: Χαρακτηριστικό Φάσμα (T) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 220 nm

Εικόνα 34: Χαρακτηριστικό Φάσμα (OL) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 210 nm

Εικόνα 35: Ηλεκτροφερογράμματα (Electropherograms) που αφορούν Α) Δείγμα ελαιολάδου με κωδικό Δ17, Β) Κορυφή πρότυπης ουσίας υδροξυτυροσόλης στα 11.562 min

Εικόνα 36: Ηλεκτροφερογράμματα που αφορούν Α) Δείγμα ελαιολάδου με κωδικό Δ17, Β) Κορυφή πρότυπης ουσίας τυροσόλης στα 7.388 min

Εικόνα 37: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π5 με ταυτοποίηση κορυφών

τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στα 7.383 min και 11.650 min αντίστοιχα σε συνδυασμό με τα φάσματα τους

Εικόνα 38: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π26 με κορυφές τυροσόλης στα 7.379 min και υδροξυτυροσόλης στα 11.548 min και τα χαρακτηριστικά φάσματα αυτών

Εικόνα 39: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης και τα φάσματα αυτών

Εικόνα 40: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π22 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 41: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ5 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 42: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ26 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 43: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλη

Εικόνα 44: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ22 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 45: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T5 με κορυφή τυροσόλης και ταυτοποίηση μέσω του φάσματος της

Εικόνα 46: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T26 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 47: α) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος πρώτου ανεπεξέργαστου ελαιολάδου T17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης β) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος τελικού ελαιολάδου T17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Εικόνα 48: α) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T22 με κορυφή τυροσόλης στα 7.379 min β) Κορυφή τυροσόλης του δείγματος T22, με προσθήκη πρότυπης ουσίας τυροσόλης

Εικόνα 49: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)) στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^H περίοδος :5/11, 2^H περίοδος: 26/11, 3^H περίοδος: 17/12, 4^H περίοδος: 22/01) για το παραδοσιακό σύστημα ελαιοποίησης

Εικόνα 50: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)) στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^Hπερίοδος :5/11, 2^H περίοδος: 26/11, 3^H περίοδος: 17/12, 4^H περίοδος: 22/01) για το διφασικό σύστημα ελαιοποίησης

Εικόνα 51: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)) στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^Hπερίοδος :5/11, 2^H περίοδος: 26/11, 3^H περίοδος: 17/12, 4^H περίοδος: 22/01) για το τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης

Εικόνα 52: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)) στο αρχικό και στο τελικό ελαιόλαδο της 3ης περιόδου: 17/12, για το παραδοσιακό σύστημα ελαιοποίησης

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μέσος όρος παραγωγής ελαιολάδου των ετών 2007-2009

Πίνακας 2: Παγκόσμια κατανάλωση ελαιολάδου (σε 1000tn) για το χρονικό διάστημα 2003-2013

Πίνακας 3: Επί τοις εκατό περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα

Πίνακας 4: Συγκέντρωση μη γλυκεριδικών συστατικών παρθένου ελαιολάδου σε mg/Kgr

Πίνακας 5: Όρια διαφόρων χαρακτηριστικών του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου

Πίνακας 6: Παράμετροι σταθερότητας EVOO διαφορετικών ποικιλιών

Πίνακας 7: Σύγκριση χαρακτηριστικών αποβλήτων μεταξύ τριών διαφορετικών συστημάτων εξαγωγής ελαιολάδου

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων τριφασικού συστήματος

Πίνακας 9: Τιμές χαρακτηριστικών υγρών αποβλήτων παραδοσιακού και τριφασικού συστήματος παραλαβής ελαιολάδου

Πίνακας 10: Κωδικοποίηση των πειραματικών δειγμάτων της εργασίας αυτής με βάση τον τύπο του συστήματος εξαγωγής ελαιολάδου και την ημερομηνία λήψης των δειγμάτων.

Πίνακας 11: Ποσοτικά αποτελέσματα σε mg/Kgr βάρους νωπού καρπού τριών βιοενεργών ουσιών (HT, Y, OL) σε δείγματα ελαιολάδων από διαφορετικά συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου σε διαφορετικές χρονικές περιόδους

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην λεκάνη της Μεσογείου η ελιά (*Olea europaea* L.) αποτελεί τη βασική καλλιέργεια μέχρι σήμερα και το οικολογικό περιβάλλον της Χώρας μας είναι άριστο για την καλλιέργειά της. Το 23.5% του συνόλου των καλλιεργούμενων εκτάσεων στην Ελλάδα καλύπτεται από ελαιοκαλλιέργειες, με την περιοχή της Κρήτης να αριθμεί 33.000.000 ελαιόδεντρα και ετήσια παραγωγή ελαιολάδου έως 120.000 τόνους. Το ελαιόλαδο παραλαμβάνεται με φυσικές μεθόδους από τον καρπό και αποτελεί βασικό τρόφιμο της μεσογειακής διατροφής με ιδιαίτερη βιολογική αξία, που οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στα λιπαρά οξέα και τα αντιοξειδωτικά που περιέχει. Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν την ευεργετική δράση του ελαιολάδου στη μείωση της εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου, των καρδιακών παθήσεων, του καρκίνου του προστάτη και του παχέος εντέρου και πολλών ακόμη παθήσεων. Οι φαινολικές ενώσεις (χαρακτηρίζονται και βιοενεργές), αποτελούν μέρος των συστατικών του ελαιολάδου και συμβάλλουν στην οξειδωτική σταθερότητά του, προσδίδοντάς του σημαντικές ευεργετικές ιδιότητες. Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο δεν είναι σταθερή, καθώς εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ποικιλία, η ωριμότητα του καρπού, η περίοδος της συγκομιδής και της επεξεργασίας, η περιοχή της καλλιέργειας, οι χρησιμοποιούμενες καλλιεργητικές τεχνικές, οι πιθανές μολύνσεις από ζωικούς εχθρούς όπως ο δάκος (*Dacus olea*) αλλά και ο τρόπος παραλαβής του ελαιολάδου.

Στην παρούσα εργασία έγιναν προσπάθειες ανίχνευσης των επιπέδων τριών βιοενεργών ουσιών του ελαιολάδου, με παραλαβή του από τρεις διαφορετικούς τύπους ελαιοτριβείων. Τα ελαιοτριβεία βρίσκονται στην περιοχή του Κολυμβαρίου, που είναι η κυριότερη ελαιοκομική περιοχή των Χανίων στην οποία κυριαρχεί η κορωνέϊκη ποικιλία ελαιόδεντρου, με την παραγωγή του ελαιολάδου να ανέρχεται στους 12.000 τόνους ετησίως. Το πειραματικό πλάνο της εργασίας αυτής ήταν μέρος ερευνητικού έργου που χρηματοδοτήθηκε από ιδίους πόρους του εργαστηρίου Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του Γ.Ε.Ι. Κρήτης.

Από τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου, αυτά που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία ήταν η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη. Στόχος ήταν να

διαπιστωθεί ποιος τύπος ελαιοτριβείου είναι λιγότερο επιζήμιος στα επίπεδα της συγκέντρωσης των υπό εξέταση φαινολικών ενώσεων και πώς ο χρόνος συγκομιδής επηρεάζει τις συγκεντρώσεις τους και κατ' επέκταση την ποιότητα του ελαιολάδου

Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα ελαιολάδων από τρία ελαιοτριβεία που εφαρμόζουν διαφορετικά συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου, σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές, από την αρχή της περιόδου της συγκομιδής έως το τέλος αυτής, που οι ελαιόκαρποι βρίσκονται σε υπερώριμο στάδιο. Έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, τα δείγματα αναλύθηκαν σε σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων. Σε γενικό επίπεδο, το παραδοσιακό σύστημα με πίεση και το διαφασικό φυγοκεντρικό σύστημα έδειξαν υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Η ελευρωπαΐνη ήταν μη ανιχνεύσιμη σε όλα σχεδόν τα δείγματα, ενώ οι χαμηλότερες τιμές συγκεντρώσεων απλών φαινολών για όλους τους τύπους ελαιοποίησης πάρθηκαν τη τελευταία ημερομηνία συγκομιδής, όπου οι ελιές βρισκόταν σε στάδιο υψηλής ωρίμανσης.

ABSTRACT

The olive tree is the main cultivation in the Mediterranean basin from the antiquity until nowadays since the environmental and ecological profile of Greece is excellent for its growth. The 23.5% of the total cultivated areas in Greece is covered by olives while Crete possesses 33.000.000 olives with maximum annual olive oil production 120.000 tones. The olive oil is derived from the olive fruit with natural extraction methods and it is the main food of the Mediterranean diet with high biological value, mainly due to the fatty acids and antioxidants that are contained. Many scientific studies have shown the beneficial action of the olive oil to the occurrence reduction of the coronary disease, of the prostate cancer, of the large intestine cancer and many other illnesses. Phenolic compounds contained in olive oil contribute to its oxidative stability and assign it with important beneficial properties.

The concentration of the phenolic compound in olive oil is not fixed as it depends on many factors like, the variety, the fruit maturity, the harvesting and post-harvest processing period, the area of the orchard, the cultivating techniques, possible entomological enemies like *Dacus olea* and the olive oil extraction methods.

In this dissertation, efforts have been done to detect the levels of three different bioactive compounds of the olive oil, produced by three different types of olive mills. The olive mills are located in the region of Colymbari, which is the main olive oil production region of Chania. The Koroneiki is the dominant variety cultivated in this region with crops to produce more than 12.000 tons annually.

The phenolic compounds studied, were Hydroxytyrosol, Tyrosol and the Oleuropein. The aim of the study is to determine which olive mill type affects less detrimental the concentration levels of the studied phenolics and how the maturity stage affect their concentrations and consequently the final olive oil quality

For this purpose, olive oil samples were obtained from three different olive mills, which apply different systems of olive oil extraction, in four discrete timings, from the beginning of the collecting period until the end of it, thus the olive fruits are in advanced maturation stage. After the appropriate processing the samples were analyzed by Capillary Electrophoresis with diode array detection. Overall, the traditional pressure applied system and the two phase centrifugal

system, indicated higher values of Tyrosol and Hydroxytyrosol. The oleuropein was untraceable scarce in all the samples while the lowest concentration values of simple phenols for all the types of olive milling were obtained in the last date of collection, when the olive fruits were in advanced maturation stage.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Η τροφή σου να είναι το
φάρμακο σου και το φάρμακό σου να
είναι η τροφή σου.**

Ιπποκράτης

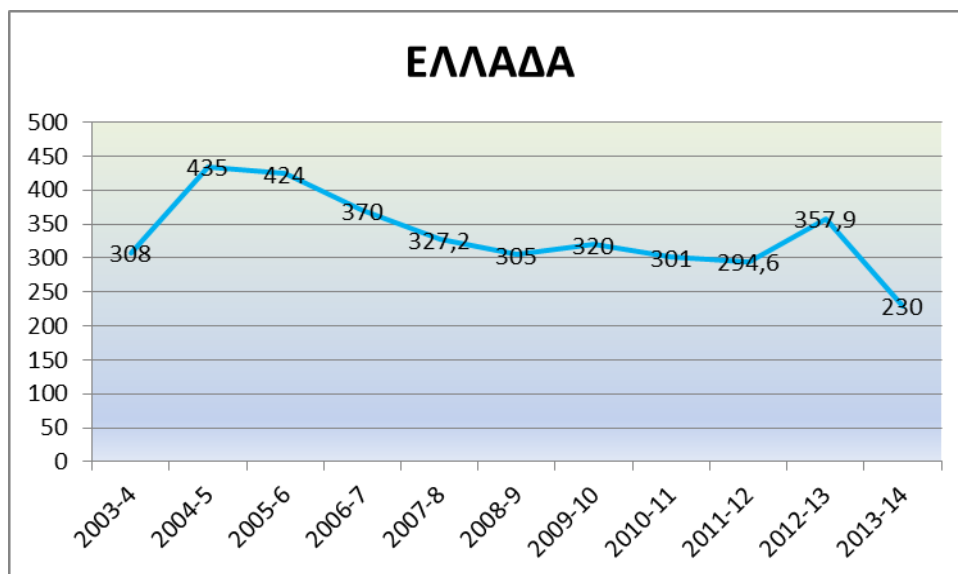
1.1 Λίγα λόγια για την ελιά

Το δέντρο της ελιάς αποτελεί μέρος της ενδημικής χλωρίδας της Μεσογείου και από Αρχαιοτάτων χρόνων εμφανίζεται σε μύθους, παραστάσεις, δοξασίες και στην ιστορία των λαών της. Ευρήματα της ελιάς από περιοχές της Ισπανίας, της Ιταλίας, της Μικράς Ασίας και της Ελλάδας έχουν καταγραφεί στην ιστορία. Σχετικά με την Χώρα καταγωγής της δεν υπάρχει ομόφωνη γνώμη των επιστημόνων. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με ιστορικές μελέτες και ευρήματα αρχαιολογικών ανασκαφών της Κνωσού, καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά από τον Μινωικό πολιτισμό περίπου πριν από 3.500 χρόνια, ενώ στον ευρύτερο χώρο της Μεσογείου από τα 4000 έτη π.Χ. (Ροκορνύ, 1997). Θεωρείται σύμβολο γνώσης, σοφίας, ειρήνης, ελπίδας και δύναμης. Πρόκειται για ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα δέντρα στον κόσμο με ιδιαίτερη σημασία, εφόσον διαχρονικά τα προϊόντα της αποτελούν δύο από τα βασικότερα είδη διατροφής του ανθρώπου. Η *Olea europaea* ανήκει στην οικογένεια *Oleaceae* και το είδος χωρίζεται σε δύο υποείδη. Το *Olea europaea sativa* που περιλαμβάνει τις ποικιλίες της καλλιεργούμενης ελιάς και το *Olea europaea oleaster* στο οποίο ανήκει η άγρια ελιά. Ειδικότερα στην Χώρα μας, αγριελιές απαντώνται από τις βουνοπλαγιές του Ολύμπου μέχρι τον Ψηλορείτη, αλλά και στα νησιά τόσο του Ιονίου όσο και του Αιγαίου πελάγους. Είναι δέντρο αειθαλές που ευδοκίμει σε ξηροθερμικές περιοχές, με δυνατότητα να παράγει καρπούς ακόμη και σε άγονα πετρώδη εδάφη. Η αντοχή του σε αντίξοες συνθήκες βοηθά στην μεγάλη

διάρκεια ζωής του δέντρου. Η ελιά αποτελεί μια από τις σημαντικότερες καλλιέργειες στην Χώρα μας από την αρχαιότητα έως σήμερα. Για τους Αρχαίους Έλληνες η ελαιοκαλλιέργεια ήταν πολύ σημαντική χρησιμοποιώντας τη φράση «Μέγιστον αγαθόν προς πάσαν του βίου θεραπείαν ο της ελαίας καρπός». Η καλλιέργεια της ελιάς καλύπτει περίπου 10 εκατομμύρια στρέμματα, από τα οποία τα 8.300.000 στρ. αφορούν έκταση καλλιεργούμενη με ελαιοποιήσιμες ελιές, με τον κύριο όγκο παραγωγής να εντοπίζεται στη Πελοπόννησο, την Κρήτη και τη Στερεά Ελλάδα, ενώ τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια δυναμική επέκταση σε πολλές άλλες περιοχές της χώρας (Πίνακας 2). Η Κρήτη και συγκεκριμένα ο νομός Ηρακλείου, έχει την μεγαλύτερη παραγωγή ελαιολάδου σε πανελλαδικό επίπεδο (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2013). Η Ελλάδα, με παραγωγή που διπλασιάστηκε τα τελευταία 40 χρόνια, είναι η τρίτη μεγαλύτερη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Ο αριθμός των ελαιόδεντρων στην Χώρα μας φτάνει τα 150.000.000, από τα οποία τα 122.000.000 προορίζονται για παραγωγή ελαιολάδου (ΥΠΑΑΤ, προσωπική επικοινωνία). Στην χώρα μας απασχολούνται με την ελαιοκαλλιέργεια περίπου 600.000 οικογένειες. Πρόκειται για μια καλλιέργεια μεγάλης οικονομικής και κοινωνικής σημασίας, με οφέλη στην εθνική μας οικονομία.

1.2 Ο ελαιοπαραγωγικός κλάδος στην Ελλάδα και στην Μεσόγειο

Το μέγεθος της εγχώριας παραγωγής παρουσιάζει διακυμάνσεις ανά έτος, καθώς εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε ελαιοκομική περίοδο στις ελαιοπαραγωγικές περιοχές της χώρας, όπως και από το γεγονός ότι το ελαιόδεντρο έχει την τάση να παρεννιαυτοφορεί, δηλαδή να καρποφορεί πλήρως τον ένα χρόνο ενώ τον επόμενο να έχει μειωμένη παραγωγή. Η παραγωγή του ελαιολάδου από το έτος 2003 έως σήμερα παρουσιάζει αυξομειώσεις, με την μέγιστη παραγωγή να σημειώνεται τα έτη 2004 και 2012 για την τελευταία δεκαετία, ενώ η χρονιά 2011-2012 αποτελεί την περίοδο με την χαμηλότερη παραγωγή (Εικόνα 1).



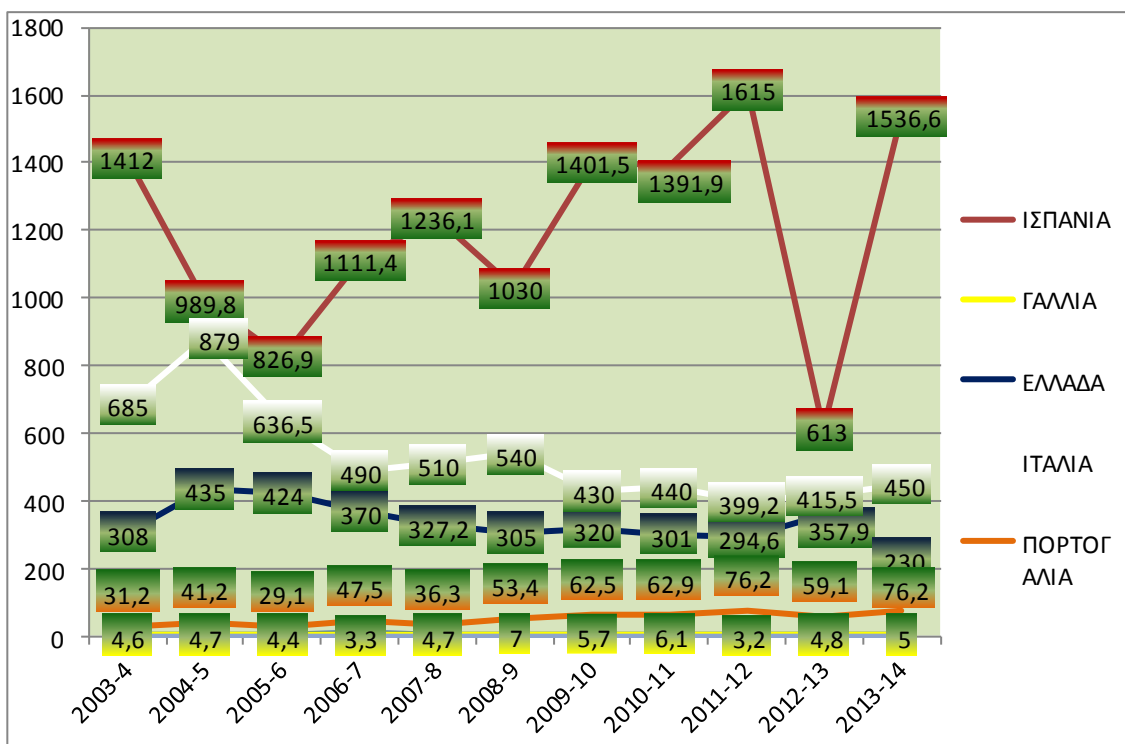
Εικόνα 1: Παραγωγή ελαιολάδου (σε 1000tn) στην Ελλάδα για την χρονική περίοδο 2003-2013 (ΙΟΟC,2013).

Στην Ευρώπη, κυρίαρχη ελαιοπαραγωγός χώρα είναι η Ισπανία, ακολουθεί η Ιταλία και έπεται η Ελλάδα. Η χρονιά 2011-2012 χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή για τη Χώρα μας, την Ιταλία και τη Γαλλία, σε αντίθεση με την Ισπανία και την Πορτογαλία που έχουν τη μέγιστη παραγωγή της τελευταίας δεκαετίας. Η Ισπανία, κατάφερε μέσα σε μια εξαετία (2005-2011) με εντατικοποίηση της καλλιέργειας του ελαιόδεντρου να διπλασιάσει την παραγωγή της (Εικόνα 2). Η Ιταλία, παρόλο που είναι η δεύτερη χώρα σε παραγωγή ελαιολάδου, δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες της εσωτερικής της αγοράς σε ελαιόλαδο, καθώς η κατανάλωσή του είναι περισσότερη από την παραγωγή του (Εικόνες 2,3). Στην Ελλάδα η κατανάλωση ελαιολάδου είναι πολύ μεγάλη, συγκρινόμενη τόσο με τις υπόλοιπες χώρες σε παγκόσμιο επίπεδο, όσο και με την παραγωγή που έχει.

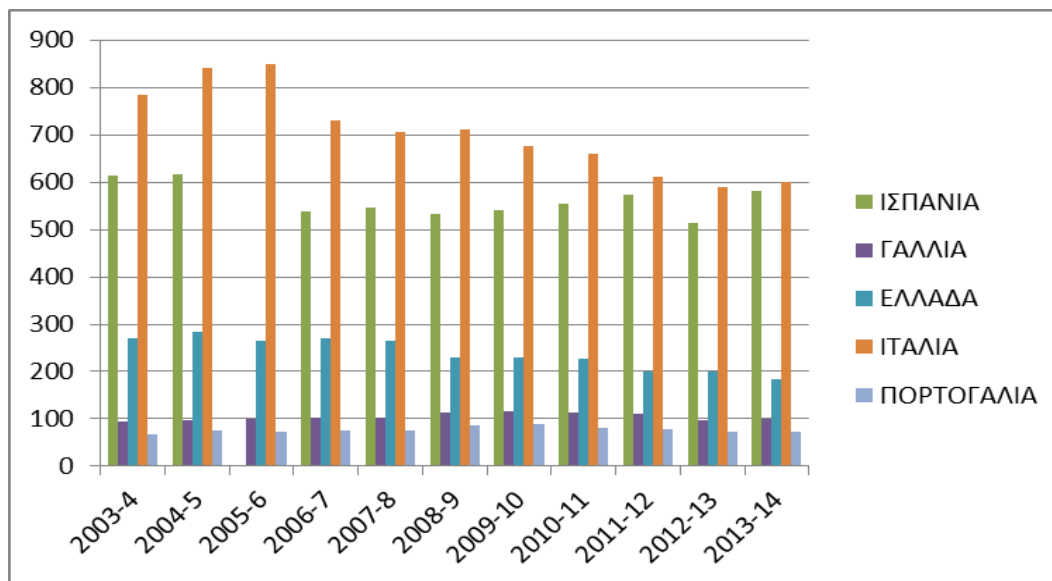
Πίνακας 1: Μέσος όρος παραγωγής ελαιολάδου των ετών 2007-2009 (ΕΛ.ΣΤΑΤ., 2009)

	Τόνοι	Ποσοστό (%)
Κρήτη	119.535	40.4
Πελοπόννησος	104.626	35.4
Στερεά Ελλάδα - Εύβοια	28.669	9.7
Νησιά Ιονίου Πελάγους	8.865	3.0
Μακεδονία	10.403	3.5

Εντοπισμός επιπέδων βιοενεργών ουσιών στο παρθένο ελαιόλαδο



Εικόνα 2: Παραγωγή ελαιόλαδου στην Ευρώπη (σε 1000tn) για τα έτη 2003-2013 (ΙΟΟC, 2013)



Εικόνα 3: Κατανάλωση ελαιόλαδου στην Ευρώπη για τα έτη 2003-2013 (ΙΟΟC, 2013).

Πίνακας 2: Παγκόσμια κατανάλωση ελαιόλαδου (σε 1000t) για το χρονικό διάστημα 2003-2013 (ΙΟΟC, 2013)

ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ	2003-4	2004-5	2005-6	2006-7	2007-8	2008-9	2009-10	2010-11	2011-12	2012-13	2013-14
ΑΛΓΕΡΙΑ	60	38	35	23	25	55	33,5	59	42,5	67	67
ΙΣΡΑΗΛ	13,5	16	16,5	15	16	17	16,5	17	15,5	17	15,5
ΙΟΥΔΑΝΙΑ	24	25	19	21	23,5	23,5	20	20	17	20	18
ΛΥΒΙΥΗ	14,5	12	9	11	13	15	15	15	15	15	15
ΜΑΡΟΚΟ	70	38	55	65	65	70	90	100	122	129	132
ΣΥΡΙΑ	150	135	79	110	80	110	120,5	130,5	135,5	135,5	95
ΣΛΟΒΕΝΙΑ	2	1,1	1,5	1,5	1,7	1,8	2	2,1	1,9	1,9	2,2
ΤΥΝΙΣΙΑ	56	44	38	45	50	21	30	30	35	40	35
ΤΟΥΡΚΙΑ	46	60	50	80	85	108	110	131	150	160	150
ΕΥΡΩΠ. ΕΝ.	1997,5	2079	1918	1905	1866	1856	1846	1866,5	1790	1690	1758
ΑΥΣΤΡΑΛΙΑ	34,5	32,5	34,5	47,5	35	37	44	44	40	36	40
ΒΡΑΖΙΛΙΑ	23,5	26,5	26	34,5	40	42	50,5	61,5	68	73	73
ΚΑΝΑΔΑΣ	26	32	30	32,5	29	30	37	40	39,5	37,5	37,5
ΗΝ. ΠΟΛΙΤ.	216,5	215,5	223	248	246	256	258	275	300	293	294
ΙΑΠΩΝΙΑ	32	32	30	30,5	29	30	40,5	35,5	43	51	51
ΡΩΣΙΑ	7	9	9,5	10,5	17	15	22	21	24	27	27
ΣΥΝΟΛΟ	2470,5	2736,6	2539,5	2632,5	2621,2	2687,3	2735,5	2786,6	2838,9	2753,5	2810,2
ΛΟΙΠΕΣ ΧΩΡΕΣ	412	186,9	151	166	133,3	145,2	166,5	274,4	246,6	287,5	246,3
ΣΥΝΟΛΟ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ	2882,5	2923,5	2690,5	2798,5	2754,5	2832,5	2902	3061	3085,5	3041	3056,5

1.2.1 Μονάδες του τομέα του ελαιολάδου

Στη χώρα μας υπάρχουν περίπου 2.300 ελαιοτριβεία, εκ των οποίων 1.855 είναι τριφασικά, 131 διφασικά και 120 κλασσικά. Τα μισά περίπου από αυτά βρίσκονται στην Πελοπόννησο και στην Κρήτη. Επίσης, λειτουργούν 414 τυποποιητήρια ελαιολάδου και 33 πυρηνελαιουργεία (ΥΠΠΑΤ, προσωπική επικοινωνία).

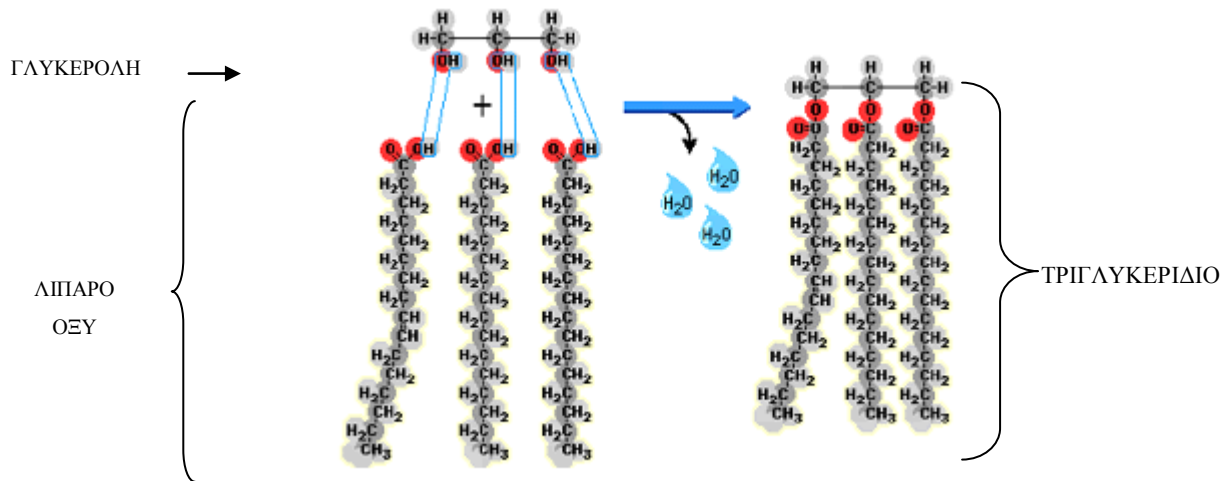
1.3 Χημική σύνθεση ελαιόκαρπου

Στο δέντρο της ελιάς ο ελαιόκαρπος είναι δρύπη και σχηματίζεται μετά τη γονιμοποίηση των ανθέων την περίοδο της Άνοιξης, ενώ η συγκομιδή του ξεκινά το Φθινόπωρο και ολοκληρώνεται στα τέλη του Χειμώνα στις νότιες περιοχές. Πρώτα σχηματίζεται ο πυρήνας και ακολουθεί η σάρκα. Όπως κάθε δρύπη, αποτελείται από το ενδοκάρπιο, το μεσοκάρπιο και το εξωκάρπιο. Το ενδοκάρπιο που είναι ο πυρήνας, αποτελείται από το ξυλώδες τμήμα και περιέχει ένα έως δύο ενδοσπέρμια. Το εξωκάρπιο είναι η επιδερμίδα του καρπού. Η καλή καρπόδεση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του ελαιόδεντρου με το περιβάλλον του. Επομένως, η καρπόδεση και η παραγωγή, μπορεί να μειωθούν σε περιπτώσεις παγετού ή πολύ υψηλών θερμοκρασιών, έντονων βροχοπτώσεων ή προσβολών από ασθένειες και έλλειψη θρεπτικών στοιχείων. Η σάρκα, είναι το μεσοκάρπιο που καλύπτει το 70-90% του καρπού και περιέχει διάφορα συστατικά μεταξύ των οποίων και το έλαιο που διαχωρίζεται με φυσικές μεθόδους ως ελαιόλαδο. Η κατανομή του λαδιού στον ελαιόκαρπο είναι 96-98% στο περικάρπιο και 2-4% στο ενδοκάρπιο (Kiritsakis, 1990). Η συσσώρευση λαδιού στο περικάρπιο ξεκινά τον Αύγουστο και συνεχίζεται μέχρι να ωριμάσει ο καρπός και να μεταχρωματιστεί. Το ελαιόλαδο καταλαμβάνει το 15-40% της νωπής σάρκας.

Εκτός από το λάδι και το νερό, περιέχονται και οργανικά οξέα, ελευρωπαΐνη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, πηκτίνες, λιγνίνη, ταννίνες, χρωστικές, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Στην ελευρωπαΐνη οφείλεται η πικρή γεύση του καρπού και εξαιτίας της δεν μπορεί να καταναλωθεί άμεσα από το ελαιόδεντρο, αλλά απαιτείται επεξεργασία. Συγκριτικά με άλλες δρύπες, ο καρπός της ελιάς περιέχει χαμηλά σάκχαρα (2.6-6%) και υψηλό ποσοστό λαδιού (12-30%) ανάλογα με την ποικιλία και την ωρίμανση (Uylaser and Yildiz, 2014).

1.3.1 Σύσταση ελαιόλαδου

Όσον αφορά στη σύστασή του, το ελαιόλαδο όπως και κάθε λιπαρή ύλη είναι κατά κύριο λόγο ένα μίγμα τριγλυκεριδίων ή ουδέτερων λιπών. Τα τριγλυκερίδια αποτελούνται από δύο τύπους δομικών μονάδων, τα λιπαρά οξέα και την γλυκερόλη. Η Εικόνα 4 δείχνει τη δομή και την σύνθεση ενός τριγλυκεριδίου.



Εικόνα 4: Δομή και σύνθεση τριγλυκεριδίου.

Οι φυσικές ιδιότητες των ελαίων παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις, καθώς η σύσταση των τριγλυκεριδίων και το ποσοστό τους σε λιπαρά οξέα διαφέρουν. Όλα τα τριγλυκερίδια έχουν το ίδιο μόριο γλυκερόλης, οπότε η διαφορά τους έγκειται στο λιπαρό οξύ (Εικόνα 4). Κάθε τριγλυκερίδιο μπορεί να είναι κορεσμένο, μονοακόρεστο ή πολυακόρεστο. Τα κύρια τριγλυκερίδια του ελαιόλαδου είναι υγρά και είναι αυτά στα οποία απαντά το ελαϊκό οξύ, γι'αυτό και το ελαιόλαδο σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου βρίσκεται σε υγρή κατάσταση. Άλλα συστατικά που περιέχει το ελαιόλαδο, κ γυ είναι τα προϊόντα υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων, τα ονομαζόμενα ελεύθερα λιπαρά οξέα, οι στερόλες, οι φαινόλες, οι αλειφατικές αλκοόλες, τα φωσφατίδια, οι τοκοφερόλες, οι χρωστικές, οι πτητικές οργανικές ενώσεις κ.α. (Aragicio, 2000).

Τα συστατικά του ελαιόλαδου διαχωρίζονται σε σαπωνοποιήσιμα (τριακυλογλυκερόλες, μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες, λιπαρά οξέα, φωσφατίδια) σε ποσοστό περίπου 99% και σε μη σαπωνοποιήσιμα (τοκοφερόλες, χρωστικές ουσίες,

στερόλες, υδρογονάνθρακες, ανώτερες αλκοόλες και πολικές φαινόλες), σε ποσοστό περίπου 1.0% που περιλαμβάνει πάνω από 230 χημικές ενώσεις.

Ενδεικτικά, το ελαϊκό οξύ είναι μονοακόρεστο, το παλμιτικό κορεσμένο και το λινελαϊκό πολυακόρεστο. Συγκριτικά με άλλα φυτικά έλαια, το ελαιόλαδο έχει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και πολύ μικρότερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων σε σχέση με το βούτυρο και το αραβοσιτέλαιο (Viola and Viola, 2009). Τα λιπαρά οξέα με την μεγαλύτερη αναλογία είναι το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το παλμιτικό (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Επί τοις εκατό περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα (Ghanbari et al., 2012)

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα (%)	Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα (%)
Ελαϊκό	55,0-83,0	Μυριστικό	Ίχνη-0,05
Παλμιτικό	7,5-20,0	Αραχιδικό	≤ 0,6
Λινελαϊκό	3,5-21,0	Βεχενικό	≤ 0,2
Στεατικό	0,5-5,0	Λιγνοκηρικό	≤ 0,2
Παλμιτελαϊκό	0,3-3,5	Δεκαεπτανικό	≤ 0,3
Λινολενικό	Ίχνη-1,5	Εικοσενοϊκό	≤ 0,6

Τα ελαιόλαδα δεν έχουν την ίδια σύσταση, καθώς αυτή επηρεάζεται από παράγοντες, όπως η ποικιλία της ελιάς, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, οι καλλιεργητικές πρακτικές και η διαδικασία παραλαβής (Viola and Viola, 2009).

Το σπουδαιότερο κλάσμα στο οποίο οφείλονται πολλές ιδιότητες του ελαιόλαδου είναι το ασαπωνοποίητο και οι ουσίες που το αποτελούν είναι φυσικά αντιοξειδωτικά. Στο ασαπωνοποίητο κλάσμα ανήκουν οι φαινόλες, οι στερόλες, οι τοκοφερόλες, τα φωσφατίδια, οι ανώτερες αλκοόλες, οι ανθοκυανίνες και τα τριτερπενικά οξέα. Κάποιες από αυτές, όπως οι υδρογονάνθρακες, οι φαινόλες και οι τοκοφερόλες, επηρεάζουν την γεύση, κάποιες επηρεάζουν το άρωμα του (αλδεΐδες, κετόνες, αλκοόλες), ενώ οι χρωστικές ουσίες καθορίζουν το χρώμα του (Aragicio, 2000). Τα πολικά φαινολικά συστατικά του ελαιόλαδου, είναι αυτά που έχουν τη μεγαλύτερη βιολογική αξία και είναι αυτά που συμβάλλουν στην

οξειδωτική σταθερότητα του ελαιόλαδου. Η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη και οι σεκοΐριδοειδείς ενώσεις αποτελούν περίπου το 90% του συνολικού φαινολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιολάδου. Οι σεκοΐριδοειδείς ενώσεις βρίσκονται μόνο στα φυτά της βοτανικής οικογένειας *Oleraceae* στην οποία ανήκει και η *Olea europaea L.* Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των μη γλυκεριδικών συστατικών του παρθένου ελαιολάδου σε mg/Kgr.

Πίνακας 4: Συγκέντρωση μη γλυκεριδικών συστατικών παρθένου ελαιολάδου σε mg/Kgr (Kiritsakis, 1990)

Μη γλυκεριδικά συστατικά	Παρθένο Ελαιόλαδο (mg/Kg)
Υδρογονάνθρακες	3800
Τοκοφερόλες	150
Φαινόλες	350
Πτητικοί εστέρες	100
Πτητικές καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες και κετόνες)	40
Αλειφατικές αλκοόλες	200
Τριτερπενοειδείς αλκοόλες και Τριτερπενικές διαλκοόλες	3500
Στερόλες	2500

1.4 Κατηγορίες ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο διακρίνεται στις εξής κατηγορίες:

1) Παρθένο Ελαιόλαδο

Εξαιρετικό παρθένο Ελαιόλαδο (Η περιεκτικότητα του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν υπερβαίνει το 0.8% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή).

Παρθένο Ελαιόλαδο (Η περιεκτικότητα του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν υπερβαίνει το 2.0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή).

Ελαιόλαδο Λαμπάντε (Η περιεκτικότητα του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι

μεγαλύτερη του 2.0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή).

Πίνακας 5: Όρια διαφόρων χαρακτηριστικών του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου (Κυριτσάκης, 2007)

	ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ	ΕΞΤΡΑ ΠΑΡΘΕΝΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ
Οξύτητα	≤ 2,0	≤ 0,8
Αριθμός υπεροξειδίων mEq O ₂ /Kgr	≤ 20	
Κηροί mg/Kgr	≤ 250	
2- μονοπαλμιτίνη (%)	≤ 0,9 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ ≤ 14% και ≤ 1,0 εάν % ολικό παλμιτικό οξύ >14%	
Στιγμασταδιένιο mg/Kgr	≤ 0,10	
K ₂₃₂	≤ 2,50	≤ 2,60
K ₂₇₀	≤ 0,25	≤ 0,22
ΔK ≤ 0,22	≤ 0,01	
Οργανοληπτική Εξέταση Διάμεσος του ελλατώματος (Md)	Md ≤ 2,5	Md=0
Οργανοληπτική Εξέταση Διάμεσος του φρουτώδους (Mf)	Mf > 0	

II) Εξευγενισμένο ή Ραφιναρισμένο Ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο που λαμβάνεται από τον εξευγενισμό παρθένων ελαιολάδων η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 0.3% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

III) Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα

Το έλαιο που λαμβάνεται από την ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιόλαδου και παρθένων ελαιόλαδων, εκτός από το ελαιόλαδο λαμπάντε, η οξύτητα του οποίου δεν υπερβαίνει το 1.0% και τα άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

1.4.1 Παρθένο ελαιόλαδο

Σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ 1237/2007, παρθένο ελαιόλαδο είναι αυτό που λαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο μόνο με μηχανικές μεθόδους ή άλλες φυσικές επεξεργασίες που δεν προκαλούν αλλοίωση του ελαίου και το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της μετάγγισης, της φυγοκέντρισης και της διήθησης. Εξαιρούνται τα έλαια που λαμβάνονται με διαλύτες, με βοηθητικές ύλες παραλαβής που έχουν χημική ή βιοχημική δράση ή με μεθόδους επανεστεροποίησης ή πρόσμιξης με έλαια άλλης φύσης. Ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε ελαϊκό οξύ, κατατάσσεται σε τρεις κατηγορίες: Εξαιρετικά παρθένο, παρθένο και λαμπάντε.

1.4.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά ελαιολάδου

Για την ορθή αξιολόγηση του ελαιολάδου λαμβάνονται υπόψη η οξύτητα, η οξειδωση, το χρώμα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αρ. 702/2007, για κάθε κατηγορία ελαιολάδου υπάρχουν οριακές τιμές των χαρακτηριστικών τους βάσει των οποίων γίνεται ο προσδιορισμός τους (Πίνακας 5). Η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί το βασικότερο κριτήριο για την ποιότητα του και γίνεται από εξειδικευμένα άτομα σε κατάλληλα διαμορφωμένους χώρους.

Η οξύτητα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την κατάσταση του ελαιοκάρπου και πολύ λιγότερο από το ελαιόλαδο κατά την αποθήκευση του οποίου η υγρασία και τα υδρολυτικά ένζυμα μπορεί να επιφέρουν μικρή άνοδο αυτής. Υψηλή οξύτητα εμφανίζουν λάδια τα οποία παράγονται από προσβεβλημένο από ασθένειες ελαιόκαρπο, υπερώριμο ή

ελαιόκαρπο του οποίου η συγκομιδή έχει γίνει με λανθασμένες τεχνικές. Η οξύτητα ελέγχεται με τον προσδιορισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με την οξύτητα, το λάδι διακρίνεται σε βρώσιμο ή βιομηχανικό.

Η οξείδωση προσδιορίζεται κυρίως με τον αριθμό των υπεροξειδίων και τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα. Τα υπεροξειδία δημιουργούνται από την αντίδραση του οξυγόνου με το ελαιόλαδο. Υψηλά υπεροξειδία δηλώνουν οξειδωτικές αλλοιώσεις και μειωμένο χρόνο αποθήκευσης του ελαιολάδου. Μειωμένος αριθμός υπεροξειδίων επιτυγχάνεται όταν μειώνεται η ενζυματική οξείδωση, στις περιπτώσεις που εφαρμόζονται καλές γεωργικές πρακτικές στην καλλιέργεια, όταν η συγκομιδή γίνεται προσεκτικά και η αποθήκευση με τον σωστό τρόπο και τέλος, με τη σωστή τεχνική παραλαβής του ελαιολάδου. Επίσης, προστατεύοντας το ελαιόλαδο από το φως, τη θερμοκρασία, τον αέρα και τα μέταλλα μειώνοντας τη χημική οξείδωση.

Η μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες φάσμα γίνεται μέσω κάποιων σταθερών ή δεικτών ειδικού μήκους κύματος με αέρια χρωματογραφία. Η απορρόφηση στα 232 nm οφείλεται στο σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων και συζυγών διενίων. Αυξημένη τιμή της σταθεράς K_{232} δείχνει πως ο ελαιόκαρπος είχε αποθηκευτεί για πολλές ημέρες πριν την έκθλιψή του. Η απορρόφηση στα 270nm οφείλεται στο σχηματισμό καρβονυλικών ενώσεων και συζυγών τριενίων. Αυξημένες τιμές της K_{270} έχουν ελαιόλαδα παρατεταμένου χρόνου αποθήκευσης ή μείγματα ελαιολάδων με παλαιότερα.

Ο δείκτης ΔΚ αποτελεί κριτήριο διάκρισης της ποιότητας και καθαρότητας των ελαιολάδων. Πρόκειται για μια μαθηματική σχέση υπολογισμού συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός των σταθερών K_{232} και K_{270} μαζί με τον δείκτη ΔΚ σε έναν τύπο, συγκρίνονται με μια τιμή εξαιρετικού παρθένου ελαιολάδου και δείχνουν κάθε ανάμιξη με άλλο ελαιόλαδο που δεν είναι εξαιρετικό παρθένο.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση στηρίζεται στην αντίληψη των δοκιμαστών με αισθητήρια όργανα. Το ασαπωνοποίητο κλάσμα του ελαιολάδου ευθύνεται για τις γευστικές και οσφραντικές του ιδιότητες. Κάποιες αντιοξειδωτικές ουσίες είναι υπεύθυνες για την γεύση του, οι πτητικές ενώσεις είναι υπεύθυνες επιπλέον για το άρωμα του, ενώ οι χρωστικές ουσίες για το χρώμα του.

1.5 Φαινολικά συστατικά ελαιολάδου

Οι φαινόλες είναι χαρακτηριστικά συστατικά των πράσινων φυτών και συναντώνται σε διάφορα μέρη του φυτού, με ποσοτικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα φυτικά όργανα. Όταν τα φυτά εκτίθενται σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις, προκύπτει η βιοσύνθεσή τους παρέχοντας άμυνα ενάντια σε παθογόνα και ζωικούς εχθρούς, απενεργοποιώντας ενεργές μορφές οξυγόνου κ.α. (Grace, 2007). Έχουν μια χημική δομή που σχηματίζεται από την σύνδεση μιας τουλάχιστον υδροξυ-ομάδας σε ένα τουλάχιστον βενζολικό δακτύλιο. Υπάρχουν πάνω από 500 διαφορετικά είδη πολυφαινολών τα οποία ταξινομούνται σύμφωνα με τη δομή τους (Tangney and Rasmussen, 2013). Μπορεί να είναι φαινολικά οξέα, απλές φαινόλες ή φαινολικές ενώσεις. Οι απλές φαινόλες είναι υδατοδιαλυτές πολικές ενώσεις, με αντιοξειδωτική δράση η οποία αυξάνεται με την εισαγωγή δεύτερης ή τρίτης φαινολικής ομάδας υδροξυλίου στο μόριο τους. Στο παρθένο ελαιόλαδο έχει ανιχνευθεί η παρουσία μεγάλου αριθμού φαινολικών ενώσεων, κυρίως στο κλάσμα που παραλαμβάνεται έπειτα από εκχύλιση του ελαιολάδου με μίγμα μεθανόλης – νερού. Διακρίνονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: τις απλές φαινόλες, τις σεκοϊριδοειδείς ενώσεις, τις φλαβονοειδείς ενώσεις και τις λιγνάνες. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη αποτελούν τις βασικές απλές φαινόλες του ελαιολάδου. Η ελευρωπαΐνη είναι ένας σεκοϊριδοειδής γλυκοζίτης, χαρακτηριστικός των ολεασών και αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς (Bendini et al., 2007). Κατά τη διαδικασία της μάλαξης και της φυγοκέντρισης, αναπτύσσονται διεπιφανειακές δυνάμεις οι οποίες συγκρατούν τα φαινολικά συστατικά στη λιποπρωτεϊνική στοιβάδα της ελαιώδους σταγόνας και με αυτό τον τρόπο μεταφέρονται από τον καρπό στο ελαιόλαδο. Τα πολικά φαινολικά συστατικά δεν περιέχονται στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο, επειδή αυτό ανήκει στο πολικό κλάσμα το οποίο απομακρύνεται πλήρως κατά την διάρκεια του εξευγενισμού (Boskou, 2006; Colquhoun et al., 1996).

1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου

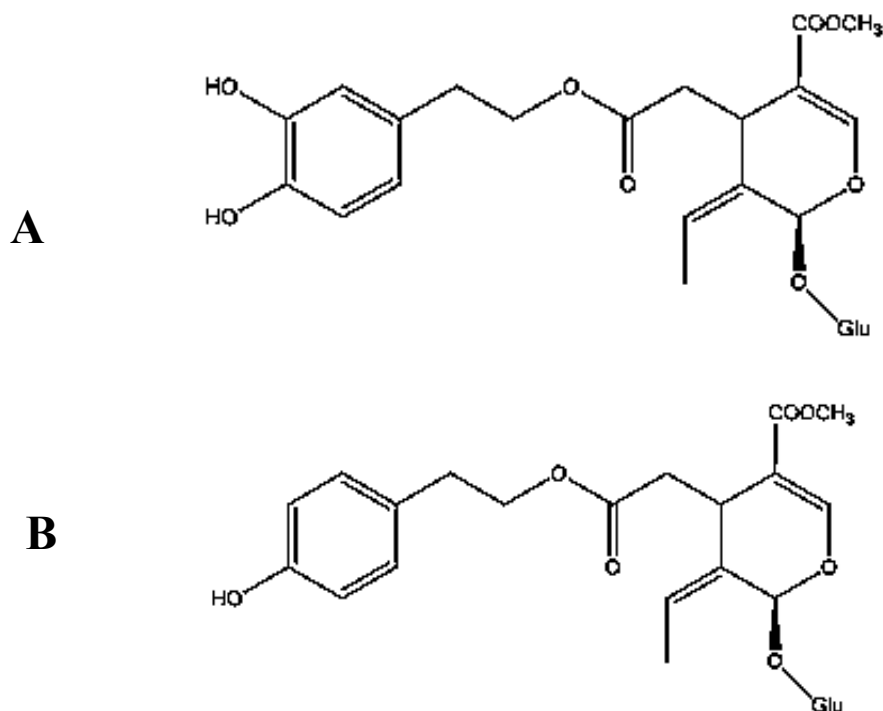
Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο ελαιόλαδο επηρεάζεται από την ποικιλία της ελιάς (Angerosa et al., 2000; Franco et al., 2014; Sarolic et al., 2014), από την ωριμότητα του ελαιοκάρπου (Martinez Nieto et al., 2010), από τις κλιματολογικές συνθήκες,

από τη ρύπανση του εδάφους, την εποχή της συγκομιδής, τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Li et al., 2014), από τις καλλιεργητικές τεχνικές (Ryan and Robards, 1998), την γεωγραφική τοποθεσία (Baiano et al., 2009) και την παρεναιτοφορία (Turktas et al., 2013). Στην παρεναιτοφορία ο έλεγχος θρέψης είναι πολύ σημαντικός, αφού οι μεγάλες θρεπτικές ανάγκες τη χρονιά της καρποφορίας αδυνατίζουν το δέντρο, έτσι που να μην ανθίζει το επόμενο έτος. Οι ποικιλίες της ελιάς έχουν διαφορετικό βαθμό εμφάνισης της παρεναιτοφορίας, με την κορωνέϊκη να εμφανίζει μικρότερο βαθμό από άλλες ποικιλίες. Η ωριμότητα του καρπού συσχετίζεται με την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πολικές φαινόλες (Dag et al., 2011). Η υπερωρίμανση του καρπού οδηγεί σε μείωση των φαινολικών ενώσεων, με εξαίρεση τα ελαιόδεντρα που καλλιεργούνται σε θερμά κλίματα, διότι οι ελιές ωριμάζουν γρηγορότερα, με αποτέλεσμα η απόδοσή τους να είναι μεγαλύτερη σε πολυφαινόλες (Caronio et al., 2001). Σημαντικό παράγοντα αποτελούν η επιλογή της εκχύλισης (Brenes et al., 2000), οι τεχνικές διαχωρισμού και ποσοτικοποίησης (Carrasco-Pancorbo et al., 2007). Επιπλέον, το ελαιόλαδο που προέρχεται από ελαιόδεντρα που βρίσκονται σε υψηλότερο υψόμετρο (π.χ. 800m) έχουν λιγότερες ολικές φαινόλες από ότι ελαιόδεντρα σε ύψος 100m (Mohamed Mousa et al., 1996), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον αυξημένο αριθμό υπεροξειδίων στα 800 m.

1.5.2 Χημικές δομές φαινολών

1.5.2.1 Ελευρωπαΐνη

Η ελευρωπαΐνη και η πρόδρομος ουσία αυτής, ο λιγκστροζίτης, οι πιο σημαντικές ολεοσίδες στην *Olea europaea*, είναι εστέρες του ελενολικού οξέος με 2-(3,4-διϋδροξυφαινυλ) αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και 2-(4-υδροξυφαινυλ)αιθανόλη (τυροσόλη). Η ελευρωπαΐνη δεν περιορίζεται στο γένος *Olea* αλλά συναντάται σε πολλά άλλα είδη που ανήκουν στην οικογένεια Oleaceae, όπως στα είδη *Fraxinus excelsior* (Ευρωπαϊκή τέφρα), *Ligustrum ovalifolium* (Λιγούστρο το ωοειδόφυλλον), *Syringa josikaea* (Ουγγρική πασχαλιά) και (Obied et al., 2008).

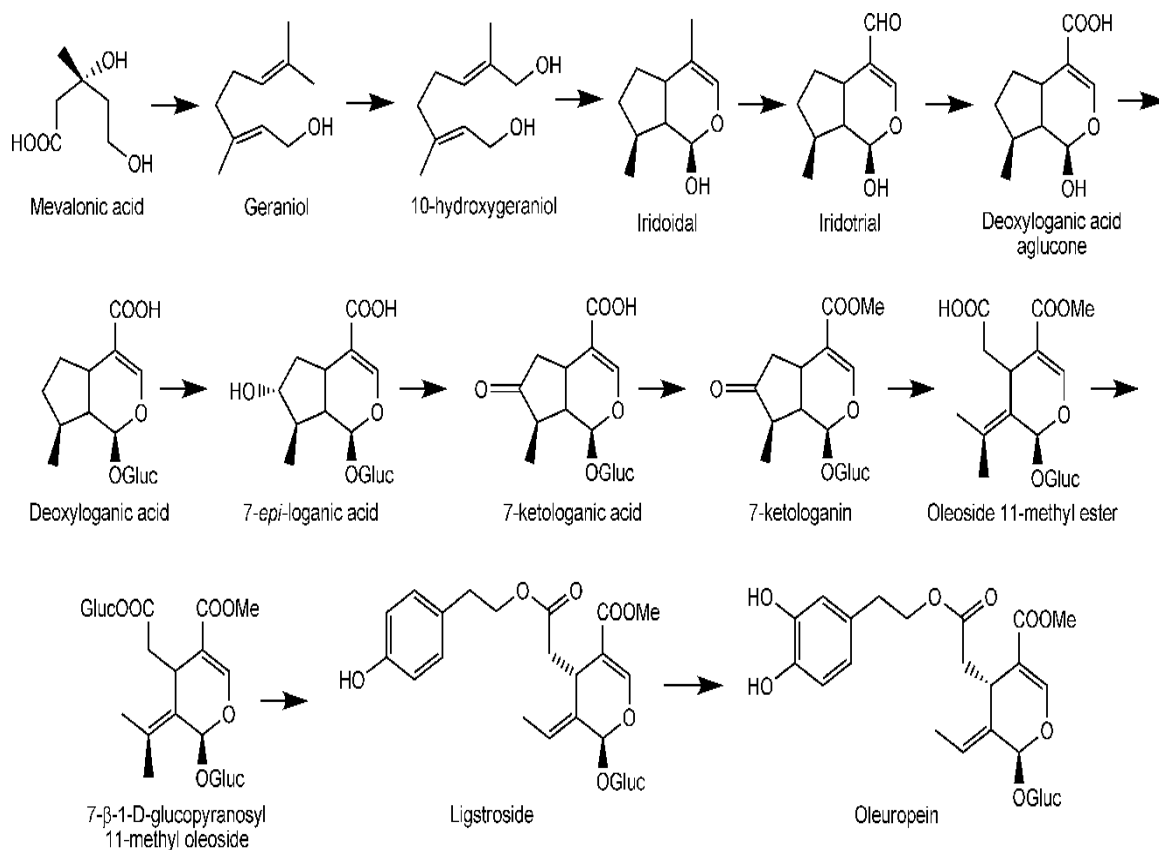


Εικόνα 5: A. Χημική δομή του μορίου της ελευρωπαΐνης και B. Χημική δομή του μορίου του λιγκστροζίτη (Obied et al., 2008)

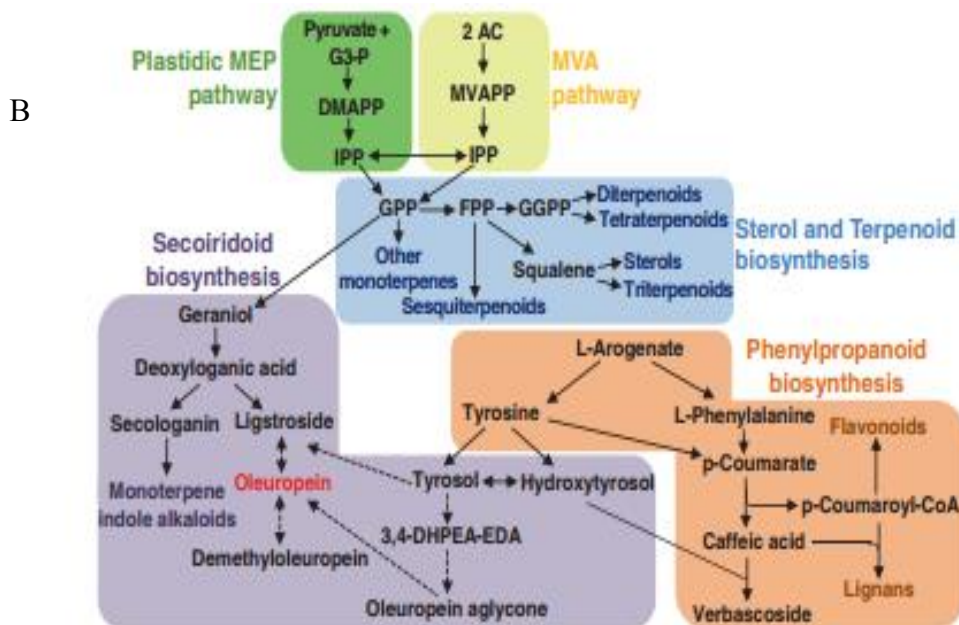
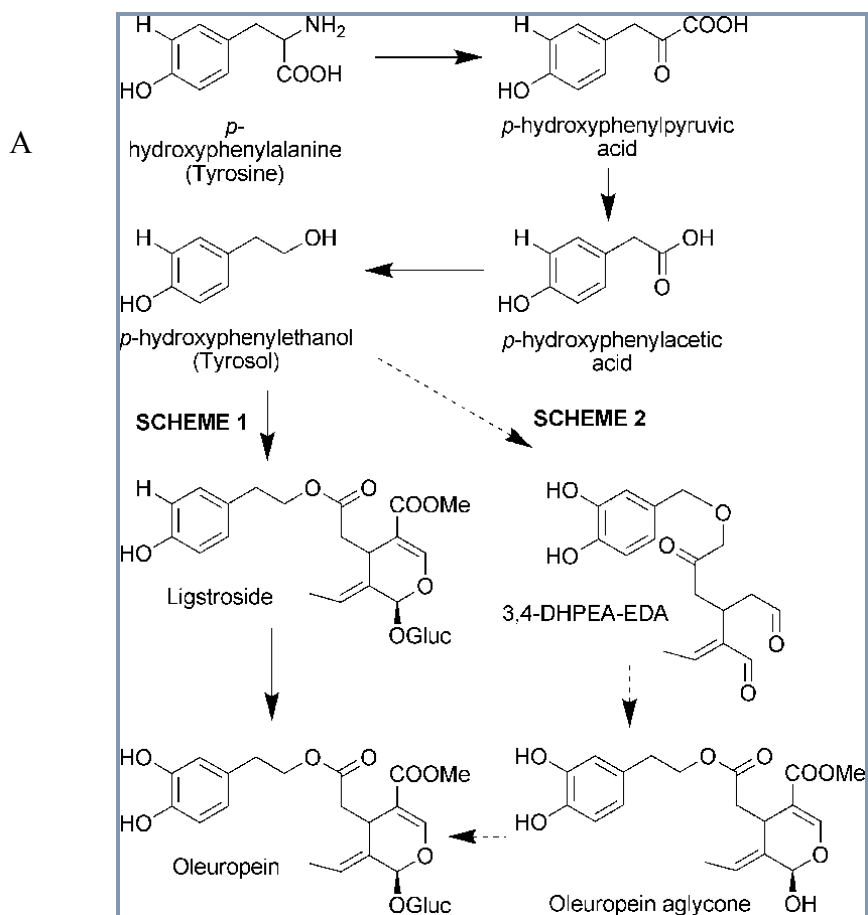
Η χημική δομή του μορίου της ελευρωπαΐνης παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Υπάρχει σε όλα τα μέρη του ελαιόδεντρου και ειδικά στα φύλλα σε υψηλή συγκέντρωση 60-90mg/g ξηρού βάρους και ανήκει σε μια ειδική ομάδα κουμαρινών, οι οποίες ονομάζονται σεκοϊριδοειδή. Η ελευρωπαΐνη συναντάται σε μεγάλα ποσά πέρα από τα φύλλα της ελιάς και στον άγουρο ελαιόκαρπο (Boskou, 2009).

Το προτεινόμενο βιοσυνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό της ελευρωπαΐνης στην οικογένεια *Oleaceae* φαίνεται στην Εικόνα 6, με τον λιγκστροζίτη να είναι ο άμεσος πρόδρομος στην παραγωγή της ελευρωπαΐνης (Jensen et al., 2002). Ένα άλλο πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι για την παραγωγή της ελευρωπαΐνης που δομικά σχετίζεται με την υδροξυτυροσόλη παρουσιάζεται στην Εικόνα 7. Η παρουσία της υδροξυτυροσόλης αποδίδεται στις μεθόδους επεξεργασίας του ελαιολάδου και στην απόρροια της από την ελευρωπαΐνη. Ενώ η 3,4-DHPEA-EDA δεν έχει ολεϊκή δομή, ο ρόλος της στην παρασκευή ελευρωπαΐνης είναι σημαντικός και επιβεβαιώνεται μέσω σηματοδοσίας ισότοπων τμημάτων του ελαιολάδου. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι ο βιοσχηματισμός της 3,4-DHPEA-EDA εξαρτάται από την καλλιέργεια, την εποχή και το περιβάλλον.

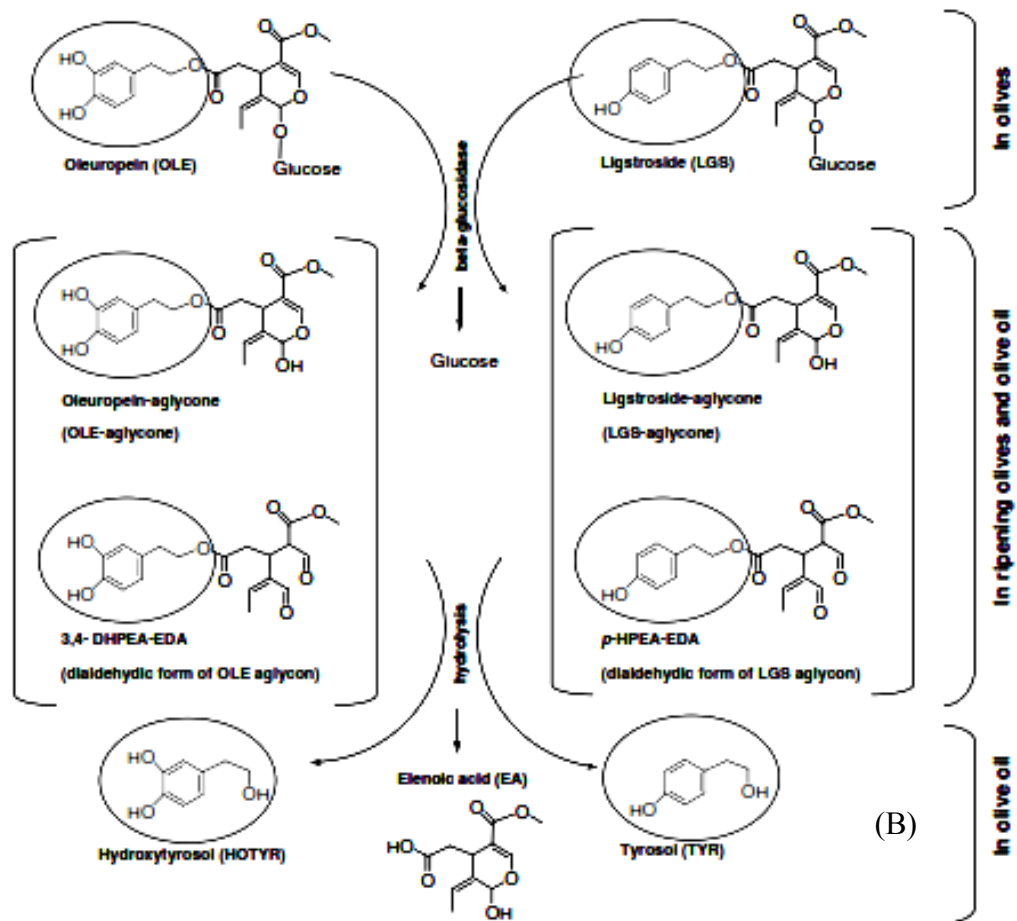
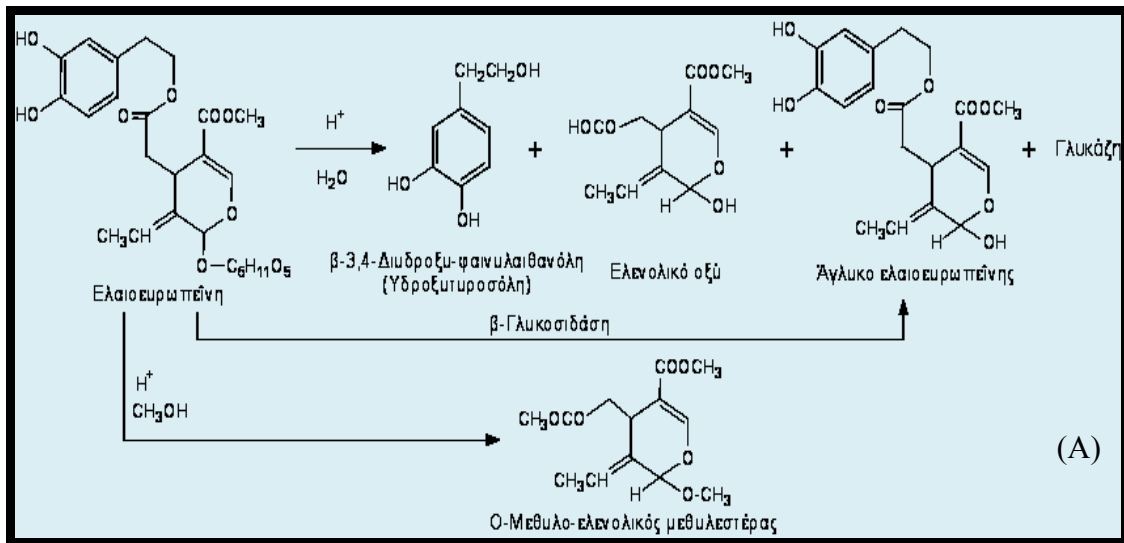
Η ελευρωπαΐνη με ενζυμική υδρόλυση με την β- γλυκοσιδάση δίνει γλυκόζη και το άγλυκο τμήμα της ελευρωπαΐνης που βρίσκεται στα φύλλα και στον καρπό της ελιάς, με πολλές αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Η χημική υδρόλυση της ελευρωπαΐνης δίνει με μερική μετατροπή το άγλυκο της ελευρωπαΐνης και γλυκόζη και σε δεύτερο στάδιο γίνεται η πλήρης μετατροπή σε υδροξυτυροσόλη, γλυκόζη και ελενολικό οξύ (Εικόνα 8).



Εικόνα 6: Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι ελευρωπαΐνης (Jensen et al., 2002)

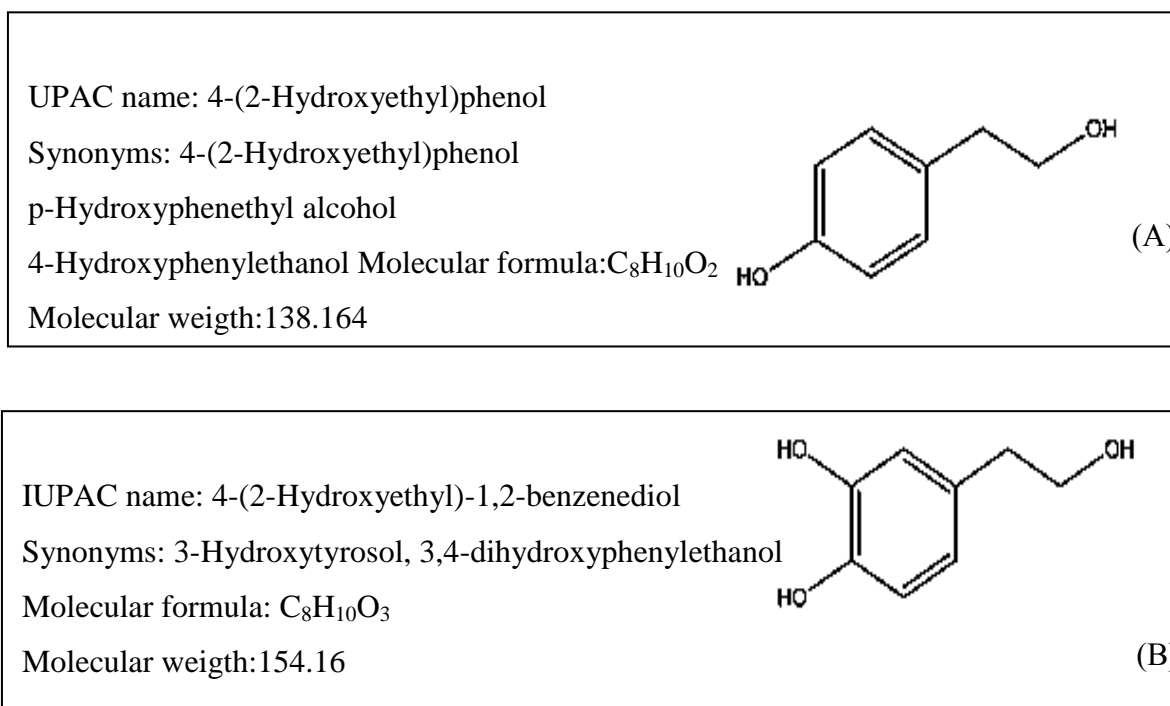


Εικόνα7: Α. Βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής ελευρωπαΐνης στην *O. Europaëa* (Ryan et al., 2002) Β. Πιθανό βιοσυνθετικό μονοπάτι παραγωγής των κύριων δευτερογενών ενώσεων στην *O. Europaëa* (Alagna et al., 2012)



Εικόνα 8: Α. Υδρολυτικές αντιδράσεις ελεουρωπίνης και λιγκστροζίτη (Walter et al., 1973) Β. Χημικές δομές παραγώγων σεκοϊριδοειδών και φαινολικών αλκοολών στην ελιά και στο ελαιόλαδο. (Brenes et al., 2001)

1.5.2 Τυροσόλη – Υδροξυτυροσόλη



Εικόνα 9: Α. Χημική δομή του μορίου της τυροσόλης και γενικά χαρακτηριστικά αυτού Β. Χημική δομή του μορίου της υδροξυτυροσόλης και γενικά χαρακτηριστικά αυτού

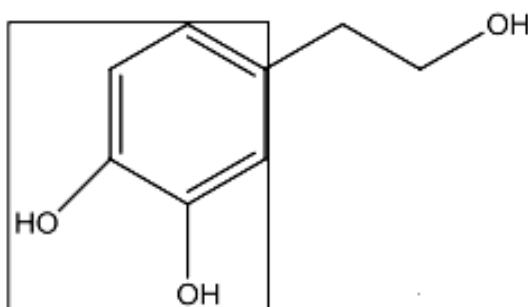
Η υδροξυτυροσόλη (Εικόνα 9B), είναι προϊόν χημικής υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης (Εικόνα 8), ένας από τους βασικότερους μεταβολίτες της υδρόλυσης, με ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες. Παρασκευάζεται ενζυμικά από την τυροσόλη, ένα στοιχείο το οποίο είναι εμπορικά διαθέσιμο στην τυροσινάση και στο ασκορβικό οξύ. Η τυροσινάση, μπορεί να ανακτηθεί από μανιτάρια (Boskou, 2009). Το δεύτερο πιθανό μονοπάτι στην Εικόνα 7B, περιλαμβάνει τα υπόλοιπα πιθανά μονοπάτια. Μετά την πάροδο δεκαετούς ευρύτερης έρευνας δεν έχει βρεθεί κάποιο στοιχείο που να μπορεί με βεβαιότητα να επιβεβαιώσει ή να αναιρέσει κάποιο από τα παραπάνω.

1.5.3 Αντιοξειδωτικά – Δράση φαινολών

Τα αντιοξειδωτικά, σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε πρωτοταγή και δευτεροταγή. Τα πρωτοταγή δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες, ενώ τα ίδια

καταναλώνονται καθώς μετατρέπονται σε σταθερά προϊόντα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και οι φαινολικές ενώσεις (Gordon, 1990). Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα κάθε πρωτοταγούς αντιοξειδωτικού διεξάγεται μέσω της προσφοράς ενός ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου σε ένα παράγωγο ρίζας, ενώ τα δευτεροταγή αντιοξειδωτικά απομακρύνουν το συστατικό που αρχίζει και ενεργοποιεί την αντίδραση των ελεύθερων ριζών και επομένως αποτρέπει την έναρξη της οξείδωσης. Ένα πρωτοταγές αντιοξειδωτικό μπορεί να είναι αποτελεσματικό, εάν έχει τη δυνατότητα να προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου πολύ γρήγορα σε ένα μόριο ρίζας και το ίδιο να γίνει πιο σταθερό από την αρχική ρίζα. Ένα δευτερογενές αντιοξειδωτικό μπορεί να εμποδίσει την πραγματοποίηση της αντίδρασης μέσω απορρόφησης της υπερϊόδους ακτινοβολίας, μέσω της δέσμευσης του οξυγόνου, της δημιουργίας χειλικών ενώσεων με μέταλλα, ή μέσω της παρεμπόδισης των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στο σχηματισμό ενώσεων με το οξυγόνο, όπως για παράδειγμα η NADPH-οξειδάση. Η NADPH-οξειδάση είναι ένζυμο των ουδετερόφιλων, που μπορεί να παράγει μεγάλα ποσά οξυγόνου (Khymenets, 2010). Ο ρόλος του φαινολικού αντιοξειδωτικού είναι να διακόψει την αντίδραση της οξείδωσης προσφέροντας ένα άτομο υδρογόνου. Ο ρυθμός της αντίδρασης εξαρτάται από το επίπεδο του ενεργειακού φραγμού για την μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου. Η αντίδραση αυτή είναι εξώθερμη και καθώς προχωρά, το κατώφλι του φραγμού ελαττώνεται και το αντιοξειδωτικό αντιδρά ταχύτερα με τη ρίζα, αποτρέποντας την αντίδραση της με το υπόστρωμα.

Η δημιουργία χειλικών ενώσεων με μέταλλα γίνεται μόνο με συστατικά που περιέχουν δύο ομάδες υδροξυλίου σε ο- ή π- θέση. Τέτοια συστατικά μπορούν να σχηματίσουν συμπλέγματα με διάφορα δισθενή και τρισθενή ιόντα μετάλλων, με τα τρισθενή να είναι τα πιο σταθερά συμπλέγματα. Εξαιτίας της υψηλής σταθερότητας των συμπλεγμάτων μετάλλων-κατεχολών, τα συστατικά που περιέχουν τις ομάδες κατεχολών αποτραβούν τα μέταλλα από άλλα συμπλέγματα και έτσι τα εμποδίζουν από το να λαμβάνουν μέρος σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Schweigert et al., 2001). Η Εικόνα 10 απεικονίζει την κατεχολική ομάδα της υδροξυτυροσόλης με βάση την οποία εμφανίζεται κατά πάσα πιθανότητα η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης.



Εικόνα 10: Ομάδα κατεχόλης της υδροξυτυροσόλης

Πίνακας 6: Παράμετροι σταθερότητας EVOO διαφορετικών ποικιλιών (Dabbou et al., 2010)

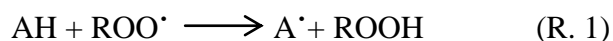
Στοιχεία	ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	ΛΕΤΣΙΝΟ	ΟΥΕΣΛΑΤΙ
Καροτένια (mg/Kg λαδιού)	6,32±0,60	3,82±0,12	4,41±0,60
Χλωροφύλλες (mg/Kg λαδιού)	15,39±3,28	7,89±1,29	10,25±0,80
α-Τοκοφερόλη (mg/Kg λαδιού)	251,44±3,27	369,04±22,38	191,65±6,70
ο-Διφαινόλη(mg HT/Kg λαδιού)	142,38±15,57	93,61±14,98	136,82±3,83
Ολικές Φαινόλες (mg HT/Kgλαδιού)	241,52±1,72	176,816±11,38	175,75±16,52
IP (h) [επαγόμενο χρονικό διάστημα κλίσης]	12,66±1,38	5,57±2,08	12,11±1,08
EC50 [συγκέντρωση δείγματος για 50% καθαρισμό](60min)	18,41±0,37	13,348±1,16	10,13±1,16
TAA-ABTS[ολική αντιοξειδωτική κατάσταση] (mM trolox/Kg)	0,24±0,01	0,13±0,01	0,09±0,00

Τα συστατικά που κυρίως ευθύνονται για την αξιοσημείωτη αντίσταση του ελαιολάδου στην οξείδωση είναι αυτά που περιέχουν υδροξυτυροσόλη, ενώ αυτά που περιέχουν τυροσόλη φαίνεται να έχουν πολύ ασθενέστερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα. Στον Πίνακα 6 δίνονται οι παράμετροι σταθερότητας έξτρα παρθένων ελαιολάδων

διαφορετικών ποικιλιών και αποδεικνύεται πως η κορωνέικη ποικιλία εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές σε όλα σχεδόν τα στοιχεία. Οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους τα φαινολικά συστατικά μπορούν να εμποδίσουν την οξείδωση του ελαιολάδου δίνονται παρακάτω με τις αντιδράσεις που ακολουθούν.

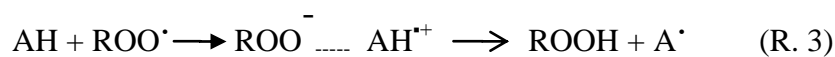
1.5.3.1 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φαινολών

Οι φαινολικές ενώσεις όπως προαναφέρθηκε, επιβραδύνουν ή παρεμποδίζουν την οξείδωση των λιπαρών οξέων, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις (Gordon, 1990):



Η δέσμευση των ριζών γίνεται με προσφορά ατόμου υδρογόνου από το φαινολικό υδροξύλιο προς τις υπερόξυ ($ROO\cdot$) ή αλκόξυ ($RO\cdot$) ρίζες.

Ο παρακάτω μηχανισμός δείχνει την αναγωγή της υπερόξυ ρίζας στο αντίστοιχο ανιόν με απόδοση μονήρους ηλεκτρονίου και μετατροπή του ανιόντος σε υδροϋπεροξειδίο (R. 3).

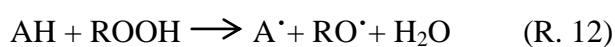


Οι ρίζες των αντιοξειδωτικών αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας σταθερά προϊόντα ως εξής:



Φαινόλες όπως η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη, ευνοούν αυτές τις αντιδράσεις, όπου με την δέσμευση των ελεύθερων ριζών περιορίζονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι παράπλευρες (βραδείες) αντιδράσεις των αντιοξειδωτικών δίνονται παρακάτω, όπου για παράδειγμα η A[•] αντιδρά με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας (R. 7) και έπειτα με το λιπαρό υπόστρωμα (R. 8), ή απευθείας με το λιπαρό υπόστρωμα και τα υδροϋπεροξειδία (R. 9, R. 10). Στις αντιδράσεις (R. 11, R. 12), η AH οξειδώνεται απευθείας από το οξυγόνο ή αντιδρά με τα υδροϋπεροξειδία εμφανίζοντας τελικά προοξειδωτική δράση.



Η ικανότητα των AH εξαρτάται από την ευκολία να δώσουν το άτομο υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες και από την σταθερότητα της φαινοξυ-ρίζας A[•]. Τα δομικά χαρακτηριστικά της AH έχουν καθοριστικό ρόλο και στις δυο περιπτώσεις. Οι απλές φαινόλες δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση παρά μόνο όταν υπάρχει υποκατάσταση σε ορθο ή παρα θέση με ομάδες δότες ηλεκτρονίων που προκαλούν αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στο φαινολικό υδροξύλιο. Έτσι, μειώνεται η ενέργεια του δεσμού οξυγόνου – υδρογόνου και είναι εφικτή η απόδοση ατόμου υδρογόνου προς τις υπερόξυ (ROO[•]) ρίζες. Η σταθεροποίηση της A[•] μπορεί να συμβεί με εισαγωγή δεύτερης υδροξυ – ομάδας λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου ή με υποκατάσταση σε ο-θέση με ογκώδεις αλκυλο-ομάδες. Στην περίπτωση αυτή, προκαλούνται φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης καθώς η ρίζα δεν μπορεί να προσεγγίσει το λιπαρό υπόστρωμα εύκολα και να αλληλοεπιδράσει μαζί τους. Η τυροσόλη ευνοείται κυρίως από αντιδράσεις που συμβάλλουν στην απελευθέρωση υπεροξειδικών και άλλων τύπων ριζών και αυτός είναι ο λόγος που εμφανίζει μειωμένη αντιοξειδωτική δράση (Harzallah, 1993).

1.6 Βιολογική αξία παρθένου ελαιολάδου

Το παρθένο ελαιόλαδο ως βασικό συστατικό της Μεσογειακής Διατροφής, κατέχει κυρίαρχη θέση στο διατροφικό κώδικα των περιοχών που το παράγουν αλλά και γενικότερα, καθώς με τις ωφέλιμες ιδιότητες του συμβάλλει στην καλή υγεία του ανθρώπου. Οι μεγαλύτεροι ιατροί της Αρχαιότητας αναφέρθηκαν εκτενώς στις ευεργετικές του ιδιότητες και μάλιστα στον Ιπποκράτειο Κώδικα αναφέρονται περισσότερες από 60 ευεργετικές χρήσεις του. Ορισμένες χρόνιες παθήσεις έχουν άμεση σύνδεση με μηχανισμούς οξειδωσης, το οξειδωτικό στρες και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι αυτές με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο άτομο του οξυγόνου, που το καθιστούν ασταθές και ικανό να αντιδράσει βίαια με άλλα μόρια. Γνωστές ελεύθερες ρίζες είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η υδροξυλική ρίζα ($OH\cdot$), οι υπεροξειδικές ρίζες ($ROO\cdot$), η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$) κ.α. (MacDonald-Wicks et al., 2006). Οι μορφές αυτές, προσβάλλουν σημαντικά βιομόρια και επηρεάζουν αρνητικά μηχανισμούς που συνδέονται με ασθένειες. Η εμπλοκή των μηχανισμών αυτών στην προστασία έναντι μολύνσεων, στάθηκε η αιτία να διατυπωθεί η άποψη για την ευεργετική επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών από φυσικά φυτικά τρόφιμα στην υγεία.

1.6.1 Επίδραση στην υγεία

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΕ) 432/2012 εγκρίθηκε ο ισχυρισμός υγείας για το ελαιόλαδο και διατυπώθηκε ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες. Ο ισχυρισμός αυτός χρησιμοποιείται για το ελαιόλαδο το οποίο περιέχει 5mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (π.χ. σύμπλοκο ελευρωπαΐνης και τυροσόλης) ανά 20 g ελαιολάδου. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της πληροφορίας αυτής εξασφαλίζονται με την ημερήσια πρόληψη 20g ελαιολάδου.

1.6.2 Ευεργετικές ιδιότητες ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο, ως ένα από τα πιο σπουδαία έλαια, διακρίνεται για τη μεγάλη θρεπτική του αξία, καθώς τα πολύτιμα συστατικά που περιέχει δρουν ευεργετικά για τις περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Ο Ιπποκράτης είχε ονομάσει το ελαιόλαδο το «μέγα θεραπευτικό». Στη σύγχρονη εποχή έχουν γίνει πολλές μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες για τη βιολογική αξία του ελαιόλαδου, με μια πρόσφατη αυτή που δείχνει μια πιθανή φαρμακευτική χρήση της υδροξυτυροσόλης στη θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου και στη μείωση του διαβήτη (Cao et al., 2014). Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στο σχηματισμό και στη συντήρηση των οστών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία των συμπτωμάτων της οστεοπόρωσης, μιας και δύναται να ενεργοποιήσει την απόθεση του ασβεστίου και να εμποδίσει το σχηματισμό πολυπύρηνων οστεοκλαστών, με τρόπο εξαρτώμενο από τη δοσολογία (Hagiwara et al., 2011). Άλλη έρευνα αποκαλύπτει πως δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιόλαδο έχει προστατευτική δράση σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Salas-Salvadó et al., 2011).

Η ελευρωπαΐνη έχει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες, που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας των γυναικών παγκοσμίως. Περαιτέρω έρευνες θα ήταν χρήσιμες ώστε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού (Elamin et al., 2013). Άλλη έρευνα δείχνει πως η ελευρωπαΐνη ρυθμίζει στον καρκίνο του μαστού τη μετάσταση συγκεκριμένων κυττάρων με την καταστολή της έκφρασης κάποιων γονιδίων (Hassan et al., 2012). Παρόμοια έρευνα αποδεικνύει πως η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη προκαλούν κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων MCF-7 του καρκίνου του μαστού (Han et al., 2009).

Η υδροξυτυροσόλη, η ελευρωπαΐνη αλλά και η τυροσόλη με σειρά αποτελεσματικότητας όπως αναφέρονται, αναστέλλουν τη λευκοτριένη B4 (Petroni et al., 1997). Το ενδοθήλιο εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη της φλεγμονώδους νόσου, της αθηροσκλήρωσης. Η αθηροσκλήρωση είναι η κύρια αιτία θανάτου σε ανεπτυγμένες χώρες, καθώς ως προϊόν δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου επηρεάζει στεφανιαίες αρτηρίες και οδηγεί σε καρδιαγγειακά συμβάματα. Επιπλέον, η οξειδωτική βλάβη συνδέεται ποσοτικά με την ποσότητα των φαινολών στο ελαιόλαδο καθώς αυτό

επιηρεάζει τις λειτουργίες του ενδοθηλίου είτε απευθείας, είτε μέσω της μείωσης της οξειδωτικής κατάστασης (Convas, 2007). Οι ρίζες οξυγόνου επιτίθενται σε ανθρώπινα κύτταρα και μέσω της οξειδωτικής καταστροφής του DNA προκαλούν ένα πρόσφορο περιβάλλον για καρκινογένεση. Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες που μπορεί να βελτιώσουν την ενδοθηλιακή λειτουργία και να μειώσουν τα επίπεδα των ROS στο ενδοθήλιο, άρα βοηθούν την καρδιακή λειτουργία (Pegona et al., 2006). Μια άλλη έρευνα αποδεικνύει πως τα οφέλη της κατανάλωσης αποκλειστικά έξτρα παρθένου ελαιόλαδου, μέσα σε λίγες ώρες από την κατανάλωση του, είναι σημαντικά καθώς μειώνονται οι δείκτες φλεγμονής TXB2, LTB4 και οι δείκτες οξειδωτικού στρες (Bogani et al., 2007).

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Bisignano et al., 1999) και συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη απενεργοποιεί ιούς της influenza A (Yamada et al., 2009). *In vivo* μελέτη, δείχνει μια προληπτική δράση της υδροξυτυροσόλης και μίγματος φαινολών εκχυλισμένων από ελαιόλαδο και κατσίγαρο, συνεπαγόμενη στην καταστροφή DNA περιφερειακών μονοπύρηνων κυττάρων αίματος και προμυελωτικών κυττάρων λευχαιμίας. Σε αυτή την περίπτωση οι φαινόλες είχαν πιθανό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου (Fabiani et al., 2008).

Άλλη έρευνα αποδεικνύει πως τα οφέλη του ελαιολάδου είναι πολλά, καθώς δίαιτες πλούσιες σε ελαιόλαδο, μειώνουν τις απαιτήσεις σε ινσουλίνη και την συγκέντρωση της γλυκόζης και της ινσουλίνης πλάσματος στον διαβήτη τύπου 2. Ανάλογη έρευνα δείχνει πως η κατανάλωση ελαιολάδου βελτιώνει το προφίλ των λιπιδίων, καθώς μειώνει τον λόγο LDL/HDL (Martinez-Gonzalez and Sanchez-Villegas, 2004). Η υδροξυτυροσόλη και η ελευρωπαΐνη έχουν αναγνωρισθεί σαν μοναδικοί παρεμποδιστές του HIV-1 να εισέλθει στα κύτταρα ξενιστές (Lee-Huang et al., 2007). Παράγωγα της υδροξυτυροσόλης είναι επίσης χρήσιμα όταν χρησιμοποιούνται τοπικά σαν αντιβιοτικό για πρόληψη κατά του HIV όπως επίσης και σε άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα που προκαλούνται από μύκητες βακτήρια ή ιούς (Gómez-acebo et al., 2012). Οι φαινόλες του παρθένου ελαιολάδου, μεταξύ των οποίων η υδροξυτυροσόλη και η τυροσόλη, είναι ικανές να αναστείλουν διάφορα στάδια καρκινογένεσης και μετάστασης του ανθρώπινου καρκινώματος του παχέος εντέρου με την υδροξυτυροσόλη να έχει τις πιο αντιοξειδωτικές επιδράσεις (Hashim et al., 2014).

Σημαντικός είναι και ο ρόλος των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου ως προς την ανασταλτική τους δράση κατά την παραγωγή εικοσανοειδών. Υπάρχει σχέση μεταξύ ανάπτυξης καρκίνου και ανώμαλης υπερέκφρασης ενζύμων σχηματισμού εικοσανοειδών όπως οι λιποξυγενάσες (LOX) και οι κυκλοοξυγενάσες (COX) (Hoffman, 2012).

In vitro μελέτη της υδροξυτυροσόλης και της ελευρωπαΐνης απέδειξε πως είναι αρκετά κυτταροτοξικές σε μεγάλο αριθμό βακτηριδιακών στελεχών του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού και είναι σημαντικός ο ρόλος τους εφόσον τα βακτηρίδια του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού σχετίζονται με την ανάπτυξη του πεπτικού έλκους και ορισμένους τύπους καρκίνου του στομάχου (Romero et al., 2007) .

1.7 Παραλαβή του ελαιολάδου

1.7.1 Συγκομιδή και μεταφορά του ελαιόκαρπου

Το ελαιόλαδο λαμβάνεται από τον ελαιόκαρπο με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. Πρώτη διαδικασία αποτελεί η συγκομιδή του στο βέλτιστο στάδιο ωρίμανσης, καθώς τότε η περιεκτικότητα του σε πολικές φαινόλες και πτητικές ενώσεις που σχετίζονται με το άρωμα του είναι μεγαλύτερη (Therios, 2009). Οι ελαιοποιήσιμες ποικιλίες συγκομίζονται όταν εξωτερικά αυξηθεί το μέγεθος του καρπού και το χρώμα του αλλάξει από πράσινο ή κίτρινο σε μελανοϊώδες. Η συγκομιδή πραγματοποιείται είτε με τα χέρια είτε με ειδικά μηχανήματα ώστε να μην τραυματιστεί ο καρπός. Όταν η συγκομιδή γίνεται με τα χέρια, το λάδι έχει χαμηλότερη οξύτητα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (Dag et al., 2008), (Yousfi et al., 2012). Σχετικά με το βάρος του καρπού, πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 1,2 γραμμάρια το Νοέμβριο και μικρότερο από 0,8 γραμμάρια ένα μήνα αργότερα. Η περίοδος της συγκομιδής για τις ορεινές περιοχές όπως είναι η περιοχή του Κολυμβαρίου, είναι Δεκέμβρη –Ιανουάριο. Ακολουθεί η μεταφορά του καρπού με τρόπο που να επιτυγχάνεται ο επαρκής αερισμός του και να αποφεύγεται ο πιθανός τραυματισμός του. Συνήθως, χρησιμοποιούνται πλαστικά τελάρα με οπές αερισμού ή πλαστικοί σάκοι. Η

επεξεργασία του πρέπει να γίνεται άμεσα, ώστε να αποφευχθεί ενδεχόμενη αλλοίωση του (Boskou, 2009).

Στην ποιότητα του παραγόμενου ελαιόλαδου ιδιαίτερο ρόλο διαδραματίζει ο τύπος του ελαιοτριβείου και σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως τρία συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου. Τα δύο συστήματα είναι φυγοκεντρικού τύπου και το τρίτο είναι σύστημα με υδραυλική πίεση. Στην παρούσα εργασία τα δείγματα προήλθαν από τρία ελαιοτριβεία του Νομού Χανίων, ένα παραδοσιακού τύπου, ένα διφασικό και ένα τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης.

1.7.2 Τύποι ελαιοτριβείων

1.7.2.1 Παραδοσιακό ελαιοτριβείο με μυλόπετρες – Στάδια επεξεργασίας

1.7.2.1.1 Παραλαβή, αποφύλλωση και πλύσιμο ελαιόκαρπου παραδοσιακού ελαιοτριβείου

Ο καρπός, μεταφέρεται αρχικά στη λεκάνη τροφοδοσίας και στη συνέχεια οδηγείται στο αποφυλλωτήριο μέσω μεταφορικής ταινίας. Η αποφύλλωση, αποτελεί το πρώτο στάδιο της επεξεργασίας του ελαιολάδου και είναι απαραίτητη, καθώς η συν-έκθλιψη των φύλλων με τον ελαιόκαρπο, οδηγεί σε ελαιόλαδο με πικρή γεύση, πλούσιο σε χλωροφύλλη, η οποία παρουσία φωτός επιδρά αρνητικά στην ποιότητά του επιταχύνοντας την οξείδωσή του. Η αποφύλλωση πραγματοποιείται με αυτόματες μηχανές, οι οποίες απομακρύνουν το φύλλωμα με ρεύμα αέρα. Όταν ο ελαιόκαρπος μεταφερθεί στο ελαιοτριβείο, περιέχει ξένες ύλες όπως χώμα, πέτρες, σκόνη και άλλα στερεά σωματίδια. Για την απομάκρυνση των ξένων υλών, οι καρποί τοποθετούνται σε ένα τύμπανο στο οποίο κυκλοφορεί κρύο νερό και μετά το πλύσιμό τους ζυγίζονται ώστε να είναι γνωστή η ποσότητα του καθαρού καρπού κάθε παραγωγού.

1.7.2.1.2 Άλεση ελαιοκάρπου παραδοσιακού ελαιοτριβείου

Μετά την απομάκρυνση του φυλλώματος και των ξένων υλών, ακολουθεί το ζύγισμα του ελαιοκάρπου ώστε να μεταφερθεί στη λεκάνη υποδοχής και με τη βοήθεια μεταφορικού

κοχλία να ξεκινήσει η άλεση του στις κυλινδρικές μύλοπετρες (Εικόνα 11). Οι μύλοπετρες είναι κυλινδρικού σχήματος από γρανίτη και περιστρέφονται αργά γύρω από ένα μεταλλικό άξονα ο οποίος βρίσκεται σε όμοιας σύστασης σταθερή βάση εκτελώντας 12 περιστροφές το λεπτό. Η άλεση του ελαιοκάρπου έχει στόχο τη διάρρηξη των κυττάρων του μεσοκαρπίου, ώστε να καταστεί εφικτή η εξαγωγή του ελαίου και να σχηματισθούν σταγόνες μεγαλύτερου μεγέθους που θα διαχωριστούν ευκολότερα στα επόμενα στάδια κατεργασίας. Η σταθερότητα του ελαίου εξαρτάται από το μέγεθος των σταγόνων που περιέχει, οι οποίες περιβάλλονται από μεμβράνη που το βοηθά να έχει τη μορφή γαλακτώματος. Η σταθερότητά του είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος των σταγονιδίων. Οι πηκτίνες της ελαιόπαστας δημιουργούν ένα κολλοειδές σύστημα στο οποίο είναι δεσμευμένο ένα μικρό ποσοστό της ελαιόπαστας (Petraakis,2006).



Εικόνα11: Μύλοπετρες ελαιοτριβείου παραδοσιακού τύπου με διαδικασία αυτοματοποιημένου ελέγχου.

1.7.2.1.3 Μάλαξη Ελαιοζύμης παραδοσιακού ελαιοτριβείου

Η μάλαξη της ελαιοζύμης αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα σημεία της διαδικασίας εξαγωγής ελαιόλαδου. Οι συνθήκες της, όπως είναι ο χρόνος, η θερμοκρασία και η σύνθεση της ατμόσφαιρας σε επαφή με την ελαιοζύμη, μπορεί να επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τα υγιή και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Ο μαλακτήρας είναι σημαντικό να παραμένει κλειστός κατά τη διάρκεια της μάλαξης, για τον απόλυτο έλεγχο της συγκέντρωσης του οξυγόνου, με την προσθήκη ευγενούς αερίου το οποίο έχει τη δυνατότητα να μειώσει την οξειδωτική υποβάθμιση των φαινολικών ενώσεων και να παρατείνει το χρόνο της μάλαξης. Χρόνος μάλαξης 30-45' σε θερμοκρασία έως 30°C συνίσταται για την παραλαβή καλής ποιότητας λαδιού (Clodoveo, 2012). Η χρήση του CO₂ που παράγεται με φυσικό τρόπο από την πάστα κατά τη διάρκεια της μάλαξης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη φυσική αδρανοποίηση του υπερκείμενου χώρου του μαλακτήρα, μειώνοντας το κόστος της χρήσης του αδρανούς αερίου. Η προσθήκη χλιαρού νερού στην πάστα μπορεί να βελτιώσει την εκχυλισσιμότητα του ελαίου, αλλά μειώνονται ταυτόχρονα και οι φαινόλες που είναι υδρόφιλες σε συνάρτηση με το νερό που προστίθεται (Clodoveo, 2012).

Στο συγκεκριμένο ελαιοτριβείο, μετά την έκθλιψη του ελαιόκαρπου, η ελαιοζύμη εισέρχεται σε μια λεκάνη με ειδικούς μαλακτήρες ορθογώνιου σχήματος, εντός των οποίων κυκλοφορεί νερό. Το σύστημα μάλαξης που περιέχει το συγκεκριμένο ελαιοτριβείο επιτρέπει τη μάλαξη σε χαμηλή θερμοκρασία και έτσι το έλαιο είναι προστατευμένο από οξειδώσεις, ενώ δεν είναι μεγάλης διάρκειας και το άρωμα του παραγόμενου ελαιόλαδου είναι αρκετά έντονο. Με τη μάλαξη εξέρχεται το ελαιόλαδο από τα φυτικά κύτταρα, καθώς επιτυγχάνεται η συνένωση των ελαιοσταγονιδίων του μεσοκαρπίου και διευκολύνεται ο διαχωρισμός του από την υδατική φάση. Η ελαιοζύμη σε αυτού του τύπου τα ελαιοτριβεία, είναι πιο λεπτή και μαλακή από ότι σε ελαιοτριβεία άλλου τύπου. Το στάδιο αυτό είναι υψίστης σημασίας για την απόδοση αλλά και την ποιότητα του ελαιολάδου.



Εικόνα 12: Πρέσες υψηλής πίεσης για τον διαχωρισμό του ελαιολάδου με χαρακτηριστικά ελαιόπανα

1.7.2.1.4 Διαχωρισμός ελαιολάδου παραδοσιακού ελαιοτριβείου

Μετά την μάλαξη, η πάστα πέφτει στα ελαιόπανα (πλεγμένα σχοινιά κυλινδρικού σχήματος) τους λεγόμενους "ντορβάδες"(Εικόνα 12), τα οποία συγκρατούνται από έναν άξονα που περνά από την οπή που έχουν στο κέντρο τους, τοποθετούνται χειροκίνητα το ένα πάνω στο άλλο και οδηγούνται στο πιεστήριο, όπου το έλαιο διαχωρίζεται μηχανικά σε υδραυλικές πρέσες υψηλής πίεσης έως 400 atm. Είναι μια ασυνεχής διαδικασία που με την πίεση των αλεσμένων καρπών, το μίγμα διαφοροποιείται σε δύο φάσεις. Προϊόντα αυτής της συμπίεσης είναι ο ελαιοπυρήνας και η ελαιόπαστα. Κατά τη διάρκεια της συμπίεσης του ελαιόκαρπου, το μίγμα ελαιόλαδο-νερό κυλάει και προχωράει προς το ντεκάντερ. Με τη διαδικασία της ψυχρής πίεσης δεν υπάρχει απώλεια αντιοξειδωτικών ουσιών, διότι η ελαιόπαστα δεν υφίστανται αραίωση. Μετά το διαχωριστή φάσεων παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο και τα υγρά απόβλητα.



Εικόνα 13: Τελικός διαχωρισμός α) ελαιολάδου και β) κασίγαρου σε παραδοσιακό ελαιοτριβείο

1.7.2.2 Ελαιοτριβείο δύο φάσεων – Στάδια επεξεργασίας

1.7.2.2.1 Παραλαβή, αποφύλλωση και πλύσιμο ελαιόκαρπου σε διφασικό ελαιοτριβείο

Στο συγκεκριμένο ελαιοτριβείο κατά την παραλαβή των καρπών, δίδεται ένας κωδικός, ο οποίος καταχωρείται στο σύστημα ιχνηλασιμότητας και μπορεί κάθε παραγωγός να ανιχνεύει τον καρπό του σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας.



Εικόνα 14: Εσωτερικός χώρος στον οποίο διακρίνονται οι μονάδες παραγωγής και το σύστημα αποφύλλωσης και πλυσίματος του καρπού σε διφασικό ελαιοτριβείο

Ακολουθεί η διαδικασία της αποφύλλωσης, όπου μεγάλοι ανεμιστήρες ξεχωρίζουν φύλλα, κλαδιά και άλλα ξένα σώματα που μπορεί να υπάρχουν στα δίκτυα κατά την συλλογή των ελιών. Έπειτα, οι ελιές μπαίνουν σε ένα μεγάλο σιλό ανάλογα με την ποιότητά τους και αφού κατηγοριοποιηθούν από το εργαστήριο της εταιρείας το οποίο με τη βοήθεια λογισμικού ελέγχει κάποια χαρακτηριστικά του καρπού, μπαίνουν σε μια από τις δύο μεγάλες μονάδες παραγωγής για την υπόλοιπη διαδικασία. Στην γραμμή παραγωγής, οι ελιές πλένονται τρεις φορές με πόσιμο νερό ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φύλλα, ακαθαρσίες και ξένα σώματα που ενδέχεται να περιέχουν.



Εικόνα 15: Αποφυλλωτήριο σε διφασικό ελαιοτριβείο



Εικόνα 16: Πλύσιμο ελαιόκαρπου σε διφασικό ελαιοτριβείο

1.7.2.2 Άλεση ελαιόκαρπου σε διφασικό ελαιοτριβείο

Μετά το πλύσιμο, οι ελιές μεταφέρονται σε έναν ανοξείδωτο σπαστήρα με μεταλλικούς περιστρεφόμενους δίσκους, οι οποίοι κινούμενοι με μεγάλη ταχύτητα, τεμαχίζουν τους καρπούς μαζί με τον πυρήνα. Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής, είναι η παραγωγή μιας μικρό-τεμαχισμένης ελαιόπαστας.



Εικόνα 17: Εσωτερικός χώρος διφασικού ελαιοτριβείου.

1.7.2.3 Μάλαξη ελαιοκάρπου σε διφασικό ελαιοτριβείο

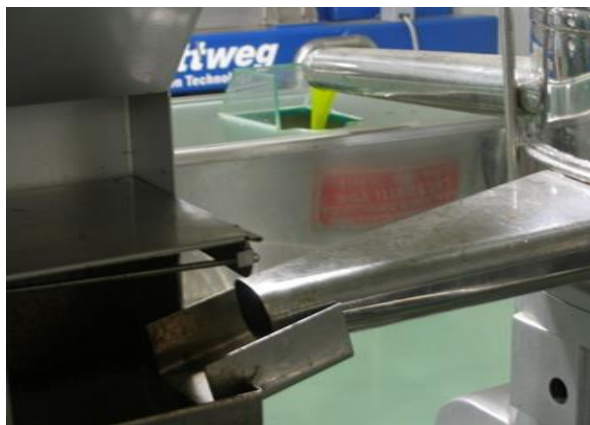
Η ελαιόπαστα που προκύπτει από τον τεμαχισμό του καρπού, οδηγείται στους μαλακτήρες που είναι μεγάλα δοχεία από ανοξείδωτο ατσάλι. Η θερμοκρασία της μάλαξης ελέγχεται από ένα αυτόματο σύστημα καταγραφής θερμοκρασιών έκθλιψης και δεν ξεπερνά τους 27° C, ενώ η διάρκεια της μάλαξης είναι 45'.



Εικόνα 18: Εσωτερικός χώρος μαλακτήρα

1.7.2.2.4 Διαχωρισμός ελαιολάδου σε διφασικό ελαιοτριβείο

Σε αυτό το στάδιο, παραλαμβάνεται λάδι και υγρός ελαιοπυρήνας χωρίς προσθήκη νερού, γεγονός που βοηθά να μην απομακρυνθούν οι υδατοδιαλυτές πτητικές και αντιοξειδωτικές ουσίες του ελαιολάδου. Το λάδι που προκύπτει περιέχει και μικρή ποσότητα ιζήματος, οπότε στο τελικό στάδιο διαχωρίζεται πλήρως και παραλαμβάνεται το ελαιόλαδο. Ο ελαιοπυρήνας των διφασικών συστημάτων, αποτελεί το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτών των ελαιοτριβείων, εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού υγρασίας που έχει, γεγονός που τον καθιστά δύσκολο στην επεξεργασία του. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα πυρηνελαιουργεία που είναι υπεύθυνα για την επεξεργασία του βρίσκονται σε μακρινές αποστάσεις και η μεταφορά του είναι ασύμφορη, με αποτέλεσμα να παραμένει ανεκμετάλλευτος και να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.



Εικόνα 19: Τελικός διαχωρισμός ελαιολάδου σε διφασικό ελαιοτριβείο



Εικόνα 20: Απόνερα τελικής διαδικασίας σε διφασικό ελαιοτριβείο

1.7.2.3 Ελαιουργικό συγκρότημα τριών φάσεων – Στάδια επεξεργασίας

Πρόκειται για ένα ελαιοτριβείο συνεχούς έκθλιψης με μια γραμμή παραγωγής, στο οποίο αλέθονται 800-900tn τη σεζόν. Χαρακτηριστικά, τη φετινή χρονιά αλέστηκαν μόνο 300-350tn λόγω βροχοπτώσεων την Άνοιξη.

1.7.2.3.1 Παραλαβή, αποφύλλωση και πλύσιμο ελαιόκαρπου τριφασικού συστήματος ελαιοποίησης

Σχεδόν σε όλα τα ελαιοτριβεία οι διαδικασίες προετοιμασίας του καρπού είναι κοινές και η διαφοροποίηση έγκειται στο σύστημα αυτοματισμού που μπορεί να έχουν. Στο τριφασικό σύστημα ο ελαιόκαρπος παραλαμβάνεται και τοποθετείται στην λεκάνη τροφοδοσίας και εν συνεχεία οδηγείται στο αποφυλλωτήριο όπου με ρεύμα αέρα απομακρύνονται τα φύλλα και οι ξένες ύλες. Ακολουθεί το πλύσιμο του καρπού με πόσιμο νερό για τον καλύτερο καθαρισμό του.



Εικόνα 21: Σακιά με ελαιόκαρπο στον χώρο παραλαβής τριφασικού ελαιοτριβείου



Εικόνα 22: Πλύσιμο ελαιόκαρπου σε τριφασικό ελαιοτριβείο

1.7.2.3.2 Άλεση σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Μετά το πλύσιμο του ο ελαιόκαρπος βρίσκεται σε ειδική λεκάνη και από εκεί μεταφέρεται με τη βοήθεια μεταφορικού κοχλίου στους μεταλλικούς σπαστήρες, όπου σπάει ο πυρήνας του καρπού και προκύπτει η ελαιοζύμη.



Εικόνα 23: Εσωτερικός χώρος τριφασικού ελαιοτριβείου πριν τη μάλαξη

1.7.2.3.3 Μάλαξη ελαιοζύμης σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Η μάλαξη της ελαιοζύμης, πραγματοποιείται σε ειδικές δεξαμενές με διπλά τοιχώματα, στα οποία κυκλοφορεί ζεστό νερό και στο εσωτερικό τους υπάρχουν περιστρεφόμενα πτερύγια με τα οποία υλοποιείται η μάλαξη. Υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης τόσο της ποσότητας όσο και της θερμοκρασίας του νερού, παράγοντες σημαντικοί για την ποιότητα του παραγόμενου ελαιολάδου. Η θέρμανση της ελαιοζύμης, βοηθά στην εξαγωγή του ελαιολάδου από τα φυτικά κύτταρα και πάνω στους μαλακτήρες υπάρχουν αυτόματοι θερμοστάτες για την καταγραφή της θερμοκρασίας, ώστε να μην ξεπερνά τιμές που θα υποβαθμίσουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος.



Εικόνα 24: Μάλαξη ελαιοζύμης τριφασικού συστήματος ελαιοποίησης

1.7.2.3.4 Φυγοκεντρικός διαχωριστήρας σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Η διαδικασία της φυγοκέντρισης περιλαμβάνει δύο μέρη, τον κύριο διαχωρισμό με τον οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα και τον κατακόρυφο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα που πραγματοποιεί τον τελικό διαχωρισμό.

1.7.2.3.4.1 Οριζόντιος διαχωριστήρας (*Tricanter*) σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Η ελαιοζύμη μέσω αντλίας οδηγείται μετά τη μάλαξη στον οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, στον οποίο οι περιστρεφόμενοι δίσκοι που έχει στο εσωτερικό του κινούμενοι με γρήγορη ταχύτητα, βοηθούν στο διαχωρισμό του ελαιολάδου. Η φυγοκέντριση στηρίζεται στην διαφορά του ειδικού βάρους των συστατικών της ελαιοζύμης και την αδυναμία τους να αναμιχθούν μεταξύ τους. Για τον καλύτερο διαχωρισμό του ελαιολάδου, προστίθεται ζεστό νερό περίπου 300-600L/Kgr καρπού, σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας. Από τις εξόδους του μηχανήματος παραλαμβάνεται το λάδι με μικρό μέρος φυτικών υγρών, ο κατσίγαρος (υδατικά απόβλητα) και ο ελαιοπυρήνας (πυρήνας και σάρκα από την ελαιοζύμη).



Εικόνα25: Παραλαβή ελαιολάδου με φυτικά υγρά και κασίγαρος από οριζόντιο διαχωριστήρα σε τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης

1.7.2.3.4.2 Κάθετος διαχωριστήρας σε τριφασικό ελαιοτριβείο

Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιολάδου στο τριφασικό ελαιοτριβείο λαμβάνει χώρα στον κάθετο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, όπου με την περιστροφή των δίσκων και την εισαγωγή ζεστού νερού, οι προσμίξεις του λαδιού οδηγούνται στην υδατική φάση και παραλαμβάνεται ο κασίγαρος. Το ελαιόλαδο διαχωρίζεται από το νερό και τα στερεά σωματίδια τα οποία έχουν παραμείνει από το προηγούμενο στάδιο διαχωρισμού.



Εικόνα 26: Παραλαβή ελαιολάδου μετά τον κάθετο διαχωριστήρα σε τριφασικό ελαιοτριβείο

1.8 Χημικές αλλοιώσεις του ελαιολάδου

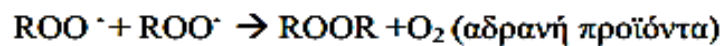
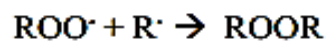
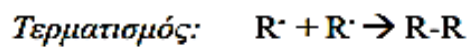
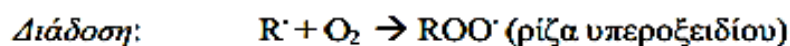
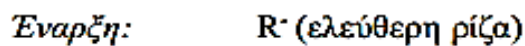
Η ποιότητα του ελαιολάδου, σχετίζεται με τις φυσιολογικές συνθήκες του καρπού από τον οποίο εξάγεται. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, συμβαίνουν σημαντικές χημικές αλλαγές μέσα στον καρπό, οι οποίες έχουν σχέση με τη σύνθεση των οργανικών ουσιών και ειδικότερα των τριγλυκεριδίων αλλά και άλλων ενζυματικών δραστηριοτήτων που ενδεχομένως επηρεάζουν την ποιότητα του παρθένου ελαιολάδου (Piscopo and Poiana, 2012). Η λιπόλυση ή αλλιώς υδρολυτική τάγγιση, είναι μια από τις σημαντικές αλλοιώσεις του ελαιολάδου και λαμβάνει χώρα κυρίως πριν την παραλαβή του.

Η οξείδωση, αποτελεί τη σπουδαιότερη και συνηθέστερη αλλοίωση στα τρόφιμα και κατ' επέκταση στο ελαιόλαδο. Κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου συμβαίνουν οξειδωτικές μεταβολές, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η θρεπτική αξία του εφόσον μεταβάλλεται η σύσταση του σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (λινελαϊκό και λινολενικό) και καταστρέφονται οι λιποδιαλυτές βιταμίνες του (Wasowicz, 2004). Η οξείδωση λαμβάνει χώρα παρουσία αλλά και απουσία φωτός και μπορεί να επιφέρει τροποποίηση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιολάδου. Η αυτοοξείδωση συμβαίνει όταν δεν υπάρχει φως στις οξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ η φωτοοξείδωση συμβαίνει παρουσία φωτός.

Οι αλλαγές στο λιπιδικό υπόστρωμα εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες. Η χαμηλή περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε πολυακόρεστα λιπαρά, σε συνδυασμό με τις αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχει, το καθιστούν ανθεκτικό στην αυτοοξείδωση. Καλής ποιότητας παρθένο ελαιόλαδο ανθίσταται στην αυτοοξείδωση περισσότερο από άλλα λάδια πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά. Επιπλέον, οι αλλαγές οξείδωσης είναι αργές, όταν το δοχείο είναι γεμάτο με ελαιόλαδο ή N_2 και γρήγορες, όταν τα δοχεία ανοίγονται περιοδικά ή είναι μισογεμάτα (Psomiadou and Tsimidou, 2002). Οι μεταλλικές επιφάνειες της δεξαμενής και το οξυγόνο που μπορεί να βρίσκεται εντός αυτής ή στο μέσο συσκευασίας του επιταχύνουν την αυτοοξείδωση του ελαιολάδου. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο κρίνεται σκόπιμο η αποθήκευση του ελαιολάδου να πραγματοποιείται σε συνθήκες χαμηλής πίεσης, ή σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου όπως είναι το άζωτο N_2 . Το παρθένο ελαιόλαδο διατηρεί αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά του για διάστημα 90 εβδομάδων κάτω από σωστές συνθήκες αποθήκευσης (Mancebo-Campos et al., 2014). Ερευνητές απέδειξαν πως η

αποθήκευση του παρθένου ελαιολάδου σε ανοξειδωτά δοχεία και γυάλινα σκούρου χρώματος για διάστημα 12 μηνών, είναι καλύτερη για τη διατήρηση των αντιοξειδωτικών συστατικών του από ότι σε πλαστικά δοχεία πολυαιθυλενίου (PET) (Dabbou et al., 2010). Άλλη έρευνα έδειξε πως με την αποθήκευσή του για 6 μήνες σε μεταλλικά δοχεία λευκοσιδήρου, γυαλιού πολυαιθυλενίου και χάρτινα με εσωτερική επίστρωση φιλμ αλουμινίου με πλαστικό, είχε υποστεί μικρότερη υποβάθμιση στο χάρτινο και το μεταλλικό μέσο. Τα χάρτινα δοχεία έχουν αποτελεσματικό φραγμό στο φως και το οξυγόνο, παρόλο που τα πλαστικά τελευταίας τεχνολογίας έχουν χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο (Méndez and Falqué, 2007). Η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα της οξείδωσης αναλογικά με την αύξηση της. Ο μηχανισμός αυτοοξείδωσης των λιπιδίων παρουσιάζεται παρακάτω (Gordon, 2001).

Κατά την έναρξη, δημιουργούνται ρίζες από ακόρεστα λιπίδια. Η διάδοση, οδηγεί στο σχηματισμό υπερόξυ ριζών, με την απορρόφηση του οξυγόνου από τη ρίζα του προηγούμενου σταδίου. Στο στάδιο του τερματισμού παράγονται σταθερά προϊόντα. Το στάδιο αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί και με αντιοξειδωτικά τα οποία δρουν ως δότες υδρογόνου και σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες που εξουδετερώνουν αυτές των λιπιδίων, σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις.



Η φωτοοξείδωση η οποία συμβαίνει παρουσία φωτός, οδηγεί σε μεγάλη υποβάθμιση του ελαιολάδου, στην οποία συμβάλλουν και οι χλωροφύλλες που περιέχει. Όταν το

ελαιόλαδο συσκευάζεται σε διαφανή δοχεία, οι χλωροφύλλες που είναι ευαισθητοποιητές και εμφανίζουν μέγιστο φάσμα απορρόφησης στα όρια του ορατού με το υπεριώδες, με αποτέλεσμα την διέγερση των ηλεκτρονίων στο μόριό τους και την μετάπτωση τους σε μια ηλεκτρονιακά διεγερμένη κατάσταση, ξεκινούν τη φωτοοξειδωση. Μεταφέρουν την ενέργεια σε ένα μόριο οξυγόνου (ενεργοποιημένο οξυγόνο) το οποίο συμπεριφέρεται ως ηλεκτρονιόφιλο και αντιδρά πολύ εύκολα με ακόρεστο λιπαρό οξύ (ενώσεις με διπλό δεσμό στο μόριο τους), με αποτέλεσμα να σχηματίζεται το υδροϋπεροξειδίο του λιπαρού οξέος (Rawls and Van Santen, 1970). Το β-καροτένιο, έχει αποδειχθεί πως παρεμποδίζει την δράση της χλωροφύλλης καθώς καταστέλλει το διαμαγνητικό οξυγόνο. Οι τοκοφερόλες λειτουργούν επίσης ως συλλέκτες του διαμαγνητικού οξυγόνου, παρεμποδίζοντας την φωτοοξειδωση. Επομένως, ο βαθμός της αλλοίωσης εξαρτάται τόσο από την διάρκεια της έκθεσης στο φως, όσο και από τις συγκεντρώσεις των χρωστικών του ελαιολάδου (Κυριτσάκης, 2007).

1.8.1 Ενζυμική οξείδωση

Η ενζυμική οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως είναι το λινελαϊκό, οφείλεται στην παρουσία οξειδωτικών ενζύμων όπως η φαινολοξειδάση (Τυροσινάση) και η λιποξυγενάση (LOX), όπου με την καταλυτική τους δράση σχηματίζουν υδροϋπεροξειδία τα οποία διασπώνται παρουσία άλλων ενζύμων (λυσών) σε κετόνες και αλδεύδες, που προσδίδουν χαρακτηριστική οσμή (Γεωργαλάκη, 1999).

1.8.2 Υδρολυτικές αλλοιώσεις

Λιπόλυση, είναι η υδρόλυση γλυκεριδίων προς ελεύθερα λιπαρά οξέα παρουσία νερού και οι κύριοι παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, τα ένζυμα και οι μικροοργανισμοί. Ανάλογα με τις αιτίες που την προκαλούν χωρίζεται σε ενζυμική και μικροβιακή. Η ενζυμική λιπόλυση οφείλεται στην καταλυτική δράση των λιπασών. Όταν μια λιπαρή ουσία παραμένει σε συνθήκες που επιτρέπουν την δράση των λιπασών, ενζύμων που είτε υπάρχουν φυσικά στον ελαιόκαρπο, είτε παράγονται από μικροοργανισμούς, μπορεί να συμβεί λιπόλυση μόνο στα μη θερμανθέντα έλαια, επειδή τα λιπολυτικά ένζυμα καταστρέφονται με την θέρμανση. Η παρουσία τους στον ελαιόκαρπο μπορεί να οφείλεται σε

επιμόλυνση του, έπειτα από επαφή με το χώμα στην περίπτωση μακράς παραμονής του στα δίχτυα ελαιοσυλλογής ή σε περίπτωση παραμονής των ελαιοκάρπων στο δέντρο για μεγάλο χρονικό διάστημα. Γενικότερα, ο λανθασμένος τρόπος αποθήκευσης του ελαιολάδου σε συνδυασμό με την παρουσία υγρασίας και την επίδραση των μικροβιακών λιπασών, οδηγεί σε ελαιόλαδα αυξημένης οξύτητας και μειωμένης ποιότητας (Aragicio, 2000). Πέρα από τις λιπάσες, στο ελαιόλαδο υπάρχουν και άλλα σημαντικά ένζυμα που συντελούν στην αποπύκνωση του ελαιολάδου, λόγω της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από την β-γλυκοσιδάση του ελαιοκάρπου. Ένζυμα από διάφορους ζυμομύκητες, όπως *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida wickerhamii*, μπορούν επίσης να υδρολύσουν την ελευρωπαΐνη καταλύοντας την διάσπαση β-D-γλυκοζιτικών δεσμών (Ciafardini and Zullo, 2002).

1.9 Φαινολικά συστατικά - Απόβλητα

Οι φαινολικές ενώσεις, δεν απαντούν μόνο στο ελαιόλαδο αλλά και στα απόβλητα των ελαιοτριβείων σε σημαντικές ποσότητες. Στο ελαιόλαδο, αποτελούν στοιχεία μεγάλης βιολογικής σημασίας, ενώ στα απόβλητα οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται ως βιοτοξικές, φυτοτοξικές και ανεπιθύμητες ενώσεις που συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό των αποβλήτων των ελαιοτριβείων ως επικίνδυνων για το περιβάλλον.

1.9.1 Απόβλητα Ελαιοτριβείων

Η υποβάθμιση των υδάτινων πόρων λόγω ανεξέλεγκτης ρίψης πάσης φύσεως αποβλήτων, αποτελεί μείζον πρόβλημα. Τα συστήματα ελαιοποίησης του ελαιοκάρπου, πέρα από την ποιότητα του ελαιολάδου, διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς τα απόβλητα που παράγουν. Στο παρελθόν υπήρχαν ελαιοτριβεία μικρής δυναμικότητας, παραδοσιακού τύπου, τα οποία δεν δημιουργούσαν το πρόβλημα που υφίσταται στις μέρες μας, δεδομένου ότι η παραγωγή ελαιολάδου πλέον γίνεται με φυγοκεντρικά συστήματα, συσσωρευμένα σε συγκεκριμένες περιοχές που παράγουν τεράστιο όγκο αποβλήτων. Η ποσότητα και η σύνθεση των αποβλήτων είναι διαφορετική για κάθε τύπο ελαιοτριβείου, εξαιτίας του γεγονότος ότι

κάθε σύστημα χρησιμοποιεί διαφορετική ποσότητα νερού σε διαφορετικά στάδια κατά την παραγωγική διαδικασία. Άλλοι παράγοντες υπεύθυνοι για τον όγκο και τη σύνθεση των αποβλήτων των ελαιοτριβείων, είναι η ποικιλία της ελιάς, το μέγεθος της έκτασης, η χρήση των φυτοφαρμάκων και των λιπασμάτων, το στάδιο ωριμότητας του ελαιοκάρπου κατά τη συγκομιδή κ.α. (Niaounakis, 2006).

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων χωρίζονται σε υγρά, στερεά και αέρια. Τα αέρια απόβλητα είναι τα καυσαέρια που παράγονται από τις μηχανές εσωτερικής καύσης, τα οποία θεωρητικά δημιουργούν το μικρότερο πρόβλημα, δεδομένου ότι οι εγκαταστάσεις βρίσκονται εκτός των αστικών κέντρων. Τα στερεά απόβλητα, είναι κυρίως ο ελαιοπυρήνας, το φύλλωμα της ελιάς και τα κλαδιά. Συνήθης πρακτική στην χώρα μας είναι η καύση των ελαιοκλαδων, με αποτέλεσμα τη ρύπανση της ατμόσφαιρας και τον κίνδυνο πυρκαγιών σε περιοχές με ισχυρούς ανέμους την περίοδο του κλαδέματος.

Τα υγρά απόβλητα, αποτελούν το κυριότερο περιβαλλοντικό πρόβλημα δεδομένης της τοξικότητας της σύνθεσής τους. Η ρίψη τους στο έδαφος, σε χείμαρρους, ποτάμια, θάλασσες και λίμνες, οδηγεί σε διατάραξη του οικοσυστήματος, με σοβαρά προβλήματα στη χλωρίδα και στην πανίδα. Οι λιπαρές ουσίες μειώνουν το πορώδες του εδάφους. Η έλλειψη οξυγόνου στο νερό, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία επιβίωσης των υδρόβιων οργανισμών, τη μόλυνση των υδροφόρων οριζόντων, τη μόλυνση του πόσιμου και του αρδευτικού νερού αλλά και τη ρύπανση των θαλασσών. Στον Πίνακα 7 γίνεται μια σύγκριση των κυριότερων χαρακτηριστικών των τριών συστημάτων παραλαβής ελαιολάδου. Το διφασικό σύστημα, έχει το μεγαλύτερο στερεό υπόλειμμα και τις χαμηλότερες τιμές σε απόνερα και υγρά απόβλητα. Το στερεό υπόλειμμα (ελαιοπυρήνας) των διφασικών συστημάτων, αποτελείται από υψηλό ποσοστό υγρασίας, γεγονός που τον καθιστά δύσκολο στη διαχείριση του, καθώς απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις και τεχνικές επεξεργασίας. Το τριφασικό σύστημα, έχει την υψηλότερη ποσότητα υγρών αποβλήτων (κατσίγαρου). Αυτό συμβαίνει διότι, τα ελαιοτριβεία τριών φάσεων χρησιμοποιούν μεγαλύτερες ποσότητες νερού (περίπου 1,5 φορές) συγκριτικά με τα παραδοσιακά συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου (Vlyssides et al., 2004).

Η διαδικασία εκχύλισης με τριφασικό σύστημα διαχωρισμού, εξακολουθεί να εφαρμόζεται στην πλειοψηφία των βιομηχανιών, ενώ παράγει 1-1.2m³ υγρών αποβλήτων/tn ελαίων ετησίως, που ισοδυναμεί με 12-24 εκατομμύρια κατσίγαρου στη λεκάνη της

Μεσογείου. Το παραδοσιακό σύστημα, έχει υγρά απόβλητα χαμηλότερης ποσότητας από το τριφασικό σύστημα, αλλά έχει την υψηλότερη τιμή του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου των υγρών αποβλήτων, που αποτελεί παράμετρο προσδιορισμού του οργανικού τους φορτίου (Πίνακας 7).

1.9.2 Υγρά απόβλητα- Συστατικά

Το υδατικό φυτικό εκχύλισμα των αποβλήτων των ελαιοτριβείων είναι ο κασίγαρος. Αποτελείται από νερό (83.4%), οργανικά (14.8%) και ανόργανα (1.8%) συστατικά (Πίνακας 8). Σε μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκονται τα σάκχαρα (κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη), ενώ οι φαιολικές ενώσεις παρόλο που υπάρχουν σε μικρό ποσοστό, είναι ικανές να προκαλέσουν τοξικότητα. Η βιοαποικοδόμηση τους είναι βραδεία, είναι φυτοτοξικές και αντιβακτηριδιακές, καθώς μειώνουν τον αριθμό των μικροοργανισμών. Τα σάκχαρα βοηθούν στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα στους υδάτινους αποδέκτες να ελαττώνεται το οξυγόνο και να διαταράσσεται το οικοσύστημα.

Πίνακας 7: Σύγκριση χαρακτηριστικών αποβλήτων μεταξύ τριών διαφορετικών συστημάτων εξαγωγής ελαιολάδου

	Παραδοσιακό σύστημα	Τριφασικό σύστημα	Διφασικό σύστημα
Στερεό υπόλειμμα (Kgr/tnκαρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα (L/tn καρπού)	600	1200	250
Φυτικό νερό υγρών αποβλήτων (%)	94	90	99
BOD ₅ αποβλήτων (g/L)	100	80	10
Πολυφαινόλες στα υγρά απόβλητα (mg/L)	203	164	200
Δείκτης πικρότητας	1.4	0.5	-

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων τριφασικού συστήματος (Fiestas Ros de Ursinos and Borja-Padilla, 1996)

ΟΡΓΑΝΙΚΑ		ΑΝΟΡΓΑΝΑ	
Λίπη	0.02-1%	Ανθρακικά άλατα	21%
Πρωτεΐνες	1.2-2.4%	Φωσφορικά άλατα	14%
Σάκχαρα	2-8%	Άλατα καλίου	47%
Οργανικά οξέα	0.5-1.5%	Άλατα νατρίου	7%
Πολυαλκοόλες	1-1.5%	Άλλα συστατικά	7%
Πηκτίνες-Κόμμεα- Ταννίνες	0.5-1.5%		
Πολυφαινόλες	0.5-1%		

Το υψηλό οργανικό φορτίο (BOD₅, COD) συνδυαστικά με τη παρουσία των φαινολικών και λιπαρών οξέων και των δύσκολα αποδομούμενων ταννινών, καθιστούν ανεπίτρεπτη τη διάθεσή των υγρών αποβλήτων στο περιβάλλον χωρίς επεξεργασία. Δεδομένου ότι το πρόβλημα των υγρών αποβλήτων εντοπίζεται στα τριφασικά αλλά και τα παραδοσιακά συστήματα, στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται κάποια από τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων του ελαιολάδου των συστημάτων αυτών.

1.9.2.1 Υγρά απόβλητα- Φαινολικά συστατικά

Πάνω από 30 διαφορετικά φαινολικά συστατικά ανιχνεύθηκαν στα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων και κατεγράφησαν από διαφορετικούς συγγραφείς. Αυτά βρίσκονται στον ελαιοκαρπο αλλά δημιουργούνται και κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου (Obied et al., 2005b). Σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες. Τις απλές φαινόλες, τα φλαβονοειδή, τις μη αυτοοξειδούμενες ταννίνες και άλλα συστατικά με $M.B \leq 10kDa$ και τα φαινολικά συστατικά μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους ($M.B \geq 10kDa$) που προέρχονται από τον πολυμερισμό και την αυτοοξείδωση των συστατικών της πρώτης ομάδας και είναι σκουρόχρωμα. Το χρώμα τους εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των δύο κατηγοριών και η χημική τους σύνθεση τα κατηγοριοποιεί σε 3 ομάδες. Στα παράγωγα του κινναμικού οξέος, του βενζοϊκού οξέος και της β-3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλης, όπως είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Άλλες φαινόλες που έχουν ανιχνευθεί, είναι η ελευρωπαΐνη, φαινολικά οξέα όπως το βανιλικό, το

πρωτοκατεχικό κ.α. Η υδροξυτυροσόλη ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα φαινολικά συστατικά καθώς είναι η πιο άφθονη φαινόλη στα υγρά απόβλητα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, είναι ένωση υψηλής προστιθέμενης αξίας με όλες τις ευεργετικές ιδιότητες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.6.2.

Γίνεται αντιληπτό ότι τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων έχουν αφενός υψηλή ρυπογόνο δύναμη, αφετέρου αποτελούν πηγή πολύτιμων συστατικών. Κατά καιρούς έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την καταστροφή των φαινολικών συστατικών των υγρών αποβλήτων λόγω των αρνητικών τους χαρακτηριστικών, αλλά είναι σημαντικότερη η προσπάθεια ανάκτησης των συστατικών αυτών από τα απόβλητα με οφέλη σε πολλαπλά επίπεδα. Για την απομάκρυνση του φαινολικού κλάσματος έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες βιολογικές, φυσικές, θερμικές και φυσικοχημικές διεργασίες

Πίνακας 9: Τιμές χαρακτηριστικών υγρών αποβλήτων παραδοσιακού και τριφασικού συστήματος παραλαβής ελαιολάδου (Vlyssides et al., 2004)

Παράμετροι	Παραδοσιακό σύστημα	Τριφασικό σύστημα
Ολικά στερεά (g/L)	99.70 ± 28.85	63.5 ± 24.4
TOC (g/L)	64.11 ± 10.79	39.82 ± 6.47
Ολικό άζωτο κατά Kjeldahl (g/L)	1.15 ± 0.21	0.76 ± 0.13
Ολικός φώσφορος ως P ₂ O ₅ (g/L)	0.87 ± 0.14	0.53 ± 0.084
pH	4.50 ± 0.60	4.8 ± 0.8
BOD ₅ (g/L)	68.71 ± 12.64	45.5 ± 8.2
COD (g/L)	158.18 ± 32.63	92.5 ± 17.5
Πυκνότητα (g/cm ³)	1.05 ± 0.06	1.048 ± 0.033
Αγωγιμότητα (mmhos/cm)	18 ± 5	12 ± 4
Ολικά σάκχαρα (g/L)	25.86 ± 8.3	16.06 ± 5.92
Λίπη και έλαια (g/L)	2.80 ± 1.03	1.64 ± 0.64
Φαινολικές ενώσεις (g/L)	17.15 ± 4.55	10.65 ± 4.08
Φαινολικά οξέα (g/L)	0.48 ± 0.18	0.28 ± 0.1
Ταννίνες (g/L)	6.74 ± 2.94	4.01 ± 1.54

Φυσικές μέθοδοι είναι η αραίωση, η επίπλευση, η ιζηματοποίηση, η φυγοκέντριση, η διήθηση και η χρήση μεμβρανών. Μεμονωμένα αυτές οι μέθοδοι δεν επιφέρουν αποτελέσματα στη μείωση του οργανικού φορτίου των υγρών αποβλήτων. Η αραίωση εφαρμόζεται κυρίως πριν τις βιολογικές μεθόδους, ώστε να μειωθεί η τοξικότητα των αποβλήτων.

Οι βιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τις λίμνες εξάτμισης, αερόβιες και αναερόβιες μεθόδους. Τα υγρά απόβλητα αποτελούν πρόσφορο υπόστρωμα για την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών (ζυμών, μυκήτων κ.α.) και το οργανικό φορτίο απομακρύνεται μέσω οξειδωτικών μικροβιακών διεργασιών. Οι αερόβιες διεργασίες περιλαμβάνουν την τεχνολογία ενεργού ιλύος, την μέθοδο της ολικής οξείδωσης, τους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου σε σειρά, τους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης και την τεχνολογία περιστρεφόμενων βιολογικών δίσκων. Οι αερόβιες βιολογικές μέθοδοι, δεν παράγουν ικανοποιητικά αποτελέσματα εξαιτίας της ύπαρξης υψηλών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών, των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων, της μεγάλης ποσότητας δευτεροβάθμιας ενεργού ιλύος και του υψηλού κόστους κατασκευής που έχουν.

Η αναερόβια χώνευση γίνεται με τη βοήθεια αναερόβιων μικροοργανισμών (βακτηρίων), οι οποίοι έχουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τους αερόβιους. Πρόκειται για μια μέθοδο ευαίσθητη και βραδεία. Περιλαμβάνει τρία στάδια, την υδρόλυση, την οξεογένεση και την μεθανιογένεση. Η τεχνολογία για την αναερόβια αποικοδόμηση οργανικού υλικού στηρίζεται στην κατασκευή αντιδραστήρων συνεχούς ροής πλήρους ανάδευσης, επαφής, αναερόβια φίλτρα ανοδικής ή καθοδικής ροής και αναερόβιο στρώμα ιλύος με ανοδική ροή. Η παρουσία φαινολικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη μεθανιογενών βακτηρίων.

Οι θερμικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την καύση και την πυρόλυση, την εξάτμιση και την απόσταξη. Οι δυο πρώτες έχουν υψηλό κόστος και εκπομπή ρύπων στην ατμόσφαιρα. Η εξάτμιση σε λίμνες απαιτεί καλή μόνωση της λεκάνης, ενώ η δυσοσμία είναι χαρακτηριστικό πρόβλημα αυτής της μεθόδου.

Οι φυσικοχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την κροκίδωση, την προσρόφηση, την οξείδωση, προηγμένες τεχνικές οξείδωσης, την οξείδωση Fenton και την ηλεκτροχημική οξείδωση. Άλλες μέθοδοι, είναι η προσθήκη αλάτων ασβεστίου, η κομποστοποίηση, συνδυαστικές μέθοδοι με O_3/UV και H_2O_2/UV κ.α.

Κάποιες μέθοδοι έχουν καλά αποτελέσματα στη μείωση των φαινολικών ενώσεων των αποβλήτων. Η υπερδιήθηση συνδυαστικά με την νανοδιήθηση ή και την αντίστροφη ώσμωση, μείωσε τις φαινολικές ενώσεις σε ποσοστό 95% (Paraskeva et al., 2007). Η αερόβια επεξεργασία με τους μικροοργανισμούς *Geotrichum candidum*, *Azotobacter chroococum* και *Aspergillus terreus*, μείωσε τις φαινολικές ενώσεις κατά 65.6, 90, 94.3% αντίστοιχα (Bořja et al., 1995). Στην Ελλάδα έχουν γίνει απόπειρες διάθεσης κασίγαρου σε εξατμισοδεξαμενές, σε λάκκους, στο έδαφος, δοκιμάστηκε η χρήση του ως εδαφοβελτιωτικό, επεξεργάστηκε ακόμη και με αστικά λύματα σε τεχνητούς υγρότοπους. Πολλές έρευνες γίνονται στα πλαίσια χρηματοδοτούμενων ερευνητικών προγραμμάτων από την Ευρωπαϊκή Ένωση προκειμένου να βρεθούν ολοκληρωμένοι τρόποι διαχείρισης των αποβλήτων. Σε γενικές γραμμές, συνδυαστικές μέθοδοι μπορούν να συμβάλλουν στην αποτελεσματική τους διαχείριση. Το πρόβλημα είναι πως κάποιες εφαρμογές δεν είναι περιβαλλοντικά αποδεκτές, άλλες είναι οικονομικά ασύμφορες και άλλες τεχνικά ανέφικτες. Η εποχικότητα της διαδικασίας (στην Κρήτη 3,5 μήνες), οι μικρές επιχειρήσεις που καθιστούν ανέφικτη την εγκατάσταση συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων και ο όγκος των αποβλήτων που προέρχονται κυρίως από τριφασικά συστήματα, αποτελούν σοβαρά προβλήματα διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιοτριβείων στην χώρα μας.

Οι μέθοδοι που περιγράφηκαν στόχο έχουν τη μείωση των φαινολικών συστατικών, αν όχι την εξάλειψη τους. Είναι όμως πολύ σημαντικό τα φαινολικά συστατικά να ανακτηθούν και να αξιοποιηθούν εμπορικά στους τομείς δράσης τους όπως ο τομέας της υγείας. Οι τεχνολογίες για το σκοπό αυτό απαιτούν οικονομικές μεθόδους με χρήση ήπιων φυσικοχημικών διεργασιών, μη τοξικών αντιδραστηρίων κ.α. Προς αυτή την κατεύθυνση έχουν γίνει κάποιες έρευνες όπως των Agalias και συνεργατών, οι οποίοι με διαδοχικά στάδια φιλτραρίσματος, χρήση ρητινών, θερμική εξάτμιση και διαχωρισμό φαινολών με χρωματογραφία κατανομής, κατάφεραν να μειώσουν την περιεκτικότητα των λυμάτων σε πολυφαινόλες κατά 99,99%, σε COD κατά 98%. και κατόρθωσαν να παραλάβουν καθαρή

υδροξυτυροσόλη (Agalias et al., 2007). Σε μια άλλη έρευνα έγινε προσπάθεια να παραληφθεί καθαρό νερό και συμπύκνωμα με υψηλές ποσότητες φαινολών (με σκοπό αυτές να εξαχθούν σταδιακά), μέσω της χρησιμοποίησης μεμβρανών, με τη μεμβράνη πολυτετραφθοροαιθυλενίου (TF200) να πραγματοποιεί διαχωρισμό κατά 99% (El-Abbassi et al., 2009). Σημαντικές ποσότητες τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης αλλά και παραγώγων ελευρωπαϊνης ανακτήθηκαν (>1gr/ Kgr) και στην έρευνα των Obied και συνεργατών (Obied et al., 2005a). Ομοίως, σε άλλη έρευνα, ανάκτηση φαινολών επετεύχθη με διαδοχικές εκχυλίσεις και εφαρμογή μιας σειράς οργανικών διαλυτών. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής παρουσίασαν απόδοση (>1gr/ Kgr) για έξι φαινόλες, μεταξύ των οποίων η τυροσόλη, ένα παράγωγο της ελευρωπαϊνης και η υδροξυτυροσόλη (Suárez et al., 2009). Κάποιες από τις τεχνολογίες είναι πολύ ελπιδοφόρες καθώς εξασφαλίζουν την ανάκτηση των φυσικών φαινολών αξιοποιώντας τις φαινόλες σε διάφορους τομείς, αντικαθιστώντας τη σύνθεση τους.

1.10 Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της εργασίας, είναι ο εντοπισμός βιοενεργών ουσιών στο παρθένο ελαιόλαδο, δεδομένου ότι τα φαινολικά συστατικά που περιέχει διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική του αξία. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Φυτών του ΤΕΙ Κρήτης, στα πλαίσια αυτοχρηματοδοτούμενου ερευνητικού προγράμματος, από ιδίους πόρους του εργαστηρίου. Ελήφθησαν δείγματα ελαιολάδων από ελαιοτριβεία που εφαρμόζουν διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής του ελαιολάδου από τον ελαιόκαρπο, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές την περίοδο της συγκομιδής. Πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις και αναλύσεις των δειγμάτων μέσω της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, CE).

Πιο συγκεκριμένα, στην εργασία αυτή διερευνήθηκαν:

- Η επίδραση των διαφορετικών μεθόδων ελαιοποίησης του ελαιόκαρπου στα επίπεδα συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου, όπως η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη.
- Η επίδραση του χρόνου συγκομιδής στα επίπεδα των υπό εξέταση φαινολών.
- Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης σε ελαιόλαδο πριν και μετά τον τελικό διαχωρισμό, σε τριφασικό σύστημα εξαγωγής ελαιολάδου.

2 ΥΛΙΚΑ

2.1 Δείγματα ελαιολάδων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου από την περιοχή του Κολυμβαρίου Χανίων. Τα δείγματα προερχόταν από διαφορετικούς ελαιώνες και η παραλαβή τους έγινε από ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν τρία διαφορετικά συστήματα ελαιοποίησης. Με υδραυλική πίεση, με φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων και με τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα. Τα δείγματα παρελήφθησαν μετά το στάδιο της φυγοκέντρισης και πριν το στάδιο της αποθήκευσης, η οποία οδηγεί στη διαύγασή τους. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε διάστημα 2 μηνών και η αποθήκευσή τους στους 4°C, μέχρι το στάδιο της επεξεργασίας τους, όπου τοποθετήθηκαν σε μικρά φιαλίδια των 15ml στους -18°C. Λίγο πριν την ανάλυσή τους, αποψύχονταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τον τύπο του ελαιοτριβείου και την ημερομηνία συλλογής του ελαιοκάρπου (π.χ. Π26 για δείγμα που προέρχεται από παραδοσιακό ελαιοτριβείο η παραλαβή του οποίου έγινε στις 26 του μήνα συλλογής), (Πίνακας 10).

Πίνακας10: Κωδικοποίηση των πειραματικών δειγμάτων της εργασίας αυτής με βάση τον τύπο του συστήματος εξαγωγής ελαιολάδου και την ημερομηνία λήψης των δειγμάτων.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΑ		
	Παραδοσιακό	Τριφασικό	Διφασικό
5/11/2011	Π5	T5	Δ5
26/11/2011	Π26	T26	Δ26
17/12/2011	Π17	T17	Δ17
22/01/2012	Π22	T22	Δ22

2.2 Αντιδραστήρια

2.2.1 Πρότυπες ουσίες

Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Υδροξυτυροσόλη [2-(4-hydroxyphenyl)ethanol], η Τυροσόλη [4 - (2-Υδροξυαιθυλ) φαινόλη] και η Ελευρωπαΐνη (Oleuropein) της εταιρείας Fluka, καθαρότητας $\geq 98\%$.

2.2.2 Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αιθανόλη (ethanol absolute, Fisher Chemicals), το κυκλοεξάνιο (Cyclohexane, Applichem) και η μεθανόλη (Methanol, Applichem), όλα υψηλής καθαρότητας (HPLC grade). Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό (HPCE grade, Applichem), Sodium hydroxide και Sodium Tetraborate (Sigma Aldrich).

2.2.3 Προσκολλητικές ουσίες (Ρητίνη XAD-7)

Τα υλικά προσρόφησης XAD της Amberlite, αποτελούνται από σκληρά αδιάλυτα μικροσφαιρίδια πορώδους πολυμερούς, που χαρακτηρίζονται από ένα φάσμα επιφανειακών πολώσεων και από μια ποικιλία επιφανειακών περιοχών με διασπορά του μεγέθους του πορώδους. Εξαιτίας των διαφορετικών επιφανειακών ιδιοτήτων τους, οι πολυμερικοί προσροφητές προσφέρουν ένα μεγάλο εύρος προσροφητικής ικανότητας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε υδατικά όσο και σε μη υδατικά συστήματα. Η συγκεκριμένη ρητίνη που έχει 0.5mm διάμετρο χαντρών (σφαιριδίων), αποτελείται από πολλά μικροσφαιρίδια με διάμετρο 10-4mm. Αυτή η μακροπορώδης δομή, σε συνδυασμό με την κανονική ιονική ανταλλαγή των στοιχειωδών σφαιριδίων, προσφέρει καλές υδραυλικές ιδιότητες που συνδυάζονται με προσροφήσεις γρήγορης κινητικής. Εξαιτίας του υψηλού επιπέδου των διαλυμένων ουσιών για προσρόφηση και της επιθυμίας για αναγέννηση της ρητίνης Amberlite XAD-7, κρίθηκε απαραίτητο να πλυθεί η ρητίνη με απιονισμένο νερό πριν τη διαδικασία της αναγέννησης. Σαν αναγεννητικός διαλύτης της Amberlite XAD-7 επελέγη

η αιθανόλη, καθώς σύμφωνα με πληροφορίες της εταιρεία παρασκευής Sigma-Aldrich, η απόδοση αναγέννησης της υπολογίζεται στο 97%.

2.3 Συσκευές και όργανα

Περιστροφικός εξατμιστής ROTAVAP (Heidolph, laborator 4003 control), φυγοκεντρικός εξατμισοποιητής (Thermo scientific, SPD-210-230), πεχάμετρο (Crison, GLP21), σύστημα ανάλυσης τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, G1600AX της Agilent), συσκευές φυγοκέντρισης (Kubota 7780, Hettich D-78532), μικροπιπέτες Eppendorf, συσκευή ανάδευσης (vortex, Velp Scientifica, ZX3), ποτήρια ζέσεως και διάφορα άλλα σκεύη για την προετοιμασία των δειγμάτων.

3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματική διαδικασία

Πρώτο βήμα ήταν η ενεργοποίηση της ρητίνης XAD7. Για τον σκοπό αυτό, έγινε πλύσιμο 100gr ρητίνης με υπερκάθαρο νερό 300ml και ανάδευση για 5΄σε αναδευτήρα Edmund buchler. Ακολούθησε αφαίρεση του νερού με σιφόνιο εφόσον η ρητίνη είχε κατασταλάξει. Προστέθηκε μεθανόλη σε ικανοποιητική ποσότητα που να την σκεπάζει, με ανάδευση για 30΄και αφαίρεση του υγρού. Επαναλήφθηκε η προσθήκη του νερού, η ανάδευση και η αφαίρεση του με σιφόνιο και η ρητίνη μετά τη ζύγιση της τοποθετήθηκε στην συντήρηση ώστε να εξατμιστεί το εναπομείναν νερό κατά την διάρκεια της νύχτας. Το επόμενο πρωί έγινε ζύγιση της ρητίνης και ήταν πλέον έτοιμη προς χρήση.

Σε διαχωριστική χοάνη προστέθηκε ποσότητα ελαιολάδου 50ml μαζί με 7.3gr ρητίνης XAD-7. Η χοάνη τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ανάδευσης και παρέμεινε εκεί κατά την διάρκεια της νύχτας. Το επόμενο πρωί πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός της ρητίνης με χωνί Buchner και ακολούθησε η απολίπανση της.

Για την απολίπανση της ρητίνης, τοποθετήθηκε μαζί με ικανοποιητικό όγκο κυκλοεξανίου ώστε να την καλύπτει αρκετά καλά και έγινε σταδιακό πλύσιμο αυτής περίπου 5 φορές.

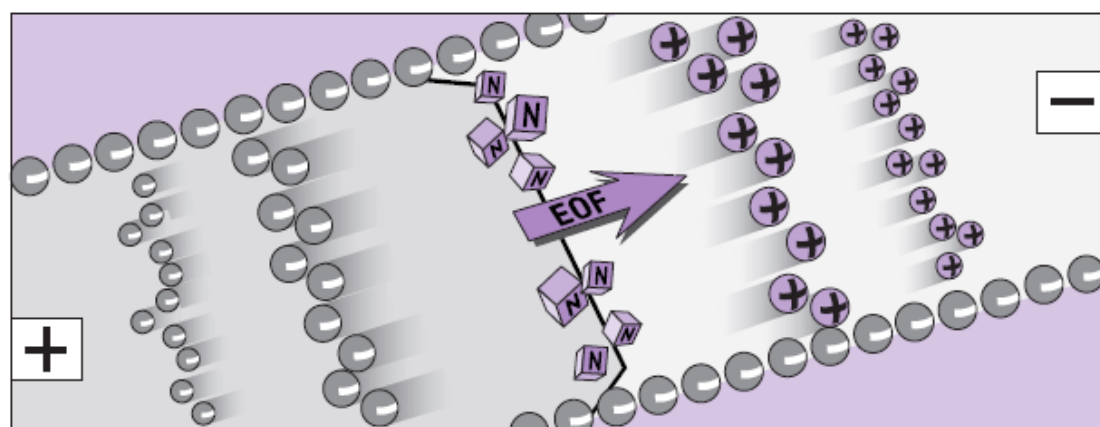
Μετά το στάδιο της απολίπανσης, προστέθηκε στην ρητίνη αιθανόλη και ακολούθησε ανάδευση για 40΄. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές και όλα τα αιθανολικά εκχυλίσματα πέρασαν από απλό διηθητικό χαρτί για την απομάκρυνση της. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα ξηράνθηκαν με την χρήση του περιστροφικού εξατμισοποιητή ROTAVAP. Το ξηρό υπόλειμμα που απέμεινε διαλύθηκε σε 5 ml αιθανόλης. Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman 0,2μm και ανάλυση του δείγματος στην συσκευή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης.

3.1.1 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE)

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι ένα σύστημα ανάλυσης το οποίο χρησιμοποιεί λίγα αντιδραστήρια, αυτοματοποιείται εύκολα και έχει ευρεία χρήση σε ερευνητικό επίπεδο. Πρόκειται για μια τεχνική με πλήθος εφαρμογών, με την οποία υλοποιούνται ποσοτικοί και επαναλήψιμοι διαχωρισμοί/αναλύσεις πρωτεϊνών, σακχάρων, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών.

Στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται σωλήνας (στήλη) τηγμένου διοξειδίου του πυριτίου τον οποίο διατρέχουν τα δείγματα αντί το πλακίδιο από άγαρ που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν. Ο τριχοειδής σωλήνας έχει εσωτερική διάμετρο 25-75μm και εξωτερικά επενδύεται με πολυακρυλαμίδιο το οποίο παρέχει μηχανική αντοχή στην πίεση και θερμική μόνωση (σταθερότητα). Τα άκρα του σωλήνα είναι τοποθετημένα σε δοχεία ηλεκτρολυτών που περιέχουν ηλεκτρόδια.

Η βασικότερη λειτουργία της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτρο-οσμωτική ροή. Είναι η κινητήριος δύναμη που προωθεί τα μόρια μέσα στον τριχοειδή σωλήνα και προκύπτει από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου πάνω στο διάλυμα σε δύο επίπεδα πάνω στα τοιχώματα του τριχοειδούς σωλήνα. Η ηλεκτρο-οσμωτική ροή καθορίζει το χρονικό διάστημα που οι διαλυτές ουσίες παραμένουν μέσα στο σωλήνα



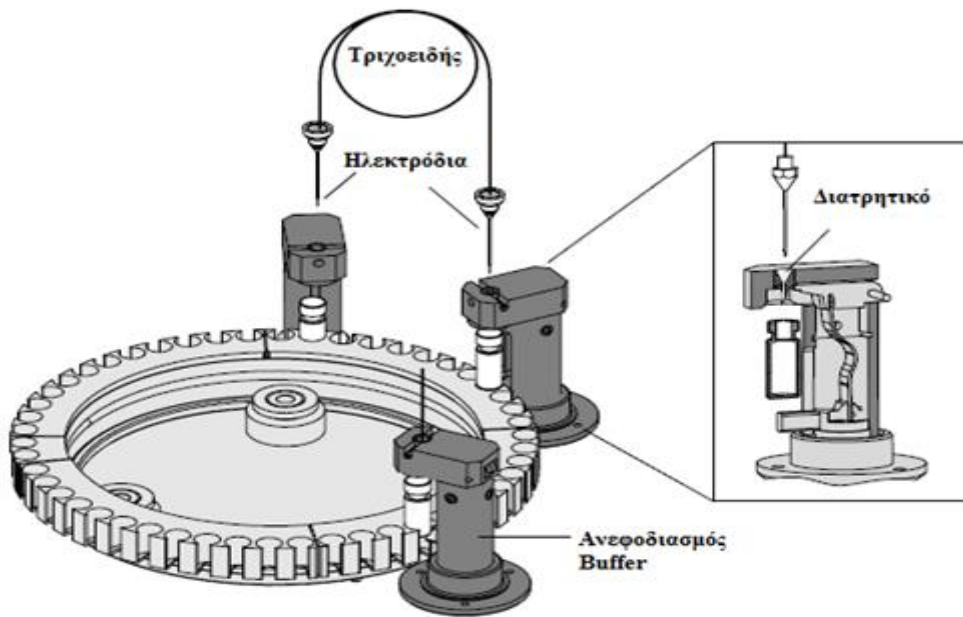
Εικόνα 27: Μετανάστευση διαφορετικών μορίων στο διάλυμα μέσω ηλεκτρο-οσμωτικής ροής (Agilent, CE Primer.).

3.1.1.1 Συσκευή Agilent G1600AX

Στην παρούσα εργασία οι μετρήσεις έγιναν με τον αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης G1600AX της Agilent, με τη βοήθεια του αντίστοιχου λογισμικού Agilent CE ChemStation. Τα στάδια λειτουργίας του αναλυτή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής:

1. Εισαγωγή του δείγματος μέσα στον τριχοειδή σωλήνα με εφαρμογή πίεσης ή ηλεκτροκινητική έγχυση
2. Εφαρμογή υψηλού ηλεκτρικού πεδίου
3. Ανίχνευση με συστοιχία διόδων υψηλής ευαισθησίας
4. Καθαρισμός-εξισορρόπηση τριχοειδούς σωλήνα και προετοιμασία επόμενου δείγματος.

1. Η επιλογή του εκάστοτε δείγματος προς ανάλυση, γίνεται μέσω του συστήματος «καρουζέλ», που επιτρέπει τυχαία πρόσβαση σε οποιαδήποτε από τις 48 θέσεις που διαθέτει. Η εισαγωγή του δείγματος μέσα στον τριχοειδή σωλήνα μπορεί να γίνει είτε μέσω έγχυσης με πίεση, είτε μέσω έγχυσης με ηλεκτρική τάση.



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση του εσωτερικού συσκευής (Agilent, CE Description.).

2. Η μονάδα τροφοδοσίας υψηλής τάσης μπορεί να εφαρμόσει στα άκρα του τριχοειδούς μέχρι 30KV. Η τάση αυτή παρακολουθείται και διορθώνεται συνεχώς έτσι ώστε να παραμένει σταθερή στη προκαθορισμένη τιμή. Η λειτουργία αυτή είναι απαραίτητη για τη σωστή επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

3. Ο ανιχνευτής με συστοιχία διόδων αποτελείται από ένα σύστημα άχρωμου οπτικού φακού που εστιάζει το φως της λυχνίας δευτερίου UV πάνω στον τριχοειδή σωλήνα και η δέσμη στη συνέχεια διαχέεται πάνω στη συστοιχία διόδων. Η συστοιχία διόδων αποτελείται από 210 διακριτές διόδους διαφορετικών φασμάτων ανίχνευσης, οι οποίες προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία και γραμμικότητα σε όλο το φάσμα 190-600nm.

4. Μετά την ολοκλήρωση μέτρησης του δείγματος, η συσκευή προχωρά στον καθαρισμό του τριχοειδούς πριν φορτώσει το επόμενο δείγμα. Η συσκευή έχει αυτόματο σύστημα πλήρωσης με ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), για να μπορεί να διεκπεραιώνει πλήθος μετρήσεων χωρίς διακοπή και επέμβαση.

3.2 Ανάλυση φαινολών

Γνωρίζοντας ότι οι φαινολικές ουσίες είναι σε μικρές συγκεντρώσεις στο ελαιόλαδο, για την ανάλυση τους ελήφθησαν υπόψιν διάφορα πρωτόκολλα (Ballus et al., 2014), (Bonoli et al., 2003) που βρέθηκαν στην βιβλιογραφία, τα οποία μελετήθηκαν και προσαρμόστηκαν κατάλληλα, ώστε το αποτέλεσμα να είναι το καλύτερο δυνατό. Πριν την διαδικασία της ανάλυσης ήταν απαραίτητη η προετοιμασία της στήλης

3.2.1 Προετοιμασία της στήλης

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν γυμνή τριχοειδής στήλη πυριτίου (bare- fused silica), εσωτερικής διαμέτρου 50μm και ενεργού μήκους 70cm τύπου φούσκας (με πεπλατυσμένη διατομή διαδρομής φωτός εντός της στήλης). Η προετοιμασία της στήλης στο ξεκίνημα των αναλύσεων (1 φορά κάθε πρωί) περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ✓ Ξέπλυμα της στήλης με διάλυμα NaOH 1N για 4΄
- ✓ Ξέπλυμα με H₂O για 6΄
- ✓ Ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα τετραβορικού νατρίου pH 9.26 που είχε επιλεγεί για την ανάλυση για 20΄
- ✓ Εφαρμογή σταθερής τάσης 20KV για 2΄ με το ρυθμιστικό διάλυμα.

Ανάμεσα στις αναλύσεις πραγματοποιούνταν μια σύντομη προετοιμασία της στήλης πριν από κάθε δείγμα η οποία περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- ✓ Ξέπλυμα της στήλης με διάλυμα NaOH 1N για 1΄
- ✓ Ξέπλυμα με H₂O για 1΄
- ✓ Ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα τετραβορικού νατρίου για την ανάλυση για 5΄
- ✓ Εφαρμογή σταθερής τάσης 20KV για 2΄ με το ρυθμιστικό διάλυμα

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου που ακολουθήθηκε, ελέχθησαν διάφορες μεταβλητές όπως το ρυθμιστικό διάλυμα, η συγκέντρωση και το pH του, η τάση και η θερμοκρασία. Παρατηρήθηκε πως η επιλογή του pH είχε ιδιαίτερη σημασία και η επιλογή της τάσης ήταν αρκετά σημαντική. Η τάση είχε επίδραση στον χρόνο εκτέλεσης και στον διαχωρισμό των ουσιών. Δεδομένου ότι οι ουσίες είναι φορτισμένες, η αύξηση της τάσης οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της στήλης και σε μείωση των χρόνων κατακράτησης. Επελέγη στα 29KV που είναι σχεδόν η ανώτερη επιτρεπτή του μηχανήματος. Η θερμοκρασία, στην οποία βρισκόταν η κασέτα με την στήλη, ήταν στους 25°C. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το Sodium Tetraborate με καλά αποτελέσματα.

Προετοιμάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα τετραβορικού νατρίου (Sodium Tetraborate) με διαφορετικές τιμές pH από 9-10.8 με την ανάλογη προσθήκη NaOH και επελέγη η τιμή στα 9,26, με την συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος στα 45mM. Μετά την ταυτοποίηση των ουσιών στα δείγματα ελαιολάδων των τριών διαφορετικών συστημάτων εξαγωγής ελαιολάδου, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση τους (Πίνακας 10).

Η ποσοτικοποίηση έγινε με την δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης την ίδια ημέρα με τις μετρήσεις των άγνωστων δειγμάτων. Προετοιμάστηκαν δείγματα υδροξυτυροσόλης, τυροσόλης και ελευρωπαϊνης πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων. Για όλα τα δείγματα των γνωστών συγκεντρώσεων, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ήταν $R^2 \geq 0.9799$. Προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ακολούθησε η ανίχνευση της υδροξυτυροσόλης και της ελευρωπαϊνης στα 210 nm και της τυροσόλης στα 220 nm.

4.1 Ταυτοποίηση ουσιών

Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους. Ο πρώτος περιλάμβανε τον χρόνο μετανάστευσης (κατακράτησης) των ουσιών (retention time), σε συνδυασμό με το φάσμα απορρόφησης και ο δεύτερος την προσθήκη εσωτερικού προτύπου (internal standard),

προσθήκη δηλαδή ουσίας η οποία δεν περιέχεται στο δείγμα, με φυσικοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με της ένωσης που πρέπει να ταυτοποιηθεί. Αρχικά, ελήφθησαν τα φάσματα των προτύπων ουσιών υδροξυτυροσόλης (Εικόνα 29), τυροσόλης (Εικόνα 30) και ελευρωπαΐνης (Εικόνα 31). Στην συνέχεια, έγινε σύγκριση των φασμάτων των άγνωστων ουσιών των δειγμάτων ελαιολάδου με τα φάσματα προτύπων ουσιών. Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων επιτρέπει την καταγραφή μετρήσεων σε πολλαπλά μήκη κύματος και το φάσμα που προκύπτει μπορεί να συγκριθεί με φάσματα προτύπων ουσιών για επιβεβαίωση. Ως μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης, επελέγησαν τα μήκη κύματος που απορροφούν μέγιστα οι πρότυπες ουσίες, για την HT στα 210 nm, την T στα 220 nm και την OL στα 210 nm. Συνδυαστικά με τα φάσματα, μελετήθηκε και ο χρόνος κατακράτησης άγνωστων ουσιών σε σχέση με τον χρόνο κατακράτησης των προτύπων (Εικόνες 35, 36) και πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση.

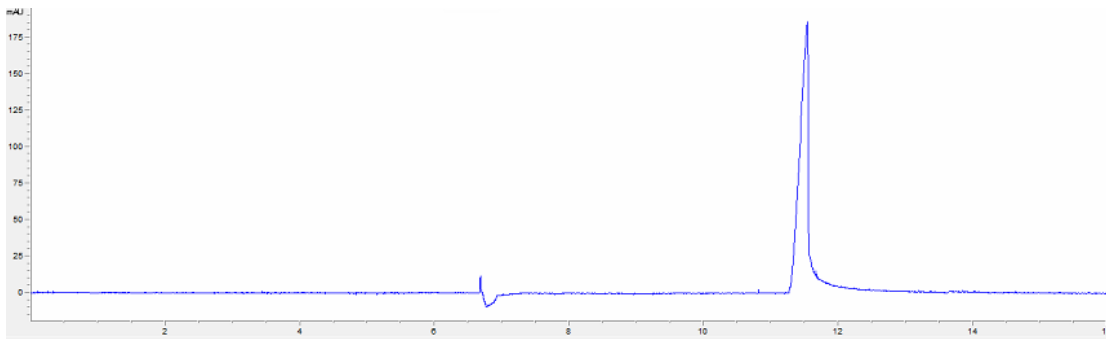
Στις περιπτώσεις που η κορυφή δεν ήταν ευδιάκριτη ή έπρεπε να γίνει επιβεβαίωση της ουσίας διότι η απόκριση του οργάνου διέφερε ανάμεσα στις μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου. Με την προσθήκη εσωτερικού προτύπου, συγκρίνεται το σήμα της πρότυπης ουσίας με αυτό της άγνωστης ουσίας. Πρότυπη ουσία τυροσόλης προστέθηκε στο δείγμα T22 και αύξησε την κορυφή στα 7.380 min. (Εικόνα 48).

Με αυτούς τους τρόπους ταυτοποιήθηκαν όλες οι ουσίες στα δείγματα ελαιολάδων των τριών διαφορετικών συστημάτων εξαγωγής ελαιολάδου και ακολούθησε η ποσοτικοποίηση για το κάθε ένα από αυτά. Τα επίπεδα των τριών βιοενεργών ουσιών (HT, T και OL) διαφέρουν ανάμεσα στα συστήματα ελαιοποίησης και στους χρόνους παραλαβής των ελαιολάδων (Πίνακας 11).

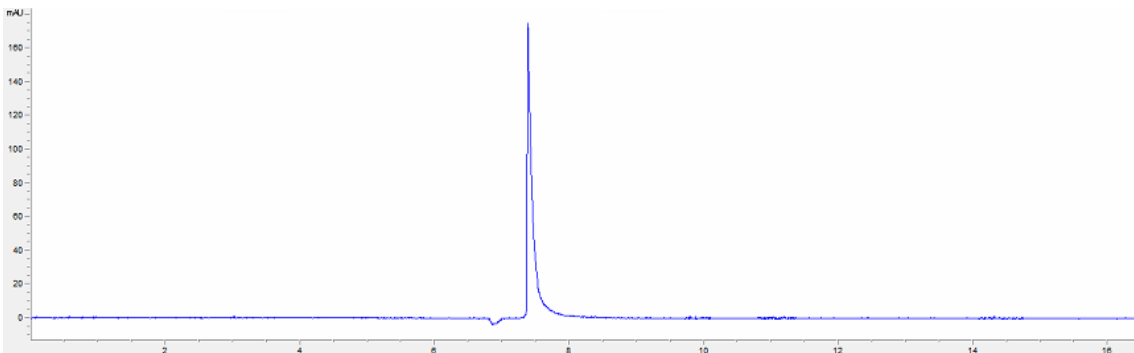
4.1.1 Κορυφές και φάσματα προτύπων ουσιών

Προετοιμάστηκαν διαλύματα πρότυπων ουσιών HT, T και OL συγκέντρωσης 1mg/ ml και αναλύθηκαν στο μηχάνημα της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης από όπου προέκυψαν οι κορυφές τους (Εικόνες 29, 30, 31). Εν συνεχεία, ελήφθησαν τα φάσματα τους μετά την μέτρηση τους στο χαρακτηριστικό μήκος κύματος της κάθε ουσίας στα 210nm για την HT (Εικόνα 32), στα 220 nm για την T (Εικόνα 33) και στα 210 nm για την OL (Εικόνα 34).

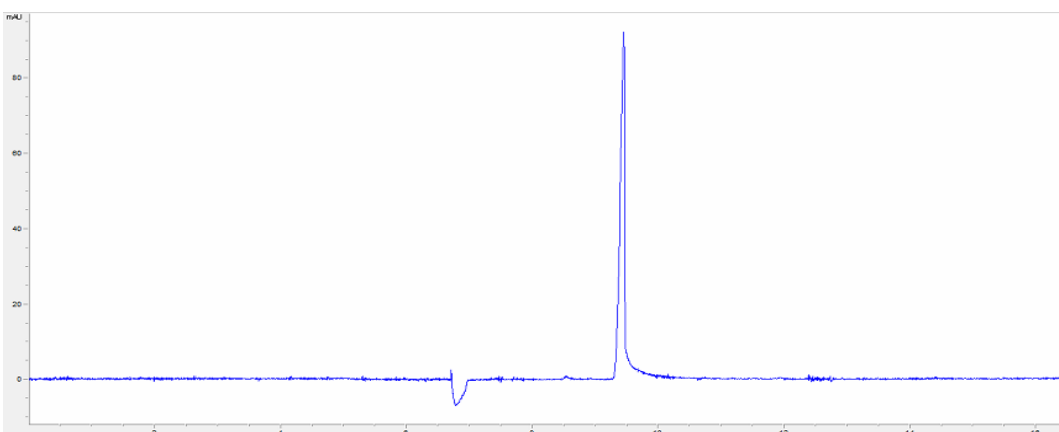
4.1.2 Κορυφές προτύπων ουσιών



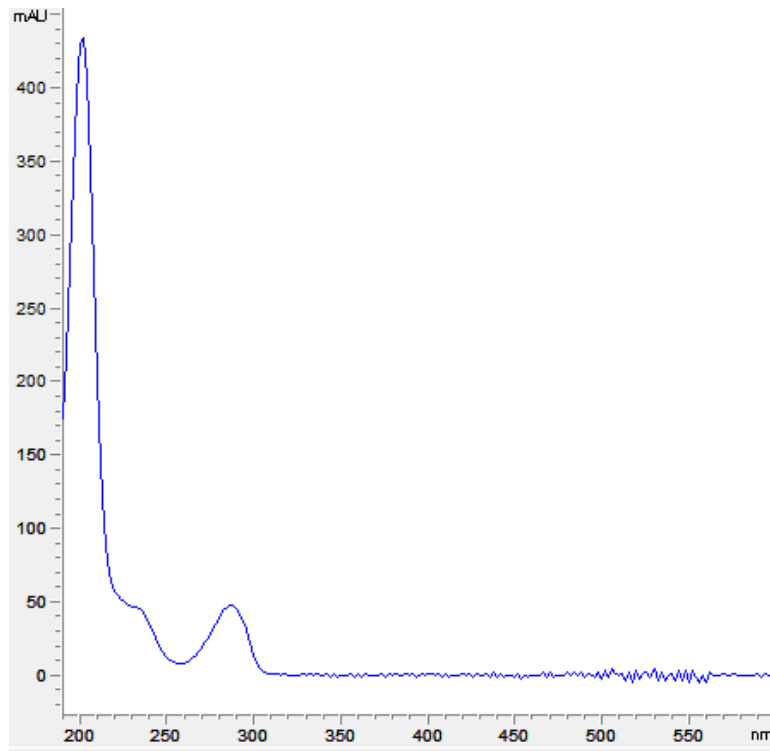
Εικόνα 29: Κορυφή πρότυπης ουσίας υδροξυτυροσόλης στα 11.562 min.



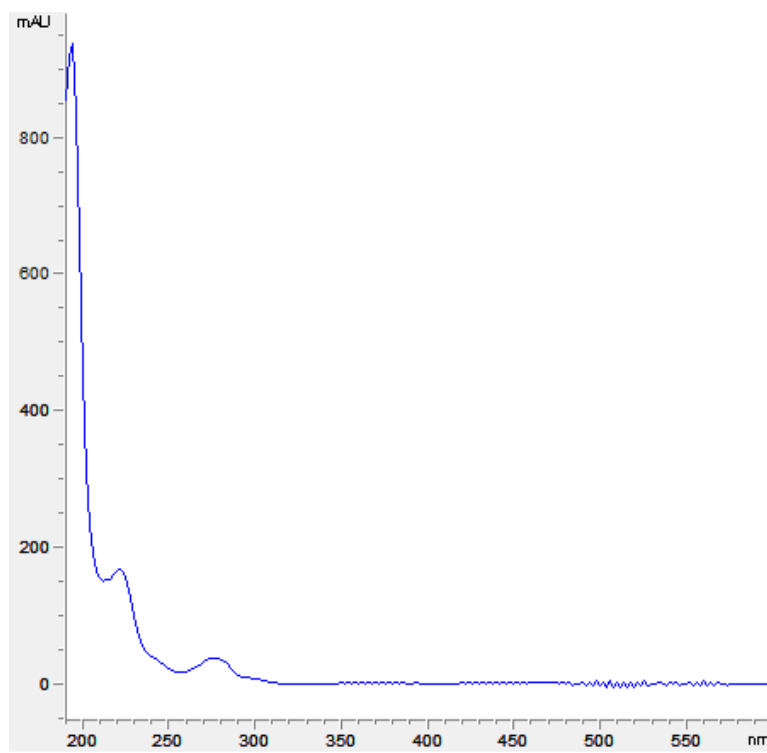
Εικόνα 30: Κορυφή πρότυπης ουσίας τυροσόλης στα 7.388min



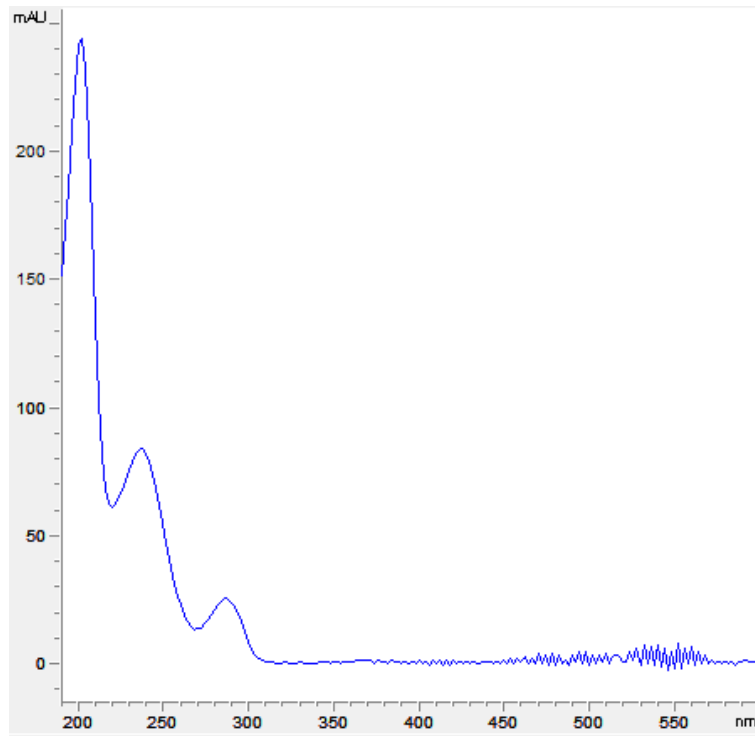
Εικόνα 31: Κορυφή πρότυπης ουσίας ελευρωπαΐνης στα 9.45 min



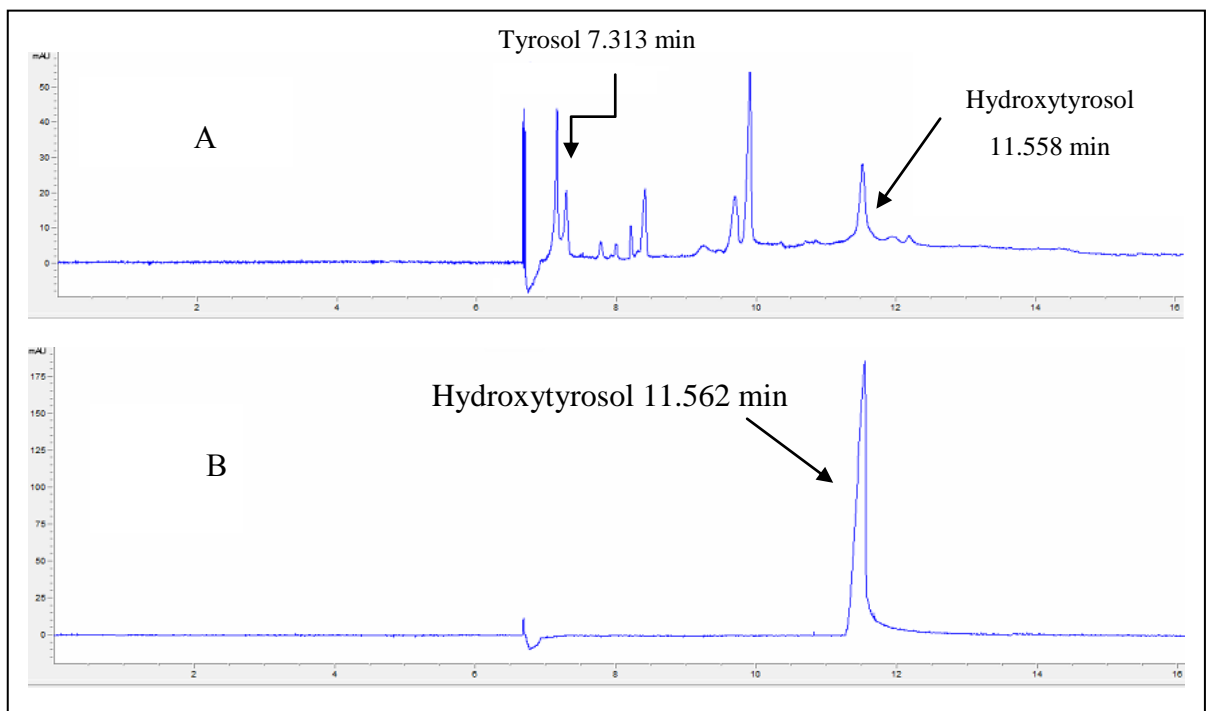
Εικόνα 32: Χαρακτηριστικό Φάσμα υδροξυτυροσόλης (HT) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 210 nm



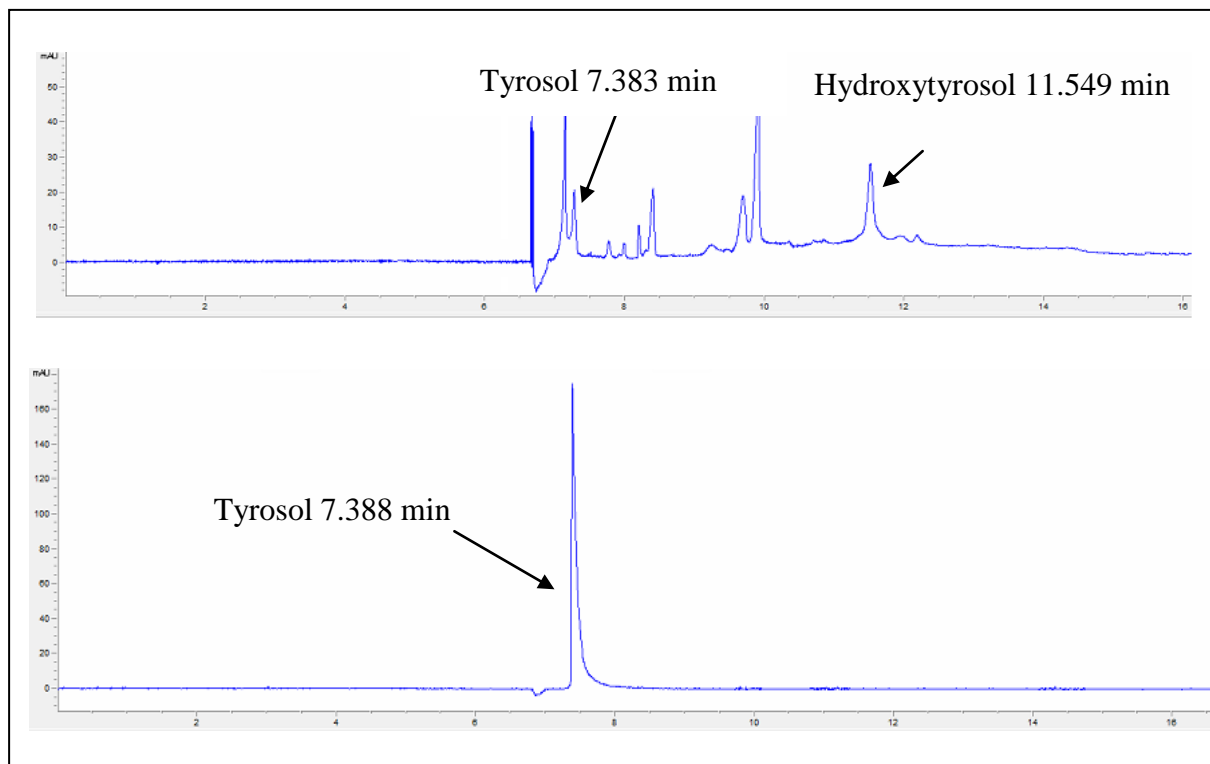
Εικόνα 33: Χαρακτηριστικό Φάσμα τυροσόλης (T) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 220 nm



Εικόνα 34: Χαρακτηριστικό Φάσμα (OL) με μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στα 210 nm

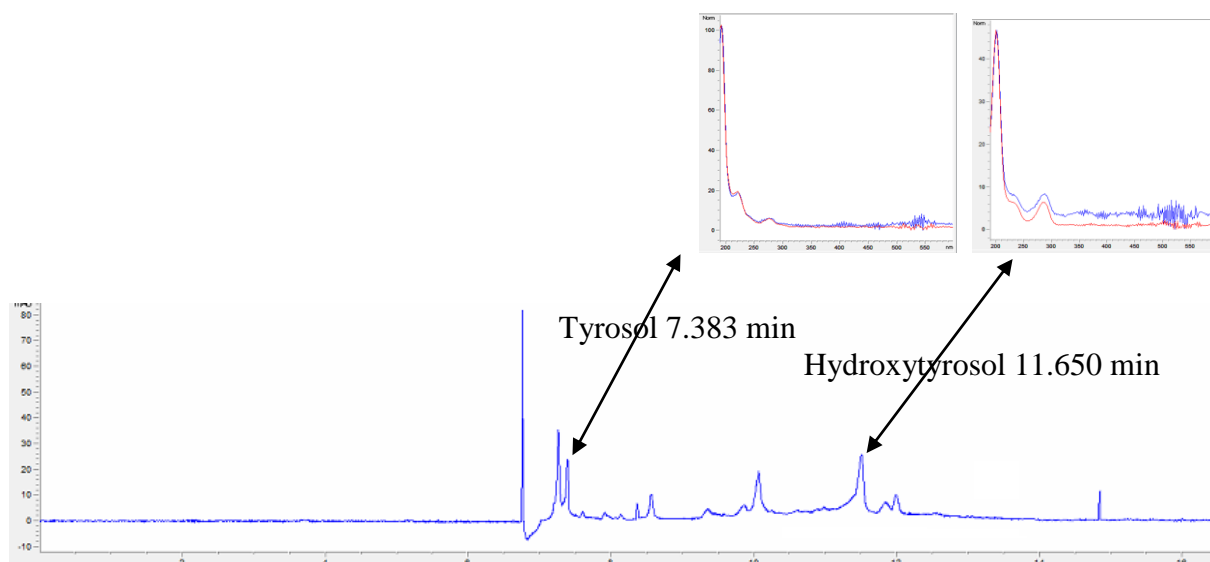


Εικόνα 35: Ηλεκτροφερογράμματα που αφορούν Α) Δείγμα ελαιολάδου με κωδικό Δ17, Β) Κορυφή πρότυπης ουσίας υδροξυτυροσόλης στα 11.562 min.

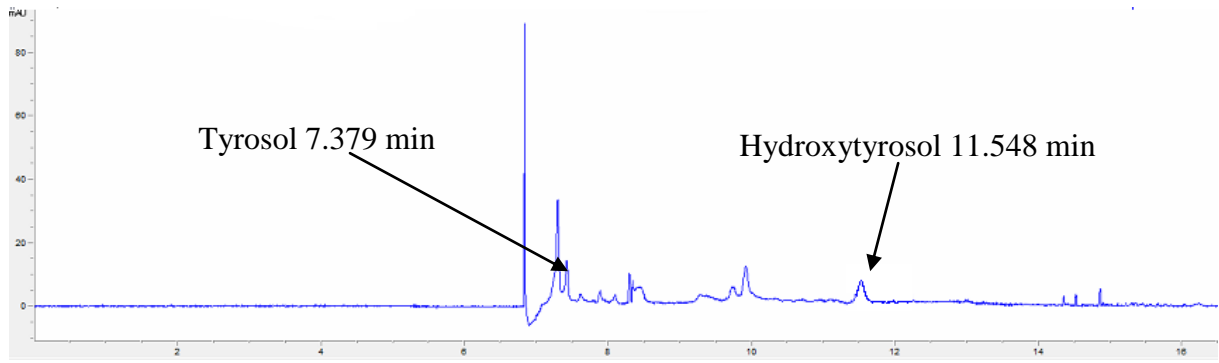


Εικόνα 36: Ηλεκτροφερογράμματα που αφορούν Α) Δείγμα ελαιολάδου με κωδικό Δ17, Β) Κορυφή πρότυπης ουσίας τυροσόλης στα 7.388 min.

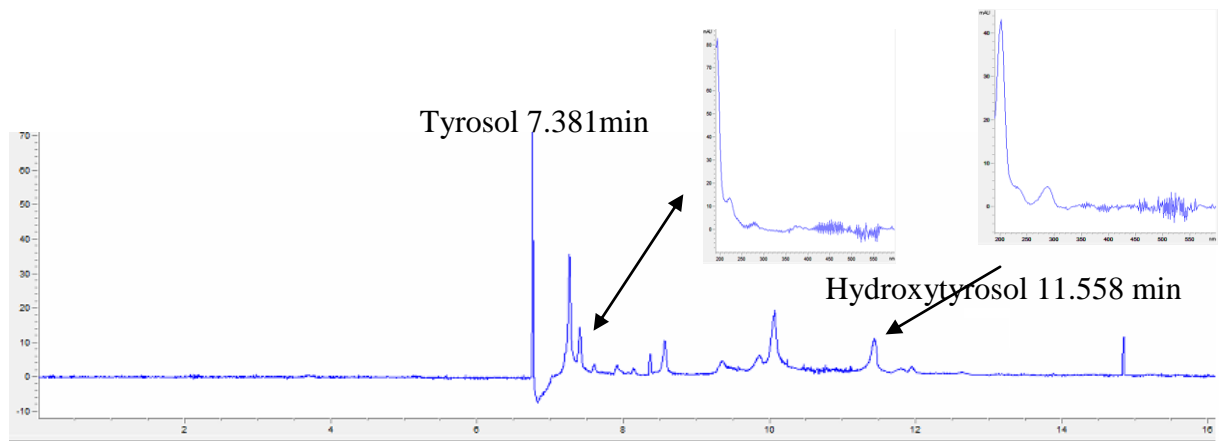
4.1.3 Δείγματα ελαιολάδων



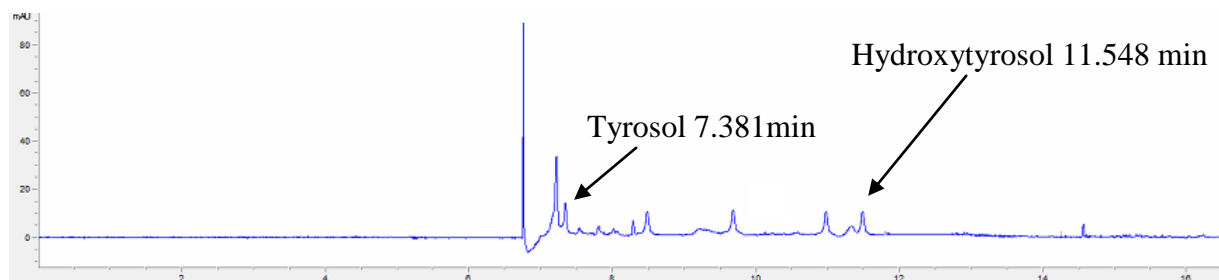
Εικόνα 37: Ηλεκτροφερογράμμα του δείγματος ελαιολάδου Π5 με ταυτοποίηση κορυφών τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης στα 7.383 min και 11.650 min αντίστοιχα σε συνδυασμό με τα φάσματά τους



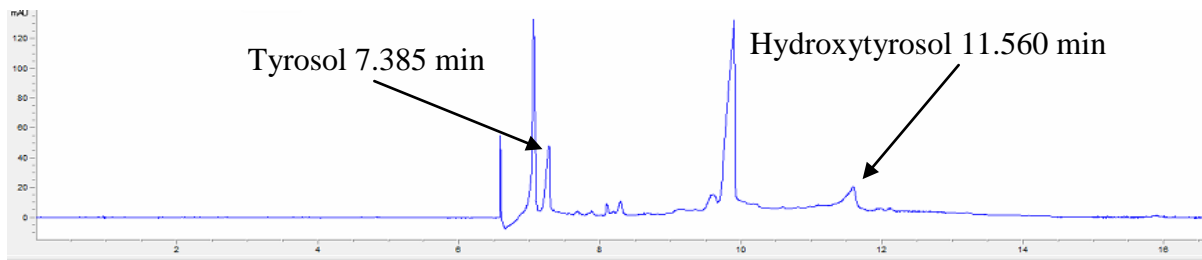
Εικόνα 38: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π26 με κορυφές τυροσόλης στα 7.379 min και υδροξυτυροσόλης στα 11.548 min και τα χαρακτηριστικά φάσματα αυτών



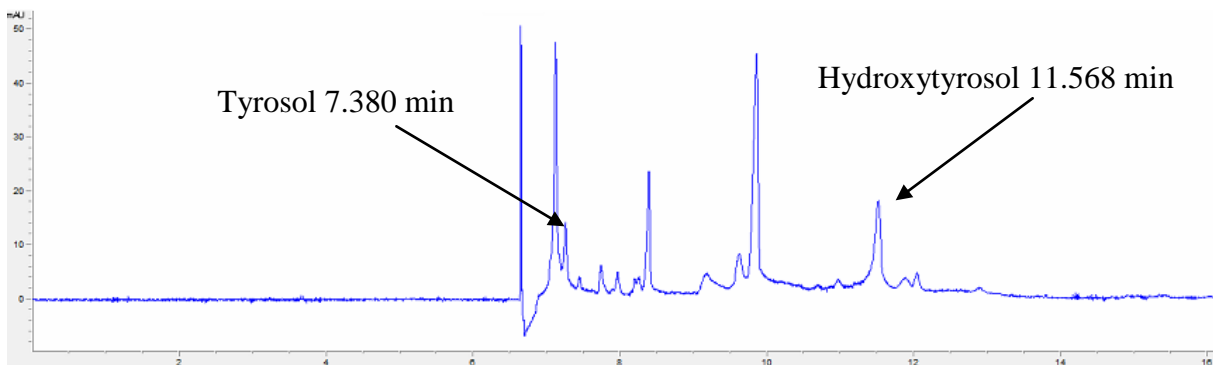
Εικόνα 39: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης και τα φάσματα αυτών



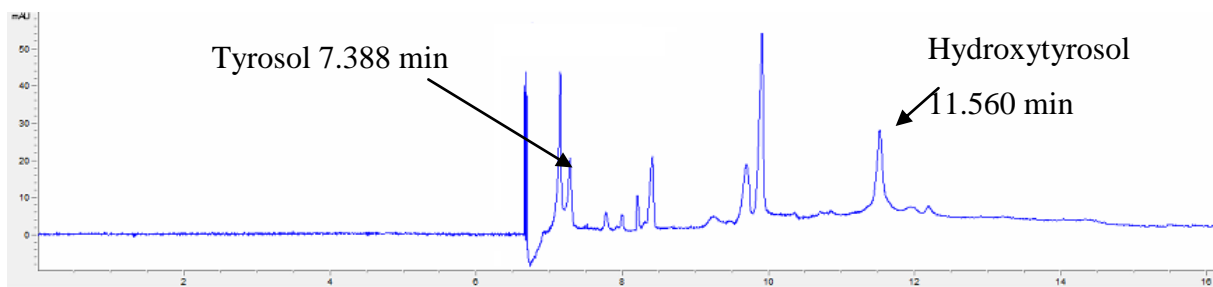
Εικόνα 40: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Π22 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης



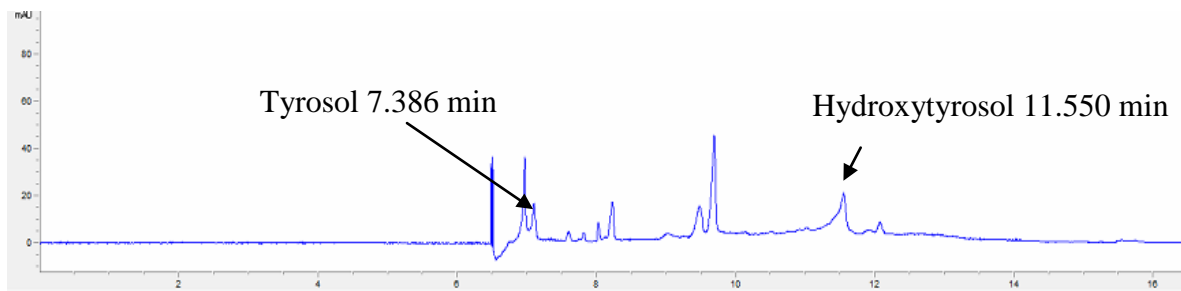
Εικόνα 41: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ5 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης



Εικόνα 42: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ26 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

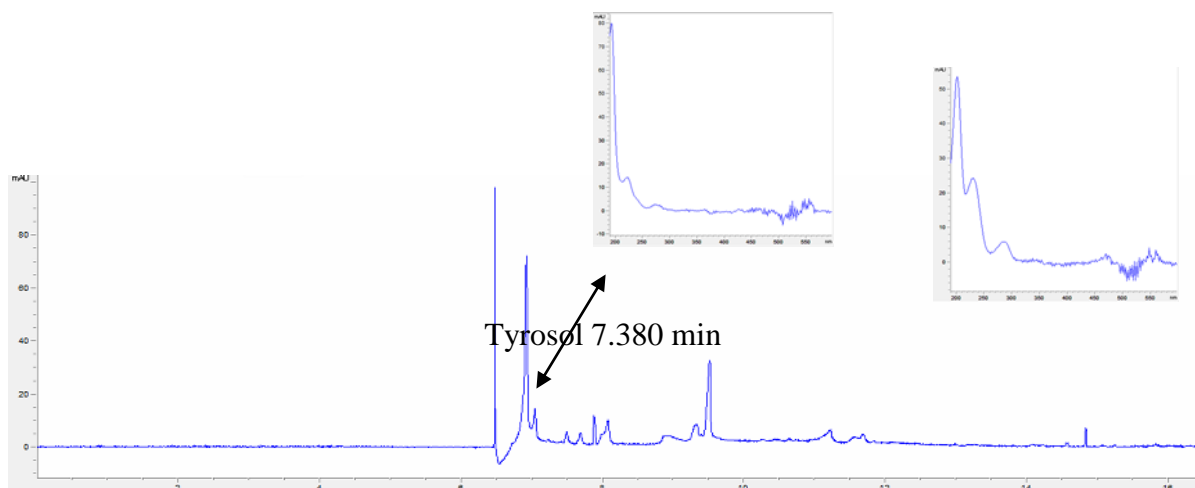


Εικόνα 43: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

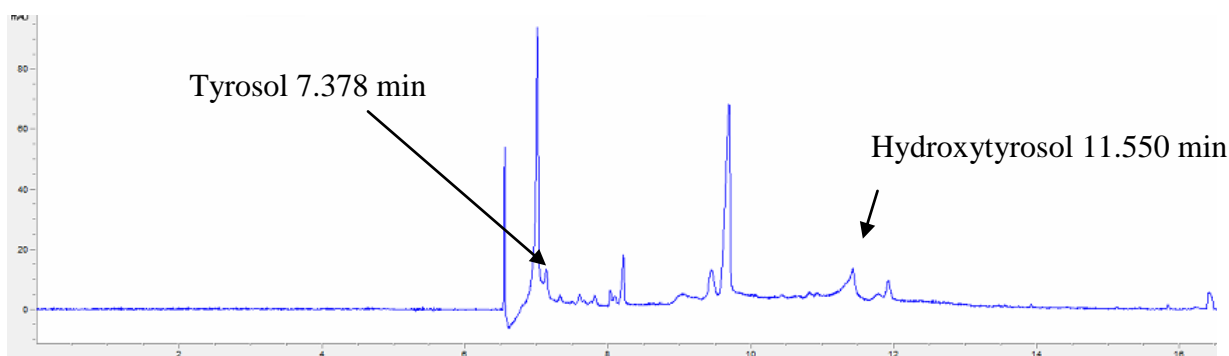


Εικόνα 44: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου Δ22 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

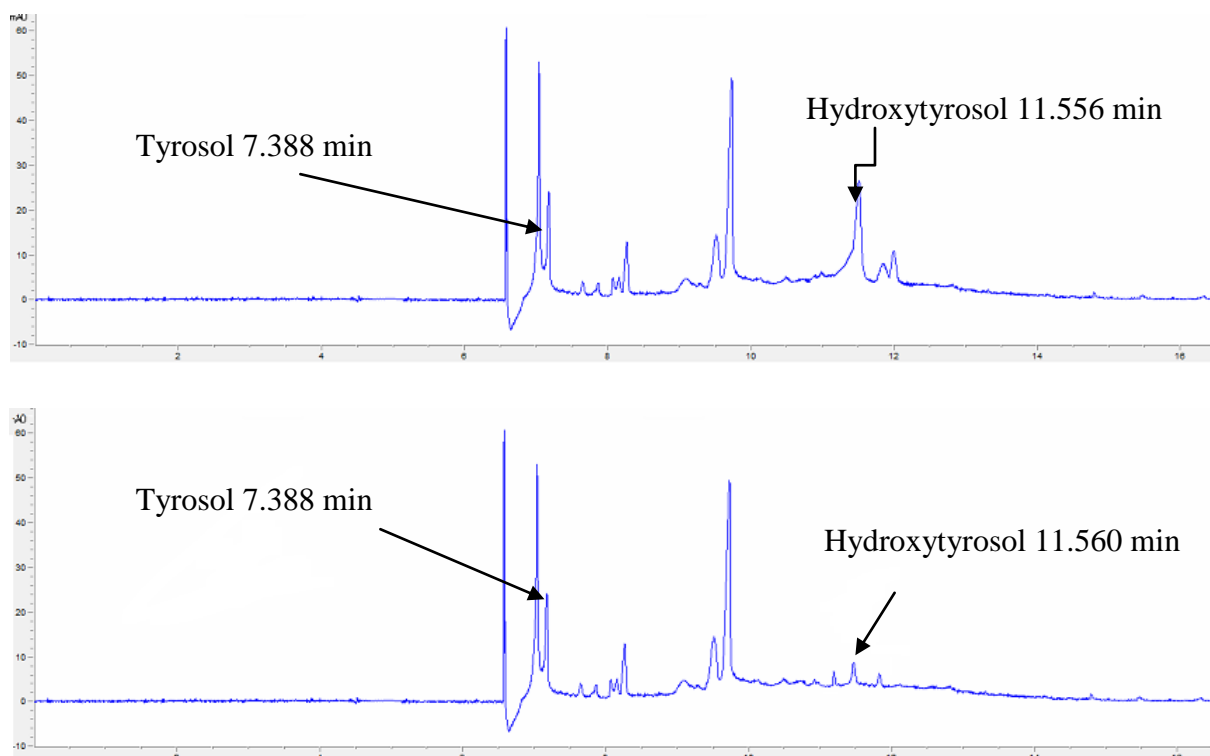
Η ελευρωπαΐνη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα ελαιολάδου, γεγονός που εξηγείται. Για την ταυτοποίηση της συγκρίθηκε ο χρόνος κατακράτησης και το φάσμα απορρόφησης (Εικόνα 45).



Εικόνα 45: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T5 με κορυφή τυροσόλης και ταυτοποίηση μέσω του φάσματός της

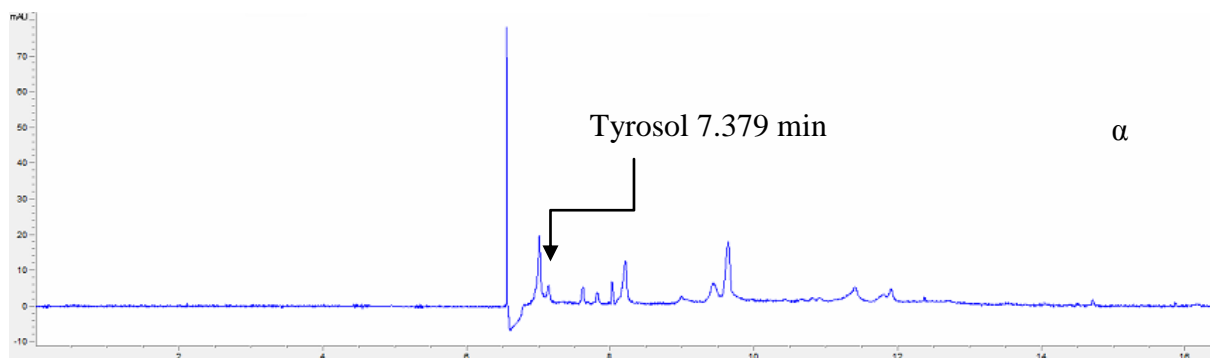


Εικόνα 46: Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T26 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

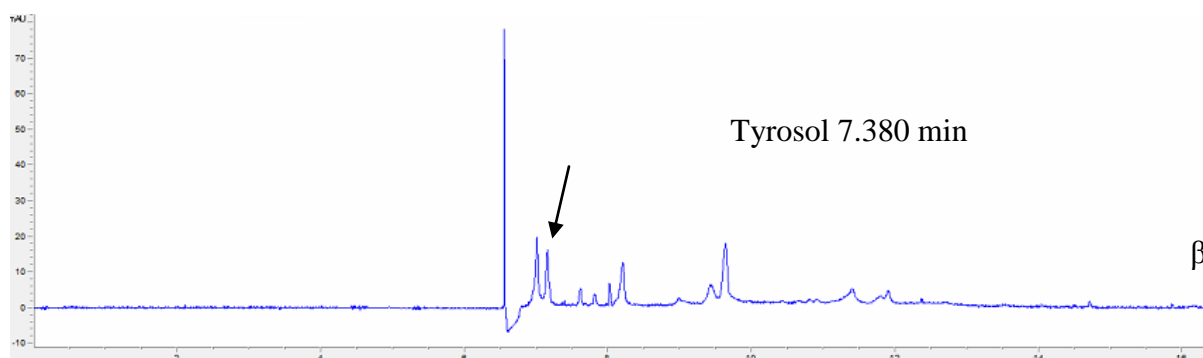


Εικόνα 47: α) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος πρώτου ανεπεξέργαστου ελαιολάδου T17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης β) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος τελικού ελαιολάδου T17 με κορυφές τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης

Την Τρίτη περίοδο συγκομιδής, στο τριφασικό σύστημα εξαγωγής ελαιολάδου έγιναν μετρήσεις των τριών βιοενεργών συστατικών τόσο στο ανεπεξέργαστο όσο και στο τελικό ελαιόλαδο (Εικόνα 47). Στο δείγμα ελαιολάδου T5 ανιχνεύθηκε στα 11.560 min ουσία που είχε ακριβώς τον ίδιο χρόνο με την ελευρωπαίνη. Η λήψη του φάσματος της έδειξε πως δεν πρόκειται για την ελευρωπαίνη αλλά ίσως για κάποιο από τα παράγωγα αυτής καθώς το φάσμα μοιάζει πολύ με αυτό της ελευρωπαίνης (Εικόνα 45).



α



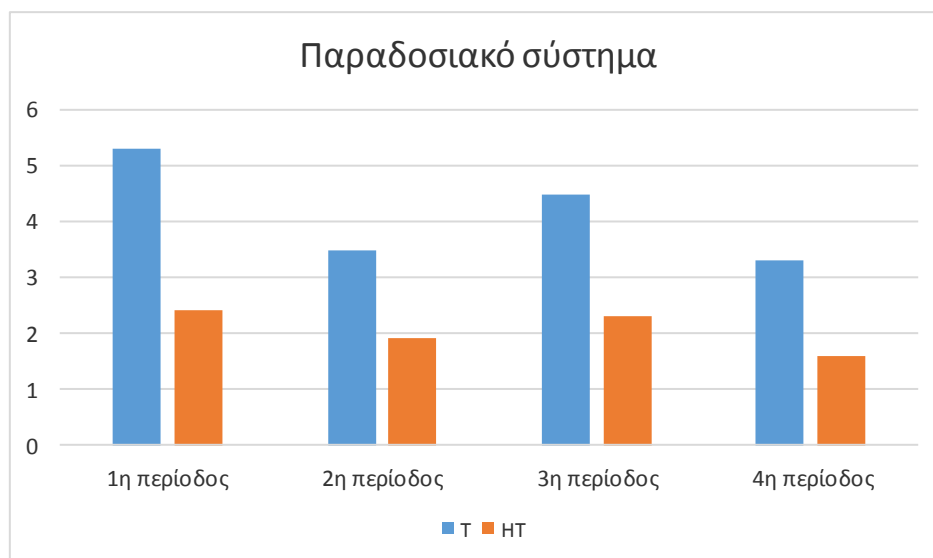
Εικόνα 48: α) Ηλεκτροφερόγραμμα του δείγματος ελαιολάδου T22 με κορυφή τυροσόλης στα 7.379 min β) Κορυφή τυροσόλης του δείγματος T22, με προσθήκη πρότυπης ουσίας τυροσόλης

Πίνακας 11: Ποσοτικά αποτελέσματα σε mg/Kgr βάρους νωπού καρπού τριών βιοενεργών ουσιών (HT, Y, OL), σε δείγματα ελαιολάδων από διαφορετικά συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου, σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

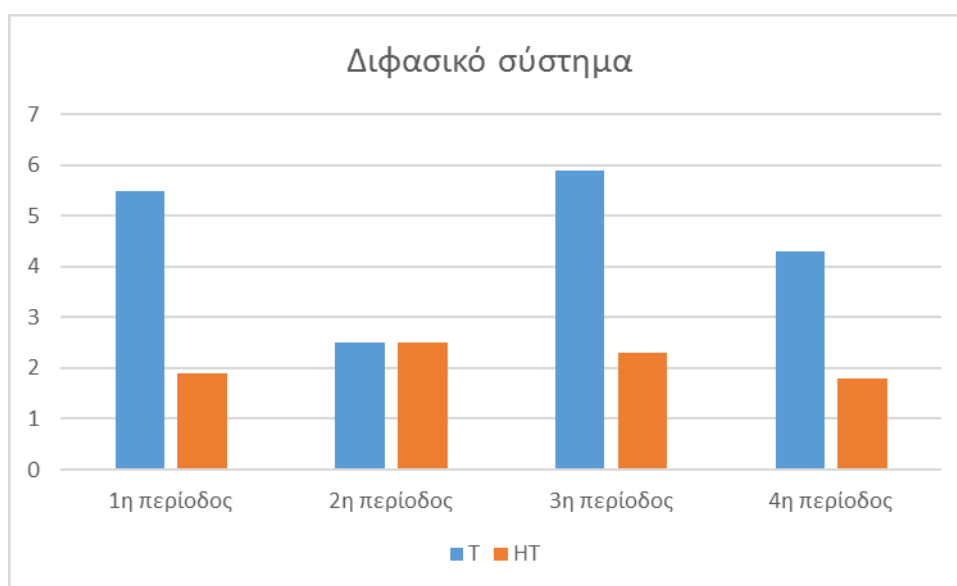
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΕΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΑ								
	Παραδοσιακό			Τριφασικό			Διφασικό		
	T	HT	OL	T	HT	OL	T	HT	OL
5/11/2011	5.3	2.4	n.d.	2.7	n.d.	n.d.	5.5	1.9	n.d.
26/11/2011	3.5	1.9	n.d.	2.2	0.7	n.d.	2.5	2.5	n.d.
17/12/2011	4.5	2.3	n.d.	5.2*/4.5	2.3*/1.0	n.d.	5.9	2.3	n.d.
22/01/2012	3,3	1,6	n.d.	1.6	n.d.	n.d.	4.3	1.8	n.d.

*:Μέτρηση σε αρχικό ανεπεξέργαστο ελαιόλαδο

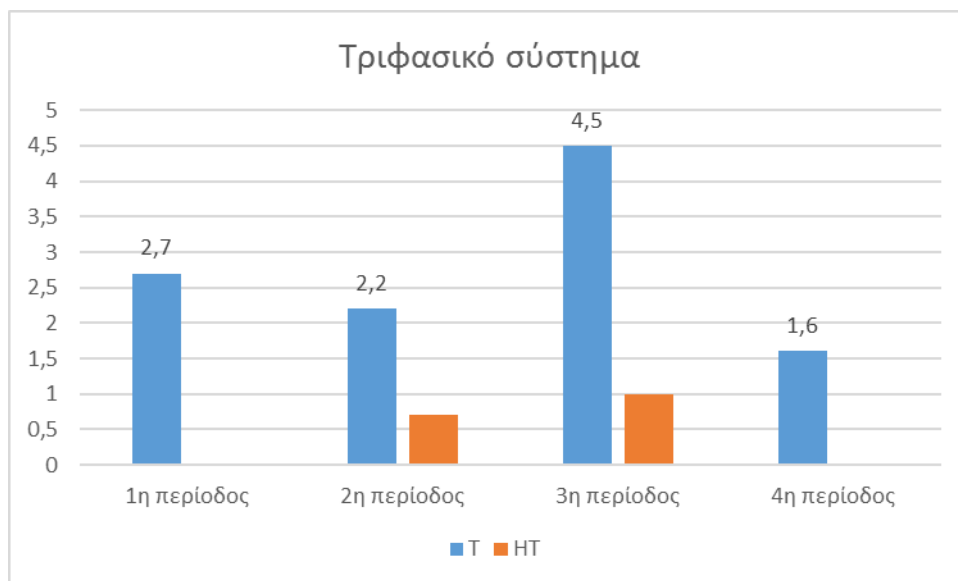
n.d.: none detected



Εικόνα 49: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol, (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)), στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^η περίοδος : 5/11, 2^η περίοδος: 26/11, 3^η περίοδος: 17/12, 4^η περίοδος: 22/01), για το παραδοσιακό σύστημα ελαιοποίησης

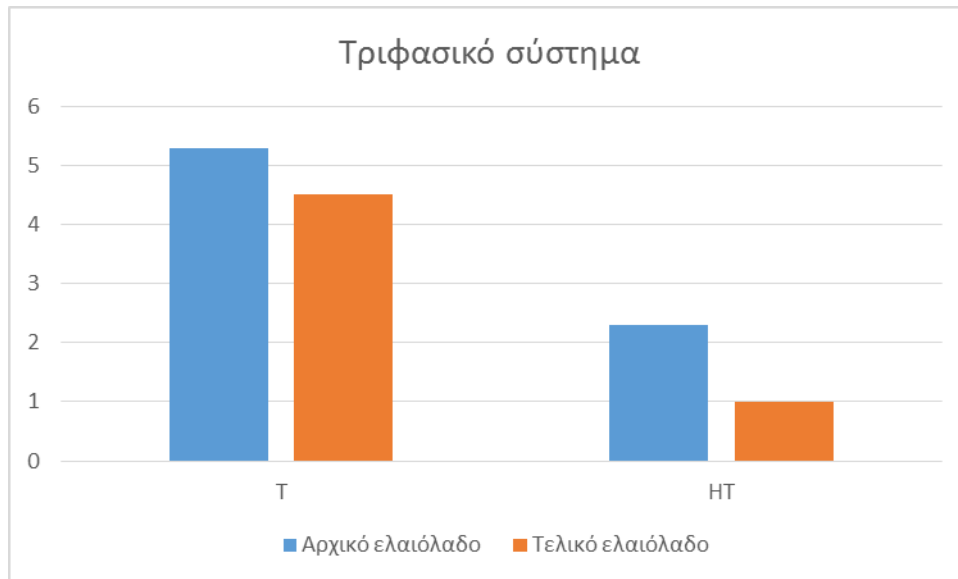


Εικόνα 50: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol, (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)), στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^η περίοδος : 5/11, 2^η περίοδος: 26/11, 3^η περίοδος: 17/12, 4^η περίοδος: 22/01), για το διφασικό σύστημα ελαιοποίησης



Εικόνα 51: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol, (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)), στις διάφορες περιόδους ωρίμανσης (1^η περίοδος : 5/11, 2^η περίοδος: 26/11, 3^η περίοδος: 17/12, 4^η περίοδος: 22/01), για το τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης

Μετρήσεις έγιναν για τα τρία συστήματα εξαγωγής ελαιολάδου στις τέσσερις διαφορετικές περιόδους συγκομιδής ελαιοκάρπων. Για το παραδοσιακό σύστημα (Εικόνα 49), ελήφθησαν τιμές τόσο για την τυροσόλη όσο και για την υδροξυτυροσόλη, με σχετικά μικρές διαφορές ανάμεσα στις τέσσερις περιόδους. Στο διφασικό σύστημα (Εικόνα 50), υπήρξε μια μείωση της τυροσόλης την δεύτερη περίοδο στις 26/11, ενώ στο τριφασικό σύστημα η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε μόνο την 2^η και 3^η περίοδο ωρίμανσης των ελαιοκάρπων (Εικόνα 51). Μια σύγκριση ανάμεσα στο ελαιόλαδο που βγαίνει από τον οριζόντιο διαχωριστήρα με το τελικό από τον κατακόρυφο στο τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης, φανερώνει σημαντικές απώλειες τυροσόλης, αλλά κυρίως υδροξυτυροσόλης στο τελικό ελαιόλαδο (Εικόνα 52).



Εικόνα 52: Μετρήσεις τυροσόλης (Tyrosol, (T)) και υδροξυτυροσόλης (Hydroxytyrosol (HT)) στο αρχικό και στο τελικό ελαιόλαδο της 3^{ης} περιόδου: 17/12, για το παραδοσιακό σύστημα ελαιοποίησης

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κύριος στόχος της διατριβής ήταν ο εντοπισμός βιοενεργών συστατικών στο παρθένο ελαιόλαδο και πιο συγκεκριμένα, της υδροξυτυροσόλης (*Hydroxytyrosol*, HT), της τυροσόλης (*Tyrosol*, T) και της ελευρωπαΐνης (*Oleuropein*, OL), δεδομένου ότι συμβάλλουν στην ποιότητα του ελαιολάδου και αποτελούν ουσίες ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία, όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή (βλ. παρ. 1.6.2). Στην εργασία αυτή, μετά την ανίχνευσή τους μέσω της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων υψηλής ευαισθησίας, ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Οι ουσίες αυτές OL, T και HT, εντοπίστηκαν σε δείγματα ελαιολάδων προερχόμενα από ελαιοτριβεία που χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής ελαιολάδου και εμφάνισαν διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων τους στις διαφορετικές περιόδους ωρίμανσης στις οποίες είχαν παραληφθεί. Οι διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων των φαινολικών συστατικών ήταν αναμενόμενες, δεδομένου ότι επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η μέθοδος εξαγωγής του ελαιολάδου, το στάδιο ωρίμανσης των καρπών, η ποικιλία, η παρενιαυτοφορία, οι καλλιεργητικές φροντίδες, οι κλιματολογικές συνθήκες, οι ζωικοί εχθροί κ.α.

Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 11), προκύπτει ότι η παραδοσιακή μέθοδος εξαγωγής ελαιολάδου (με υδραυλική πίεση) και το διφασικό σύστημα (με φυγοκέντριση), δίνουν σημαντικά υψηλότερες τιμές στις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών που μελετήθηκαν, συγκριτικά με το τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης, για τις περισσότερες ημερομηνίες συγκομιδής. Στο τριφασικό σύστημα, η υδροξυτυροσόλη ανιχνεύθηκε στις μεσαίες περιόδους συγκομιδής, με σημαντική άνοδο κατά την διάρκεια της ωρίμανσης (από μη ανιχνεύσιμη στην πρώτη περίοδο, αυξήθηκε στα 2.3 mg/Kgr νωπού βάρους ελαιοκάρπου (NBE)). Η ελευρωπαΐνη δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα ελαιολάδου των τριών συστημάτων ελαιοποίησης. Την Τρίτη περίοδο συγκομιδής στα μέσα του Δεκέμβρη, πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις στο ελαιόλαδο που εξήχθη από το τριφασικό σύστημα ελαιοποίησης. Η πρώτη μέτρηση αφορούσε στο ανεπεξέργαστο (πρώτο ελαιόλαδο) και η δεύτερη στο τελικό

ελαιόλαδο. Μειονέκτημα του τριφασικού συστήματος αποτελεί ο μεγάλος όγκος υγρών αποβλήτων που δημιουργεί, οπότε στόχος της διπλής αυτής μέτρησης ήταν να εντοπισθεί η ποσότητα των φαινολικών συστατικών που χάνονται στα υγρά απόβλητα (Πίνακας 7, σελ. 4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές των συγκεντρώσεων της T και της HT μειώθηκαν μετά την διαδικασία της φυγοκέντρησης στον κάθετο διαχωριστήρα και την μεγαλύτερη αποβολή την είχε η HT της οποίας η συγκέντρωση μειώθηκε στο 1.0 mg/Kgr νωπού βάρους από 2.3 mg/Kgr που ήταν στο αρχικό ανεπεξέργαστο ελαιόλαδο. Η T είχε λιγότερη μείωση, καθώς από 5.2 mg/Kgr μετρήθηκε 4.5 mg/Kgr στο τελικό ελαιόλαδο. Αυτό δείχνει ότι στον τελικό διαχωρισμό στον οποίο προστίθεται ζεστό νερό αποβάλλονται σημαντικές ποσότητες πολύτιμων συστατικών του ελαιολάδου και συνεπάγεται πως τα υγρά απόβλητα είναι μια πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών, κυρίως υδροξυτυροσόλης, γι' αυτό είναι σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω το περιεχόμενο τους και να γίνουν ολοκληρωμένες προσπάθειες ανάκτησης και χρησιμοποίησής τους. Ομοίως, σε άλλη έρευνα διαπιστώθηκε πως στο ανεπεξέργαστο ελαιόλαδο η HT από 5.8 mg/Kgr NBE, μειώθηκε στα 2.4 mg/Kgr στο τελικό ελαιόλαδο, ενώ η T από 5.3 mg/Kgr στα 5.0 mg/Kgr αντίστοιχα (Kanakis et al., 2013). Την τελευταία περίοδο συγκομιδής, στο τριφασικό σύστημα, η T είχε την χαμηλότερη τιμή (1.6 mg/Kgr NBE) και η HT δεν ανιχνεύθηκε καθόλου. Το σύστημα εξαγωγής του ελαιολάδου, το υψηλό υψόμετρο και η ωριμότητα των καρπών είναι μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά την συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών συγκρίσιμα με τις τιμές στην ποικιλία (Janick, 2011; Mohamed Mousa et al., 1996).

Για το παραδοσιακό και το διφασικό σύστημα, αυξημένες συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών παρατηρήθηκαν στην αρχή των ημερομηνιών συγκομιδής και ακολούθησε μείωση στο τέλος του μήνα και μια αύξηση ξανά προς τα μέσα του Δεκέμβρη. Συγκεκριμένα, στο παραδοσιακό σύστημα εξαγωγής ελαιολάδου, η συγκέντρωση της T ήταν 5.3 mg/Kgr NBE στην πρώτη περίοδο συγκομιδής και 3.3 mg/Kgr NBE στο ανώτερο στάδιο ωρίμανσης. Η HT ακολούθησε την ίδια πτωτική πορεία, από 2.4 mg/Kgr στα 1.6 mg/Kgr NBE. Στο διφασικό σύστημα, η T είχε συγκέντρωση 5.5 mg/Kgr και στην τελευταία μέτρηση 4.3 mg/Kgr, ενώ η HT είχε πολύ μικρή διαφορά ανάμεσα στην πρώτη και τελευταία μέτρηση. Τα επίπεδα των βιοενεργών αυτών συστατικών του ελαιολάδου, είναι παρόμοια με τα επίπεδα που βρέθηκαν στην έρευνα των Kanaki και συνεργατών, οι οποίοι έκαναν μετρήσεις σε ελαιόλαδο από ελιές Κορωνέϊκης ποικιλίας που εξήχθη με διφασικό σύστημα και οι τιμές

της T ήταν 5.0 mg/Kgr NBE, της HT 2.4g/Kgr NBE, ενώ η OL ήταν μη ανιχνεύσιμη (Kanakakis et al., 2013). Βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί διαφορετικά αποτελέσματα σχετικά με την διακύμανση των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Σε συμφωνία με την εργασία αυτή, βρίσκονται τα ερευνητικά δεδομένα που έχουν μετρηθεί από τους Baccouri και συνεργάτες σε ποικιλίες όπως η Chetoui, στην έρευνα των οποίων διαπιστώθηκε αύξηση των πολυφαινολών ανάμεσα στις περιόδους ωρίμανσης και μείωση στο τέλος αυτών (Baccouri et al., 2008). Σε μια άλλη έρευνα, των Ben Youssef και συνεργατών, ανάμεσα σε πέντε περιόδους ωρίμανσης, τα επίπεδα της HT αυξήθηκαν την δεύτερη περίοδο ωρίμανσης (231.99 mg/Kgr ελαιολάδου) και μειώθηκαν σταδιακά μέχρι την τελευταία περίοδο, όπου σημειώθηκε η χαμηλότερη τιμή (45.52 mg/Kgr ελαιολάδου). Στην ίδια έρευνα, η T έδειξε σταδιακή μείωση, με την χαμηλότερη τιμή στο τέλος της περιόδου ωρίμανσης (από 54.36 στα 7.8 mg/Kgr ελαιολάδου) (Ben Youssef et al., 2010). Σε μετρήσεις που έγιναν σε ελαιόλαδα Κορωνέικης ποικιλίας για δυο μη συνεχόμενες χρονιές, η HT φάνηκε να μην παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης της ελιάς στη μια χρονιά, σε αντίθεση με την άλλη όπου σημείωνε αύξηση, ενώ η συγκέντρωση της T διέφερε ανάμεσα στα στάδια ωρίμανσης και για τις δύο χρονιές (Anastasopoulos et al., 2011). Αντίθετα, στην έρευνα των Vekiarí και συνεργατών, σε Κορωνέικη ποικιλία έξτρα παρθένου ελαιολάδου, τόσο η συγκέντρωση της HT όσο και της T, σημείωσαν σταδιακή αύξηση κατά την διάρκεια των σταδίων της ωρίμανσης. Η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε ανάμεσα σε τρεις περιόδους ωρίμανσης και η συγκέντρωση της HT από 8.04 mg/Kgr αυξήθηκε στο 13.23 mg/Kgr και η T από 3.42 mg/Kgr στο 5.55 mg/ Kgr (Vekiarí S. A., 2010). Είναι φανερό πως υπάρχουν πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τα επίπεδα των φαινολικών συστατικών του ελαιολάδου και το στάδιο ωρίμανσης των ελαιοκάρπων. Οι διαφορές αυτές ανάμεσα στις μελέτες είναι φυσιολογικές, δεδομένων των πολλών παραγόντων που ευθύνονται για την περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινολικά συστατικά. Επομένως, κρίνεται σκόπιμο να γίνουν περαιτέρω έρευνες για την επίδραση του σταδίου ωρίμανσης στα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου.

6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Το ελαιόλαδο είναι βασικό στοιχείο της μεσογειακής διατροφής, προϊόν υψηλής βιολογικής αξίας, καθώς τα πολύτιμα συστατικά που περιέχει, δρουν ευεργετικά στις περισσότερες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου έχουν αποδεδειγμένα πολλαπλά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία με αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, καρδιοπροστατευτικές και πολλές άλλες ιδιότητες, γεγονός που τα καθιστά υψίστης σημασίας για την καλή υγεία του ανθρώπου. Ο προστατευτικός τους ρόλος εξαρτάται από τα επίπεδα των συγκεντρώσεων στα οποία βρίσκονται, οι τιμές των οποίων εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες όπως η ποικιλία, οι μέθοδοι εξαγωγής του ελαιολάδου, το στάδιο ωρίμανσης των ελαιοκάρπων κ.α. Στην εργασία αυτή, η ελευρωπαΐνη ήταν μη ανιχνεύσιμη στα τρία συστήματα ελαιοποίησης. Το παραδοσιακό και το διφασικό σύστημα ελαιοποίησης φάνηκε να εξάγουν ελαιόλαδα με υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης συγκριτικά με το τριφασικό σύστημα στο οποίο αποδείχθηκε πως ένα μεγάλο μέρος κυρίως της υδροξυτυροσόλης χάνεται με τα υγρά απόβλητα. Το στάδιο ωρίμανσης έδειξε να προκαλεί διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των βιοενεργών αυτών συστατικών.

Οι βιοενεργές ουσίες του ελαιολάδου δημιουργούν σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους, μολύνοντας τον υδροφόρο ορίζοντα και καταστρέφοντας οικοσυστήματα όταν διατίθενται ανεξέλεγκτα. Για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων κρίνεται αναγκαία η δημιουργία μιας ολοκληρωμένης διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Η μετατροπή των τριφασικών συστημάτων σε διφασικά θα ήταν ίσως μια λύση για τον περιορισμό των υγρών αποβλήτων. Κατ' επέκταση, για τα στερεά απόβλητα που αποτελούν πρόβλημα των διφασικών συστημάτων, θα πρέπει να δημιουργηθούν πυρηνελαιουργεία κατάλληλα για την αποτελεσματική επεξεργασία τους. Τρόποι ανάκτησης των φαινολικών συστατικών από τα απόβλητα των ελαιοτριβείων είναι πολύ σημαντικό να βρεθούν ώστε να αξιοποιηθούν σε διάφορους τομείς.

Παρά την μεγάλη σημασία των φαινολικών συστατικών της ελιάς και κατ' επέκταση του ελαιολάδου, η τελική συγκέντρωση τους παρουσιάζει μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις

έρευνες και είναι αμφισβητήσιμη, εξαιτίας των αποσπασματικών προσεγγίσεων που γίνονται ερευνητικά.

Σε επόμενη εργασία, θα ήταν σημαντικό να γίνει μια ολοκληρωμένη διερεύνηση όλων των παραμέτρων που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των φαινολικών συστατικών, ξεκινώντας από τα χαρακτηριστικά της ελαιοκαλλιέργειας και τις συνθήκες του ελαιοκάρπου, μέχρι τη μέθοδο εξαγωγής του ελαιολάδου, συμπεριλαμβανομένων και των ενδιάμεσων σταδίων των συστημάτων εξαγωγής (έκθλιψη, μάλαξη, φυγοκέντριση). Έτσι θα είναι εφικτό να εντοπισθούν οι αιτίες μείωσης των φαινολικών συστατικών στο ελαιόλαδο και να γίνουν οι απαραίτητες ενέργειες ώστε να αξιοποιηθούν κατάλληλα τα πολύτιμα αυτά συστατικά του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tzarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., Manios, T., 2007. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55, 2671-6.
- Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M., Baldoni, L., 2012. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC plant biology*. 12, 162.
- Anastasopoulos, E., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., Kountouri, A., Andrikopoulos, N. K., 2011. The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *International Journal of Food Science & Technology*. 46, 170-178.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food chemistry*. 68, 283-287.
- Aparicio, R. n. H. J. L., 2000. *Handbook of olive oil : analysis and properties*. Aspen, Gaithersburg, Md.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Daoud Ben Miled, D., 2008. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food chemistry*. 109, 743-754.
- Baiano, A., Gambacorta, G., Terracone, C., Previtali, M. A., Lamacchia, C., La Notte, E., 2009. Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of food science*. 74, C177-83.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., de Souza Campos, F. A., Jr., Bruns, R. E., Godoy, H. T., 2014. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Food chemistry*. 146, 558-68.

- Ben Youssef, N., Zarrouk, W., Carrasco-Pancorbo, A., Ouni, Y., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Daoud, D., Zarrouk, M., 2010. Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chetoui virgin olive oil. *Journal of the science of food and agriculture*. 90, 199-204.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gomez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Lercker, G., 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*. 12, 1679-719.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 51, 971-4.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., Visioli, F., 2007. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*. 190, 181-6.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Gallina Toschi, T., Lercker, G., 2003. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *Journal of chromatography. A*. 1011, 163-72.
- Borja, R., Alba, J., Garrido, S. E., Martinez, L., Garcia, M. P., Monteoliva, M., Ramos-Cormenzana, A., 1995. Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive-mill wastewater. *Biotechnology and applied biochemistry*. 22 (Pt 2), 233-46.
- Boskou, D., 2006. *Olive oil : chemistry and technology*. AOCS, Champaign, Illinois.
- Boskou, D., 2009. *Olive oil : minor constituents and health*. CRC Press, Boca Raton.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Garrido, A., 2000. Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system. *Journal of agricultural and food chemistry*. 48, 5178-83.
- Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A., 2001. Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 5609-5614.

- Cao, K., Xu, J., Zou, X., Li, Y., Chen, C., Zheng, A., Li, H., Li, H., Szeto, I. M., Shi, Y., Long, J., Liu, J., Feng, Z., 2014. Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free radical biology & medicine*. 67, 396-407.
- Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A., 2001. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *Eur Food Res Technol*. 212, 329-333.
- Carrasco-Pancorbo, A., Neuss, C., Pelzing, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2007. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. *Electrophoresis*. 28, 806-21.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., 2002. Microbiological activity in stored olive oil. *International journal of food microbiology*. 75, 111-8.
- Clodoveo, M. L., 2012. Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future – An overview. *Trends in Food Science & Technology*. 25, 13-23.
- Colquhoun, D. M., Hicks, B. J., Reed, A. W., 1996. Phenolic content of olive oil is reduced in extraction and refining. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 5, 105-7.
- Covas, M. I., 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 55, 175-86.
- Dabbou, S., Brahmi, F., Taamali, A., Issaoui, M., Ouni, Y., Braham, M., Zarrouk, M., Hammami, M., 2010. Extra Virgin Olive Oil Components and Oxidative Stability from Olives Grown in Tunisia. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87, 1199-1209.
- Dag, A., Ben-Gal, A., Yermiyahu, U., Basheer, L., Nir, Y., Kerem, Z., 2008. The effect of irrigation level and harvest mechanization on virgin olive oil quality in a traditional rain-fed 'Souri' olive orchard converted to irrigation. *Journal of the science of food and agriculture*. 88, 1524-1528.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogeve, N., Zipori, I., Lavee, S., Ben-David, E., 2011. Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*. 127, 358-366.

- El-Abbassi, A., Hafidi, A., García-Payo, M. C., Khayet, M., 2009. Concentration of olive mill wastewater by membrane distillation for polyphenols recovery. *Desalination*. 245, 670-674.
- Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Elobeid, M. A., Virk, P., Al-Olayan, E. M., Hassan, Z. K., Mohammed, O. B., Aboussekhra, A., 2013. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 53, 310-6.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., Morozzi, G., 2008. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *The Journal of nutrition*. 138, 1411-6.
- Fiestas Ros de Ursinos, J. A., Borja-Padilla, R., 1996. Biomethanization. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 38, 145-153.
- Franco, M. N., Galeano-Diaz, T., Sanchez, J., De Miguel, C., Martin-Vertedor, D., 2014. Total phenolic compounds and tocopherols profiles of seven olive oil varieties grown in the south-west of Spain. *Journal of oleo science*. 63, 115-25.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., Saari, N., 2012. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)-A Review. *International journal of molecular sciences*. 13, 3291-340.
- Gómez-acebo, E., Alcami, P. J., Aunon, C. D., Topical use of hydroxytyrosol and derivatives for the prevention of hiv infection. *Google Patents*, 2012.
- Gordon, M. H., 1990. The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. In: Hudson, B. J. F., (Ed.), *Food Antioxidants*. Springer Netherlands, pp. 1-18.
- Gordon, M. H., 2001. 2 - The development of oxidative rancidity in foods. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., Eds.), *Antioxidants in Food*. Woodhead Publishing, pp. 7-21.
- Grace, S. C., 2007. Phenolics as Antioxidants. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 141-168.

- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., Hagiwara, H., 2011. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European journal of pharmacology*. 662, 78-84.
- Han, J., Talorete, T. P., Yamada, P., Isoda, H., 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology*. 59, 45-53.
- Harzallah, H., Extraction of phenolic compounds from olive leaves, olive fruit and olive oil and determination of their antioxidant activity. MAICh, Chania, 1993.
- Hashim, Y. Z., Worthington, J., Allsopp, P., Ternan, N. G., Brown, E. M., McCann, M. J., Rowland, I. R., Esposito, S., Servili, M., Gill, C. I., 2014. Virgin olive oil phenolics extract inhibit invasion of HT115 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Food & function*.
- Hassan, Z. K., Elamin, M. H., Daghestani, M. H., Omer, S. A., Al-Olayan, E. M., Elobeid, M. A., Virk, P., Mohammed, O. B., 2012. Oleuropein induces anti-metastatic effects in breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 13, 4555-9.
- Hoffman, R. G. M., *The Mediterranean diet health and science*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK; Ames, Iowa, 2012.
- IOOC, Olive Oils. World olive oil figures, 2013, pp. <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4246-production2-ang/>.
- Janick, J., *Horticultural reviews*. Volume 38 Volume 38. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011.
- Jensen, S. R., Franzyk, H., Wallander, E., 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*. 60, 213-31.
- Kanakis, P., Termentzi, A., Michel, T., Gikas, E., Halabalaki, M., Skaltsounis, A. L., 2013. From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta medica*. 79, 1576-87.
- Khymenets, O., *Health benefits of olive oil*, Department of Experimental and Health Science Pompeu Fabra University, Barcelona, 2010.

- Kiritsakis, A. K., 1990. Olive oil. American Oil Chemists' Society, Champaign, Ill.
- Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y. T., Zhang, J., Huang, P. L., 2007. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: part II. integrase inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 354, 879-84.
- Li, X., Zhu, H., Shoemaker, C., Wang, S., 2014. The Effect of Different Cold Storage Conditions on the Compositions of Extra Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1-12.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 86, 2046-2056.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., Fregapane, G., 2014. Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 degrees C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food chemistry*. 150, 374-81.
- Martinez-Gonzalez, M. A., Sanchez-Villegas, A., 2004. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *European journal of epidemiology*. 19, 9-13.
- Martinez Nieto, L., Hodaifa, G., Lozano Pena, J. L., 2010. Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olives at different stages of ripeness. *Journal of the science of food and agriculture*. 90, 2393-8.
- Méndez, A. I., Falqué, E., 2007. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. *Food Control*. 18, 521-529.
- Mohamed Mousa, Y., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I., Kiritsakis, A., 1996. Effect of Altitude on Fruit and Oil Quality Characteristics of 'Mastoides' Olives. *Journal of the science of food and agriculture*. 71, 345-350.
- Niaounakis, M. H. C. P., Olive processing waste management literature review and patent survey. Elsevier, Amsterdam; London, 2006.

- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Jr., Prenzler, P. D., Robards, K., 2005a. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 9911-20.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., Stockmann, R., 2005b. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 823-837.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Robards, K., 2008. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural product reports*. 25, 1167-79.
- Paraskeva, C. A., Papadakis, V. G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D. G., Koutsoukos, P. G., 2007. Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination*. 213, 218-229.
- Perona, J. S., Cabello-Moruno, R., Ruiz-Gutierrez, V., 2006. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of nutritional biochemistry*. 17, 429-45.
- Petroni, A., Blasevich, M., Papini, N., Salami, M., Sala, A., Galli, C., 1997. Inhibition of leukocyte leukotriene B4 production by an olive oil-derived phenol identified by mass-spectrometry. *Thrombosis research*. 87, 315-22.
- Piscopo, A., Poiana, M., 2012. *Packaging and Storage of Olive Oil*.
- Pokorný, J., 1997. *Olive Oil. Chemistry and Technology*. Edited by D. Boskou. VII and 161 pages, 45 figures and 41 tables. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996. Price: 75,- US\$. *Food / Nahrung*. 41, 119-120.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., 2002. Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50, 716-21.
- Rawls, H. R., Van Santen, P. J., 1970. A possible role for singlet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 47, 121-125.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., De Castro, A., 2007. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55, 680-6.

- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*. 92, 147-176.
- Ryan, D., Robards, K., 1998. Critical Review. Phenolic compounds in olives. *The Analyst*. 123, 31R-44R.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M. Á., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., Estruch, R., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Ruiz-Gutiérrez, V., Ros, E., Investigators, f. t. P. S., 2011. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes care*. 34, 14-19.
- Sarolic, M., Gugic, M., Tuberoso, C. I., Jerkovic, I., Suste, M., Marijanovic, Z., Kus, P. M., 2014. Volatile profile, phytochemicals and antioxidant activity of virgin olive oils from Croatian autochthonous varieties Masnjaca and Krvavica in comparison with Italian variety Leccino. *Molecules*. 19, 881-95.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B., Eggen, R. I. L., 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental microbiology*. 3, 81-91.
- Suárez, M., Romero, M.-P., Ramo, T., Macià, A., Motilva, M.-J., 2009. Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 57, 1463-1472.
- Tangney, C. C., Rasmussen, H. E., 2013. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*. 15, 324.
- Therios, I. N., 2009. *Olives*. CABI, Wallingford; Cambridge, MA.
- Turktas, M., Inal, B., Okay, S., Erkilic, E. G., Dundar, E., Hernandez, P., Dorado, G., Unver, T., 2013. Nutrition metabolism plays an important role in the alternate bearing of the olive tree (*Olea europaea* L.). *PloS one*. 8, e59876.
- Uylaser, V., Yildiz, G., 2014. The historical development and nutritional importance of olive and olive oil constituted an important part of the Mediterranean diet. *Critical reviews in food science and nutrition*. 54, 1092-101.

- Vekiari S. A., O. V., Kourkoutas Y., Kamoun N., Msallem M., Psimoul V., Arapoglou D., Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the throumbolia and Koroneiki varieties from Southern Greece. *GRASAS Y ACEITES*, Vol. 61, 2010.
- Viola, P., Viola, M., 2009. Virgin olive oil as a fundamental nutritional component and skin protector. *Clinics in dermatology*. 27, 159-65.
- Vlyssides, A. G., Loizides, M., Karlis, P. K., 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*. 12, 603-611.
- Walter, W. M., Jr., Fleming, H. P., Etchells, J. L., 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied microbiology*. 26, 773-6.
- Wasowicz, E., Granza, A., Hes, M., Jelen, H H., Korzak, J., Malecka, M., 2004. Oxidation of lipids in food. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13/54, 87-100.
- Yamada, K., Ogawa, H., Hara, A., Yoshida, Y., Yonezawa, Y., Karibe, K., Nghia, V. B., Yoshimura, H., Yamamoto, Y., Yamada, M., Nakamura, K., Imai, K., 2009. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral research*. 83, 35-44.
- Yousfi, K., Weiland, C. M., Garcia, J. M., 2012. Effect of harvesting system and fruit cold storage on virgin olive oil chemical composition and quality of superintensive cultivated 'Arbequina' olives. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60, 4743-50.
- Γεωργαλάκη, Μ., Ενζυμικές δράσεις στις ελιές και το ελαιόλαδο. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνα, 1999.
- Κυριτσάκης, Α., 2007. Ελαιόλαδο.