

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ  
ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**



**ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ  
ΣΤΟΝ ΚΑΡΠΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΚΑΙ ΤΩΝ  
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΙΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ.  
ΜΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ  $^{31}\text{P}$  NMR**

**Τ Σ Ι Ρ Ω Ν Η Β Α Γ Ι Α**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΤΑΗΣ ΦΩΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**2005**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα.....	i
Κατάλογος Σχημάτων .....	v
Κατάλογος Πινάκων .....	viii
Ευχαριστίες.....	x
Abstract.....	xii
Περίληψη .....	xiii

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

1.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ .....	1
1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ .....	2
1.2.1 ΑΛΚΑΝΙΑ .....	3
1.2.2 ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ, ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ .....	3
1.2.3 ΑΛΚΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΟ-ΦΑΙΝΥΛ-ΕΣΤΕΡΕΣ .....	5
1.2.4 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ .....	5
1.2.5 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	6
1.2.6 ΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ .....	10
1.2.7 ΣΑΚΧΑΡΑ .....	12
1.2.8 ΜΕΤΑΛΛΑ.....	12
1.2.9 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	12
1.2.10 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ.....	13
1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ.....	13
1.3.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ .....	13
1.3.2 ΣΑΚΧΑΡΑ .....	14
1.3.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ .....	15
1.3.4 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ .....	15
1.3.5 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	15
1.3.6 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ .....	16

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ**

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ.....	17
2.2 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ .....	17
2.2.1 ΕΛΛΑΔΑ .....	18
2.2.2 ΙΣΠΑΝΙΑ.....	20
2.2.3 ΜΑΡΟΚΟ .....	21
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ.....	22
2.3.1 ΠΡΑΣΙΝΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ .....	22
2.3.2 ΞΑΝΘΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ .....	24
2.3.3 ΦΥΣΙΚΟΣ ΜΑΥΡΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ .....	25
2.3.4 ΤΕΧΝΗΤΟΣ ΜΑΥΡΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ.....	26
2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ .....	26
2.4.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΑ.....	27
2.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ .....	30
2.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	33
2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ . .....	34

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ .....	38
3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ .....	38
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ .....	40
3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΤΟΥ ΕΜΠΟΡΙΟΥ .....	41
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ, ΣΤΕΡΟΛΩΝ, ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>31</sup> P NMR .....	42
3.6 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ <sup>31</sup> P NMR .....	43
3.6.1 Παρασκευή αντιδραστήριου φωσφιτυλίωσης .....	43
3.6.2 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος .....	44
3.6.3 Αντίδραση φωσφιτυλίωσης .....	44
3.6.4 Φάσματα NMR.....	45

3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 1,3-ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ.....	48
3.8 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ..	51

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ**

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
4.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΙΔΙΑ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ .....	54
4.1.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ, ΣΤΕΡΟΛΩΝ ΚΑΙ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>31</sup> P NMR .....	56
4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	63

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ**

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	66
5.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ .....	66
5.1.2 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ. ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ <sup>31</sup> P-NMR .....	67
5.1.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>31</sup> P NMR .....	73
5.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (REPEATABILITY) ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΜΟΤΗΤΑ (REPRODUCIBILITY).....	79
5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	81
5.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΦΡΕΣΚΟ	

ΩΡΙΜΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ .....	83
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	89
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>91</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.1</b>	Μορφολογία του ελαιοκάρπου.....	1
<b>Σχήμα 1.2</b>	Λιπαρά οξέα που απαντώνται στον ελαιοκάρπο .....	4
<b>Σχήμα 1.3</b>	Πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα που απαντώνται στον ελαιοκάρπο .....	5
<b>Σχήμα 1.4</b>	Στερόλες που απαντώνται στον ελαιοκάρπο .....	6
<b>Σχήμα 1.5</b>	Φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί στον ελαιοκάρπο.....	7
<b>Σχήμα 1.6</b>	Σχηματισμός τριγλυκεριδίου από την γλυκερόλη, R=αλειφατική αλυσίδα .....	11
<b>Σχήμα 1.7</b>	Χημικοί τύποι μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων. R=αλειφατική αλυσίδα .....	11
<b>Σχήμα 2.1</b>	Μεταβολή της συγκέντρωσης των ενώσεων σε άλμη (διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου) με το χρόνο επεξεργασίας του καρπού.....	29
<b>Σχήμα 2.2</b>	Συγκέντρωση των ενώσεων στην άλμη μετά από 9 ώρες κατεργασίας με υδροξείδιο του νατρίου.....	29
<b>Σχήμα 2.3</b>	Δομές συντονισμού των ριζών των πολυφαινολών .....	32
<b>Σχήμα 3.1</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR, στα 202MHz, εκχυλίσματος διγλυκεριδίων ελαιοκάρπου .....	46
<b>Σχήμα 3.2</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR στα 202MHz εκχυλίσματος πολυφαινολών επιτραπέζιου ελαιοκάρπου με την μέθοδο 1 .....	47
<b>Σχήμα 3.3</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR, στα 202MHz, εκχυλίσματος πολυφαινολών επιτραπέζιου ελαιοκάρπου με την μέθοδο 2 .....	47
<b>Σχήμα 3.4</b>	Φάσματα <sup>31</sup> P-NMR: (α) πρότυπο 1,3-DGs, (β) εκχύλισμα διγλυκεριδίων, (γ) εκχύλισμα διγλυκεριδίων του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη πρότυπου 1,3-DGs.....	49
<b>Σχήμα 3.5</b>	Φάσματα <sup>31</sup> P-NMR: (α) πρότυπο βανιλικό οξύ, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών, (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη πρότυπου βανιλικού οξέος .....	50
<b>Σχήμα 3.6</b>	Φάσματα <sup>31</sup> P-NMR: (α) πρότυπο 3-υδροξυ-4-μεθοξικιναμμικό οξύ, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών, (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη του πρότυπου 3- υδροξυ 4-μεθοξυ κιναμμικού οξέος.....	51

<b>Σχήμα 4.1</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάκι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	58
<b>Σχήμα 4.2</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάκι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	58
<b>Σχήμα 4.3</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάκι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003) .....	59
<b>Σχήμα 4.4</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας του λόγου D (1,2-DGs/TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάκι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003) .....	59
<b>Σχήμα 4.5</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	60
<b>Σχήμα 4.6</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	60
<b>Σχήμα 4.7</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας ολικών διγλυκεριδίων (TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	61
<b>Σχήμα 4.8</b>	Μεταβολή του λόγου D (1,2-DGs/TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).....	61
<b>Σχήμα 4.9</b>	Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3DGs) και ολικών διγλυκεριδίων (TDGs) του ελαιοκάρπου με την θερμοκρασία.....	62
<b>Σχήμα 5.1</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR πολικού μέρους του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου. Αλειφατική περιοχή.....	69
<b>Σχήμα 5.2</b>	Φάσμα <sup>31</sup> P-NMR πολικού μέρους του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου. Αρωματική περιοχή .....	70
<b>Σχήμα 5.3</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ελεύθερη υδροξυτυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν .....	76

<b>Σχήμα 5.4</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ελεύθερη τυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν .....	77
<b>Σχήμα 5.5</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολική υδροxyτυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν .....	77
<b>Σχήμα 5.6</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολική τυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν .....	78
<b>Σχήμα 5.7</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολικές πολυφαινόλες (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν .....	78
<b>Σχήμα 5.8</b>	Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολικές πολυφαινόλες (μmol/ελιά) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.....	79



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1</b> Κύριες πολυφαινολικές ενώσεις σε ποικιλίες ελαιοκάρπου διαφόρων χωρών (mg/100g ελαιοκάρπου).....	10
<b>Πίνακας 3.1</b> Δείγματα ελαιοκάρπου για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων .....	39
<b>Πίνακας 3.2</b> Εμπορικά Δείγματα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών .....	39
<b>Πίνακας 4.1</b> Μεταβολή του βάρους (g) του ελαιοκάρπου κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003 .....	54
<b>Πίνακας 4.2</b> Μεταβολή της υγρασίας του ελαιοκάρπου κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003 .....	55
<b>Πίνακας 4.3</b> Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DGs/TDG), ολικών ελεύθερων στερολών και οξύτητας (Μέθοδος Α).....	56
<b>Πίνακας 4.4</b> Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DG/TDG), ολικών ελεύθερων στερολών και οξύτητας (Μέθοδος Β) .....	57
<b>Πίνακας 4.5</b> Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DGs/TDG), στερολών και οξύτητας σε διάφορες θερμοκρασίες για το Δείγμα 7 (Μέθοδος Β).....	62
<b>Πίνακας 5.1</b> Βάρος επιτραπέζιου ελαιοκάρπου διαφορετικής ποικιλίας και προέλευσης .....	66
<b>Πίνακας 5.2</b> % Υγρασία επιτραπέζιου ελαιοκάρπου διαφορετικής ποικιλίας και προέλευσης.....	67
<b>Πίνακας 5.3</b> Χημικές μετατοπίσεις φωσφυτυλιωμένων παραγώγων εκχυλίσματος επιτραπέζιου ελαιοκάρπου .....	71
<b>Πίνακας 5.4</b> Ποσοτική σύσταση (μmol/g ελαιοκάρπου) πολυφαινολών, γλυκόζης και βιταμίνης Ε σε επιτραπέζιο ελαιοκάρπο με την φασματοσκοπία <sup>31</sup> P-NMR .....	74
<b>Πίνακας 5.5</b> Ολικές πολυφαινόλες (μmol/ξηρή ελιά) για τα δείγματα ελαιοκάρπου που εξετάστηκαν .....	76

<b>Πίνακας 5.6</b> Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης της επαναληψιμότητας του πειράματος $^{31}\text{P}$ -NMR .....	80
<b>Πίνακας 5.7</b> Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης της αναπαραγωγιμότητας της διαδικασίας εκχύλισης.....	81
<b>Πίνακας 5.8</b> Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για φρέσκο ελαιόκαρπο (από βιβλιογραφία) και επεξεργασμένο ελαιόκαρπο, από την παρούσα εργασία (μmol/g) και από χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (από βιβλιογραφία) ...	87

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου, Γιώργο και Χριστίνα και τον αδερφό μου Κώστα, για την υπομονή και επιμονή που έδειξαν όλο αυτό τον καιρό. Η βοήθεια τους, ψυχολογική και οικονομική, είναι ανεκτίμητη και χωρίς αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί αυτή η εργασία. Ένα ευχαριστώ είναι πολύ μικρό και λίγο για την συμπαράσταση τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Φώτη Νταή, για την ανάθεση της παρούσας διατριβής και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της. Τον καθηγητή κ. Χ. Κατερινόπουλο και Επίκουρο καθηγητή κ. Σ. Περγαντή που δέχθηκαν να αξιολογήσουν και να διορθώσουν αυτή την εργασία.

Τον δρ. Απόστολο Σπύρο, για τις καταλυτικές γνώσεις που μου μετέδωσε και τις συμβουλές που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Ακόμα τον κ. Γεώργιο Φραγκάκη, την Γεωργία Φραγκάκη για την προσφορά των δειγμάτων από την περιοχή Σκαλάκι και Κοκκίνη Χάνι, και τον Θανάση Αφράτη για την ταλαιπωρία μέχρι να εντοπίσει τα δείγματα από την Ισπανία και το Μαρόκο.

Τα παιδιά του εργαστηρίου, Άγγελο Φιλιππίδη, Γεωργία Φραγκάκη και Μανώλη Χατζάκη για την κατανόησή τους και βοήθεια όχι μόνο στα πειράματα αλλά και σε οτιδήποτε παρουσιάστηκε.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την φίλη μου και οικογένειά μου στην Κρήτη, Νίκη Ματσούκη, για τα 8 χρόνια που μου συμπαραστέκεται σε οτιδήποτε έχει προκύψει αλλά και για την τεράστια βοήθειά της οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκε.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Σέργιο Γερασόπουλο, για την υποστήριξη τα τελευταία 7 χρόνια, αλλά και την αγάπη του όλο αυτό τον καιρό. Η βοήθειά του είναι ανεκτίμητη και σημαντική.

Επίσης, την Μαρία Γραμματικοπούλου, για την συμπαράσταση και βοήθεια τα τελευταία τρία χρόνια, αλλά και την καλλιτεχνική της επιμέλεια στην παρουσίαση.

Τέλος, τους φίλους μου, Αλεξάνδρα Λαμπροπούλου, Γουργουρίνη Γιάννη, Γιώργο Χαραλαμπίδη, Μαρία Μαρκετάκη, Πόπη Λαδωμένου, για τις αξέχαστες στιγμές και την αγάπη τους.

## **Abstract**

The present dissertation describes the variation of the diglyceride content in olive fruits during maturation. It was found for the first time that 1,3-diglycerides are formed primarily in olive fruit and their concentration tends to increase as maturation progresses. On the other hand, the concentration of 1,2-diglycerides, which constitutes the major diglyceride isomers, tends to diminish upon maturation.

The second aim of this study was the detection and quantification of phenolic compounds in table oils, by employing  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. In particular, phosphitylation of the hydroxyl and carboxyl groups of phenolic compounds with the phosphorous reagent 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl dioxaphospholane allows for the detection of several phenolic compounds on the basis of  $^{31}\text{P}$  chemical shifts in their respective  $^{31}\text{P}$  NMR spectra. Moreover, by using the phosphitylated cyclohexanol as an internal standard and upon integration of the appropriate signals in the  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra, quantification of the phosphitylated phenolic compounds was achieved. Finally, the effect of processing methods on the concentration of phenolic compounds was discussed.

**Keywords:**  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy, olive fruit, diglycerides, phenolic compounds

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετάται η μεταβολή της διγλυκεριδικής σύστασης του ελαιοκάρπου κατά την ωρίμανση και η ποιοτική και ποσοτική σύσταση επιτραπέζιου ελαιοκάρπου του εμπορίου σε πολυφαινόλες. Αναλύθηκαν δείγματα από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι (4) και Σκαλάνι (4), κατά την περίοδο Σεπτέμβριος-Δεκέμβριος 2003, καθώς και δείγματα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου Ελληνικής (4), Μαροκινής (1) και Ισπανικής (2) προέλευσης διαφορετικών ποικιλιών.

Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι τα 1,3-διγλυκερίδια είναι δευτερογενή προϊόντα, τα οποία σχηματίζονται με ισομερισμό των 1,2-διγλυκεριδίων κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου. Στόχος της μελέτης είναι να δείξει ότι τα 1,3-διγλυκερίδια σχηματίζονται στον καρπό κατά την ωρίμανση αν και σε πολύ μικρότερη ποσότητα από τα 1,2-διγλυκερίδια. Επίσης, στην παρούσα εργασία προσδιορίζεται η σύσταση σε πολυφαινόλες του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου και η μεταβολή της σε σχέση με τον τύπο επεξεργασίας του φρέσκου καρπού.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των 1,2-διγλυκεριδίων, 1,3-διγλυκεριδίων και πολυφαινολών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR με μια νέα μεθοδολογία η οποία στηρίζεται στην φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$ -NMR και στη φωσφιτυλίωση υδροξυλίων και καρβοξυλίων, με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμέθυλο-διοξαφωσφολάνιο και την ολοκλήρωση των κορυφών των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων στο αντίστοιχο φάσμα  $^{31}\text{P}$ - NMR.

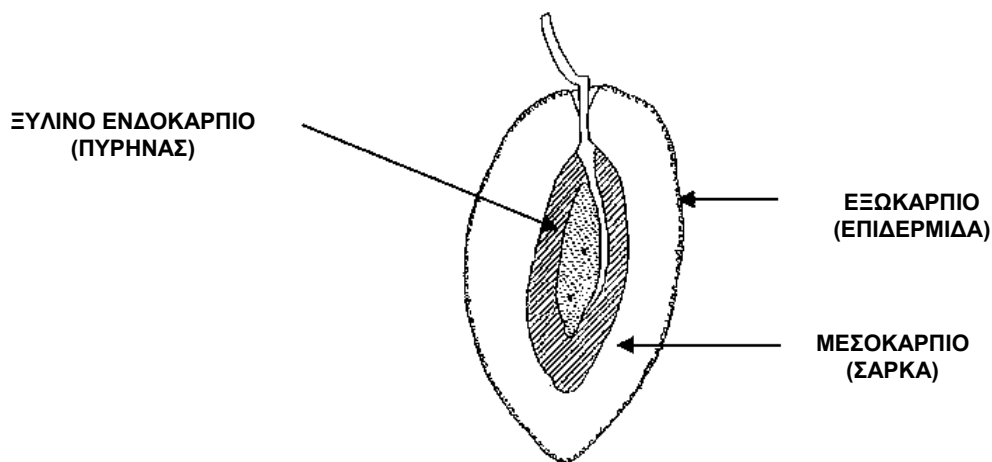
**Λέξεις κλειδιά :** Φασματοσκοπία NMR, Ελαιόκαρπος, Διγλυκερίδια, Πολυφαινόλες.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

### 1.1 Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ

Ο ελαιόκαρπος μπορεί να διαχωριστεί δομικά σε τρία διαφορετικά ανατομικά μέρη<sup>1</sup>: το εξωκάρπιο (επιδερμίδα), το μεσοκάρπιο (σάρκα) και το ξύλινο ενδοκάρπιο (πυρήνας). Και τα τρία αυτά μέρη επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 1.1 Μορφολογία του ελαιόκαρπου.

#### *ΕΞΩΚΑΡΠΙΟ (ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ)*

Η επιδερμίδα αποτελεί ένα προστατευτικό ιστό που αγγίζει το 1-3% του συνολικού βάρους του καρπού, το οποίο καλύπτεται από μία κέρινη επίστρωση που αντιπροσωπεύει το 45-70% αυτής. Σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, η επιδερμίδα έχει χρώμα έντονο πράσινο, λόγω της ύπαρξης χλωροφύλλης, αλλά σε επόμενα στάδια της ανάπτυξης το χρώμα αλλάζει σε ωχρό πράσινο, ρόδινο, πορφυρό και τελικά μαύρο. Αυτές οι αξιοσημείωτες διαφοροποιήσεις στο χρώμα είναι αποτέλεσμα της μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, καροτενοειδών και ανθοκυαννών, που αποτελούν τις πιο βασικές χρωστικές του ελαιόκαρπου.

### *ΜΕΣΟΚΑΡΠΙΟ (ΣΑΡΚΑ)*

Η σάρκα, αποτελεί το πιο μεγάλο αλλά και πιο σημαντικό τμήμα του ελαιοκάρπου. Μαζί με την επιδερμίδα, απαρτίζουν το εδώδιμο τμήμα του καρπού και αποτελούν το 70-80% του συνολικού βάρους του καρπού. Τα κύρια συστατικά του είναι το νερό (70-75% του βάρους της σάρκας) και το λάδι (κυμαίνεται από 14-15% στον πράσινο ελαιόκαρπο και 30% στον μαύρο ελαιόκαρπο). Επίσης, έχουν προσδιοριστεί τα ελεύθερα οργανικά οξέα οξαλικό, σουκινικό, μαλικό και κιτρικό (1,2-2,1% της ξηρής σάρκας), όπως επίσης και τα σάκχαρα, γλυκόζη, φρουκτόζη που επικρατούν έναντι της σακχαρόζης και μαννιτόλης που βρίσκονται σε πιο μικρά ποσοστά (3,5-6% της σάρκας)<sup>2</sup>. Η παρουσία των πρωτεϊνών είναι σημαντική στον καρπό αφού αγγίζουν το 1,5-2,2% του βάρους του. Πολυσακχαρίτες και πεπτιδία, οι κύριες συνιστώσες της μεσοκυταρρικής μεμβράνης, καθορίζουν την δομή της σάρκας. Τέλος, αξιοσημείωτο είναι και το ποσοστό σε ελεύθερες πολυφαινόλες και τους γλυκοζίτες τους που αγγίζουν το 1-3% του βάρους της σάρκας.

### *ΕΝΔΟΚΑΡΠΙΟ (ΠΥΡΗΝΑΣ)*

Ο πυρήνας είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της ποικιλίας του ελαιοκάρπου. Αποτελεί το 18-22% του συνολικού βάρους του καρπού και εσωκλείει τον «αμύγδαλο» που λαμβάνει το 2-4% του βάρους του πυρήνα. Ο καρπός αυτός απαρτίζεται από μεγάλο ποσοστό ελαίου (22-27%) σε αντίθεση με το ξύλινο κέλυφος που περιέχει μόνο 1%.

Το μέγεθος, το βάρος και η διαμόρφωση του πυρήνα, είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

## **1.2 ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ**

Η χημική σύσταση μίας ποικιλίας ελαιοκάρπου, καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες του φυτού, το κλίμα και από το στάδιο ωρίμανσης του καρπού<sup>3,4,5</sup>. Οι παρατηρούμενες μεταβολές στη σύσταση, που σχετίζονται με την ποικιλία, αλλά και με την ωρίμανση του καρπού, αντανakλούν την πολύπλοκη βιοχημεία του ελαιοκάρπου.



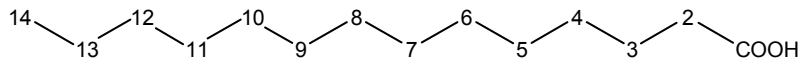
Τα συστατικά του ελαιοκάρπου μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες. Τα πολικά και τα μη πολικά. Τα μη πολικά συστατικά του ελαιοκάρπου είναι τα λιπίδια. Αποτελούνται από τους υδρογονάνθρακες (n-αλκάνια και σκουαλένια), τριγλυκερίδια, λιπαρά οξέα, αλκοόλες, τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπένια, όπως επίσης και κορεσμένους και ακόρεστους εστέρες, μεθυλο-φαινυλο-εστέρες και αλδεΐδες<sup>6</sup>. Τα πολικά συστατικά του ελαιοκάρπου είναι οι υδατοδιαλυτές ουσίες όπως τα σάκχαρα, οι ελεύθερες πολυφαινόλες και οι γλυκοζίτες τους (όταν μια πολυφαινόλη συνδέεται με ένα γλυκοζιτικό δεσμό με ένα σάκχαρο). Σημαντική είναι και η περιεκτικότητα σε μέταλλα που περιέχει ο καρπός.

### **1.2.1 ΑΛΚΑΝΙΑ**

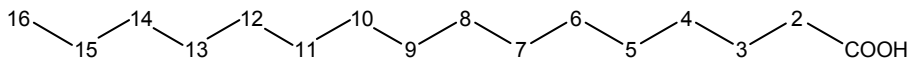
Το πλήθος των αλκανίων που βρίσκονται στον ελαιοκάρπο εντοπίζονται, τόσο στην σάρκα, όσο και στο ξύλινο τμήμα του πυρήνα του. Αποτελούν ένα μείγμα από C<sub>23</sub>- C<sub>33</sub> ομόλογα, όπου οι αλυσίδες C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> κυριαρχούν. Στον μαύρο ελαιοκάρπο υπερισχύει το ομόλογο C<sub>27</sub>, ενώ στον πράσινο ελαιοκάρπο το C<sub>29</sub>.

### **1.2.2 ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΕΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ, ΑΛΔΕΥΔΕΣ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ**

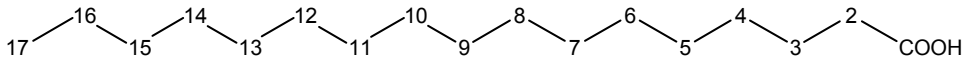
Οι αλκοόλες αντιπροσωπεύουν το 0,1-0,2% των λιπιδίων στον πυρήνα. Στην επιδερμίδα το ποσοστό φτάνει το 10%, ενώ στην σάρκα είναι ουσιαστικά ανύπαρκτες. Ως κύρια ομόλογα εντοπίστηκαν οι αλκοόλες με ανθρακική αλυσίδα C<sub>22</sub> - C<sub>28</sub>. Οι αλδεΐδες εμφανίζονται μόνο στην επιδερμίδα και αυτές με ανθρακική αλυσίδα C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>32</sub>. Τέλος τα λιπαρά οξέα, βρίσκονται σε σημαντικό ποσοστό στην επιδερμίδα, αλλά και σε κλάσματα του πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί τα εξής λιπαρά οξέα: μυριστικό (14:0), παλμιτικό (16:0), παλμιτολεϊκό (16:1), μαργαρικό (17:0), στεατικό (18:0), ελαϊκό (18:1), λινολενικό (18:3) λινελαϊκό (18:2) και αραχιδικό (20:0). Τα ακόρεστα οξέα εμφανίζονται με *cis*-διπλούς δεσμούς. Οι χημικοί τύποι των διάφορων λιπαρών οξέων εμφανίζονται στο σχήμα 1.2.



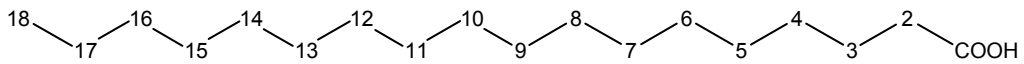
**Μυριστικό οξύ**



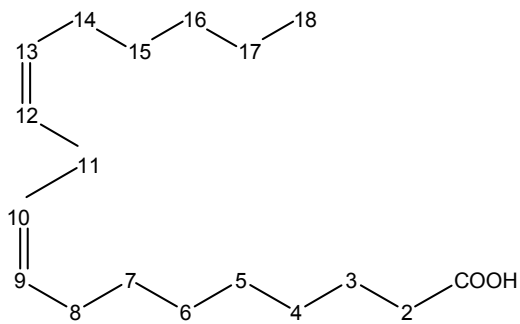
**Παλμιτικό οξύ**



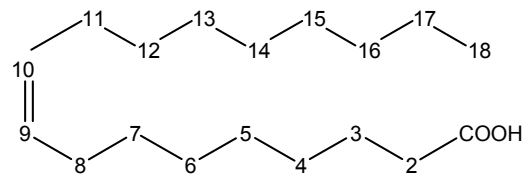
**Μαργαρικό οξύ**



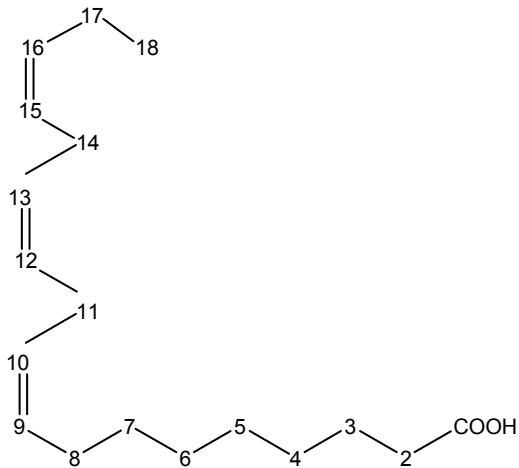
**Στεαρικό οξύ**



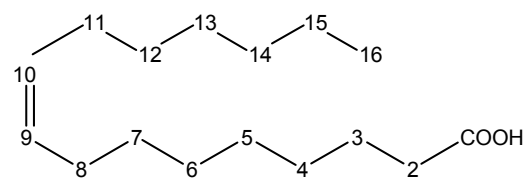
**Λινελαϊκό οξύ**



**Ελαϊκό οξύ**



**Λινολενικό οξύ**



**Παλμιτολεϊκό οξύ**

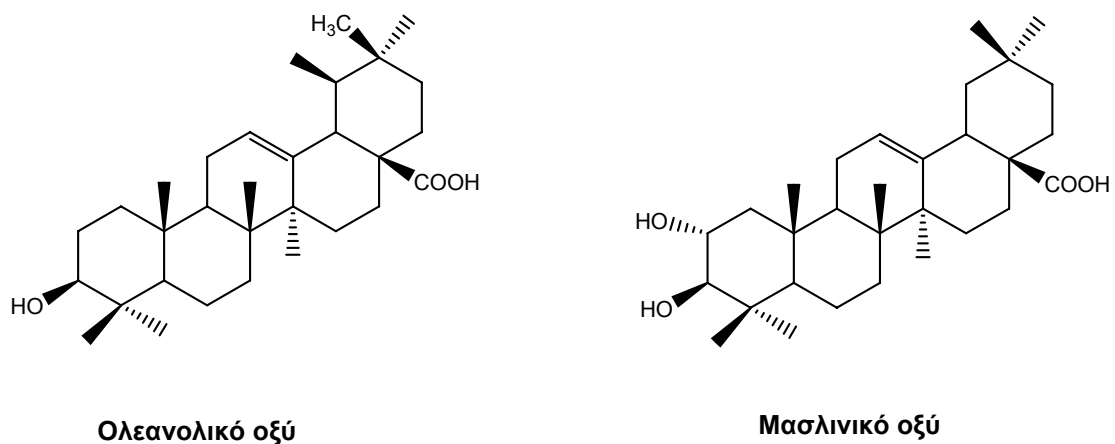
**Σχήμα 1.2** Λιπαρά οξέα που απαντώνται στον ελαιόκαρπο.

### 1.2.3 ΑΛΚΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΟ-ΦΑΙΝΥΛ-ΕΣΤΕΡΕΣ

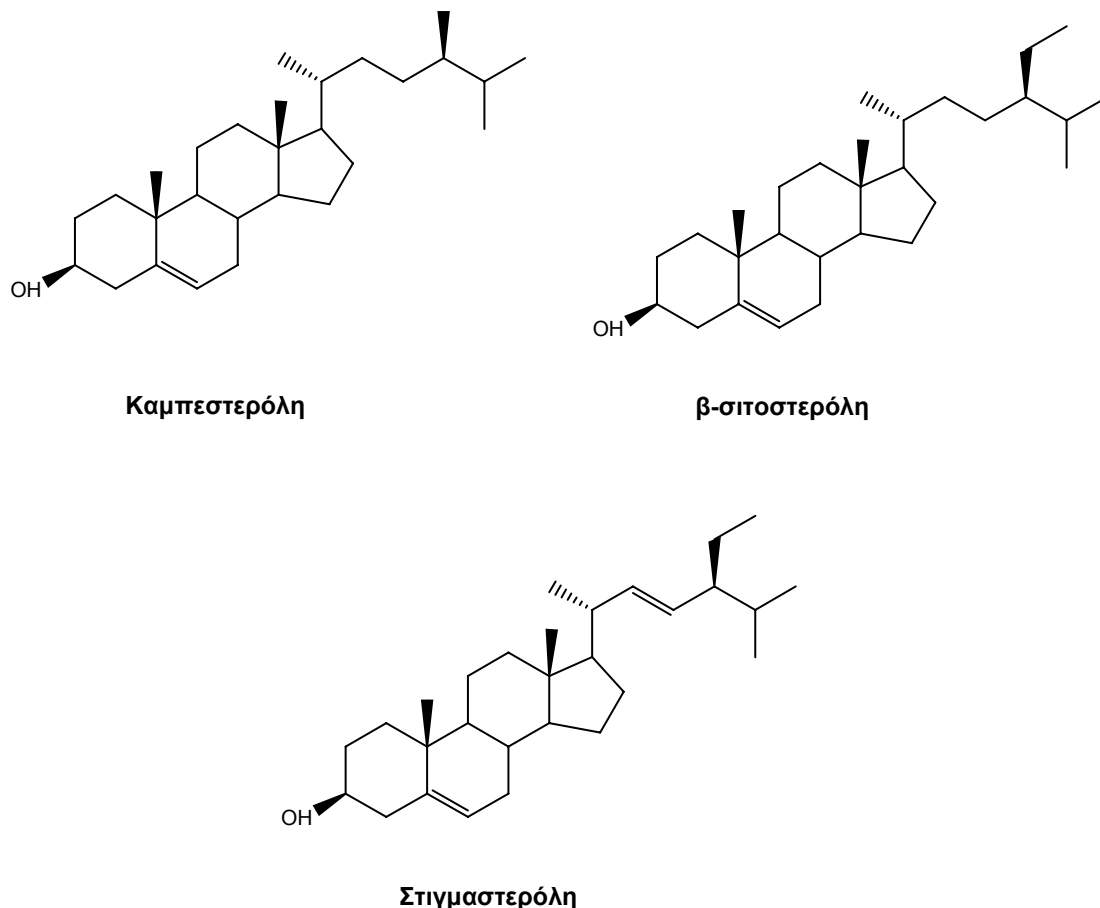
Οι άλκυλεστερες βρίσκονται σε σημαντικό ποσοστό στην επιδερμίδα του ελαιοκάρπου, ενώ σε ίχνη στην σάρκα και τον πυρήνα του. Υπάρχουν δύο ομάδες ομόλογων αλυσίδων. Αυτές περιλαμβάνουν εστέρες με ανθρακική αλυσίδα C<sub>40</sub>- C<sub>44</sub> (πρώτη ομάδα) και C<sub>46</sub>- C<sub>56</sub> (δεύτερη ομάδα). Στην πρώτη ομάδα κυριαρχούν οι ανθρακικές αλυσίδες C<sub>40</sub> και C<sub>42</sub>, ενώ στην δεύτερη ομάδα οι C<sub>52</sub>- C<sub>54</sub>. Οι εστέρες με την πιο μικρή ανθρακική αλυσίδα αποτελούνται από παλμιτικό οξύ (C<sub>16</sub>:0), ελαϊκό οξύ (C<sub>18</sub>:1) και τις αλκοόλες με ανθρακική αλυσίδα C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>. Στις ποικιλίες ελαιοκάρπου που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, έχουν βρεθεί και εστέρες με βενζυλική αλκοόλη και λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα C<sub>26</sub>- C<sub>32</sub>.

### 1.2.4 ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΛΕΣ

Η κυκλοαρτενόλη και η μεθυλενική κυκλοαρτενόλη έχουν βρεθεί στην σάρκα και τον πυρήνα του ελαιοκάρπου. Τα διύδροξυ πεντακυκλικά τριτερπένια ερυθροδιόλη και ουβαόλη βρίσκονται μόνο στην επιδερμίδα. Μεγάλη ποσότητα πεντακυκλικών τριτερπενικών οξέων, όπως το ολεανολικό οξύ και μασλινικό οξύ (σχήμα 1.3) περιέχονται στην επιδερμίδα. Ελεύθερες στερόλες και τερπένια βρέθηκαν σε μικρά αλλά μετρήσιμα ποσοστά στην επιδερμίδα, ενώ στον πυρήνα βρέθηκαν σημαντικά ποσοστά εστεροποιημένων στερολών. Οι κυριότερες στερόλες που προσδιορίστηκαν είναι η β-σιτοστερόλη, η στιγμαστερόλη και η καμπεστερόλη.



**Σχήμα 1.3** Πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα που απαντώνται στον ελαιοκάρπο.



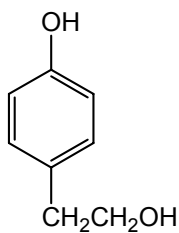
**Σχήμα 1.4** Στερόλες που απαντώνται στον ελαιοκάρπτο.

### 1.2.5 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

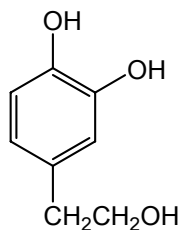
Ο ελαιοκάρπτος είναι πλούσιος σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 1-14% της ξηρής μάζας του<sup>7</sup>. Τα εκχυλίσματα των φαινολικών ενώσεων από διάφορα τμήματα του ελαιοκάρπτου είναι αρκετά πολύπλοκα, και η ποιοτική και ποσοτική τους σύσταση καθορίζεται από την ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης, το κλίμα αλλά και την γεωγραφική προέλευση του ελαιοκάρπτου<sup>8,9,10</sup>.

Οι φαινολικές ενώσεις, γνωστές και ως πολυφαινόλες ή φαινολικά οξέα είναι οι ενώσεις εκείνες που αποτελούνται από ένα (τουλάχιστον) βενζολικό δακτύλιο ο οποίος περιέχει απευθείας ενωμένες μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Από τους διάφορους τύπους ελαιοκάρπτου έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί περισσότερες από 20 πολυφαινόλες. Το κύριο φαινολικό συστατικό του φρέσκου ελαιοκάρπτου είναι η ελευρωπαΐνη, και σε μικρότερα, αλλά σημαντικά ποσοστά απαντώνται η ελεύθερη τυροσόλη και ελεύθερη υδροξυτυροσόλη. Άλλες πολυφαινόλες που έχουν

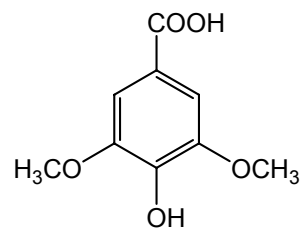
βρεθεί στον ελαιόκαρπο είναι τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (*ο*-κουμαρικό οξύ, *ρ*-κουμαρικό οξύ, φερούλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, σιναπτικό οξύ, 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ), παράγωγα του βενζοϊκού οξέος (*ρ*-υδροξυβενζοϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, συριγγικό οξύ). Επίσης περιέχονται φλαβονοειδείς ενώσεις (καμφερόλη, απιγενίνη, κερκετίνη) αλλά και γλυκοζίτες (βερμπασκοσίδιο και λιγκοστροσίδιο)<sup>11-27</sup>. Το παρακάτω σχήμα 1.5 παρουσιάζει την δομή των πολυφαινολών που περιέχονται στον ελαιόκαρπο.



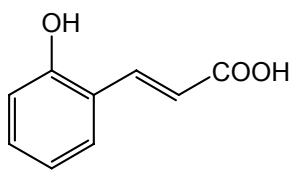
**Τυροσόλη**



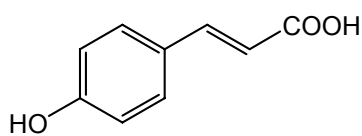
**Υδροxyτυροσόλη**



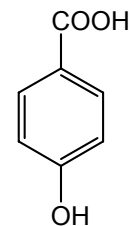
**Συριγγικό οξύ**



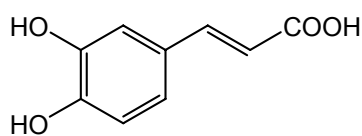
***ο*-κουμαρικό οξύ**



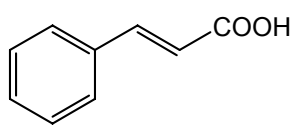
***ρ*-κουμαρικό οξύ**



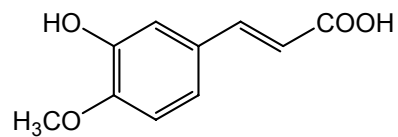
***ρ*-υδροxyβενζοϊκό οξύ**



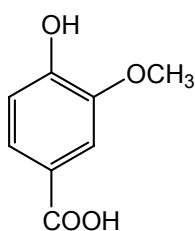
**Καφεϊκό οξύ**



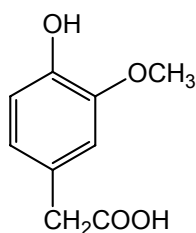
**Κινναμικό οξύ**



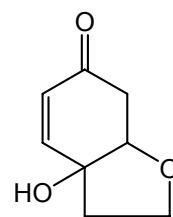
**3-υδροxy-4-μεθοxyκινναμικό οξύ**



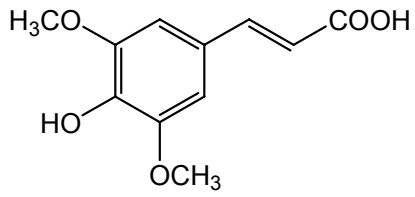
**Βανιλλικό οξύ**



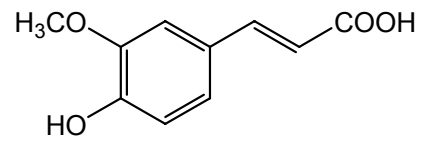
**Ομοβανιλλικό οξύ**



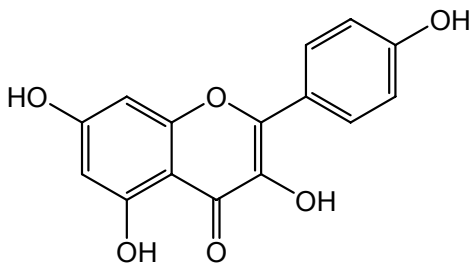
**Χαλεριδόνη**



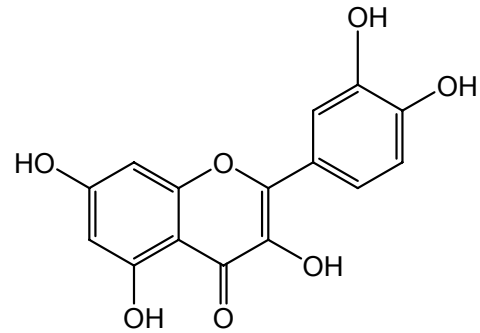
**Σιναπικό οξύ**



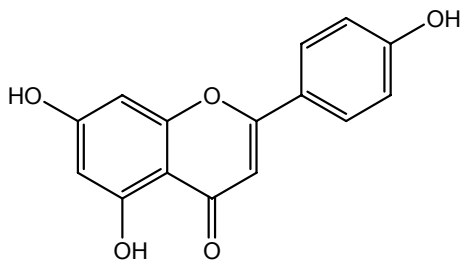
**Φερουλικό οξύ**



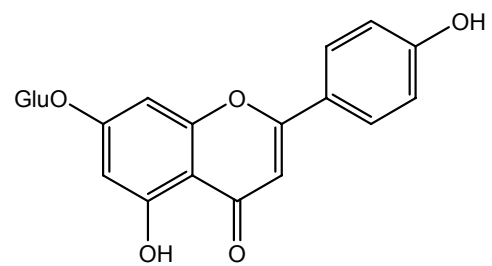
**Καμφερόλη**



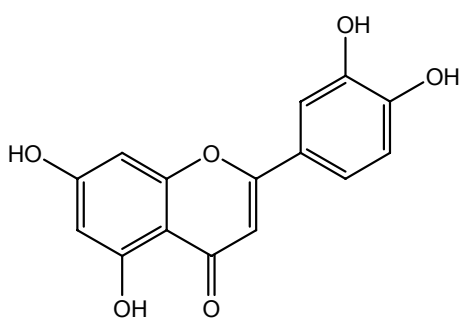
**Κερκετίνη**



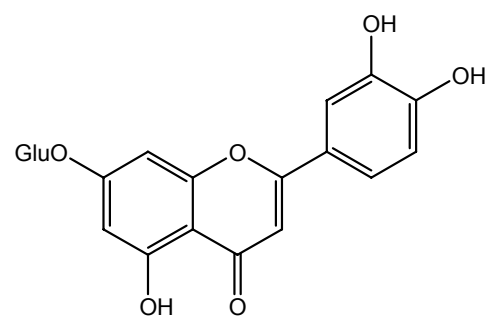
**Απιγενίνη**



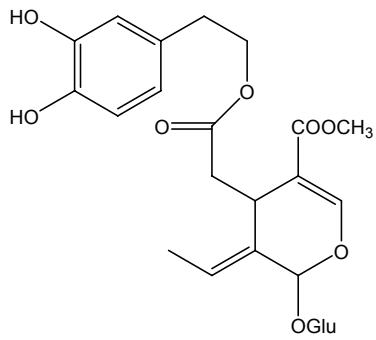
**Απιγενίνη-7-O-γλυκοζίδιο**



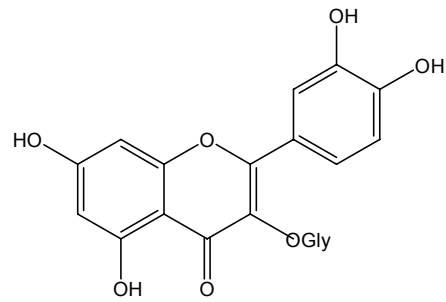
**Λουτεολίνη**



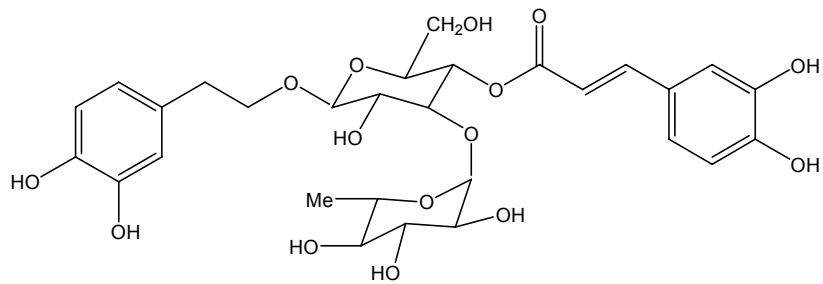
**Λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίδιο**



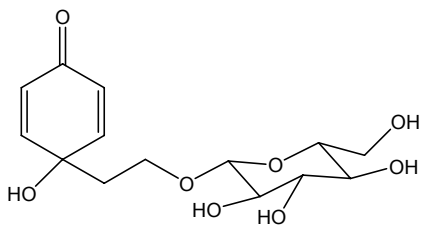
**Ελευρωπαΐνη**



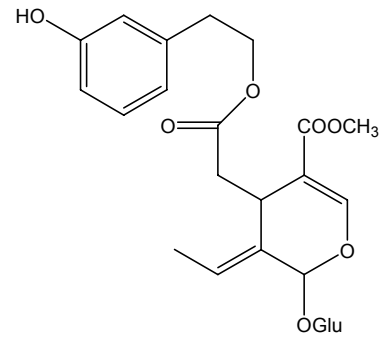
**Ρουτίνη**



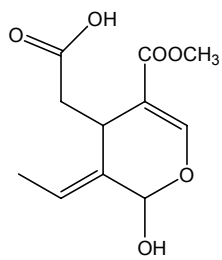
**Βερμπασκοσίδιο**



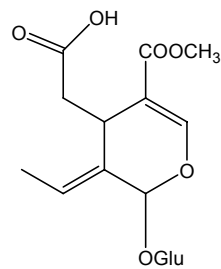
**Κορνοσίδιο**



**Λιγκστροσίδιο**



**Ελενολικό οξύ**



**Γλυκοζίτης του ελενολικού οξέος**

**Σχήμα 1.5** Φαινολικές ενώσεις που έχουν ανιχνευτεί στον ελαιόκαρπο.

Οι πολυφαινόλες, δρουν προστατευτικά για τον ελαιόκαρπο στην αντιμετώπιση της εισβολής βακτηρίων, μυκήτων και ιών, αλλά λειτουργούν και ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις που χρωματίζουν αυτόν (ελαιόκαρπο) καφέ. Ο ρυθμός και το στάδιο αυτό καθορίζονται από την ωρίμανση του καρπού<sup>28</sup>. Η συγκέντρωση των φαινολών εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης του ελαιόκαρπου. Σε αρχικό στάδιο, η ελευρωπαΐνη, είναι άφθονη, και πλησιάζει το 14% της ξηρής μάζας της σάρκας. Στις πράσινες ποικιλίες η περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη είναι χαμηλότερη. Ωστόσο το ποσοστό αυτό μπορεί να γίνει ελάχιστο (έως και σε ίχνη ή απουσία) σε εντελώς μαύρο καρπό<sup>29, 30</sup>.

Ορισμένες ποικιλίες ελαιόκαρπου έχουν συγκριθεί για το ποσοστό τους σε πολυφαινόλες<sup>31</sup> (πίνακας 1.1). Ο μαύρος ελαιόκαρπος από ελληνική και ιταλική ποικιλία έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη από την ισπανική και πορτογαλική ποικιλία, αλλά κατώτερα επίπεδα συγκέντρωσης σε ελεύθερη υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας (mg/100g ελαιόκαρπου) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1.1** Κύριες πολυφαινολικές ενώσεις σε ποικιλίες ελαιόκαρπου διαφόρων χωρών (mg/100g ελαιόκαρπου)<sup>31</sup>.

ΕΝΩΣΗ Ποικιλία Χώρα	Hojiblanca Ισπανία	Douro Πορτογαλία	Κονσερβοελιά Ελλάδα	Θάσος Ελλάδα	Caroela Ιταλία
Ελευρωπαΐνη	115	155	197	182	214
Τυροσόλη (ελεύθερη)	5	13	14	11	11
Υδροξυτυροσόλη (ελεύθερη)	35	43	28	29	20

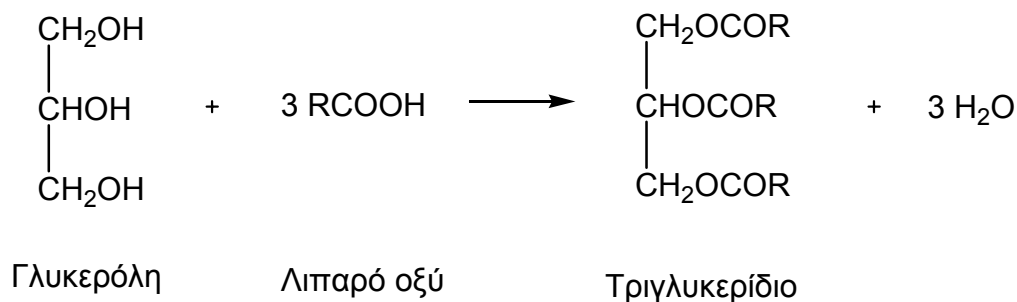
### 1.2.6 ΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ

Το μεγαλύτερο ποσοστό σε γλυκερίδια (διγλυκερίδια και τριδλυκερίδια) βρίσκεται στην σάρκα αλλά και τον πυρήνα του ελαιόκαρπου. Η περιεκτικότητα της σάρκας σε γλυκερίδια αυξάνεται ασυμπτωτικά κατά την



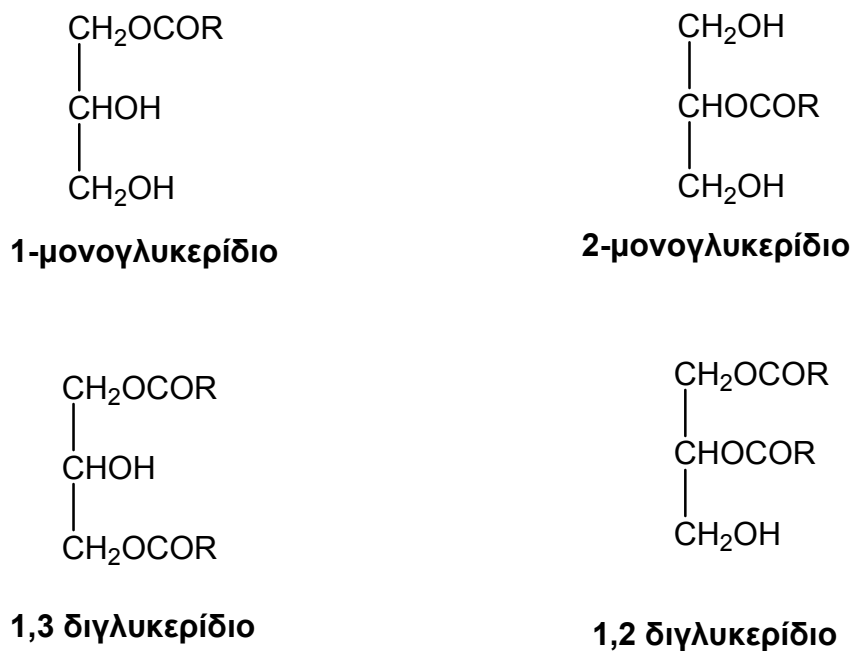
ωρίμανση. Αυτό σημαίνει ότι η σύνθεση τριγλυκεριδίων προχωρεί μέχρι ενός συγκεκριμένου σταδίου ωρίμανσης<sup>32</sup>. Η γλυκεριδική σύσταση του πυρήνα είναι διαφορετική από αυτή της σάρκας και πιο πλούσια σε ακόρεστα τριγλυκερίδια<sup>33</sup>.

Τα γλυκερίδια, είναι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα, συνήθως μακράς αλυσίδας (κορεσμένων ή ακόρεστων).



**Σχήμα 1.6** Σχηματισμός τριγλυκεριδίου από την γλυκερόλη, R=αλειφατική αλυσίδα.

Διακρίνονται σε μονοακυλογλυκερόλες ή μονογλυκερίδια, διακυλογλυκερόλες ή διγλυκερίδια και τριακυλογλυκερόλες ή τριγλυκερίδια.



**Σχήμα 1.7** Χημικοί τύποι μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων. R=αλειφατική αλυσίδα.

Τα διγλυκερίδια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα 1,2-διγλυκερίδια (1,2-DGs) και τα 1,3-διγλυκερίδια (1,3-DGs). Τα 1,2-DGs προέρχονται από την ατελή βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων και δευτερογενώς από την όξινη ή ενζυματική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Τα 1,3-διγλυκερίδια δεν έχουν μέχρι σήμερα προσδιοριστεί στον καρπό, σε αντίθεση με το ελαιόλαδο. Στο ελαιόλαδο βρίσκονται σε σημαντικά ποσοστά και αποτελούν δευτερογενή προϊόντα, τα οποία σχηματίζονται από των ισομερισμό των 1,2-διγλυκεριδίων κατά την αποθήκευσή του<sup>34</sup>.

### **1.2.7 ΣΑΚΧΑΡΑ**

Τα σάκχαρα, είναι ίσως η πιο μεγάλη κατηγορία διαλυτών ενώσεων που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο και παίζουν σημαντικό ρόλο στην χημεία του επειδή συντελούν ενεργειακά στις μεταβολικές αλλαγές. Είναι σημαντικά συστατικά του κυττάρου, σχετίζονται με τις δομικές ιδιότητες του καρπού<sup>35</sup> και δρουν σαν πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση του ελαιολάδου<sup>36</sup>. Τα ελεύθερα σάκχαρα που επικρατούν στον καρπό είναι η γλυκόζη, φρουκτόζη και γαλακτόζη ενώ η σακχαρόζη εμφανίζεται σε μικρότερα ποσοστά. Τέλος, έχει βρεθεί και ημανιτόλη, η οποία και παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και στην σύνθεση των συστατικών του καρπού καθώς και η ινισιπόλη<sup>37, 38</sup>.

### **1.2.8 ΜΕΤΑΛΛΑ**

Τα μέταλλα είναι ένα σημαντικό συστατικό το καρπού που τον καθιστά ακόμα πιο απαραίτητο για την διατροφή. Τα κυριότερα μέταλλα που έχουν προσδιοριστεί είναι τα εξής: νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, χαλκός, ψευδάργυρος και σίδηρος. Σε μεγαλύτερο ποσοστό συναντάται το κάλιο και το μαγνήσιο, ενώ σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά εμφανίζεται ο χαλκός και ο ψευδάργυρος<sup>39</sup>.

### **1.2.9 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Η πρωτεϊνική σύσταση του ελαιοκάρπου κυμαίνεται από 1% έως 3%. Στην περίπτωση της ποικιλία Κορωνέικη, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες βρέθηκε 1,2 mmol/g καρπού και περιέχει τα εξής αμινοξέα: αργινίνη, ιστιδίνη, λυσίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αλανίνη, σερίνη, γλυκίνη,

ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ<sup>40</sup>. Η αργινίνη, αλανίνη, γλυκίνη, ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, αποτελούν το 60% των ελεύθερων αμινοξέων<sup>41</sup>.

Το ποσοστό σε πρωτεΐνες εξαρτάται, τόσο από την ποικιλία, όσο και από το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκάρπου. Σε ελληνικές ποικιλίες η περιεκτικότητα βρέθηκε να είναι 68,42-155,76 mmol/g καρπού<sup>42</sup>.

### **1.2.10 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ**

Μέχρι πριν από λίγα χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι οι ελιές δεν περιείχαν βιταμίνες. Έρευνες που πραγματοποίησαν Ισπανοί ερευνητές<sup>43,44</sup> έδειξαν ότι οι πράσινες ελιές περιέχουν καροτένια, βιταμίνη C και θειαμίνη. Γενικότερα, ο ελαιοκάρπος δεν θεωρείται ως πηγή βιταμινών, καθώς οι παραπάνω βιταμίνες που βρέθηκαν βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες.

## **1.3 ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ**

Η ωρίμανση του ελαιοκάρπου είναι μια σημαντική διαδικασία κατά την οποία τα συστατικά του μεταβάλλονται με συγκεκριμένο τρόπο και έτσι λαμβάνεται το τελικό προϊόν, το οποίο και επεξεργάζεται, είτε για την παραλαβή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου, είτε για την παραλαβή ελαιολάδου.

### **1.3.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ**

Η αλλαγή τις λιπαρής σύστασης του καρπού έχει μελετηθεί από το στάδιο σχηματισμού του (περίοδος Ιουνίου), έως και λίγο πριν την συγκομιδή<sup>45</sup>. Παρατηρήθηκε μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της λιπαρής σύστασης και της υγρασίας για το ίδιο στάδιο ωρίμανσης. Πιο συγκεκριμένα, με την ωρίμανση του ελαιοκάρπου τα λιπαρά συστατικά του αυξάνονται από 0,7-19,5% του βάρους του, σε αντίθεση με την υγρασία που δείχνει να μειώνεται από 72,65% σε 69,69%. Ο ρυθμός μείωσης της υγρασίας είναι μικρότερος σε σχέση με το ρυθμό αύξησης των λιπαρών συστατικών και οφείλεται στην αύξηση του βάρους του καρπού κατά την ωρίμανση.

Η λιπιδική σύσταση του καρπού, επίσης, αλλάζει. Τα περισσότερα λιπίδια στον καρπό είναι τα τριγλυκερίδια, αλλά υπάρχουν και διγλυκερίδια και λιπαρά οξέα. Στην αρχή της ωρίμανσης τα λιπαρά οξέα, παλμιτικό, λινολεϊκό

και λινελαϊκό βρίσκονται σε αφθονία (Παλμιτικό: 45,02%, λινολεϊκό; 14,95%, λινελαϊκό: 21,45%). Με την πάροδο του χρόνου η αναλογία τους μικραίνει (Παλμιτικό: 15,90%, λινολεϊκό; 0,71%, λινελαϊκό: 0,80%) σε αντίθεση με το ελαϊκό οξύ το οποίο αυξάνεται σημαντικά (από 0,82% σε 2,52%)<sup>46</sup>. Το ποσοστό των τριγλυκεριδίων σε ολικά λιπαρά αυξάνεται έως και 95% ενώ το ποσοστό των διγλυκεριδίων μεταβάλλεται από 10% σε 0,5% στο τέλος της ωρίμανσης. Το σύνολο των διγλυκεριδίων και τριγλυκεριδίων αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.

Τα τριγλυκερίδια περιλαμβάνουν μόνο ελαϊκό και παλμιτικό οξύ στην δομή τους σε ποσοστό πάνω από 50% το οποίο και μειώνεται σε αντίθεση με το τριγλυκερίδιο που περιλαμβάνει το κατάλοιπο του λινολεϊκού οξέος. Τα υπόλοιπα τριγλυκερίδια βρίσκονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά, όπως επίσης και τα κορεσμένα.

### **1.3.2 ΣΑΚΧΑΡΑ**

Τα σάκχαρα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό παράγοντα κατά την ωρίμανση του καρπού και την ζύμωση. Τα αναγωγικά σάκχαρα της σάρκας είναι πιο σημαντικά και βρίσκονται σε ποσοστό 90-95% του βάρους της. Με την πάροδο του χρόνου μειώνονται όπως ακριβώς και τα συνολικά σάκχαρα του καρπού. Τα κυριότερα σάκχαρα στον καρπό της ελιάς είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη και σε μικρότερα ποσοστά η ξυλόζη και η ραμνόζη<sup>47</sup>.

Τα αναγωγικά, αλλά και τα μη αναγωγικά σάκχαρα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση του ελαιολάδου. Το ποσοστό της μανιτόλης είναι πολύ χαμηλό σε σχέση με τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα, γεγονός που υποδεικνύει την πιθανή σχέση της με το μεταβολικό σύστημα.

Η αλλαγή αυτή είναι πολύ σημαντική για τον καρπό, διότι με την καθυστέρηση στην συγκομιδή άρα και την χαμηλή συγκέντρωση σε σάκχαρα, οδηγεί σε ελλιπή ζύμωση στην περίπτωση του πράσινου ελαιοκάρπου που επεξεργάζεται με την διαδικασία Spanish-style, κατά την οποία η συντήρηση εξαρτάται από την ζύμωση του γαλακτικού οξέος.

### 1.3.3 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η μεταβολή της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες παρουσιάζει εξαιρετική σημασία λόγω των αντιοξειδωτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων τους, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω. Σε ισπανικές ποικιλίες παρατηρήθηκε μείωση από 7% σε μη ώριμο καρπό έως 0.5% σε ώριμο καρπό. Αντίθετα στην ποικιλία Gorbai , μια ιδιαίτερη ισπανική ποικιλία λόγω της πολύ χαμηλής περιεκτικότητας σε φαινόλες (μικρότερο από 3%), δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία μεταβολή με το πέρας της ωρίμανσης.

Η ελευρωπαΐνη, αποτελεί μια από τις κύριες πολυφαινόλες του ελαιοκάρπου, και σε γαλλικές ποικιλίες (Picholine, Lucques) παρατηρήθηκε να φθάνει το 14% του βάρους του καρπού σε μη ώριμο καρπό, ενώ μειώνεται σημαντικά κατά την ωρίμανση. Η μείωση αυτή, ακολουθείται από ταυτόχρονη αύξηση των συνολικών πολυφαινολών αλλά και της διμεθυλοελευρωπαΐνης και του γλυκοζιδίου του ελενολικού οξέος.

Το ποσοστό σε ελεύθερη τυροσόλη και ελεύθερη υδροξυτυροσόλη αυξάνεται κατά την πάροδο του χρόνου, σε αντίθεση με αυτό του βερμπασκοσιδίου που εμφανίζεται να μειώνεται χαρακτηριστικά και ιδιαίτερα στην ποικιλία Manzanillo. Τέλος σημαντική είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του λιγκστροσιδίου μέχρι και 40% μόνο σε 7 ημέρες<sup>48</sup> στην ισπανική ποικιλία Cucco, ενώ παραμένει σταθερή στην ποικιλία Manzanillo .

### 1.3.4 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Οι φλαβονοειδής ενώσεις είναι επίσης παρούσες στον ελαιοκάρπο με πιο σημαντικές τις: λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο, κερκετίνη-4-ρουτινοζίδιο, απιγενίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο και κερκετίνη-4-ραμνοζίδιο. Οι ενώσεις αυτές ανιχνεύονται ήδη στο αρχικό στάδιο της ωρίμανσης του καρπού και αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου.

### 1.3.5 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες δεν μεταβάλλεται με την ωρίμανση του ελαιοκάρπου.

### **1.3.6 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ**

Τα οργανικά οξέα και τα άλατά τους απαντώνται σε ποσοστό 0,5-1% στον καρπό. Τα συνολικά οξέα αυξάνονται κατά την ωρίμανση του καρπού σε ποσοστό 0,18% τον μήνα Ιούνιο, έως 0,27% τον μήνα Σεπτέμβριο. Πιο συγκεκριμένα η μεταβολή της περιεκτικότητας των οξέων κατά τους μήνες Αύγουστο έως Δεκέμβριο είναι η εξής: οξαλικό 0,19-1,33%, μηλεϊνικό 3,34-16,95%, ταρταρικό 0,26-0,96% και κιτρικό 1,16-7,65%<sup>49</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

#### 2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Οι επιτραπέζιες ελιές ορίζονται ως: «το υγιές φρούτο ορισμένων ποικιλιών του καλλιεργούμενου ελαιόδεντρου το οποίο συγκομιδείται σε κατάλληλο στάδιο ωριμότητας». Η ποιότητα του είναι τέτοια που όταν υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα, δίνει ένα εδώδιμο προϊόν και διασφαλίζει την διατήρησή του σε καλά επίπεδα. Μια τέτοια επεξεργασία μπορεί να περιλαμβάνει την προσθήκη διαφόρων προϊόντων ή μπαχαρικών καλής επιτραπέζιας ποιότητας<sup>50</sup>.

#### 2.2 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Η χημική σύσταση και οι φυσικές ιδιότητες του ελαιοκάρπου, είναι σημαντικοί παράγοντες που προσδιορίζουν την ποιότητα και το τελικό προϊόν, γεγονός το οποίο επηρεάζει την ποικιλία και τον χρόνο συγκομιδής<sup>51</sup>.

Η επιλογή της πιο κατάλληλης ποικιλίας για συγκεκριμένο τύπο ελαιοκάρπου με ιδιαίτερο τρόπο επεξεργασίας ή εμπορικής προετοιμασίας, είναι πολύ σημαντική. Οι φυσικές ιδιότητες του φρούτου από διαφορετική ποικιλία, όπως το μέγεθος, το σχήμα, ο λόγος βάρους σάρκα προς πυρήνα, χρώμα και σύσταση είναι μεγάλης σημασίας, αλλά πρέπει να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες. Αυτοί συμπεριλαμβάνουν:

- Γεωγραφική τοποθεσία της καλλιέργειας, ηλικία της καλλιέργειας και κατανομή αυτής στην περιοχή
- Γεωργικά χαρακτηριστικά, όπως παραγωγικότητα του ελαιόδεντρου, κύκλος ωρίμανσης και αντοχή σε ασθένειες
- Τύπος καλλιέργειας (αρδεύσιμο ή μη αρδεύσιμο σύστημα)
- Μέθοδοι κλαδέματος
- Διαδικασία συγκομιδής (χειρωνακτική ή μηχανική)

Όλες οι παραπάνω μεταβλητές έχουν σημαντική επιρροή στην σύσταση του φρούτου και των χαρακτηριστικών αυτού.

Αν και η ποικιλία του ελαιοκάρπου είναι πολύ σημαντική, η διαφορά στην ποικιλία του ελαιόδεντρου καθορίζει και την ονομασία του φρούτου. Μερικές από τις πιο σημαντικές ποικιλίες ελαιοκάρπου, ανά χώρα αναφέρονται παρακάτω. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρακάτω αναλύονται οι ποικιλίες των χωρών που εξετάστηκαν, ενώ γίνεται μια απλή αναφορά σε ποικιλίες που δεν εξετάστηκαν.

### **2.2.1 ΕΛΛΑΔΑ**

Οι τέσσερις κύριες ποικιλίες ελαιοκάρπου που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση είναι Κονσερβοελιά, Νυχάτη Καλαμών, ποικιλία Χαλκιδικής και Αδραμυτινή (Λέσβος)<sup>52,53</sup>. Σε πιο μικρή κλίμακα, για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιούνται και οι ποικιλίες Μεγαρίτικη, Κορωνέϊκη, Καρυδοελιά και Θρουμποελιά.

#### Κονσερβοελιά

Αυτή η ποικιλία είναι η πιο σημαντική οικονομικά, αφού αποτελεί το 80-85% της παραγωγής στην Ελλάδα. Καλλιεργείται σε όλη την χώρα, σε παραθαλάσσιες περιοχές και περιοχές με υψόμετρο έως 600 μέτρα. Το μέσο μέγεθος κυμαίνεται από 180 έως 200 κομμάτια/κιλό με αναλογία βάρους σάρκας προς πυρήνα 8:1 και ποσοστό σε λιπαρές ουσίες 22-25% του συνολικού βάρους του φρούτου. Το φρούτο ωριμάζει αργά. Ένα τμήμα της παραγωγής συλλέγεται από 15 Σεπτεμβρίου έως 15 Νοεμβρίου, όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινου επιτραπέζιου ελαιοκάρπου επεξεργασμένου με τον ισπανικό τρόπο (Spanish-style). Το υπόλοιπο τμήμα της παραγωγής παραμένει στο ελαιόδεντρο έως ότου το χρώμα σταδιακά μετατραπεί σε ροζ, βιολετί και τελικά σε μαύρο. Αυτό είναι το ιδανικότερο χρώμα για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου σε άλμη. Συλλέγεται από Νοέμβριο έως και Φεβρουάριο.

#### Νυχάτη Καλαμών

Η ποικιλία αυτή είναι η δεύτερη πιο σημαντική ποικιλία στην Ελλάδα, ευδοκίμει λιγότερο, αλλά αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες ποικιλίες στην Ευρώπη. Καλλιεργείται στην πόλη Καλαμάτα που βρίσκεται νότια της Πελοποννήσου. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι 180 έως 360 κομμάτια



/κιλό με αναλογία σάρκας προς πυρήνα όμοια με αυτή της ποικιλία Κονσερβοελιά, ενώ το ποσοστό σε λιπαρές ουσίες είναι σχετικά υψηλό, 25%, σε αντίθεση με το χαμηλό ποσοστό σε ζάχαρα, 3-5%. Η συγκομιδή πραγματοποιείται στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης, δηλαδή περίπου τον Δεκέμβριο και χρησιμοποιείται ειδικά για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου σε άλμη.

### Ποικιλία Χαλκιδικής

Η τρίτη πιο σημαντική ποικιλία στην Ελλάδα, που κατέχει το 3% της συνολικής παραγωγής. Καλλιεργείται στην περιοχή της Χαλκιδικής κοντά στην Θεσσαλονίκη. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι 120-140 κομμάτια / κιλό, πιο επιμυκημένο με ποσοστό σε λιπαρές ουσίες 19%. Το τμήμα της παραγωγής με το πιο καλαίσθητο μέγεθος χρησιμοποιείται για την παραγωγή πράσινου ελαιοκάρπου (Spanish-style), ενώ το υπόλοιπο τμήμα χρησιμοποιείται για την εξαγωγή ελαιολάδου. Σε αντίθεση με τις ποικιλίες που προαναφέρθηκαν, δεν χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου γιατί το χρώμα δεν είναι τόσο ικανοποιητικό.

### Αδραμυτινή

Η ίδια ποικιλία είναι γνωστή στους τόπους καλλιέργειά της και με τα ονόματα Αδραμυτιανή, Αϊβαλιώτικη και Φραγκολιά.

Είναι ποικιλία ελιάς προερχόμενη από το Αδραμύτιο της Μικράς Ασίας. Καλλιεργείται κατά κύριο λόγο στο νησί της Λέσβου, όπου μετέχει κατά 1/5 στη συγκρότηση των ελαιώνων της, εντοπιζόμενη κυρίως στην επαρχία της Μυτιλήνης. Επιπλέον καλλιεργείται στο νησί της Άνδρου σε ποσοστό 5 -20% επί του συνολικού αριθμού των ελαιόδεντρων της. Θεωρείται μέτριας παραγωγικότητας. Ο ελαιόκαρπος ωριμάζει κατά το Νοέμβρη - Δεκέμβρη, οπότε και πέφτει πάνω στο έδαφος, από όπου γίνεται η συλλογή του. Η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες είναι μέτρια, και φτάνει στο 22 - 25% του βάρους του καρπού.

Η ποικιλία εξυπηρετεί τόσο την ελαιοποίηση όσο και την οικοτεχνία της επιτραπέζιας ελιάς. Οι επιτραπέζιες ελιές της Αδραμυτινής είναι άριστης ποιότητας, συντηρούνται εύκολα μέσα σε άλμη και είναι οι καλύτερες για το νησί της Λέσβου.

### Μεγαρίτικη

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται στην Αττική. Το μέγεθος του φρούτου είναι σχετικά μικρό, 200-500 κομμάτια/ κιλό. Είναι ανθεκτική στην ξηρασία και χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου σε αλάτι.

### Κορωνέικη

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται στην Φωκίδα, την Κρήτη και την Πελοπόννησο. Το φρούτο μοιάζει με αυτό της ποικιλίας Κονσερβοελιά αλλά το μέγεθος του είναι αρκετά πιο μικρό, χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου σε άλμη.

### Καρυδοελιά

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται στην Εύβοια και είναι παρόμοια με την ποικιλία Κονσερβοελιά.

### Θρουμποελιά

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται στην Κρήτη. Στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης, το φρούτο έχει χρώμα καφέ-πράσινο και αποκτά γλυκιά γεύση. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός ειδικού τύπου μαύρου ελαιοκάρπου που ονομάζεται «μαύρος ελαιόκαρπος τύπου Θρούμπα». Ένας κλώνος της ποικιλίας που καλλιεργείται στην Θάσο, με την διαφορά ότι δεν αποκτά γλυκιά γεύση όταν βρίσκεται στο ελαιόδεντρο.

## **2.2.2 ΙΣΠΑΝΙΑ**

Οι τρεις κύριες ποικιλίες ελαιοκάρπου που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση είναι Gorbali ή Sevillana, Manzilla και Hojiblanca<sup>54</sup>. Σε πιο μικρή κλίμακα για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιούνται και οι ποικιλίες Caceraña, Verdial, Picual, Lechín, Rapazalla και Aloreña.

### Gorbal ή Sevillana

Η ποικιλία αυτή καλλιεργείται στην Ανδαλουσία. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι περίπου 100-120 κομμάτια/κιλό με αναλογία σάρκας προς πυρήνα 7,5/1. Η επιδερμίδα του φρούτου είναι εξαιρετική με μικρά άσπρα σημάδια, η σάρκα του έχει χρώμα ανοιχτό πράσινο και με την ωρίμανσή του καταλήγει σε πορφυρό-μαύρο. Η ωρίμανση του φρούτου γίνεται αρκετά γρήγορα ενώ η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες είναι σχετικά χαμηλή και αγγίζει περίπου το 10% του συνολικού βάρους του φρούτου.

### Manzilla

Η ποικιλία αυτή προτιμάται αρκετά στην ευρωπαϊκή αγορά λόγω του εξαιρετικού αρώματος και γεύσης του ελαιοκάρπου. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι 200-280 κομμάτια / κιλό με αναλογία σάρκας προς πυρήνα 6:1. Η ωρίμανση γίνεται πιο αργά σε σχέση με την ποικιλία Sevillana και το ποσοστό σε λιπαρές ουσίες αγγίζει το 15% του συνολικού μεγέθους του φρούτου. Σε αντίθεση με την ποικιλία Sevillana δεν εμφανίζει άσπρα σημάδια στην επιδερμίδα του φρούτου.

Οι δύο παραπάνω ποικιλίες Sevillana και Manzilla χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πράσινου ελαιοκάρπου σε άλμη λόγω της εξαιρετικής ποιότητας του καρπού αλλά και του τελικού προϊόντος.

### Hojiblanca

Η ποικιλία αυτή είναι η δεύτερη πιο σημαντική για την παραγωγή της Ισπανίας. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου σε άλμη. Σε αντίθεση με τις άλλες ποικιλίες, το φρούτο, εμφανίζει την τάση να σχηματίζει μικρά κελιά με αέρα κατά την ωρίμανση και την επεξεργασία του. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι 230-700 κομμάτια / κιλά με αναλογία σάρκας προς πυρήνα 6,6:1

### **2.2.3 ΜΑΡΟΚΟ**

Η ποικιλία που καλλιεργείται στο Μαρόκο προέρχεται από την Αλγερία και είναι η Picholine marocain ή Zitoun. Το φρούτο χρησιμοποιείται για την παραγωγή τόσο μαύρου ελαιοκάρπου όσο και πράσινου Spanish-style. Το μέσο μέγεθος του φρούτου είναι 280-500 κομμάτια/ φρούτο και η αναλογία

σάρκας προς πυρήνα είναι 5:1 ενώ η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες είναι 17%. Το φρούτο ωριμάζει σχετικά αργά. Η συγκομιδή για την παραγωγή πράσινου ελαιοκάρπου γίνεται στο τέλος του μήνα Νοέμβρη, ενώ για την παραγωγή μαύρου ελαιοκάρπου η συγκομιδή γίνεται από τον Δεκέμβριο έως και τον Ιανουάριο.

Άλλες ποικιλίες που καλλιεργούνται στο Μαρόκο είναι η ισπανικής καταγωγής Gorbai και Hojiblanca, καθώς και η Soussia και Meslala.

Άλλες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή επιτραπέζιου ελαιοκάρπου είναι:

Αμερική: Manzanillo, Mission, Sevillano, Ascolano, και Barouni

Ιταλία: Ascolana, Grossa di Spagna, Nocellara, Sant'Agostino και Nocellara de bellice.

Πορτογαλία: Carrasquenha, Redondil, Galega Vulgar, Cordovil, Bival, Negrina, Verdial και Manzilla dos Hermanos.

Γαλλία: Picholine, Tanche, Lucques, Amellan, Verdale, Aglaudau και Bouteillau.

Αυστραλία: Manzanilla, Gorbai, και Vertial.

## **2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ**

Ο διαχωρισμός του φρούτου και των μεθόδων επεξεργασίας του μπορεί να βασιστεί σε δύο χαρακτηριστικά: την ωριμότητα του φρέσκου καρπού και το χρώμα του τελικού προϊόντος. Με βάση τα παραπάνω έχουν καθιερωθεί τέσσερις βασικοί τύποι επιτραπέζιας ελιάς: πράσινες (green), ξανθές (turning color), φυσικές μαύρες (naturally black) και τεχνητές μαύρες (black-ripe).

### **2.3.1 ΠΡΑΣΙΝΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ**

Ο πράσινος ελαιόκαρπος συλλέγεται από το ελαιόδεντρο κατά την διάρκεια του κύκλου ωρίμανσης, όταν έχει το κατάλληλο μέγεθος, αλλά πριν από την χρωματική αλλαγή<sup>55</sup>. Συνήθως συλλέγεται όταν παρατηρείται μια ελαφρά μεταβολή στην απόχρωση των φύλων από πράσινο σε κίτρινο-πράσινο, και όταν η σάρκα αλλάζει κατάλληλα, πριν όμως γίνει πολύ μαλακή.

Μετά τη συλλογή, το φρούτο πρέπει να μεταφέρεται στο εργοστάσιο για περαιτέρω επεξεργασία αμέσως.

### **ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Η επεξεργασία του πράσινου ελαιοκάρπου γίνεται με δύο κυρίως τρόπους, με ζύμωση (Spanish or Sevillian Type) και χωρίς ζύμωση (Picholine or American Type).

### **ΙΣΠΑΝΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ**



Η επεξεργασία του γίνεται με αραιό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) για να αφαιρεθεί η πικράδα και να μετατραπεί η ελευρωπαΐνη και τα ζάχαρα σε μορφή οργανικών οξέων. Τα οξέα υποβοηθούν διαδοχική ζύμωση. Η συγκέντρωση του υδροξειδίου του νατρίου κυμαίνεται από 2% έως 3,5%, πράγμα που εξαρτάται από την ωριμότητα του φρούτου, την θερμοκρασία, την ποικιλία αλλά και την ποιότητα του νερού που χρησιμοποιείται. Η διαδικασία διεκπεραιώνεται σε δεξαμενές μεγάλου μεγέθους, όπου το φρούτο καλύπτεται εντελώς από το διάλυμα. Ο ελαιοκάρπος παραμένει στις δεξαμενές έως ότου το διάλυμα του υδροξειδίου του νατρίου διαπεράσει στην σάρκα του κατά τα 2/3 του όγκου του. Στη συνέχεια, το διάλυμα αντικαθίσταται από νερό, το οποίο απομακρύνει κάθε υπόλειμμα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Εκτενές πλύσιμο του φρούτου, αποβάλλει τα μόρια του αλκαλικού διαλύματος, αλλά ταυτόχρονα και ξεπλένει υπολειμματικά ευδιάλυτα ζάχαρα, τα οποία είναι απαραίτητα για διαδοχική ζύμωση.

Η ζύμωση πραγματοποιείται σε κατάλληλες δεξαμενές μέσα στις οποίες ο ελαιοκάρπος καλύπτεται με άλμη. Παραδοσιακά, το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε ξύλινα βαρέλια, ενώ πιο πρόσφατα, έχουν αντικατασταθεί με μεγάλες δεξαμενές, οι οποίες περιέχουν εσωτερικά αδρανή επικάλυψη. Η συγκέντρωση της άλμης κυμαίνεται αρχικά από 9-10%, αλλά γρήγορα μειώνεται σε 5% λόγω του υψηλού ποσοστού του ελαιοκάρπου σε νερό (ανταλλάξιμο νερό).

Όταν η ζύμωση πραγματοποιείται σωστά, προς αποφυγή της εμφάνισης μικροβίων, ο ελαιόκαρπος μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Εάν η επεξεργασία σε ξύλινα βαρέλια, θα πρέπει να προστίθεται άλμη κατά τακτά χρονικά διαστήματα. Τέλος, μετά το στάδιο της επεξεργασίας θα πρέπει οι ελιές να αποθηκεύονται κατάλληλα, ώστε να διατηρούν το σχήμα, την σύσταση αλλά και την γεύση τους.

Οι πιο γνωστές ποικιλίες που επεξεργάζονται με αυτό τον τρόπο είναι οι : Manzillo, Gorbai και Moroccan Picholine.

### ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ



Η πικρή γεύση του ελαιοκάρπου απομακρύνεται με την επεξεργασία με διάλυμα NaOH στο οποίο παραμένει για 8 έως 72 ώρες, έως ότου διάλυμα να διαπεράσει στην σάρκα του κατά τα 2/3 του όγκου του. Στην συνέχεια, γίνεται έκπλυση πολλές φορές για τις επόμενες ημέρες και ο καρπός τοποθετείται σε άλμη 5-6% για 2 ημέρες, κατόπιν σε διάλυμα άλμης 7% και η οξύτητα διορθώνεται με κιτρικό οξύ, σε επίπεδα pH=4,5. Έπειτα από 8-10 ημέρες ο καρπός της ελιάς έχει εξασφαλίσει το πράσινο χρώμα και μπορεί να καταναλωθεί. Ο ελαιόκαρπος διατηρείται σε σταθερή χαμηλή θερμοκρασία, 5-7°C και συγκέντρωση άλμης 3-8% για αρκετό χρονικό διάστημα. Για την εξαγωγή τους από το εργοστάσιο θα πρέπει να γίνουν πολλές εκπλύσεις με νερό κατάλληλης ποιότητας και να συντηρηθούν σε άλμη 5-6%.

### 2.3.2 ΞΑΝΘΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ



Ο συγκεκριμένος ελαιόκαρπος συλλέγεται όταν αρχίζει η αλλαγή του χρώματος του. Πιο συγκεκριμένα, ο ελαιόκαρπος συλλέγεται από το δέντρο πριν από την πλήρη ωρίμανσή του, όταν η σάρκα του είναι σχετικά σκληρή, και η σύστασή του σε λιπαρά οξέα είναι ατελής. Η διαδικασία του "μαυρίσματος" του ελαιοκάρπου γίνεται

συνήθως σε περιοχές της California. Κατά την εισαγωγή του φρούτου στο εργοστάσιο, γίνεται επεξεργασία αυτού με άλμη συγκέντρωσης 2,5-10% και παράλληλα προστατεύονται από τον αέρα.

#### **ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΞΑΝΘΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ**

Ο ελαιόκαρπος, αρχικά τοποθετείται σε δεξαμενές με διάλυμα NaOH 2%. Διαδοχική επεξεργασία με αραιά διαλύματα αλισίβας, με αντίστοιχο αερισμό, διευκολύνουν διείδυση και στον πυρήνα. Στην συνέχεια, ο ελαιόκαρπος ξεπλένεται για την απομάκρυνση του διαλύματος αλλά και για την επαναφορά του pH σε φυσιολογικά επίπεδα. Για την απόκτηση πιο σκούρου χρώματος, χρησιμοποιείται διάλυμα δισθενούς σιδήρου,  $Fe^{2+}$ , 0,1%, ( $Fe(Glu)_2$ ). Τέλος, πριν από την εξαγωγή του προϊόντος από το εργοστάσιο, είναι αναγκαία η διατήρησή του ελαιοκάρπου σε άλμη μέσα σε αποστειρωμένα και αεροστεγώς κλεισμένα δοχεία.

#### **2.3.3 ΦΥΣΙΚΟΣ ΜΑΥΡΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ**

Στην κατηγορία αυτή ανήκει ο ελαιόκαρπος, ο οποίος συλλέγεται όταν το φρούτο είναι εντελώς ώριμο και έχει αποκτήσει το βέλτιστο χρώμα και την αντίστοιχη σύσταση σε λιπαρά οξέα για κάθε ποικιλία. Υπάρχουν πολλοί τρόποι επεξεργασίας του ελαιοκάρπου, οι οποίοι ποικίλουν ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς αλλά και τα τοπικά έθιμα. Δύο από τους πιο γνωστούς τρόπους επεξεργασίας αναφέρονται παρακάτω.

#### **ΣΕ ΑΛΜΗ**



Αυτός ο τύπος ελαιοκάρπου εμφανίζεται στην ανατολική μεσόγειο. Στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται η Κονσερβοελιά ενώ στη Τουρκία χρησιμοποιείται η ποικιλία Gemlik. Το φρούτο συλλέγεται όταν είναι εντελώς μαύρο, αλλά πριν από την υπέρ-ωρίμανση και την συρρίκνωση του και τοποθετείται άμεσα σε διάλυμα άλμης συγκέντρωσης 8-10%.

Στην αρχή της ζύμωσης, το φρούτο θα πρέπει να προφυλάσσεται από τον αέρα. Ένας τρόπος είναι η υπερχύλιση των βαρελιών, όπου φυλάσσεται ο καρπός, με νερό. Η άλμη προκαλεί την έντονη δράση της μικροβιακής

ζύμωσης και μειώνει την πικρή γεύση της ελευρωπαΐνης. Όταν η συγκέντρωση της άλμης ελαττωθεί, ανακυκλώνεται το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται ο ελαιόκαρπος και αυξάνεται η συγκέντρωση της άλμης. Όταν η πικρή γεύση έχει απομακρυνθεί, ο ελαιόκαρπος μπορεί να διατεθεί στο εμπόριο. Το χρώμα του ελαιοκάρπου μπορεί να εξασθενίσει κατά την διάρκεια της επεξεργασίας, πράγμα που μπορεί να διορθωθεί με αερισμό για 2-3 ημέρες, αλλά τις περισσότερες φορές διορθώνεται με την προσθήκη διαλύματος δισθενούς σιδήρου,  $Fe^{2+}$ , 0,1%, ( $Fe(Glu)_2$ ). Τέλος, ο ελαιόκαρπος επιλέγεται και αποθηκεύεται σε δεξαμενές κατάλληλες, με νέο διάλυμα άλμης και συγκέντρωσης 8% κ.β. Στο εμπόριο, διατίθενται σε άλμη, σε ξύδι και λάδι. Ο τελευταίος τρόπος συσκευασίας χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον στον Καλαματιανό ελαιόκαρπο ποικιλίας Καλαμών.

#### ΣΕ ΑΛΑΤΙ



Τα φρούτα, μετά την συγκομιδή, πλένεται έντονα με νερό και τοποθετούνται σε καλάθια με αλάτι σε αναλογία 15% του βάρους του ελαιοκάρπου. Το αποτέλεσμα είναι η λήψη αλατισμένου ελαιοκάρπου, όχι πολύ πικρού, με υφή σταφίδας.

Η συγκεκριμένη ποικιλία Μεγαρίτικη είναι επίσης Ελληνικής προέλευσης και παρασκευάζεται από ώριμο ελαιόκαρπο.

#### 2.3.4 ΤΕΧΝΗΤΟΣ ΜΑΥΡΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ

Για την παρασκευή αυτού του τύπου ελαιοκάρπου, η συγκομιδή του γίνεται πριν την πλήρη ωρίμανση του καρπού. Έπειτα επεξεργάζεται με αλκαλικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου για απομάκρυνση της πικράδας και το επιθυμητό χρώμα του λαμβάνεται με την εμβάπτισή του σε διάλυμα δισθενούς σιδήρου,  $Fe^{2+}$ , 0,1%, ( $Fe(Glu)_2$ ).

#### 2.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Η επεξεργασία του ελαιοκάρπου με οποιοδήποτε από τους τρόπους που προαναφέρθηκαν, επιφέρει αλλαγές στα χαρακτηριστικά του καρπού.



Αυτό συμβαίνει λόγω της ώσμωσης των συστατικών του καρπού προς το μέσο με το οποίο γίνεται η επεξεργασία (NaOH) και της παρουσίας όξινων υδατοδιαλυτών συστατικών, όπως τα τριτερπένια, στην επιδερμίδα του, οι οποίες καθορίζουν την ταχύτητα ανταλλαγής των συστατικών του ελαιοκάρπου με το μέσο.

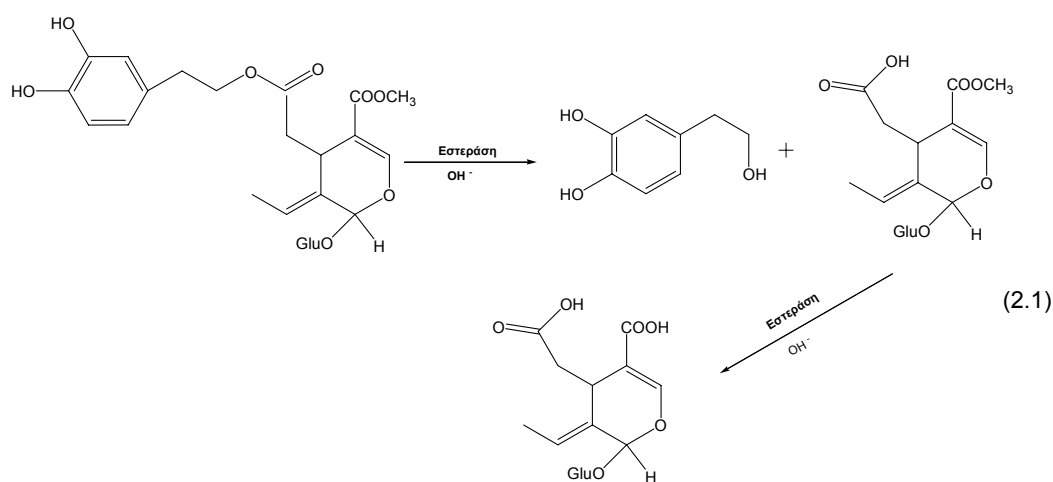
Πιο συγκεκριμένα, η επιδερμίδα του καρπού, αποτελείται από μια πολύ λεπτή μεμβράνη την οποία διαπερνά το διάλυμα του υδροξειδίου του νατρίου και διανέμει στα υπόλοιπα τμήματα του καρπού (σάρκα και πυρήνας). Η χημική σύσταση του καρπού μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα αλκάνια με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα, τις αλδεΐδες, τους αλειφατικούς εστέρες και τα τριγλυκερίδια. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα καρβοξυλικά οξέα, τα πολυκυκλικά τερπένια, τερπενικά οξέα και αλκοόλες αλλά και τους γλυκοζίτες. Η δεύτερη κατηγορία, αποτελείται από συστατικά που βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα του καρπού. Επομένως αντιδρούν με το υδροξείδιο του νατρίου, δίνουν άλατα τα οποία και απομακρύνονται από τον καρπό με σταδιακή διάλυση στην άλμη. Τα οργανικά οξέα, που προέρχονται τόσο από την επιδερμίδα του καρπού όσο και από την σάρκα του, μεταφέρονται στην άλμη υπό την μορφή των αλάτων τους.

#### **2.4.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΕΡΠΕΝΙΑ**

Η επεξεργασία του φρέσκου ελαιοκάρπου επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην ποιότητα και ποσότητα των πολυφαινολών. Αυτό επηρεάζει τόσο τις οργανοληπτικές ιδιότητες του καρπού όσο και την αντοχή του στην οξειδωση από το οξυγόνο στην ατμόσφαιρα. Η τελική συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων τους εξαρτώνται από τον τρόπο επεξεργασίας. Από τον τρόπο επεξεργασίας εξαρτώνται, επίσης, η μεταβολή του χρώματος και η γεύση του καρπού<sup>56-60</sup>.

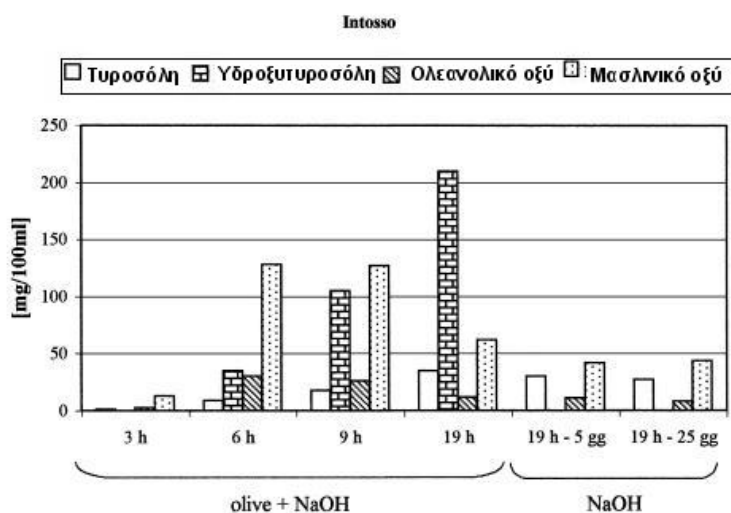
Κατά την επεξεργασία έχει παρατηρηθεί μείωση των ολικών φαινολικών ενώσεων, με ταυτόχρονη μείωση της ελευρωπαΐνης, της κυριότερης φαινολικής ένωσης του ελαιοκάρπου και αύξηση της ελεύθερης τυροσόλης και ελεύθερης υδροξυτυροσόλης. Σημαντική ποσότητα αυτών των δύο φαινολικών ενώσεων έχουν βρεθεί στην άλμη, αν και εξακολουθούν να θεωρούνται οι δύο πιο σημαντικές ενώσεις στον ελαιοκάρπο ακόμα και μετά

την επεξεργασία του. Στην μέθοδο επεξεργασίας Αμερικανικού τύπου, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης τυροσόλης και ελεύθερης υδροxyτυροσόλης και μείωση έως και εξαφάνιση του βανιλικού οξέος. Η επίδραση του υδροξειδίου του νατρίου στην ελευρωπαΐνη, έχει μελετηθεί εκτενέστερα, και πιστεύεται ότι αυτή διασπάται σε υδροxyτυροσόλη και τον εστέρα του ελενολικού οξέος (oleoside 11-methylester) στον οποίο παραμένει αναλλοίωτη η εστεροποιημένη καρβοξυλική ομάδα (εξίσωση 2.1) <sup>61-63</sup>. Ωστόσο, στην αντίδραση αυτή, όταν το pH και η αναλογία των αντιδρώντων είναι η κατάλληλη, η ομάδα COOCH<sub>3</sub> του εστέρα μπορεί να υδρολυθεί περαιτέρω δίνοντας το δικαρβοξυλικό προϊόν <sup>64</sup>.

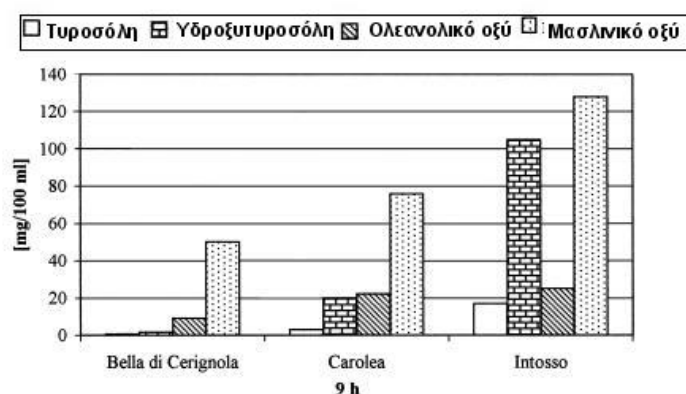


Η αλκαλική επεξεργασία, σε συνδυασμό με την υδρόλυση, ευνοεί την μετατροπή των ελεύθερων καρβοξυλικών οξέων και άλλων όξινων ουσιών, σε άλατα. Στο επόμενο στάδιο της συντήρησης του καρπού σε άλμη, συνεχίζεται η μεταφορά των συστατικών αυτών <sup>65,66</sup>.

Τα δύο πιο βασικά τριτερπενικά οξέα, μασλινικό και ολεανολικό, μεταβαίνουν σταθερά στην άλμη. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ενώσεων τυροσόλη, υδροxyτυροσόλη, μασλινικό οξύ και ολεανολικό οξύ. Στο σχήμα 2.1 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ενώσεων (στην άλμη) με το χρόνο επεξεργασίας του καρπού με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου για την ποικιλία Intosso, ενώ στο σχήμα 2.2 παρουσιάζεται η συγκέντρωση αυτών μετά από 9 ώρες κατεργασίας με υδροξείδιο του νατρίου για τις ποικιλίες Bella di Cerignola, Caroela και Intosso <sup>67</sup>. Επίσης, στην άλμη έχουν προσδιοριστεί και οι ενώσεις καφεϊκό οξύ και διυδροxy καφεϊκό οξύ <sup>68</sup>.



**Σχήμα 2.1** Μεταβολή της συγκέντρωσης των ενώσεων σε άλμη (διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου) με το χρόνο επεξεργασίας του καρπού.



**Σχήμα 2.2** Συγκέντρωση των ενώσεων στην άλμη μετά από 9 ώρες κατεργασίας με υδροξείδιο του νατρίου.

Στο σχήμα 2.1, παρατηρούμε ότι για την ποικιλία Intosso, με την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας, η συγκέντρωση της τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης αυξάνει σημαντικά. Αντίθετα το ολεανολικό οξύ αυξάνει από τις 3 έως τις 6 ώρες και μειώνεται σταδιακά έως τις 19 ώρες. Τέλος το μασλινικό οξύ αυξάνεται με πολύ μεγάλο ρυθμό έως τις 9 ώρες και μειώνεται με την περαιτέρω επεξεργασία. Μετά από τις 19 ώρες στην άλμη, η συγκέντρωση της τυροσόλης και του μασλινικού οξέος, είναι πολύ περισσότερη την υδροξυτυροσόλης και του ολεανολικού οξέος.

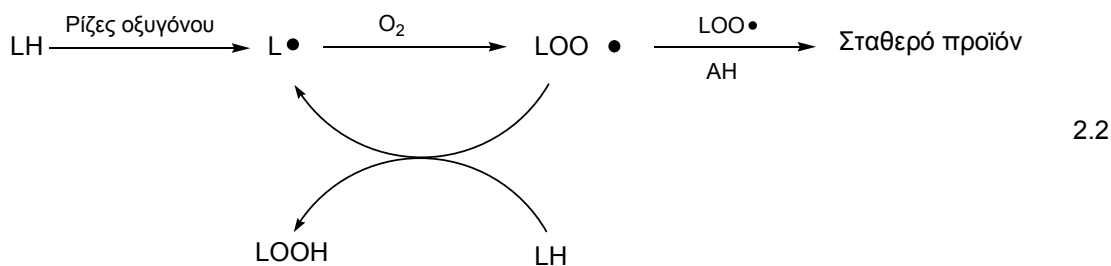
Συγκρίνοντας τις ποικιλίες Bella di Cerignola, Intosso και Carolea, μετά την παραμονή 9 ωρών στην άλμη, παρατηρούμε ότι το μασλινικό οξύ

υπερέχει στην ποικιλία Intosso η οποία περιέχει επίσης την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε υδροξυτυροσόλη. Το ολεανολικό οξύ βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στην ποικιλία Bella di Cerignola σε σχέση με τις άλλες ποικιλίες που μελετήθηκαν. Τέλος, η τυροσόλη, μια από τις πιο βασικές φαινόλες του ελαιοκάρπου, ανιχνεύτηκε σε υψηλό ποσοστό μόνο στην ποικιλία Intosso.

## 2.5 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

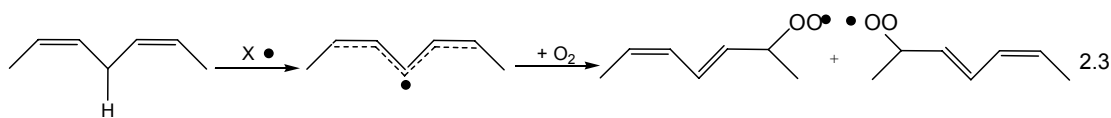
Ο καρπός της ελιάς είναι πλούσιος σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες ονομάζονται συνήθως πολυφαινόλες, ο ρόλος των οποίων είναι πολλαπλός και πολύ σημαντικός. Ορισμένες από αυτές έχουν βακτηριοκτόνες ή βακτηριοστατικές ιδιότητες, ενώ όλες επηρεάζουν την γεύση και το χρώμα των διαφόρων εμπορικών τύπων ελιάς. Πιο συγκεκριμένα, ο Ruiz Barda και οι συνεργάτες του (1990) τεκμηρίωσαν την βακτηριοκτόνο δράση των φαινολικών ουσιών επί του γαλακτιβάκιλλου *Lactobacillus plantarum*<sup>69</sup>. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η υδροξυτυροσόλη, δομικό συστατικό της ελευρωπαΐνης, η οποία είναι από τις πιο σημαντικές φαινόλες στον ελαιοκάρπο, έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα από τα πρόσθετα συνθετικά αντιοξειδωτικά BHA (βουτυλο-υδροξυ-ανισόλη) και BHT (βουτυλο-υδροξυ-τολουένιο).

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών έγκειται στην παγίδευση ελευθέρων ριζών. Η οξειδωση των λιπαρών οξέων (LH) προκαλείται από δραστικές ενώσεις οξυγόνου οι οποίες περιλαμβάνουν ρίζες οξυγόνου HO•, O<sub>2</sub>•, LOO•, και άλλες ενώσεις του οξυγόνου, όπως H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> κ.α. Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου δημιουργούνται, είτε από φυσιολογικές μεταβολικές διαδικασίες (π.χ. αναγωγή του οξυγόνου σε νερό) στον ζώντα οργανισμό, είτε από διαδικασίες στα τρόφιμα, ή ακόμα από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV)<sup>70</sup> και χαρακτηρίζονται από μικρό χρόνο ζωής. Οι οξυγονούχες ρίζες οξειδώνουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, σύμφωνα με την εξίσωση 2.2. Η δημιουργία υπεροξειδίων ακολουθείται είτε από πολυμερισμό των λιπαρών οξέων είτε από την αντίδραση με κάποιο αντιοξειδωτικό (AH). Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε το σχηματισμό σταθερών μορίων που ανακόπτουν την οξειδωση.

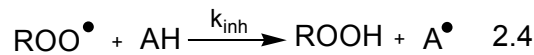


Η θεωρία της αυτοκαταλυτικής οξειδωσης των λιπαρών οξέων βασίζεται στην διάταξη διπλών δεσμών της μορφής cis-cis-1,4-πενταδιένιο ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ). Η πενταδιενική διάταξη δεν υπάρχει στο ελαϊκό οξύ, αλλά εμφανίζεται δύο φορές στο λινολενικό οξύ και τρεις φορές στο αραχιδονικό οξύ. Η αναλογία του ρυθμού οξειδωσης των μεθυλεστέρων του ελαϊκού οξέος, του λινολενικού οξέος, και του αραχιδονικού οξέος μελετήθηκε και βρέθηκε ότι είναι 1:12:25<sup>71</sup>. Επίσης, τα ελεύθερα ακόρεστα οξέα οξειδώνονται τουλάχιστον δύο φορές γρηγορότερα από ότι οι αντίστοιχοι εστέρες τους.

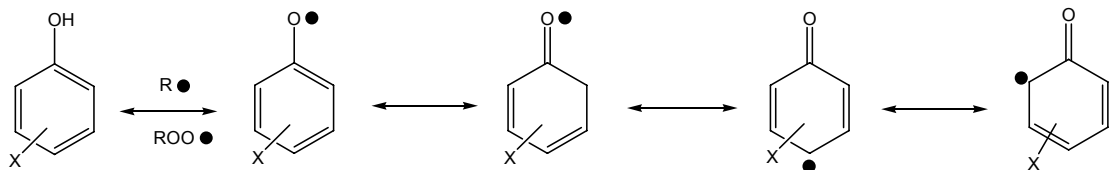
Κατά την θεωρία της αυτοκαταλυτικής οξειδωσης των λιπαρών οξέων, η ρίζα δρα στον λιγότερο ισχυρό δεσμό C-H, ο οποίος στα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ο διαλλυλικός δεσμός C-H (ενέργειες δεσμών C-H, kcal/mole: βινυλικός 108, αλειφατικός 92-98, αλλυλικός 85, διαλλυλικός 75)<sup>72</sup> σύμφωνα με την εξίσωση 2.3<sup>73</sup>. Η ρίζα που σχηματίζεται είναι σταθερή λόγω δομών συντονισμού.



Το οξειδωτικό τάγγισμα είναι αυτοκαταλυόμενη αντίδραση, αφού για κάθε υπεροξειδίο που σχηματίζεται, δημιουργείται και μία νέα ελεύθερη ρίζα σε ένα άλλο ακόρεστο λιπαρό οξύ. Έτσι, αν έχουμε συνεχή τροφοδοσία σε οξυγόνο, όλα τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του ελαιολάδου θα μετατραπούν τελικά σε υπεροξειδία λιπαρών οξέων. Τον περιορισμό της οξειδωτικής δράσης του οξυγόνου προκαλούν οι αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες του λιπαρού οξέος δημιουργώντας αντίστοιχες ρίζες στο μόριό τους, σύμφωνα με την εξίσωση 2.4

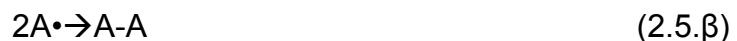


Μία ουσία για να είναι καλό αντιοξειδωτικό πρέπει (α) να παγιδεύει τις ρίζες ταχύτατα (η  $k_{\text{inh}}$  στην αντίδραση 2.4 να είναι μεγάλη ) και (β) να μπορεί να πολυμεριστεί αντιδρώντας με μία άλλη ρίζα αντιοξειδωτικού, ή να αναχθεί ώστε να αναπαράγει το αντιοξειδωτικό<sup>74</sup>. Οι πολυφαινόλες έχουν σταθερές ρίζες λόγω των πολλών δομών συντονισμού που εμφανίζουν, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4.



**Σχήμα 2.3** Δομές συντονισμού των ριζών των πολυφαινολών.

Οι ελεύθερες ρίζες των αντιοξειδωτικών δεν παίρνουν μέρος στην αλυσιδωτή αντίδραση της ταγγίσεως γιατί αδρανοποιούνται μέσω διμερισμού ή άλλων αντιδράσεων. Έτσι αναγεννώνται κατά το ήμισυ ή σχηματίζουν διμερή παράγωγα σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Μεταξύ των φυσικών αντιοξειδωτικών εξέχουσα θέση έχουν οι φαινολικές ουσίες με υδροξύλια στην όρθο- ή πάρα- θέση του δακτυλίου τους επειδή συμμετέχουν επιπλέον δομές συντονισμού στις οποίες η ρίζες εμφανίζονται στα όρθο και πάρα υδροξύλια<sup>75</sup>.

Τα αντιοξειδωτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις χαρακτηρίζονται από προοξειδωτική δράση κατά την οποία επιταχύνεται η καταστροφή σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως το DNA, υδρογονάνθρακες και πρωτεΐνες. Η *in vivo* προοξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών διαφέρει από την *in vitro*. Για παράδειγμα, η προοξειδωτική δράση *in vivo* της α-τοκοφερόλης αναιρείται από το ασκορβικό οξύ που υπάρχει στον οργανισμό. Έτσι, ενώ στις *in vitro* διαδικασίες έχει αποδειχθεί η προοξειδωτική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών, στις *in vivo* διαδικασίες η προοξειδωτική δράση είναι σχεδόν

αμελητέα<sup>76</sup>. Η αντιοξειδωτική και η προοξειδωτική δραστηριότητα πολλών από τις πολυφαινόλες που μελετώνται σε αυτή την εργασία έχει αποδειχθεί *in vitro*<sup>77-81</sup>. Η *in vivo* όμως προοξειδωτική δράση των πολυφαινολών δεν έχει αποδειχθεί.

## 2.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών, είναι υπεύθυνη και για τις θεραπευτικές ιδιότητες τους στον ανθρώπινο οργανισμό<sup>82</sup>.

Η μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης λόγω της παρουσίας πολυφαινολών έχει μελετηθεί *in vivo*<sup>83</sup>. Είναι γνωστό ότι η μείωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας LDL (“κακή” χοληστερόλη) και η αύξηση της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας HDL (“καλή” χοληστερόλη) εμποδίζουν μια σειρά από ασθένειες όπως η θρόμβωση, η αρτηριοσκλήρωση, το έμφραγμα, και το ήπιο εγκεφαλικό επεισόδιο. Το ελάχιστο των τριγλυκεριδίων ως εκατοστιαίο ποσοστό απαντά στην HDL, η οποία μεταφέρει και τοποθετεί την χοληστερίνη στο ήπαρ για την αποικοδόμηση της και έτσι αποτρέπει τη συσσώρευση χοληστερίνης στον οργανισμό. Η μέγιστη ποσοστιαία αναλογία φωσφολιπιδίων και χοληστερίνης απαντά στην LDL, η οποία είναι υπεύθυνη για την διακίνηση του 60-70% του συνόλου της χοληστερίνης. Όταν η ποσότητα της χοληστερόλης έχει φτάσει σε υψηλά σημεία σταματάει η παραγωγή LDL και έτσι τα επίπεδα μη δεσμευμένης χοληστερόλης στο αίμα αυξάνονται επικίνδυνα. Σε *in vivo* μελέτες έχει βρεθεί ότι οι πολυφαινόλες που προέρχονται από το παρθένο ελαιόλαδο εμποδίζουν αποτελεσματικά την οξείδωση της LDL και αυξάνουν την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα NO (μονοξείδιο του αζώτου), το οποίο επίσης εμποδίζει την οξείδωση της LDL. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα στηρίζουν την υπόθεση ότι τα αντιοξειδωτικά τα οποία προέρχονται από το λάδι ωφελούν το καρδιαγγειακό σύστημα του ανθρώπου<sup>84</sup>. Επίσης έχει βρεθεί ότι τροφές πλούσιες σε πολυφαινόλες, όπως το παρθένο ελαιόλαδο, μειώνουν την επιδεκτικότητα οξείδωσης της LDL<sup>85</sup> στην οποία οφείλεται η αρτηριοσκλήρωση<sup>86</sup>.

Σε πειράματα *in vivo* έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση ελαιολάδου μειώνει την απαίτηση για φάρμακα υπερτασικών ατόμων λόγω της πιθανής

αύξησης των επιπέδων μονοξειδίου του αζώτου που προκαλείται από τις πολυφαινόλες<sup>87</sup>. Πιο συγκεκριμένα η ελευρωπαΐνης έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αύξηση στα επίπεδα NO η οποία πιστεύεται ότι είναι ευεργετική στην προστασία των κυττάρων και του οργανισμού<sup>88</sup>.

*In vivo* έχει αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες υδροξυτυροσόλη, ελευρωπαΐνη, καμφερόλη και κερκετίνη, οι οποίες υπάρχουν στο ελαιόλαδο, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες σχετιζόμενες με καρδιοαγγειακές παθήσεις και τον καρκίνο<sup>89</sup>. Η υδροξυτυροσόλη του ελαιολάδου προστατεύει τα ερυθροκύτταρα<sup>90</sup> και τα κύτταρα Caco-2 από οξειδωτικές βλάβες, εμποδίζει την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων (θρόμβωση), ενώ έχει αποδειχθεί *in vitro* η βιοδιαθεσιμότητα της<sup>91</sup>. Τέλος, κλινικά πειράματα έχουν δείξει ότι η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δράση με συνέπεια να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπευτική αγωγή κατά των εντερικών μολύνσεων και για μολύνσεις της αναπνευστικής οδού<sup>92</sup>. Επίσης αντιβακτηριακή δράση έχουν τα παράγωγα του βενζοϊκού και του κινναμικού οξέος<sup>93</sup>.

## **2.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ**

Οι συμβατικές *Χρωματογραφικές Μέθοδοι* για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών, βασίζονται στη μέτρηση των ολικών πολυφαινολών, και σε κάποιες περιπτώσεις στην μέτρηση των 1,2-διφαινολών<sup>94</sup>. Η συνήθης προσέγγιση<sup>95,96</sup> είναι σχετικά αργή και απαιτεί αρκετή ώρα για ανάλυση. Περιλαμβάνει απομόνωση (εκχύλιση) των πολυφαινολών με αλκοολικό υδατικό διάλυμα, το οποίο βοηθά στην απομάκρυνσή τους από ακόρεστα συστατικά. Ο χρόνος εκχύλισης είναι μια σημαντική παράμετρος δεδομένου ότι οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης αυξάνουν την πιθανότητα οξείδωσης των πολυφαινολών, εκτός εάν προστίθενται αναγωγικά μέσα στο διάλυμα. Το Folin-Ciocalteu είναι ένα σύνηθες αντιδραστήριο που συνιστάται για την μέτρηση των ολικών πολυφαινολών. Το τμήμα της υδατικής φάσης αντιδρά με το Folin-Ciocalteu παρουσία ανθρακικού νατρίου και το διάλυμα χρωματίζεται μπλε. Με την πάροδο του χρόνου, το διάλυμα σκουραίνει και μετά από 15-90 λεπτά μετράται η απορρόφηση στα 725 nm<sup>95</sup>. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε συγκέντρωση μιας πολυφαινόλης, συνήθως το καφεϊκό οξύ ή το γαλλικό οξύ. Το αντιδραστήριο αυτό χρησιμοποιείται



ευρέως, αν και όλες οι πολυφαινόλες δεν απορροφούν στα 725nm. Η συγκέντρωση των 1,2-διφαινολών προσδιορίζονται με το άλας του τριοξειδίου του μολυβδαινίου με μέτρηση στα 350 nm.

#### *Χρωματογραφικές μέθοδοι*

Η ανάγκη για τον επιλεκτικά ποιοτικό αλλά και ποσοτικό προσδιορισμό των πολυφαινολών οδήγησε στην ανάπτυξη χρωματογραφικών αναλυτικών τεχνικών. Η περιορισμένη χρήση της αέριας χρωματογραφίας για τον διαχωρισμό των πολυφαινολών του ελαιοκάρπου μπορεί να αποδοθεί στην πολικότητα που εμφανίζουν οι πολυφαινόλες αλλά και στην περιορισμένη σταθερότητά τους<sup>97</sup>. Επίσης, μπορεί να λάβει χώρα θερμική αποσύνθεση κατά την διάρκεια της εκλεκτικής προσρόφησης, με αποτέλεσμα πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους να μην χρωματογραφηθούν.

Μια εναλλακτική λύση είναι ο συνδυασμός αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας, GC-MS, η οποία έχει καθιερωθεί ως μια πολύ απλή τεχνική ρουτίνας που πραγματοποιείται είτε με χημικό ιονισμό (Chemical ionization, CI), είτε με ιονισμό ηλεκτρονίων (Electron ionization, EI), δεδομένου ότι αυτοί οι τύποι ανιχνευτών είναι κατάλληλοι για πτητικές ενώσεις. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης σταθερότητας, η ανάλυση των πολυφαινολών και των γλυκοζιτών τους ειδικά με την αέρια χρωματογραφία, δεν είναι ευνοϊκή.

#### *Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)*

##### *α) Έκλυση*

Τα φαινολικά εκχυλίσματα από ελαιόκαρπο, έχουν διαχωριστεί με κλασσικές χαμηλής πίεσης κολώνες χρωματογραφίας<sup>98</sup>. Εναλλακτικά, προκαταρκτικός διαχωρισμός μπορεί να επιτευχθεί σε στήλες ιονικής ανταλλαγής, όπως έχουν περιγραφεί<sup>99</sup> για τα φαινολικά οξέα αραβόσιπου. Η χαμηλή απόδοση αυτών των τεχνικών έχει φανεί ευνοϊκή στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας *Χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης* (reversed-phase chromatography, RPC), η οποία αποτελεί, ίσως, την πιο δημοφιλή και αξιόπιστη τεχνική για την μέτρηση των πολυφαινολών. Η έκλυση των ενώσεων ακολουθεί την πολικότητα αυτών. Πιο συγκεκριμένα στην αρχή εκλύονται οι πιο πολικές ενώσεις (φαινολικά οξέα) και έπειτα οι λιγότερο πολικές. Κατά συνέπεια, η σειρά έκλυσης των πολυφαινολικών ενώσεων, που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα είναι<sup>100-103</sup>: υδροξυτυροσόλη, τυροσόλη,

βανιλλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, ελενολικό οξύ, βερμπασκοσίδιο, ρουτίνη, λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο. Σε μια τελευταία αναφορά<sup>103</sup> χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μίγματα διαλυτών όπως οξικό οξύ, νερό, μεθανόλη και ακετονιτρίλιο για τον διαχωρισμό των πιο πολύπλοκων κλασμάτων.

Η περιορισμένη διαθεσιμότητα των κατάλληλων προτύπων αναφοράς, είναι ένα πρόβλημα που έχει εν μέρει υπερνικηθεί από την σύνθεση αυτών<sup>104,105,102</sup>.

### β) Ανίχνευση

Η ανίχνευση βασίζεται στην απορρόφηση των πολυφαινολών στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού (UV). Δεν υπάρχει όμως ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος στο οποίο να απορροφούν όλες οι πολυφαινόλες. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα μέγιστα απορρόφησης των πιο σημαντικών πολυφαινολών που υπάρχουν στον ελαιόκαρπο. Αυτό εμφανίζει ένα νέο πρόβλημα, όπως αναφέρθηκε και από την Τσιμίδου και τους συνεργάτες τις<sup>106</sup>, η οποία ταξινόμησε τις πολυφαινόλες σε τέσσερις ομάδες και χρησιμοποίησε ενιαίο πρότυπο βαθμονόμησης για τα μέλη κάθε ομάδας. Από την άλλη πλευρά, αυτά τα διαφορετικά φασματικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την εκλεκτική ανίχνευση ενός από τα διαχωριζόμενα είδη. Το συνηθέστερο χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος είναι 280nm<sup>99,106,107</sup> αν και έχουν χρησιμοποιηθεί ακόμα τα 230 nm και 340nm<sup>108</sup>.

Η προσπάθεια ανίχνευσης πολυφαινολών με τη φασματοσκοπία NMR του πυρήνα άνθρακα-13 ήταν μάλλον απογοητευτική. Η χαμηλή φυσική αφθονία (μόλις 1,1%) και η χαμηλή ευαισθησία του πυρήνα άνθρακα-13 δεν επέτρεψαν την ανίχνευση άλλων πολυφαινολών, εκτός από την τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, οι οποίες κυριαρχούν ποσοτικά των άλλων πολυφαινολών. Επίσης, για τους ίδιους λόγους, η διάρκεια του πειράματος (3-4 ώρες) ήταν μάλλον απαγορευτική σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Η φασματοσκοπία NMR πρωτονίου δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολυφαινολών στο παρθένο ελαιόλαδο, προφανώς λόγω της μικρής περιοχής συχνοτήτων που εμφανίζει το πρωτόνιο (10 ppm) και της πολυπλοκότητας των φασμάτων NMR λόγω της σύζευξης σπιν-σπιν.

Σε αντίθεση με τον πυρήνα άνθρακα-13, ο πυρήνας φώσφορος-31 είναι περισσότερο ευαίσθητος με φυσική αφθονία 100%. Επίσης, η μεγάλη περιοχή χημικών μετατοπίσεων που παρουσιάζει σε σχέση με τον πυρήνα C-13 (τουλάχιστον πέντε φορές μεγαλύτερη), ευνοεί την αύξηση της διακριτικής ικανότητας των φασμάτων NMR. Συνεπώς, οι ιδιότητες του πυρήνα P-31 σε συνδυασμό με τα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR, καθιστούν την τελευταία μια πολλά υποσχόμενη αναλυτική τεχνική για την ανάλυση, όχι μόνον των πολυφαινολών, αλλά και άλλων συστατικών (π.χ. ελεύθερα οξέα, αλειφατικές αλκοόλες, τοκοφερόλες, στερόλες, αλδεύδες, μόνο- και διγλυκερίδια)<sup>109</sup>.

Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιηθεί μια νέα αναλυτική τεχνική ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των διγλυκεριδίων και πολυφαινολών στον ελαιοκάρπο. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια, αλδεϋδικές ομάδες) με το αντιδραστήριο *2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλοδιοξαφωσφολάνιο* και τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR του πυρήνα φώσφορος-31 για την ταυτοποίηση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων. Η αντίδραση γίνεται σε ήπιες συνθήκες (εντός του σωλήνα NMR σε θερμοκρασία δωματίου), είναι ποσοτική και ολοκληρώνεται σε 15 λεπτά. Η ποσοτική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο (κυκλοεξανόλη)<sup>109,110</sup>.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι να δείξει ότι τα 1,3-διγλυκερίδια σχηματίζονται στον καρπό κατά την ωρίμανση αν και σε πολύ μικρότερη ποσότητα από τα 1,2-διγλυκερίδια, ενώ παλιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι τα 1,3-διγλυκερίδια αποτελούν προϊόντα ισομερισμού των 1,2-διγλυκεριδίων κατά την αποθήκευση του ελαιολάδου. Επίσης, στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός της σύστασης σε πολυφαινόλες του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου και η μεταβολή της σε σχέση με τον τύπο επεξεργασίας του φρέσκου καρπού.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Ως διαλύτες NMR χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο  $\text{CDCl}_3$  περιεκτικότητας 99,8% σε δευτέριο και πυριδίνη καθαρότητας 95%. Για την προστασία των προτύπων διαλυμάτων από την υγρασία χρησιμοποιήθηκαν Molecular Sieves<sup>TM</sup> διαμέτρου σπών 0,5 nm και μεγέθους 2 mm οι οποίες αγοράστηκαν, επίσης, από την Merck. Η κυκλοεξανόλη (99%), η πινακόλη, η πυριδίνη, ο τριχλωριούχος φωσφόρος, το εξάνιο και το τρις(ακετυλοακετονικό) χρώμιο (97%)  $[\text{Cr}(\text{acac})_3]$  αγοράστηκαν από την Aldrich. Οι φαινολικές πρότυπες ενώσεις, καφεϊκό οξύ, *o*-κουμαρικό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, βανιλλικό οξύ, ρουτίνη, λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο, D-γλυκόζη, 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ, συριγγικό οξύ και συναπτικό οξύ αγοράστηκαν από την Aldrich. Το βερμπασκοσίδιο ήταν δώρο του εργαστηρίου Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

### 3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Για την μελέτη της μεταβολής της σύστασης των διγλυκεριδίων χρησιμοποιήθηκαν 8 δείγματα ελαιοκάρπου, ποικιλίας Κορωνέικη, από τις περιοχές Σκαλάκι (4 δείγματα) και Κοκκίνη Χάνι (4 δείγματα). Τα δείγματα από το Κοκκίνη Χάνι είχαν ανοιχτό πράσινο χρώμα, ενώ αυτά από το Σκαλάκι είχαν σκούρο πράσινο χρώμα. Η συλλογή του ελαιοκάρπου έγινε για κάθε περιοχή σε χρονικά διαστήματα ενός μηνός και για την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003.

Για την μελέτη της περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες αναλύθηκαν 7 δείγματα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου εμπορίου διαφορετικής προέλευσης και ποικιλίας. Πιο συγκεκριμένα αναλύθηκαν ποικιλίες Καλαμών (πράσινες και μαύρες), βιολογικής καλλιέργειας (πράσινες και μαύρες), καθώς και οι ισπανικές

ποικιλίας richolines, sevillanes και τέλος ένα δείγμα από το Μαρόκο ποικιλίας richolines. Τα δείγματα του ελαιοκάρπου για τον προσδιορισμό της σύστασης των διγλυκεριδίων και των πολυφαινολών συγκεντρώνονται στους πίνακες 3.1 και 3.2.

**Πίνακας 3.1** Δείγματα ελαιοκάρπου για τον προσδιορισμό των διγλυκεριδίων.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΣΥΓΚΟΜΙΔΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
4/9/2003	ΣΚΑΛΑΝΙ	1
6/10/2003	ΣΚΑΛΑΝΙ	2
6/11/2003	ΣΚΑΛΑΝΙ	3
11/12/2003	ΣΚΑΛΑΝΙ	4
3/9/2003	ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ	5
3/10/2003	ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ	6
6/11/2003	ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ	7
12/12/2003	ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ	8

**Πίνακας 3.2** Εμπορικά Δείγματα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών.

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ	ΧΩΡΑ ΚΑΤΑΓΩΓΗΣ	ΧΡΩΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ΟΝΟΜΑΣΙΑ)
ΑΛΤΙΣ	ΚΑΛΑΜΩΝ	ΕΛΛΑΔΑ	ΜΑΥΡΟ	1
ΧΕΝΙΑ	ΚΑΛΑΜΩΝ	ΕΛΛΑΔΑ	ΠΡΑΣΙΝΟ	2
ΓΑΕΑ	ΚΑΛΑΜΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ	ΕΛΛΑΔΑ	ΜΑΥΡΟ	3
ΓΑΕΑ	ΚΑΛΑΜΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ	ΕΛΛΑΔΑ	ΠΡΑΣΙΝΟ	4
ΜΟΝΟΡΡΙΧ	ΡΙΧΟΛΙΝΕΣ	ΜΑΡΟΚΟ	ΠΡΑΣΙΝΟ	5
GAULT MILLAU	ΡΙΧΟΛΙΝΕΣ	ΙΣΠΑΝΙΑ	ΠΡΑΣΙΝΟ	6
GAULT MILLAU	SEVILLANES	ΙΣΠΑΝΙΑ	ΠΡΑΣΙΝΟ	7

### **3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ**

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης διγλυκεριδίων από τον ελαιόκαρπο.

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ Α**

Η απομόνωση των διγλυκεριδίων από τον ελαιόκαρπο έγινε με συσκευή Soxhlet και διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα<sup>111</sup>. Σε κάθε δείγμα αφαιρέθηκε ο πυρήνας (κουκούτσι), και μετά τη ζύγιση, η σάρκα του ελαιοκάρπου τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης για την απομάκρυνση της υγρασίας. Η μέθοδος λυοφιλοποίησης είναι μία τεχνική παρόμοια με την αφυδάτωση. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το δείγμα ψύχεται και το στερεό νερό (πάγος) εξαχνώνεται. Η εξάχνωση ολοκληρώνεται όταν το δείγμα είναι σε θερμοκρασία μικρότερη από 0 °C, και τοποθετείται σε συσκευή κενού υπό πίεση 4,7mm Hg. Η χαμηλή θερμοκρασία κρατά το νερό στην στερεή του κατάσταση και η επίσης χαμηλή ατμοσφαιρική πίεση επιτρέπει στα μόρια του νερού να διαφεύγουν γρήγορα ως ατμοί και να αφυδατώνουν το δείγμα. Με την μέθοδο αυτή αποφεύγεται η διάσπαση συστατικών του δείγματος ή άλλη διεργασία που υποβοηθείται από την αύξηση της θερμοκρασίας.

Στην συνέχεια το δείγμα κατεργάστηκε με υγρό N<sub>2</sub> και κονιοποιήθηκε για την καλύτερη δυνατή εκχύλιση. Τέλος, το δείγμα τοποθετήθηκε σε συσκευή Soxhlet για 10 ώρες στους 50°C με 250 ml πετρελαϊκό αιθέρα. Το εκχύλισμα αποστάχθηκε εν κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη.

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ Β**

Για την εκχύλιση των γλυκεριδίων από τον ελαιόκαρπο χρησιμοποιήθηκε και μια νέα μέθοδος (B). Σε κάθε δείγμα αφαιρέθηκε ο πυρήνας. Η σάρκα του ελαιοκάρπου, ζυγίστηκε και τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης για την απομάκρυνση της υγρασίας. Στην συνέχεια το δείγμα κατεργάστηκε με υγρό N<sub>2</sub> και κονιοποιήθηκε. Μετά την λειοτρίβηση, η σκόνη τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη με 250ml πετρελαϊκό αιθέρα σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύτηκε για

24 ώρες. Τέλος ακολούθησε διήθηση με διηθητικό χαρτί και το εκχύλισμα αποστάχθηκε εν κενό για την απομάκρυνση του διαλύτη.

### **3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΑΠΟ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΕΜΠΟΡΙΟΥ**

Χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης πολυφαινολών από τον ελαιόκαρπο.

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ 1**

Για την εκχύλιση των πολυφαινολών από επιτραπέζιο ελαιόκαρπο εμπορίου, αφαιρέθηκε ο πυρήνας. Η σάρκα του, αφού ζυγίστηκε, τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης για την απομάκρυνση της υγρασίας. Στην συνέχεια έγινε κατεργασία του δείγματος με υγρό N<sub>2</sub> και λειοτρίβηση με σκοπό την παραλαβή σκόνης. Εκχυλίστηκε 1 g σκόνης 3 φορές με 15 ml αιθανόλη/ νερό (80:20, v:v), η οποία περιέχει 0,5% κ.β Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και η αιθανόλη εξατμίστηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε 8 ml νερό και εκχυλίστηκε 2 φορές με 15 ml πετρελαϊκό αιθέρα για την απομάκρυνση του χρώματος και του μεγαλύτερου μέρους των λιπιδίων. Έπειτα στην υδατική φάση προστέθηκε διάλυμα μεθανόλης 20% v/v, το οποίο περιείχε 20% θειϊκό αμμώνιο και 2% μεταφωσφορικό οξύ, για οξύνιση και αύξηση της ιοντικής ισχύος. Οι πολυφαινόλες λήφθηκαν με εκχύλιση του διαλύματος 4 φορές με 20ml οξικού αιθυλεστέρα. Τα εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και προστέθηκε άνυδρο θειϊκό νάτριο για απομάκρυνση της υγρασίας<sup>112</sup>. Μετά από διήθηση σε φίλτρο χαρτιού, ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό και στο εναπομένον στερεό προστέθηκε το εσωτερικό πρότυπο της κυκλοεξανόλης, το αντιδραστήριο φωσφιτυλίωσης και ελήφθη φάσμα <sup>31</sup>P-NMR.

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ 2**

Για την εκχύλιση των πολυφαινολών από επιτραπέζιο ελαιόκαρπο εμπορίου χρησιμοποιήθηκε και μια δεύτερη μέθοδος. Σε κάθε δείγμα αφαιρέθηκε

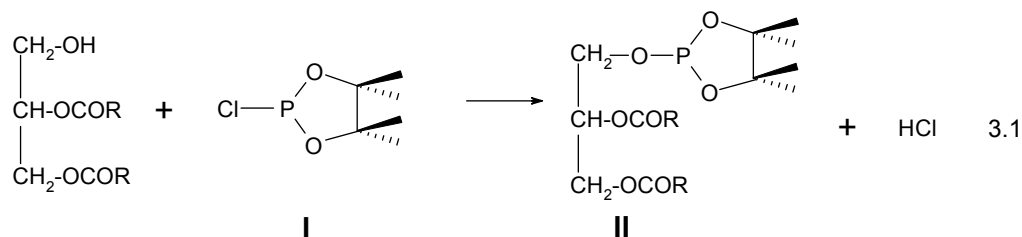
ο πυρήνας. Η σάρκα του ελαιοκάρπου, αφού ζυγίστηκε, τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης για την απομάκρυνση της υγρασίας. Στην συνέχεια το δείγμα κατεργάστηκε με υγρό N<sub>2</sub> και λειοτριβήθηκε με σκοπό την παραλαβή σκόνης. Τοποθετήθηκε 1 g σκόνης σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκε για 1 λεπτό με 20 ml μεθανόλη 80% (v/v). Το διάλυμα διηθήθηκε σε χωνί Buchner και η στερεά μάζα εκχυλίστηκε για δεύτερη φορά με 20 ml μεθανόλη 80%. Τα διηθήματα ενώθηκαν και εκχυλίστηκαν με 20 ml κ-εξάνιο<sup>113</sup>. Η υδατική φάση απομονώθηκε και ο διαλύτης αποστάχθηκε υπό κενό. Στο στερεό υπόλειμμα προστέθηκε το εσωτερικό πρότυπο της κυκλοεξανόλης, το αντιδραστήριο φωσφυλιώσεως και ελήφθη φάσμα <sup>31</sup>P-NMR.

### **3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ, ΣΤΕΡΟΛΩΝ, ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>31</sup>P NMR**

Στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR έχει αναπτυχθεί μια νέα αναλυτική μέθοδος για την ανίχνευση ησσόνων συστατικών του ελαιοκάρπου και ελαιολάδου (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, στερόλες, πολυφαινόλες). Η μέθοδος βασίζεται στην *in situ*, φωσφυλιώση των συστατικών του ελαιοκάρπου και ελαιολάδου που έχουν ελεύθερα υδροξύλια ή καρβοξυλικές ομάδες, με κατάλληλο αντιδραστήριο φωσφόρου και στη συνέχεια ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών γίνεται με τη φασματοσκοπία του πυρήνα <sup>31</sup>P NMR.

Ειδικότερα, η νέα τεχνική βασίζεται<sup>114</sup> στην αντικατάσταση των όξινων υδρογόνων χαρακτηριστικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια) με το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξαφωσφολάνιο (I), σύμφωνα με την αντίδραση (2.2), και τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR του πυρήνα φωσφόρου-31 για την ταυτοποίηση των φωσφυλιωμένων παραγώγων (II). Για τα διγλυκερίδια η αντίδραση φωσφυλιώσεως είναι:





Η αντίδραση γίνεται σε ήπιες συνθήκες (εντός του σωλήνα NMR σε θερμοκρασία δωματίου), είναι ποσοτική και ολοκληρώνεται σε λιγότερο από 15 λεπτά. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο, την κυκλοεξανόλη.

### 3.6 ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ $^{31}\text{P}$ -NMR

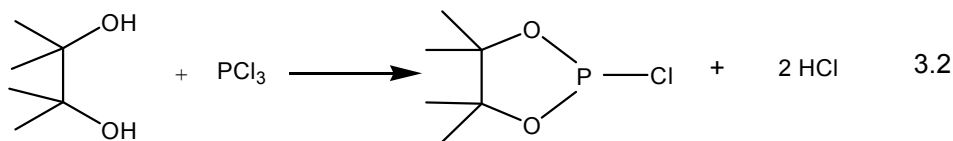
Για την λήψη των φασμάτων  $^{31}\text{P}$ -NMR, παρασκευάστηκαν, το αντιδραστήριο φωσφιτυλίωσης και το πρότυπο διάλυμα της κυκλοεξανόλης.

#### 3.6.1 Παρασκευή αντιδραστήριου φωσφιτυλίωσης

Το αντιδραστήριο 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμέθυλο διοξα-φωσφολάνιο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο της βιβλιογραφίας, από την αντίδραση της πινακόλης με τριχλωριούχο φωσφόρο (εξ. 3.1)<sup>114</sup>. Στο εργαστήριο μας έγιναν κάποιες αλλαγές με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Αντί για βενζόλιο και τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιήθηκε εξάνιο και πυριδίνη.

Αναλυτικά, η παρασκευή του αντιδραστήριου έχει ως εξής:  
σε δίλαιο σφαιρική φιάλη των 250 ml με ψυκτήρα και προσθετική χοάνη των 100 ml προστέθηκαν 20 ml  $\text{PCl}_3$  (0,1 mol=8.7 ml) διαλυμένα σε 180 ml n-εξανίου. Σε μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 23,7 gr πινακόλης, τα οποία διαλύθηκαν σε 32 ml πυριδίνης και 150 ml εξανίου. Η προσθήκη του διαλύματος πινακόλης γίνεται στάγδην, για μία ώρα υπό ανάδευση σε λουτρό πάγου γιατί η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το μείγμα αφήνεται να αντιδράσει για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διηθήθηκε (με φίλτρο χαρτιού). Ακολουθεί έκπλυση του λευκού ιζήματος ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}\cdot\text{Cl}$ ) που έχει σχηματιστεί με 100 ml εξάνιο. Το

εξάνιο απομακρύνεται με απόσταξη από το διήθημα στους 30 °C και κατόπιν γίνεται απόσταξη του προϊόντος σε αντλία κενού. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν ~45% σε σύγκριση με το 19% της μεθόδου της βιβλιογραφίας.



### 3.6.2 Παρασκευή πρότυπου διαλύματος

Σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml ζυγίστηκαν 33,75 mg κυκλοεξανόλης (14.47 μM). Σε άλλο φιαλίδιο ζυγίστηκαν 1,5 mg Cr(acac)<sub>3</sub> (0.165 μM), και προστέθηκαν 16 ml ξηρής πυριδίνης και 10 ml CDCl<sub>3</sub> (1,6:1 v/v). Το μείγμα των διαλυτών αναδεύτηκε και προστέθηκε στην ογκομετρική φιάλη. Το πρότυπο διάλυμα προστατεύθηκε από την υγρασία με την προσθήκη 5A μοριακών κόσκινων (molecular sieves).

### 3.6.3 Αντίδραση φωσφιτυλίωσης

Ποσότητα 100-150 mg του εκχυλίσματος των διγλυκεριδίων του ελαιοκάρπου ζυγίστηκε σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm, και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,3 ml του πρότυπου διαλύματος. Κατόπιν προστέθηκαν 20 μl αντιδραστήριου 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξα-φωσφολανίου (I). Το μείγμα αφέθηκε να αντιδράσει 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη των φασμάτων <sup>31</sup>P - NMR.

Κατά την απομόνωση των πολυφαινολικών ουσιών από επιτραπέζιο ελαιόκαρπο του εμπορίου, το στερεό υπόλειμμα (μετά από τις εκχυλίσεις) διαλύθηκε σε 0,6 ml του πρότυπου διαλύματος. Κατόπιν προστέθηκαν 90 μl αντιδραστήριου 2-χλώρο-4,4,5,5-τετραμεθυλο-διοξα-φωσφολανίου (I). Το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα NMR διαμέτρου 5 mm, όπου και αφέθηκε να αντιδράσει 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τη λήψη φάσματος <sup>31</sup>P - NMR.

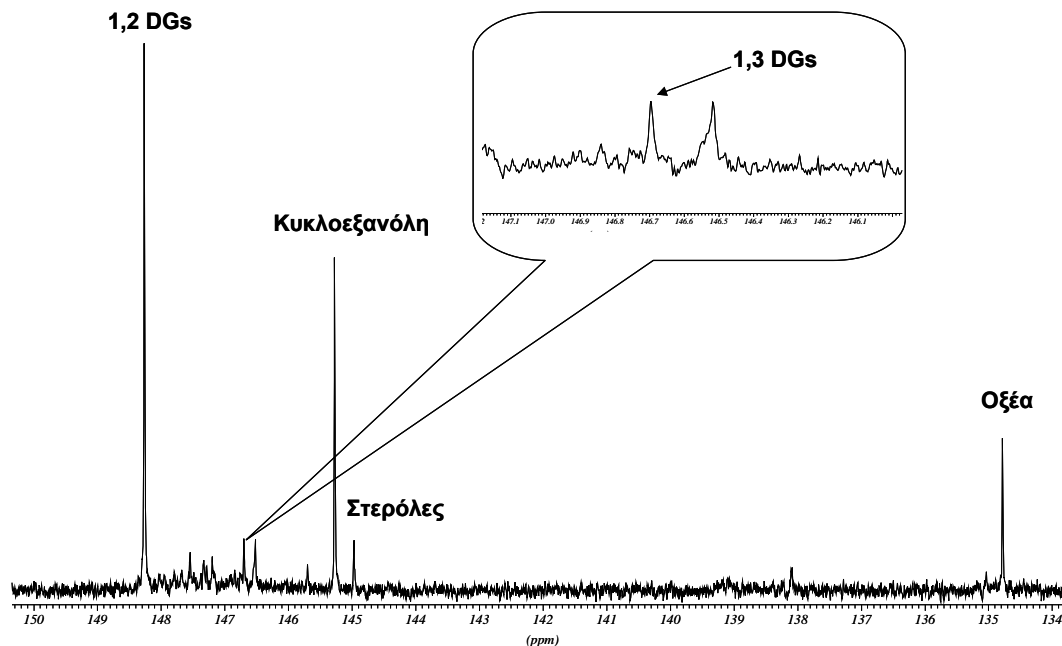
### 3.6.4 Φάσματα NMR

Όλα τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker AMX500 λειτουργικής συχνότητας 500.1 MHz για το πρωτόνιο και 202.2 MHz για τον  $^{31}\text{P}$ . Η θερμοκρασία στο δοκιμαστή ήταν  $30 \pm 1$  °C.

#### Φάσματα $^{31}\text{P}$ NMR

Για την ποσοτική ανάλυση με την φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$  NMR, θα πρέπει να αποκλειστεί το φαινόμενο Nuclear Overhauser Enhancement (NOE), δηλαδή η αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου μεταξύ των πυρήνων του φωσφόρου-31 και των γειτονικών πρωτονίων στο μόριο μιας ένωσης. Η ύπαρξη NOE προκαλεί μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών με αποτέλεσμα να μην είναι ποσοτικά τα αντίστοιχα φάσματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική αποσύζευξη αντίστροφης εισόδου (inverse gated decoupling). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική ο αποσυζευκτής πρωτονίων λειτουργεί μόνο κατά την διάρκεια του χρόνου ανάκτησης του σήματος, ενώ παραμένει κλειστός σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος. Για την ελάττωση των χρόνων αποδιέγερσης  $T_1$  των πυρήνων  $^{31}\text{P}$  χρησιμοποιήθηκε το παραμαγνητικό αντιδραστήριο  $\text{Cr}(\text{acac})_3$ , με αποτέλεσμα οι χρόνοι αποδιέγερσης να μην υπερβαίνουν τα 5 sec. Ο χρόνος αναμονής ήταν 30 s ίσως περίπου με  $5T_1^{\text{max}}$ , όπου  $T_1^{\text{max}}$  ο μεγαλύτερος χρόνος αποδιέγερσης σπιν-πλέγμα του φωσφόρου (5s για το εσωτερικό πρότυπο της κυκλοεξανόλης). Οι τυπικοί παράμετροι ενός πειράματος  $^{31}\text{P}$  NMR για ποσοτικές μετρήσεις ήταν: εύρος παλμού  $90^\circ$  12.5  $\mu\text{s}$ , φασματικό εύρος 48.41 ppm, χρόνος αναμονής 30 s, αριθμός δεδομένων (data points) 16 K. Για κάθε φάσμα συλλέχθηκαν 64 FIDs (192 FIDs στην περίπτωση των πολυφαινολών στον επιτραπέζιο ελαιόκαρπο). Πριν από το μετασχηματισμό Fourier, η ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) πολλαπλασιάστηκε με μία εκθετική συνάρτηση με εκθέτη  $\text{lb}=1$  Hz και τα δεδομένα αυξήθηκαν με την προσθήκη μηδενικών 32 K στη μνήμη του υπολογιστή. Πριν από την ολοκλήρωση, η γραμμή βάσης του φάσματος διορθώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πολυώνυμο τέταρτης τάξης και έγινε διόρθωση φάσης. Οι χημικές μετατοπίσεις σε ένα φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR έχουν ως αναφορά την κορυφή η οποία οφείλεται στην φωσφιτυλίωση του νερού (υγρασία του δείγματος), η οποία παρουσιάζει μία στενή κορυφή σε  $\delta$  132.20.

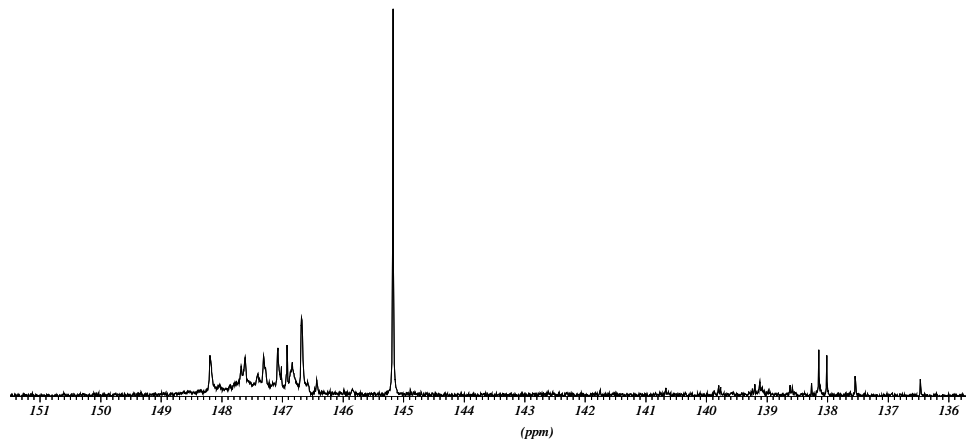
Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζεται το φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR ενός εκχυλίσματος διγλυκεριδίων (μέθοδος απομόνωσης A) στην περιοχή που απορροφούν τα φωσφυτιλιωμένα διγλυκερίδια, οι στερόλες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα.



**Σχήμα 3.1** Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR, στα 202MHz, εκχυλίσματος διγλυκεριδίων ελαιοκάρπου.

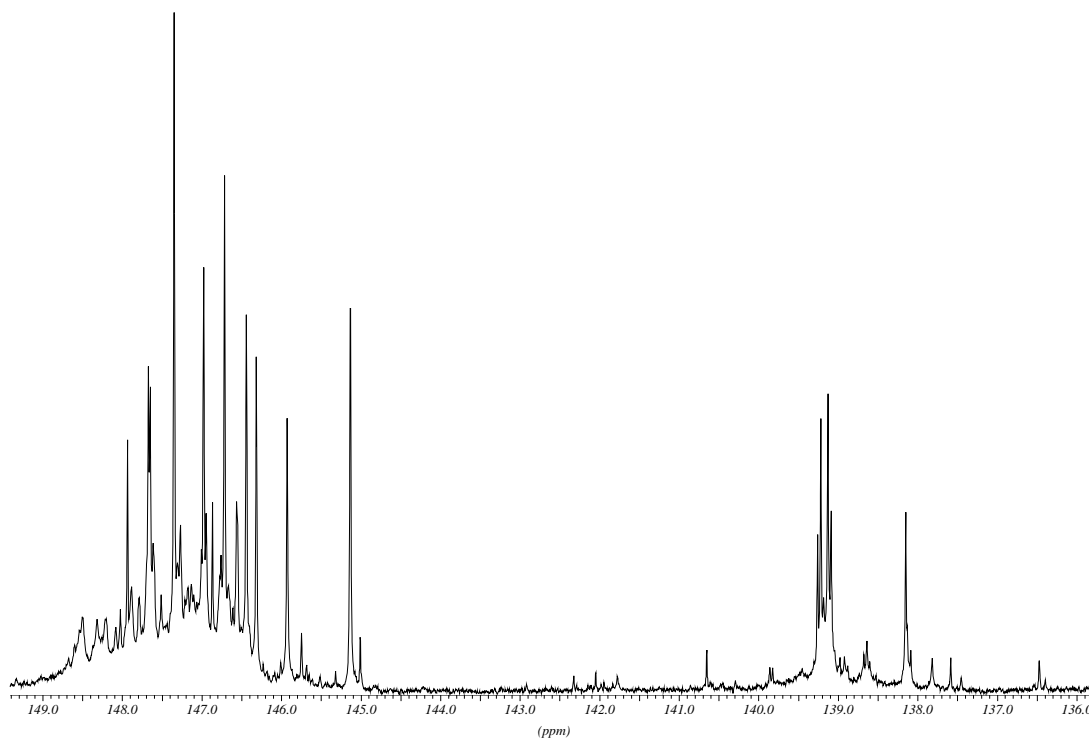
Για την μέθοδο απομόνωσης B το φάσμα που λαμβάνεται είναι πανομοιότυπο με αυτό της μεθόδου A, αν και παρουσιάζει διαφορές ως προς τις εντάσεις των κορυφών των φωσφυτιλιωμένων παραγώγων. Η σύγκριση των δύο μεθόδων απομόνωσης των διγλυκεριδίων θα συζητηθεί παρακάτω.

Στο σχήμα 3.2 παρουσιάζεται το φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR ενός εκχυλίσματος πολυφαινολών με τη μέθοδο απομόνωσης 1, στην περιοχή που απορροφούν τα φωσφυτιλιωμένα παράγωγα των πολυφαινολών.



**Σχήμα 3.2** Φάσμα <sup>31</sup>P-NMR στα 202MHz εκχυλίσματος πολυφαινολών επιτραπέζιου ελαιοκάρπου με την μέθοδο 1.

Στο σχήμα 3.3 παρουσιάζεται το φάσμα <sup>31</sup>P-NMR ενός εκχυλίσματος πολυφαινολών με τη μέθοδο απομόνωσης 2. Η μέθοδος 2 είναι πιο αποτελεσματική γιατί η εκχύλιση με μίγμα μεθανόλης/ νερού (80:20, v:v) θεωρείται ότι παραλαμβάνει σχεδόν όλες τις πολυφαινόλες<sup>15</sup>.

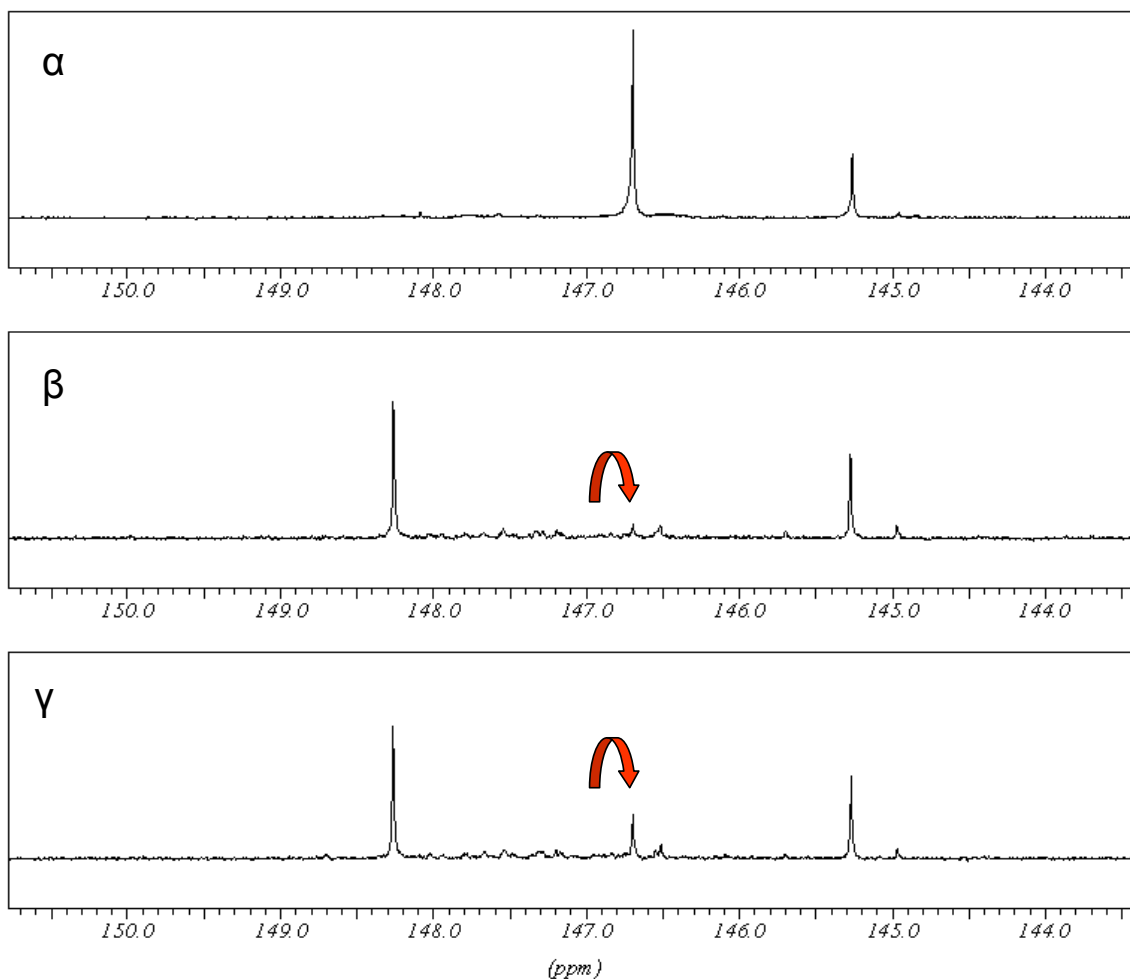


**Σχήμα 3.3** Φάσμα <sup>31</sup>P-NMR, στα 202MHz, εκχυλίσματος πολυφαινολών επιτραπέζιου ελαιοκάρπου με την μέθοδο 2.

### 3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ 1,3-ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΓΝΩΣΤΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

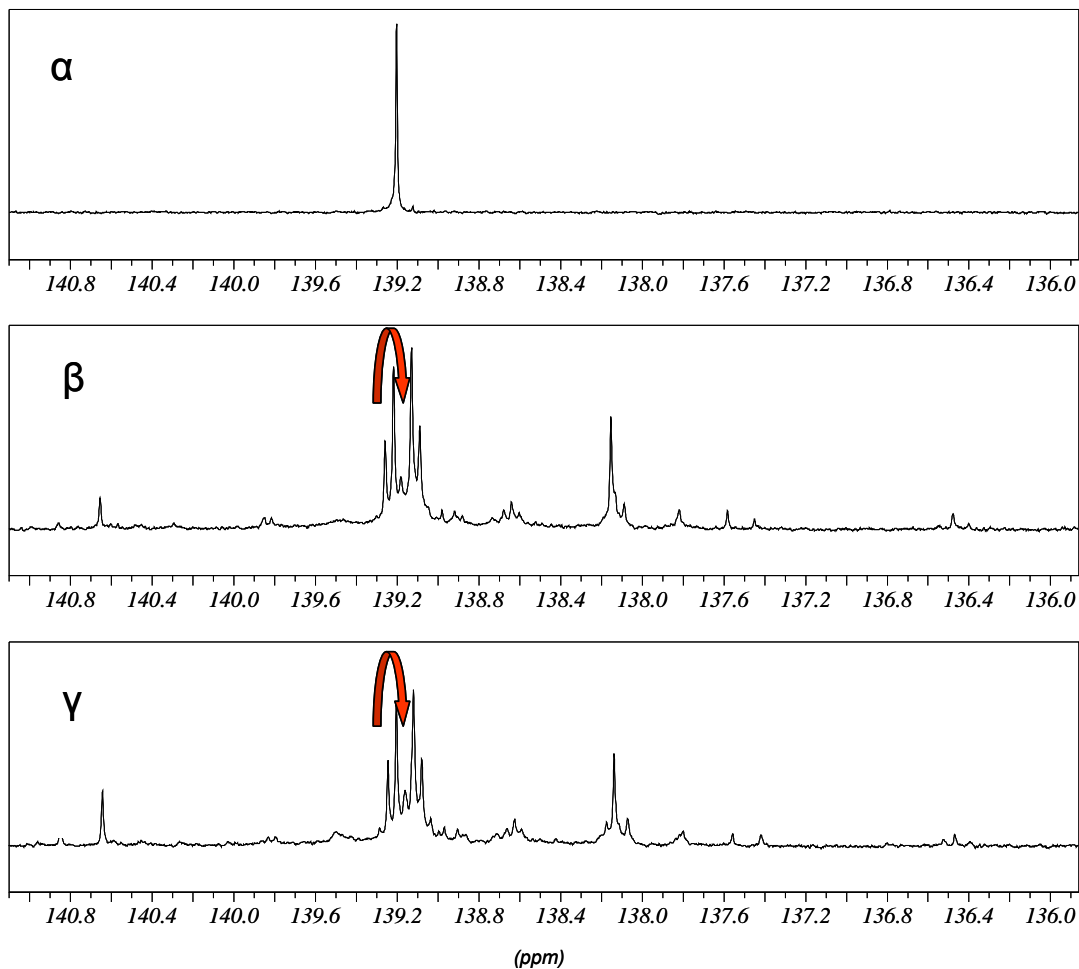
Μετά την λήψη του φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR και την επεξεργασία αυτού, παρατηρήθηκαν ορισμένες κορυφές άγνωστης προέλευσης. Για τον προσδιορισμό αυτών των κορυφών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων (standard addition method), προτύπων 1,3-διγλυκεριδίων και πολυφαινολών. Κατά την μέθοδο αυτή λαμβάνεται αρχικά φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR και στην συνέχεια προστίθεται γνωστή ποσότητα διαλύματος πρότυπης ουσίας και λαμβάνεται εκ νέου το φάσμα. Από την αύξηση της έντασης των κορυφών και την ολοκλήρωση αυτών, μπορεί να εξακριβωθεί εάν η πρότυπη ένωση βρίσκεται στο εκχύλισμα ή όχι. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ποσότητα των προτύπων ουσιών διαλύθηκε σε 5 ml διαλύματος  $\text{CDCl}_3$ /πυριδίνη (10/16 v/v). Ενδεικτικά παρουσιάζονται φάσματα στα οποία προστέθηκαν πρότυπες ουσίες που υπήρχαν ή όχι, στα εκχυλίσματα των πολυφαινολών του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου.

Στο σχήμα 3.4 παρουσιάζονται τα φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR (α) πρότυπο 1,3-διγλυκερίδιο, στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή του φωσφιτυλιωμένου υδροξυλίου σε  $\delta$  146,69, (β) εκχύλισμα διγλυκεριδίων από τον ελαιοκάρπο και (γ) εκχύλισμα διγλυκεριδίων στο οποίο προστέθηκε διάλυμα πρότυπης ένωσης 1,3-διγλυκερίδιο, συγκέντρωσης 1,29  $\mu\text{mol}/10\text{ml}$ . Ολοκληρώνοντας την κορυφή στα 146,69 ppm στο φάσμα (β) και στο φάσμα (γ) μπορούμε να διακρίνουμε εάν η κορυφή αυτή ανήκει στα 1,3-διγλυκερίδια. Πράγματι, το ολοκλήρωμα στο φάσμα (β) αντιστοιχεί σε 0,39  $\mu\text{mol}$  και στο φάσμα (γ) αντιστοιχεί σε 1,68  $\mu\text{mol}$ .



**Σχήμα 3.4** Φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR: (α) πρότυπο 1,3-DGs, (β) εκχύλισμα διγλυκεριδίων, (γ) εκχύλισμα διγλυκεριδίων του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη πρότυπου 1,3-DGs.

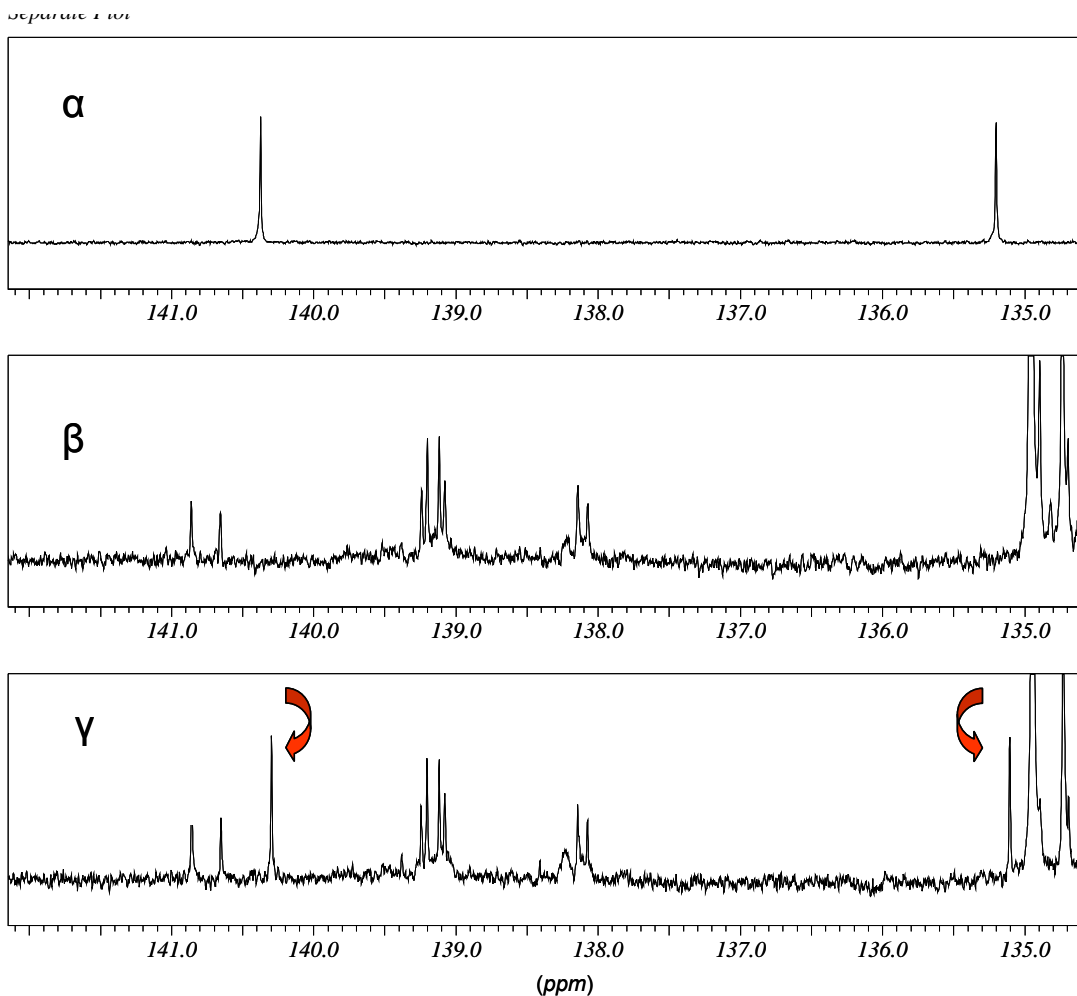
Στο σχήμα 3.5 παρουσιάζονται φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR (α) της πρότυπης ένωσης βανιλικό οξύ, στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή του φωσφιτιλιωμένου υδροξυλίου σε  $\delta$  139,18, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου και (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών ελαιοκάρπου, στο οποίο προστέθηκαν 60  $\mu\text{l}$  διαλύματος πρότυπης ένωσης βανιλικού οξέος συγκέντρωσης 0,48  $\mu\text{mol}/60\mu\text{l}$ . Ολοκληρώνοντας την κορυφή στα 139,18 ppm στο φάσμα (β) και στο φάσμα (γ) μπορούμε να διακρίνουμε εάν η κορυφή αυτή όντως ανήκει στο βανιλικό οξύ ή όχι. Πράγματι, το ολοκλήρωμα στο φάσμα (β) αντιστοιχεί σε 0,31  $\mu\text{mol}$  και στο φάσμα (γ) αντιστοιχεί σε 0,79  $\mu\text{mol}$ . Επομένως η κορυφή στα 139,18 ppm ανήκει στο βανιλικό οξύ.



**Σχήμα 3.5** Φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR: (α) πρότυπο βανιλικό οξύ, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών, (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη πρότυπου βανιλικού οξέος.

Στο σχήμα 3.6 παρουσιάζονται φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR (α) της πρότυπης ένωσης 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ, στο οποίο εμφανίζεται η κορυφή του φωσφιτυλιωμένου υδροξυλίου σε  $\delta$  140,30 και του φωσφιτυλιωμένου καρβοξυλίου σε  $\delta$  135,10, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου, (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών στο οποίο προστέθηκαν 20 μl διαλύματος πρότυπης ένωσης 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικού οξέος, συγκέντρωσης 0,51 μmol/20μl. Στο φάσμα (γ) παρατηρούμε την εμφάνιση των δύο κορυφών που αντιστοιχούν στις κορυφές του 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικού οξέος, οι οποίες όμως δεν εμφανίζονται στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR (β) του εκχυλίσματος των πολυφαινολών. Επομένως, συμπεραίνεται με ασφάλεια ότι το εκχύλισμα των πολυφαινολών δεν περιέχει 3-υδροξυ-4-μεθοξυκινναμικό οξύ.





**Σχήμα 3.6** Φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR: (α) πρότυπο 3-υδροξυ-4-μεθοξικινναμμικό οξύ, (β) εκχύλισμα πολυφαινολών, (γ) εκχύλισμα πολυφαινολών του ελαιοκάρπου μετά την προσθήκη του πρότυπου 3- υδροξυ 4-μεθοξυ κινναμμικού οξέος.

### 3.8 ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

#### ► Ποσοτικός προσδιορισμός διγλυκεριδίων

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων κάνουμε τις εξής παραδοχές:

- Ένα mol διγλυκεριδίων αντιδρά με ένα mol αντιδραστηρίου,
- Το οξύ που εστεροποιεί το μόριο της γλυκερόλης είναι το ελαιικό οξύ δηλαδή τα διγλυκερίδια είναι 1,2- ή και 1,3-διολεΐνη,
- Η περιεκτικότητα (% κ.β) των διγλυκεριδίων υπολογίζεται από την σχέση :

$$\text{Διγλυκερίδια (\% κ.β)} = \frac{\text{---} \times A \times 10^{-3}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (3.3)$$

όπου,

$I_{\text{διγλυκερίδια}} (I_{\text{DG}})$ : Η τιμή του ολοκληρώματος των κορυφών των φωσφιτυλιωμένων διγλυκεριδίων στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR

$I_{\text{CH}}$ : Η τιμή του ολοκληρώματος της φωσφιτυλιωμένης πρότυπης ουσίας (κυκλοεξανόλης) στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR

A: Η ποσότητα του πρότυπου διαλύματος σε mmol

$M_{\text{διολεΐνη}}$ : Μοριακό βάρος διολεΐνης (621)

$M_{\text{ελαιολάδου}}$ : Μάζα ελαιολάδου

#### ► Προσδιορισμός οξύτητας

Η οξύτητα του ελαιοκάρπου προσδιορίζεται από τη κορυφή σε  $\delta$  134.80 στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR, η οποία οφείλεται στη φωσφιτυλίωση των ομάδων  $-\text{COOH}$  των ελεύθερων αλειφατικών οξέων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται σύμφωνα με τον επόμενο μαθηματικό τύπο, ο οποίος εκφράζει την % οξύτητα σε ελαϊκό οξύ:

$$\text{Οξύτητα (\%)} = \frac{\text{---} \times A \times 10^{-3} M_{\text{ελαικού οξέος}}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (3.4)$$

$I_{\text{οξέα}}$ : Η τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR

$M_{\text{ελαικού οξέος}}$ : Μοριακό βάρος ελαϊκού οξέος (282)

#### ► Ποσοτικός προσδιορισμός στερολών

Το ποσοστό των συνολικών στερολών υπολογίζεται από την κορυφή σε  $\delta$  144,98 στο φάσμα, σύμφωνα με τη σχέση :

$$\text{Στερόλες (\%)} = \frac{\frac{I_{\text{στερόλες}}}{I_{\text{CH}}} \times A \times 10^{-3}}{10 \times M_{\text{ελαιολάδου}}} \quad (3.5)$$

όπου,

$I_{\text{στερόλες}}$ : Η τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής στο φάσμα  $^{31}\text{P}$  NMR

$M_{\beta\text{-σιτοστερόλη}}$ : Μοριακό βάρος  $\beta$ -σιτοστερόλης (415)

Για τον υπολογισμό των στερολών χρησιμοποιείται η μοριακή μάζα της  $\beta$ -σιτοστερόλης, προσεγγιστικά, γιατί είναι η κύρια στερόλη στα έλαια

### ► Ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών

Για κάθε μια κορυφή που προσδιορίσαμε, υπολογίσαμε την περιεκτικότητα της ουσίας στην οποία αντιστοιχεί σε  $\mu\text{mol/g}$  και σε  $\mu\text{mol}/\text{ελιά}$ , σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$\Pi = \frac{I_{\text{ουσίας}}}{I_{\text{CH}}} \times A \quad \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) \quad (3.6)$$

$$\Pi = \frac{I_{\text{ουσίας}}}{I_{\text{CH}}} \times A \times W_{\varepsilon} \quad \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{ελιά}} \right) \quad (3.7)$$

όπου

$I_{\text{ουσίας}}$  : Η τιμή του ολοκληρώματος για την εκάστοτε φαινολική ένωση που προσδιορίζουμε στο φάσμα.

$W_{\varepsilon}$  : Το μέσο βάρος ανά ελιά.

$A$ : Η ποσότητα του πρότυπου διαλύματος σε  $\text{mmol}$ .

Να σημειωθεί ότι για την υδροξυτυροσόλη, οι εξισώσεις 3.6 και 3.7 διαιρούνται με το 2. Αυτό συμβαίνει, επειδή τα δυο φωσφιτυλιωμένα, αρωματικά υδροξύλια της υδροξυτυροσόλης παρουσιάζουν φάσμα τύπου AB (φάσμα δευτέρας τάξης) και όχι δυο διπλές κορυφές (φάσμα πρώτης τάξης)<sup>116</sup>.

$$\text{HTyr} = \frac{1}{2} \times \left( \frac{I_{\text{HTyr}}}{I_{\text{CE}}} \times A \right) \quad \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) \quad (3.8)$$

$$\text{HTyr} = \frac{1}{2} \times \left( \frac{I_{\text{HTyr}}}{I_{\text{CE}}} \times A \times W_{\varepsilon} \right) \quad \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{ελιά}} \right) \quad (3.9)$$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΣΤΟΝ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ

#### 4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 4.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΙΔΙΑ ΕΛΑΙΟΔΕΝΤΡΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ

Για αυτό το μέρος της εργασίας, μελετήθηκαν 8 δείγματα ελαιοκάρπου από τις περιοχές Σκαλάνι (4 δείγματα) και Κοκκίνη Χάνι (4 δείγματα). Η συγκομιδή του ελαιοκάρπου έγινε για κάθε περιοχή ανά 1 μήνα και για την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003. Όλοι οι ελαιοκάρποι ήταν της ίδιας ποικιλίας, Κορωνέϊκη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του βάρους του ελαιοκάρπου, για κάθε περιοχή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η μέτρηση του βάρους έγινε δυο φορές για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 4.1** Μεταβολή του βάρους (g) του ελαιοκάρπου κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003.

ΔΕΙΓΜΑ	ΒΑΡΟΣ (g $\pm$ 0,00005)
<b>ΣΚΑΛΑΝΙ</b>	
1	0,8222
2	1,3383
3	1,5371
4	1,3460
<b>ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ</b>	
5	0,6012
6	0,6865
7	0,7551
8	0,7483

Για τον υπολογισμό της υγρασίας του ελαιοκάρπου, το κάθε δείγμα ζυγίστηκε (2 φορές) και έπειτα τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης. Το βάρος του αναπροσδιορίστηκε και υπολογίστηκε η επί τοις % περιεκτικότητα του σε νερό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της υγρασίας του ελαιοκάρπου, για κάθε περιοχή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.2** Μεταβολή της υγρασίας του ελαιοκάρπου κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Δεκεμβρίου 2003.

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>% ΥΓΡΑΣΙΑ</b>
<b>ΣΚΑΛΑΝΙ</b>	
1	65,06
2	49,50
3	47,53
4	47,54
<b>ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ</b>	
5	59,58
6	57,56
7	59,10
8	61,38

Παρατηρούμε ότι εκτός, ίσως από το πρώτο δείγμα από το Σκαλάνι, η υγρασία παραμένει σχεδόν σταθερή για όλα τα δείγματα κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου. Αυτή η διαπίστωση συμφωνεί με την βιβλιογραφία<sup>117</sup>.

#### 4.1.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΩΝ, ΣΤΕΡΟΛΩΝ, ΚΑΙ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>31</sup>P-NMR

##### ΜΕΘΟΔΟΣ Α

Μελετήθηκαν 8 δείγματα ελαιοκάρπου από τις περιοχές Σκαλάκι (4 δείγματα) και Κοκκίνη Χάνι (4 δείγματα), όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος. Μετά την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος <sup>31</sup>P-NMR, πραγματοποιήθηκε η μαθηματική επεξεργασία σύμφωνα με τις εξισώσεις που έχουν περιγραφεί στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 3.3). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.3** Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DGs/TDG), ολικών ελεύθερων στερολών και οξύτητας (Μέθοδος Α).

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
<b>ΣΚΑΛΑΚΙ</b>						
1	2,39	0,06	2,45	0,98	0,16	0,13
2	2,41	0,16	2,57	0,94	0,12	0,09
3	2,05	0,14	2,19	0,94	0,12	0,02
4	1,75	0,13	1,88	0,93	0,12	0,09
<b>ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ</b>						
5	2,34	0,13	2,47	0,95	0,12	0,12
6	2,38	0,06	2,44	0,98	0,10	0,08
7	2,06	0,16	2,22	0,93	0,12	0,05
8	1,62	0,15	1,78	0,91	0,13	0,03

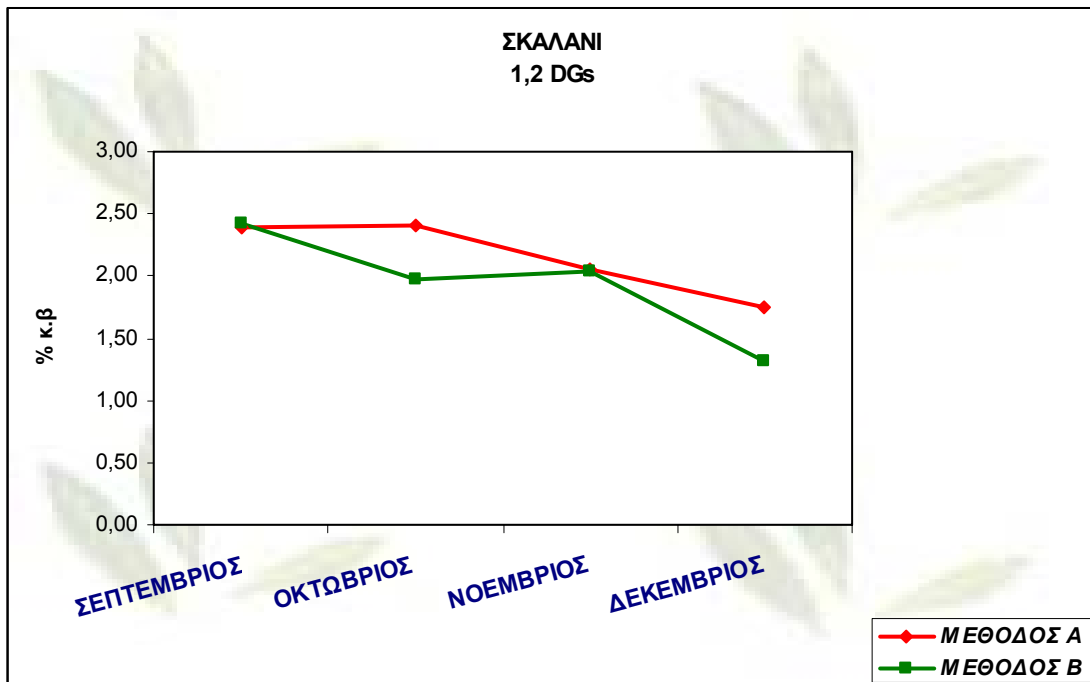
## ΜΕΘΟΔΟΣ Β

Μελετήθηκαν 8 δείγματα ελαιοκάρπου από τις περιοχές Σκαλάνι (4 δείγματα) και Κοκκίνη Χάνι (4 δείγματα), όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος. Μετά την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος  $^{31}\text{P-NMR}$ , πραγματοποιήθηκε η μαθηματική επεξεργασία σύμφωνα με τις εξισώσεις που έχουν περιγραφεί στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 3.3). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

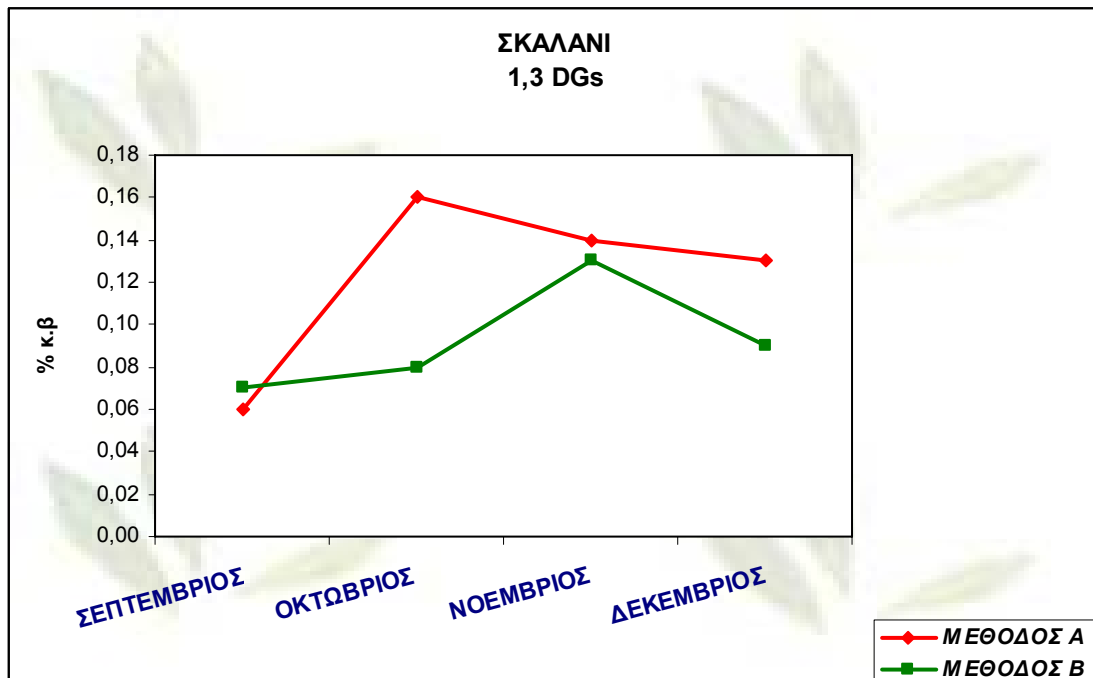
**Πίνακας 4.4** Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DG/TDG), ολικών ελεύθερων στερολών και οξύτητας (Μέθοδος Β)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
<b>ΣΚΑΛΑΝΙ</b>						
1	2,42	0,07	2,50	0,97	0,17	0,23
2	1,98	0,08	2,06	0,96	0,17	0,17
3	2,03	0,13	2,17	0,94	0,08	0,21
4	1,31	0,09	1,40	0,93	0,14	0,16
<b>ΚΟΚΚΙΝΗ ΧΑΝΙ</b>						
5	2,08	0,02	2,10	0,99	0,10	0,15
6	1,78	0,05	1,83	0,97	0,14	0,18
7	2,18	0,09	2,28	0,96	0,09	0,32
8	1,45	0,13	1,58	0,92	0,13	0,29

Τα σχήματα 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, απεικονίζουν την μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων, 1,3-διγλυκεριδίων, ολικών διγλυκεριδίων και του λόγου D, κατά την ωρίμανση για τις δυο μεθόδους Α και Β στην περιοχή Σκαλάνι.

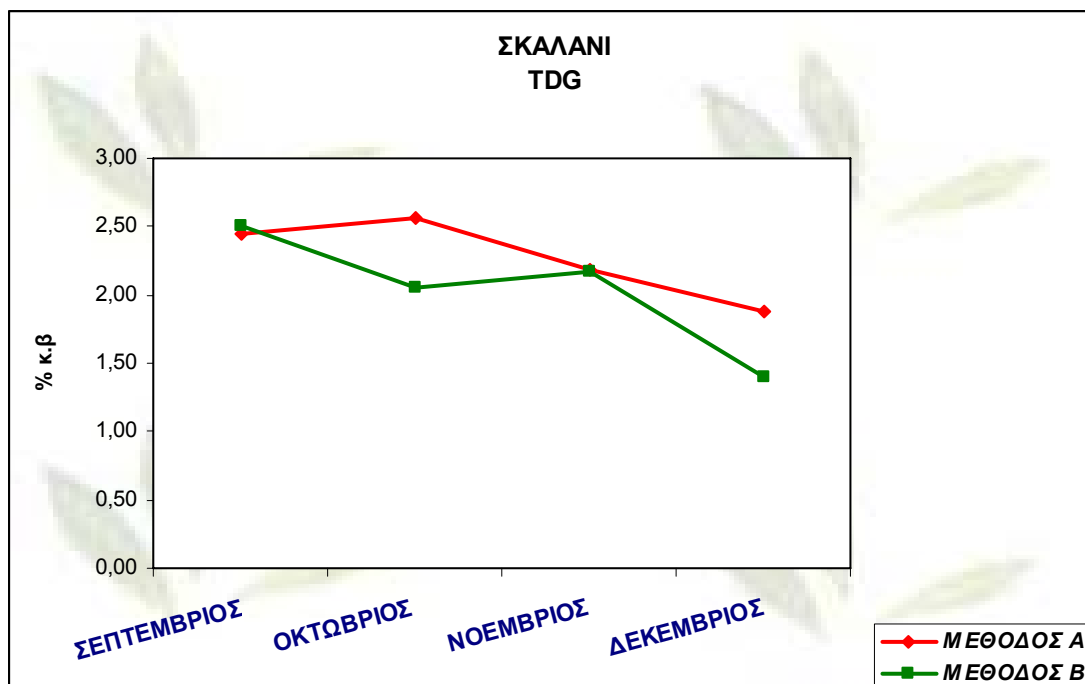


**Σχήμα 4.1** Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).

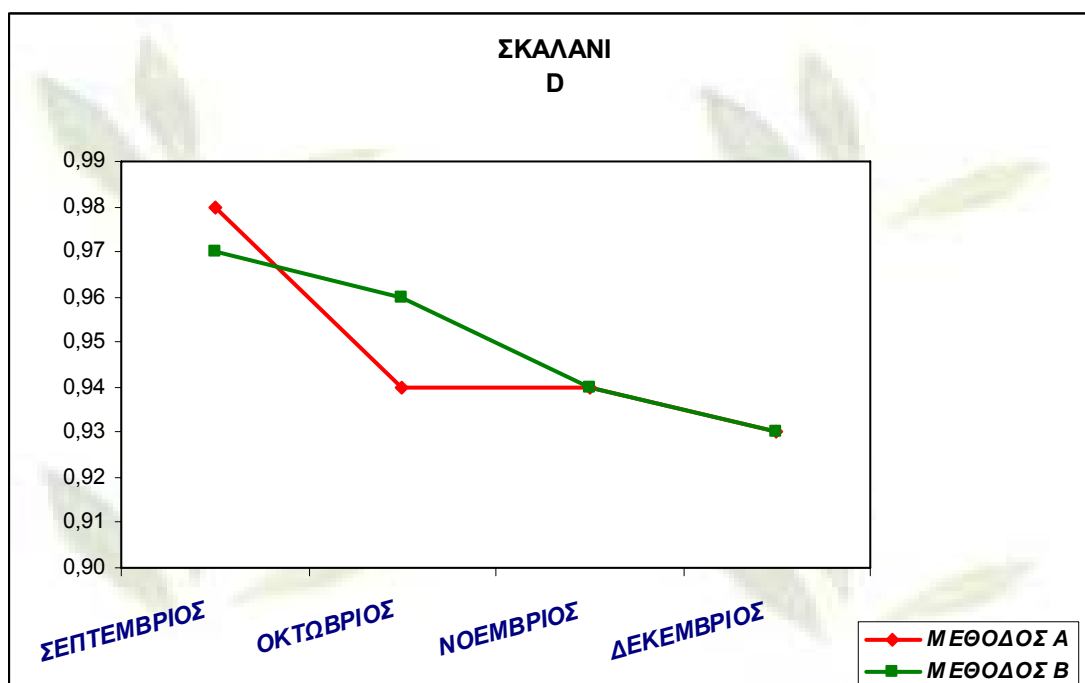


**Σχήμα 4.2** Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).



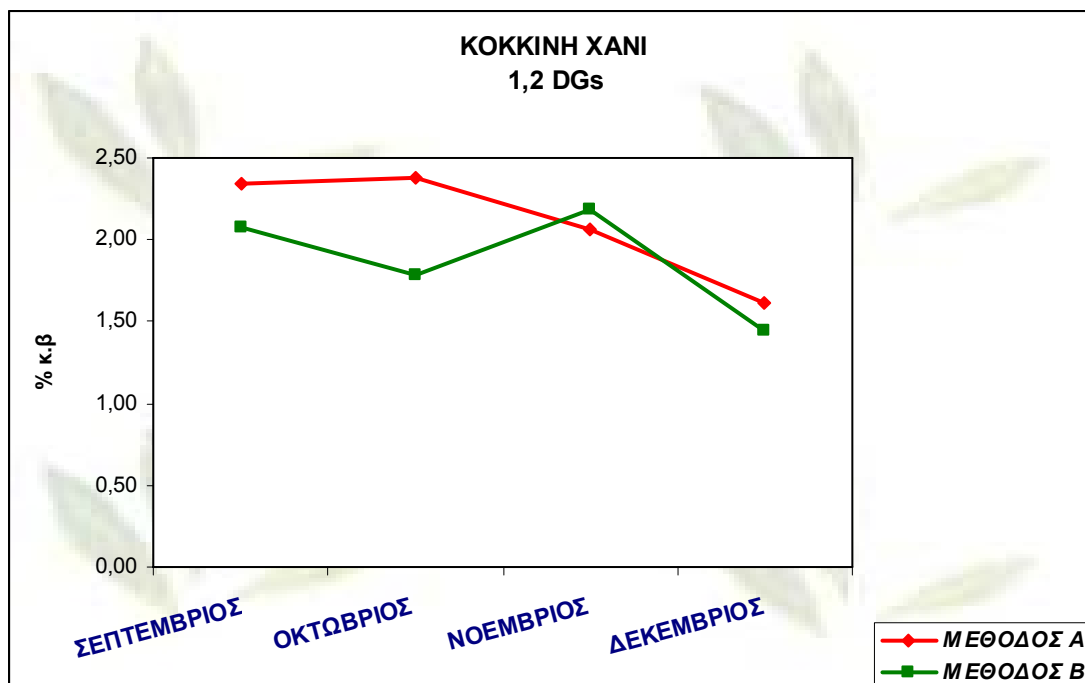


**Σχήμα 4.3** Μεταβολή της περιεκτικότητας των ολικών διγλυκεριδίων (TDGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).

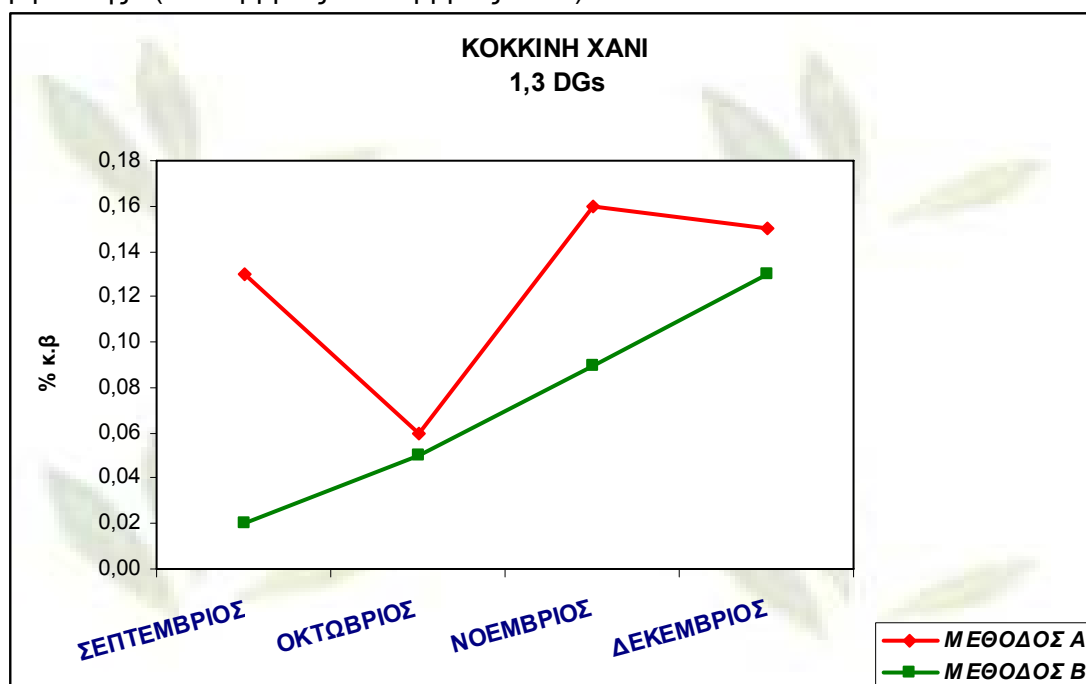


**Σχήμα 4.4** Μεταβολή της περιεκτικότητας του λόγου D (1,2-DGs/TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).

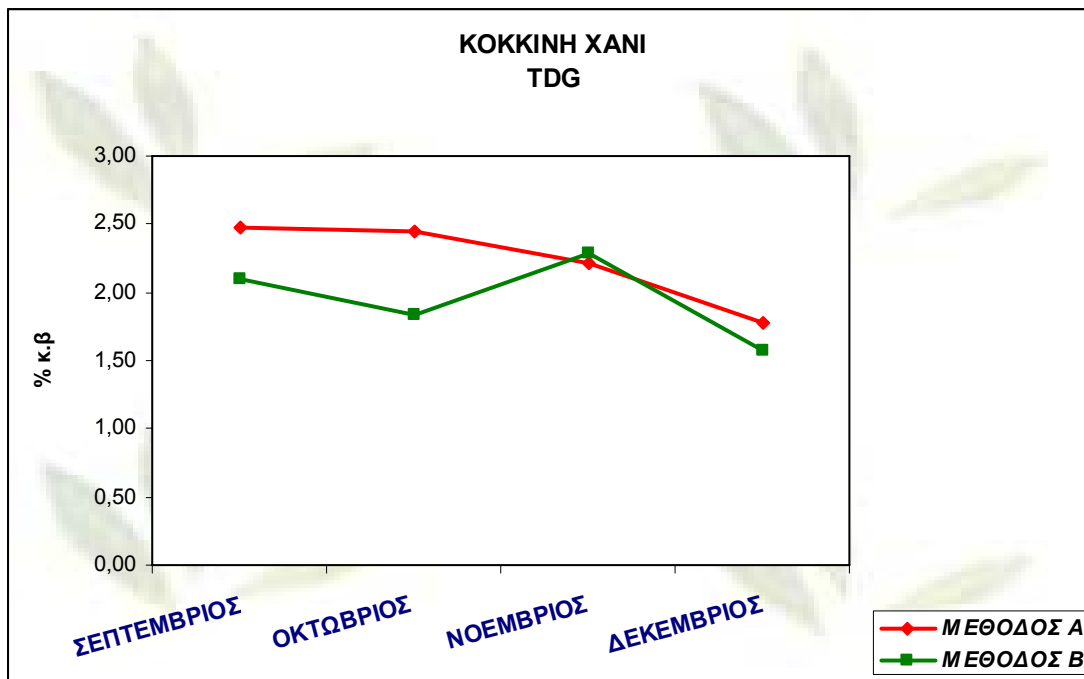
Τα σχήματα 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, απεικονίζουν την μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων, 1,3-διγλυκεριδίων, ολικών διγλυκεριδίων και του λόγου D, κατά την ωρίμανση για τις δυο μεθόδους A και B στην περιοχή Κοκκίνη Χάνι.



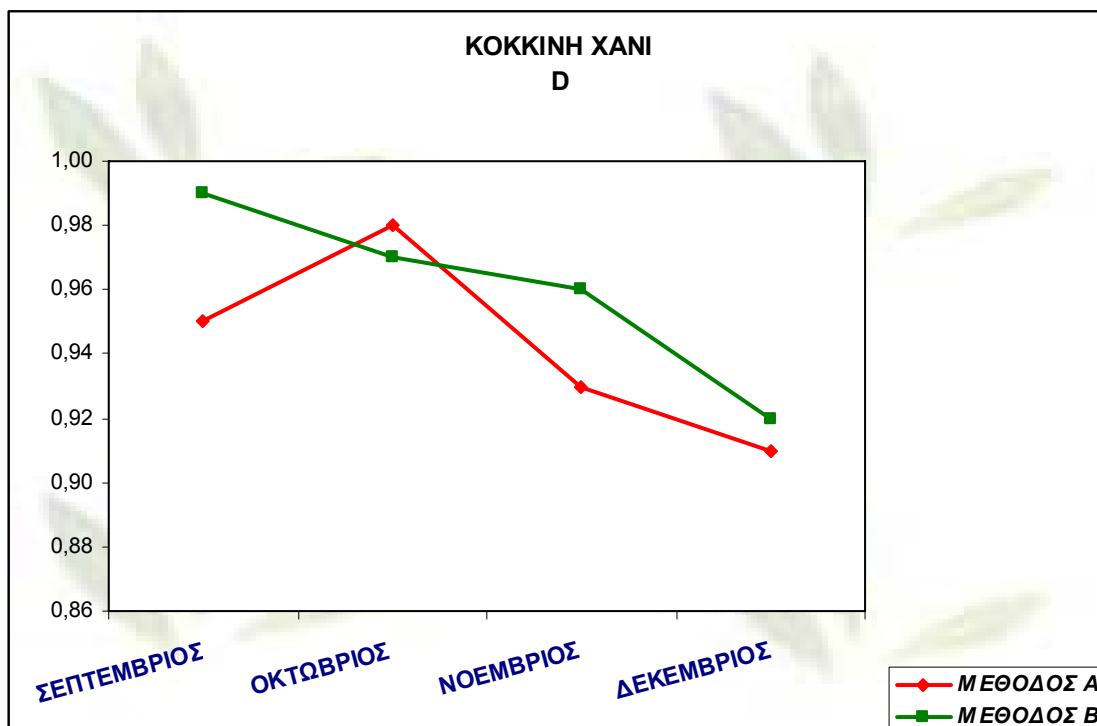
**Σχήμα 4.5** Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).



**Σχήμα 4.6** Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,3-διγλυκεριδίων (1,3-DGs), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους A και B, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).



**Σχήμα 4.7** Μεταβολή της περιεκτικότητας ολικών διγλυκεριδίων (TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).



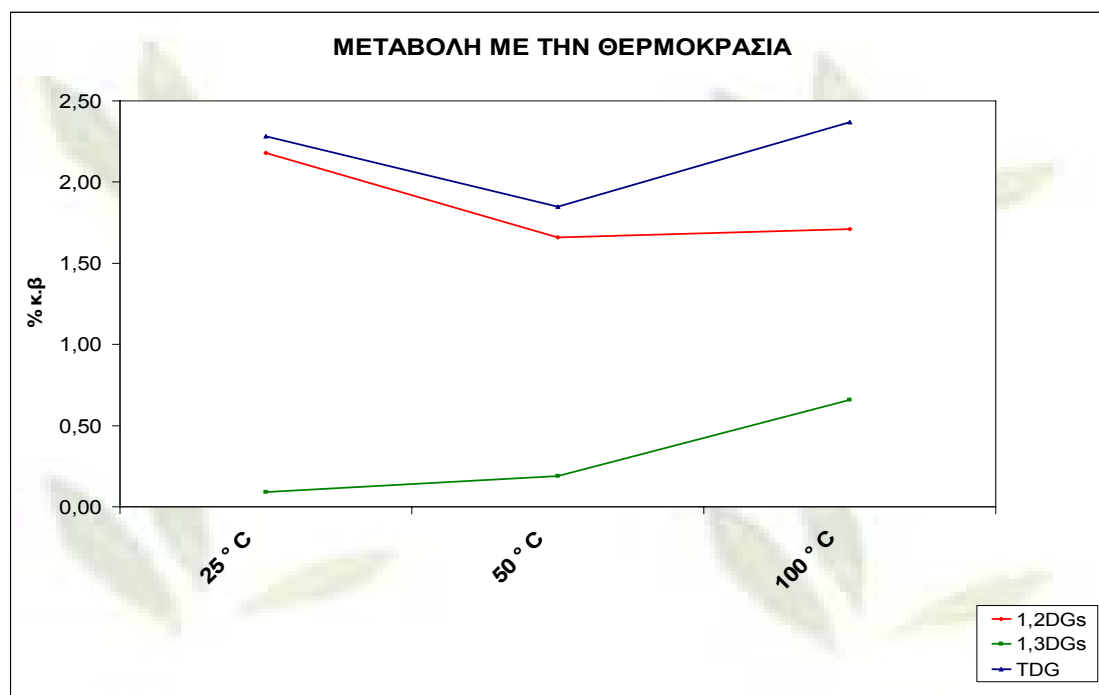
**Σχήμα 4.8** Μεταβολή του λόγου D (1,2-DGs/TDG), του ελαιοκάρπου από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, για τις δυο μεθόδους Α και Β, με τον χρόνο ωρίμανσης. (Σεπτέμβριος - Δεκέμβριος 2003).

Τέλος, ελήφθησαν φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR για το δείγμα 7 σε διάφορες θερμοκρασίες. Μετά την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR, και την μαθηματική επεξεργασία, τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.5** Περιεκτικότητα (% κ.β), 1,2-διγλυκεριδίων (1,2-DGs), 1,3 - ιγλυκεριδίων (1,3-DGs), ολικών διγλυκεριδίων (TDG), λόγος D (1,2-DGs/TDG), στερόλες και οξύτητα σε διάφορες θερμοκρασίες για το Δείγμα 7 (Μέθοδος Β).

7	1,2-DGs	1,3-DGs	TDGs	D	Στερόλες	Οξύτητα
25 °C	2,18	0,09	2,28	0,96	0,09	0,32
50 °C	1,66	0,19	1,85	0,90	0,12	0,30
100 °C	1,71	0,66	2,37	0,72	0,14	0,26

Το σχήμα 4.9 απεικονίζει την μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων, 1,3-διγλυκεριδίων και των ολικών διγλυκεριδίων κατά την θέρμανση.



**Σχήμα 4.9** Μεταβολή της περιεκτικότητας των 1,2-διγλυκεριδίων (1,2DGs), 1,3-διγλυκεριδίων (1,3DGs) και ολικών διγλυκεριδίων (TDGs) του ελαιοκάρπου με την θερμοκρασία.

## 4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την προσεκτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που απεικονίζουν κυρίως την μεταβολή των διγλυκεριδίων κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου, εξαγάγουμε ορισμένα συμπεράσματα:

### Σχετικά με την υγρασία του ελαιοκάρπου:

1. Το βάρος του ελαιοκάρπου, παραμένει σχεδόν σταθερό και για τις δύο περιοχές που μελετήθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες<sup>117</sup>. (Πίνακας 4.1)
2. Το % ποσοστό της υγρασίας παρατηρείται επίσης, να παραμένει σταθερό και για τις δυο περιοχές. (Πίνακας 4.2)

### Σχετικά με τη μεταβολή της περιεκτικότητας των διγλυκεριδίων:

#### **ΜΕΘΟΔΟΣ Α**

1. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των διγλυκεριδίων, για τα δείγματα από το Σκαλάκι με την μέθοδο αυτή δείχνει ότι τα 1,2-DGs έχουν την τάση να ελαττώνονται με την ωρίμανση, ενώ τα 1,3-DGs παρουσιάζουν μια σχετική αύξηση από τον Σεπτέμβριο έως τον Οκτώβριο και στην συνέχεια παραμένουν σταθερά. (Πίνακας 4.3, σχήμα 4.1, 4.2)
2. Στην περίπτωση των δειγμάτων από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, ο ποσοτικός προσδιορισμός των διγλυκεριδίων δείχνει ότι τα 1,2-DGs τείνουν να ελαττωθούν με την ωρίμανση. Αντίθετα τα 1,3-DGs μειώνονται από τον μήνα Σεπτέμβριο έως τον μήνα Οκτώβριο, αυξάνονται αισθητά τον μήνα Νοέμβριο και παραμένουν σταθερά έως τον Δεκέμβριο. (Πίνακας 4.3, σχήμα 4.5, 4.6)
3. Τα TDG των δειγμάτων από την περιοχή Σκαλάκι παρουσιάζουν μια ελαφρά αρχική αύξηση και μειώνονται με την περαιτέρω ωρίμανση του καρπού. Για την περιοχή Κοκκίνη Χάνι, τα TDG μειώνονται μονότονα κατά την ωρίμανση. (Πίνακας 4.3, σχήμα 4.3, 4.7)
4. Ο λόγος D μειώνεται για τα δείγματα και από τις δύο περιοχές. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση του λόγου D για την περιοχή Κοκκίνη Χάνι και για τον μήνα Οκτώβρη. (Πίνακας 4.3, σχήμα 4.4, 4.8)
5. Η περιεκτικότητα του καρπού σε στερόλες μειώνεται με την ωρίμανση για τα δείγματα από την περιοχή Σκαλάκι, ενώ παραμένει σταθερή στην περιοχή Κοκκίνη Χάνι. (Πίνακας 4.3)

6. Η οξύτητα του καρπού μειώνεται με την ωρίμανση και για τις δυο περιοχές. (Πίνακας 4.3)

### **ΜΕΘΟΔΟΣ Β**

Στην δεύτερη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε, τα αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά.

1. Τα 1,2-DGs και στις 2 περιοχές μειώνονται, ενώ τα 1,3-DGs αυξάνονται. (Πίνακας 4.4, σχήμα 4.1, 4.2, 4.5, 4.6)
2. Τα TDG των δειγμάτων και των δύο περιοχών μειώνονται με την ωρίμανση, εμφανίζουν όμως μια μικρή αύξηση τον μήνα Νοέμβρη. (Πίνακας 4.4, σχήμα 4.3, 4.7)
3. Ο λόγος D μειώνεται μονότονα για τα δείγματα και των δυο περιοχών. (Πίνακας 4.4, σχήμα 4.4, 4.8).
4. Η περιεκτικότητα του καρπού σε στερόλες παραμένει σχεδόν σταθερή και για τις δυο περιοχές. (Πίνακας 4.4)
5. Η οξύτητα του ελαιοκάρπου από την περιοχή Σκαλάκι, μειώνεται, ενώ αυξάνεται στον ελαιόκαρπο από την περιοχή Κοκκίνη Χάνι. (Πίνακας 4.4)

### **ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

Συγκρίνοντας τις συνθήκες των 2 μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν και πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας την θερμοκρασία εκχύλισης παρατηρείται μεγάλη απόκλιση. Στην πρώτη μέθοδο Α, η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν 40 °C, ενώ στην δεύτερη μέθοδο Β, η θερμοκρασία εκχύλισης ήταν 25 °C. Για το ίδιο δείγμα η ποσότητα των 1,2-DGs μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ τα 1,3-DGs αυξάνονται. Επομένως, θα μπορούσε να προταθεί ως πιο ακριβής εκχύλιση των διγλυκεριδίων από τον ελαιόκαρπο, αυτή με την απλή ανάδευση για 48 ώρες χωρίς καμία θέρμανση (Μέθοδος Β).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, εξάγονται ορισμένα γενικά συμπεράσματα:

1. Τα 1,3-DGs σχηματίζονται κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου, πιθανώς από την ατελή βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων, όπως ακριβώς και τα 1,2-DGs<sup>118</sup>.
2. Κατά την ωρίμανση του ελαιοκάρπου παρουσιάζεται μια τάση αύξησης της περιεκτικότητας σε 1,3-DGs και ελάττωση σε 1,2-DGs.
3. Κατά την ωρίμανση παρουσιάζεται μια τάση ελάττωσης των TDGs.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ

#### 5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 5.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ ΚΑΙ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.

Για αυτό το μέρος της εργασίας μελετήθηκαν 7 δείγματα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου εμπορίου διαφορετικής προέλευσης και ποικιλίας. Πιο συγκεκριμένα αναλύθηκαν ποικιλίες Καλαμών (πράσινες και μαύρες), ελιές βιολογικής καλλιέργειας (πράσινες και μαύρες), οι ισπανικές ποικιλίας Picholine, Sevillanes και τέλος ένα δείγμα από το Μαρόκο ποικιλίας Picholine.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του βάρους του ελαιοκάρπου, για κάθε περιοχή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η μέτρηση του βάρους έγινε δυο φορές για κάθε δείγμα.

**Πίνακας 5.1** Βάρος επιτραπέζιου ελαιοκάρπου διαφορετικής ποικιλίας και προέλευσης.

ΔΕΙΓΜΑ	ΒΑΡΟΣ / ΕΛΙΑ (g±0,00005)
1 (Καλαμών)	4,5700
2 (Καλαμών)	4,7195
3 (Βιολογική)	2,9109
4 (Βιολογική)	4,4902
5 (Picholine Μαρόκο)	2,5053
6 (Picholine Ισπανία)	2,6001
7 (Sevillanes)	6,6852

Για τον υπολογισμό της υγρασίας του ελαιοκάρπου, το κάθε δείγμα ζυγίστηκε (2 φορές) και έπειτα τοποθετήθηκε σε συσκευή λυοφιλοποίησης. Το βάρος του αναπροσδιορίστηκε και υπολογίστηκε η επί τοις %



περιεκτικότητα του σε νερό. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της υγρασίας του ελαιοκάρπου, για κάθε περιοχή φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 5.2** % Υγρασία επιτραπέζιου ελαιοκάρπου διαφορετικής ποικιλίας και προέλευσης.

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>% ΥΓΡΑΣΙΑ</b>
1	47,20
2	73,86
3	58,19
4	78,17
5	73,47
6	75,40
7	82,49

### **5.1.2 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ. ΑΝΑΘΕΣΗ ΤΩΝ ΚΟΡΥΦΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΟΥ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ <sup>31</sup>P-NMR**

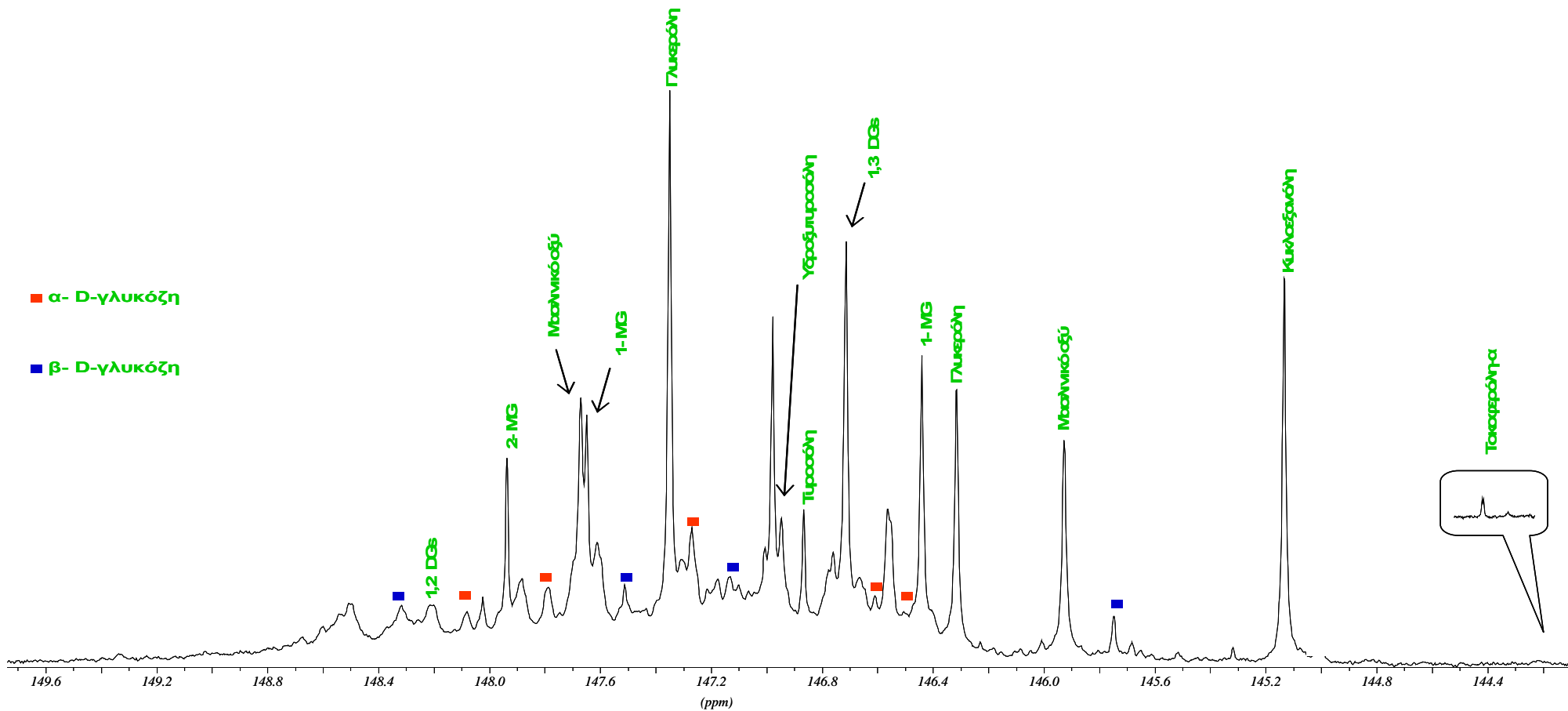
Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών στον ελαιοκάρπο είναι η εύρεση της κατάλληλης διαδικασίας εκχύλισης του καρπού. Λαμβάνοντας υπόψη τα φάσματα που ελήφθησαν με τις δυο διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης, όπως αναφέρθηκαν στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 3.4), και τις διαφορές στις εντάσεις των κορυφών αλλά και στο πλήθος αυτών, χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη μεθοδολογία για την απομόνωση των πολυφαινολών. Η μέθοδος 2 είναι πιο αποτελεσματική γιατί η εκχύλιση με μίγμα μεθανόλη/ νερό (80:20, v:v) θεωρείται ότι παραλαμβάνει σχεδόν όλες τις πολυφαινόλες<sup>115</sup>.

Το δεύτερο βήμα για τον προσδιορισμό των πολυφαινολών είναι η εύρεση της χημικής μετατόπισης <sup>31</sup>P-NMR του φωσφιτυλιωμένου παραγώγου κάθε πολυφαινόλης. Για τον προσδιορισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αποτελέσματα από προηγούμενες εργασίες στο εργαστήριο φασματοσκοπίας NMR<sup>109,116,119</sup> και η μέθοδος της προσθήκης γνωστής ποσότητας, όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 3.7).

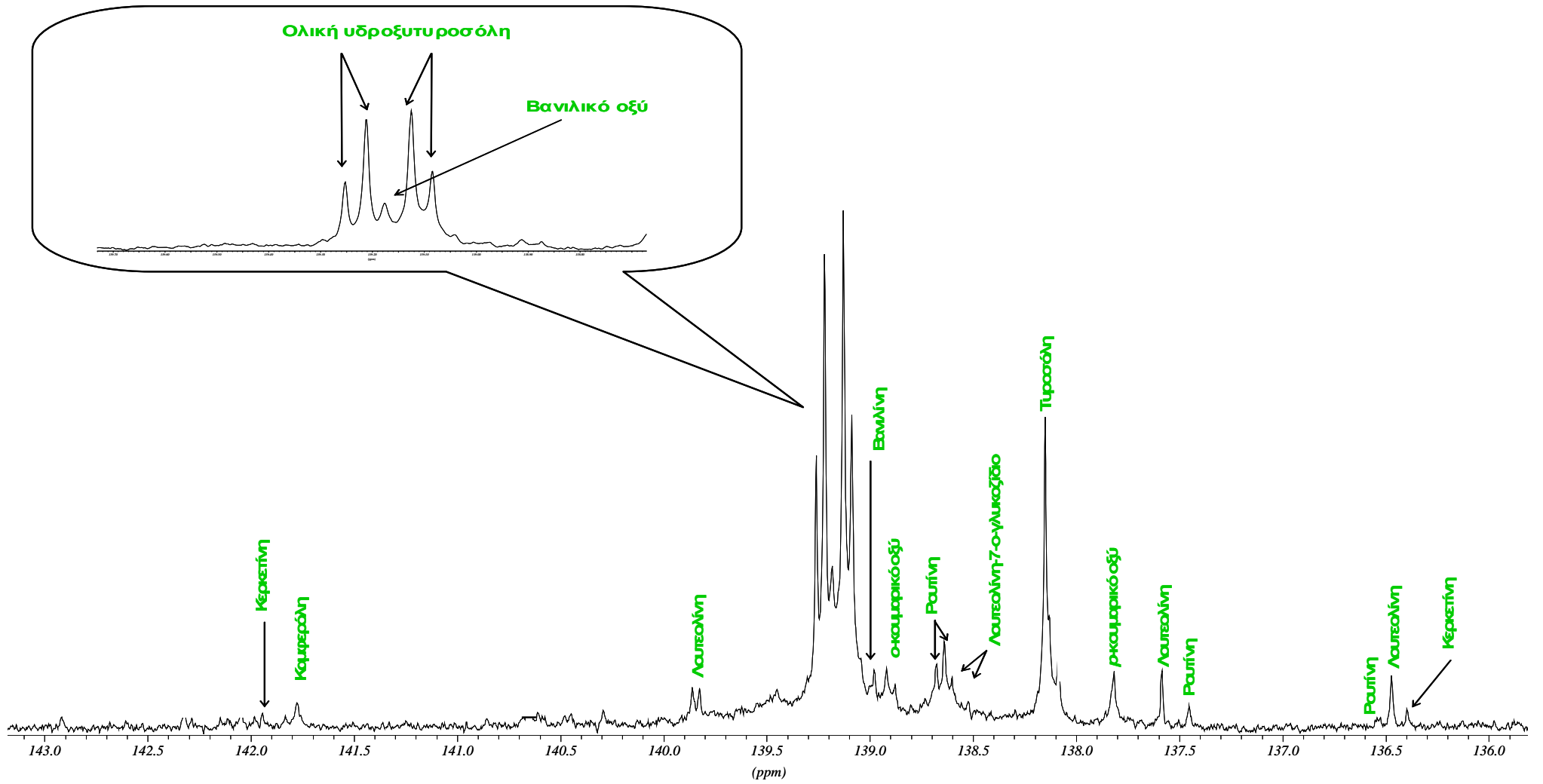
Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζεται η αλειφατική περιοχή ενός φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR του εκχυλίσματος των πολυφαινολών. Αρχικά στο φάσμα πιστοποιήθηκε η παρουσία μόνο- και δι- γλυκεριδίων (1-MG, 2-MG και 1,2-DGs, 1,3-DGs, αντίστοιχα). Επίσης παρατηρήθηκαν οι κορυφές των φωσφυτιλιωμένων παραγώγων της γλυκερόλης, όπως επίσης και του μασλινικού οξέος. Στην περιοχή αυτή προσδιορίστηκαν και τα φωσφυτιλιωμένα παράγωγα των αλειφατικών υδροξυλίων της ελεύθερης τυροσόλης και ελεύθερης υδροξυτυροσόλης.

Στην αλειφατική περιοχή, εκτός από τα φωσφυτιλιωμένα παράγωγα που αναφέρθηκαν, παρουσιάζονται και τα παράγωγα των σακχάρων τα οποία υπάρχουν στον ελαιόκαρπο αλλά και απομένουν μετά την υδρόλυση των γλυκοζιδίων των πολυφαινολών. Έτσι προσδιορίστηκαν οι δύο μορφές της ελεύθερης γλυκόζης,  $\alpha$ -D-γλυκόζη και  $\beta$ -D-γλυκόζη<sup>120</sup>. Τέλος, σε κάποια δείγματα ελαιόκαρπου εμφανίστηκε και η κορυφή της βιταμίνης E, η οποία δεν έχει αναφερθεί, μέχρι σήμερα, στην βιβλιογραφία ότι περιέχεται στον ελαιόκαρπο.

Στο σχήμα 5.3 παρουσιάζεται η αρωματική περιοχή ενός φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR του εκχυλίσματος των πολυφαινολών το οποίο αντιστοιχεί στο Δείγμα 1. Αρχικά στο φάσμα πιστοποιήθηκε η παρουσία της δεσμευμένης τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι κορυφές των φωσφυτιλιωμένων παραγώγων του *ο*-κουμαρικού οξέος, του *ρ*-κουμαρικού οξέος, της λουτεολίνης, ρουτίνης απιγενίνης και καμφερόλης. Στην περιοχή αυτή εμφανίστηκε και μία κορυφή της βανιλίνης αλλά και άγνωστες κορυφές που δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστούν. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο εμφανιζόμενο φάσμα δεν παρουσιάζεται η κορυφή όλων των φωσφυτιλιωμένων παραγώγων της καμφερόλης και κερκετίνης. Λόγω της ομοιότητας της δομής, τόσο μεταξύ τους όσο και με την ρουτίνη κάποιες κορυφές επικαλύπτονται. Επομένως, λήφθηκαν υπόψη μόνο οι κορυφές εκείνες οι οποίες διαφοροποιούν τις ενώσεις αυτές.



Σχήμα 5.1 Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR πολικού μέρους του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου. Αλειφατική περιοχή



Σχήμα 5.2 Φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR πολικού μέρους του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου. Αρωματική περιοχή

Οι χημικές μετατοπίσεις των ενώσεων που προσδιορίστηκαν με την φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR στην παρούσα μελέτη καθώς και οι χημικές μετατοπίσεις των πρότυπων ενώσεων συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 5.3** Χημικές μετατοπίσεις φωσφυτυλιωμένων παραγώγων εκχυλίσματος επιτραπέζιου ελαιοκάρπου.

ΕΝΩΣΗ	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΣΤΟ ΦΑΣΜΑ <sup>31</sup> P-NMR	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΕΝΩΣΗΣ
<b>ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ</b>		
<b>1,2 – Διγλυκερίδιο (1,2 – DG)<sup>a</sup></b>	148,21	148,20
<b>1,3 – Διγλυκερίδιο (1,3 - DG)<sup>a</sup></b>	146,71	146,70
<b>1 – Μονογλυκερίδιο (1 – MG)<sup>a</sup></b>	147,66	147,71
	146,43	146,46
<b>2 – Μονογλυκερίδιο (2 – MG)<sup>a</sup></b>	148,01	148,03
<b>Γλυκερόλη<sup>a</sup></b>	147,36	147,43
	146,32	146,35
<b>Ρουτίνη<sup>b</sup></b>	148,36	148,34
	148,03	148,05
	147,98	147,77
	146,77	146,74
	146,75	146,73
	146,08	146,33
<b>Μασλιτικό οξύ</b>	145,84	145,46
	145,94	145,97
	147,67	147,67
<b>Τυροσόλη (ελεύθερη)<sup>b</sup></b>	146,91	146,91
<b>Υδροτυροσόλη (ελεύθερη)<sup>b</sup></b>	146,98	146,99
<b>α- D-Γλυκόζη</b>	148,07	148,08
	147,89	147,89
	147,26	147,32
	146,76	146,79
	146,69	146,70
<b>β -D-Γλυκόζη</b>	148,31	148,32
	147,67	147,32
	147,27	147,16

	145,74	145,74
<b>Βιταμίνη Ε</b>	144,22	144,43
<b>ΑΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ</b>		
<b>Λουτεολίνη<sup>b</sup></b>	139,84	139,78
	139,81	139,77
	137,57	137,52
	136,46	136,47
<b>Τυροσόλη (ολική)<sup>b</sup></b>	138,15	138,20
<b>Υδροξυτυροσόλη (ολική)<sup>b</sup></b>	139,25	139,25
	139,21	139,21
	139,12	139,12
	139,08	139,08
<b>Βανιλικό οξύ<sup>b</sup></b>	139,17	139,20
	135,06	135,17
<b>ο - κουμαρικό οξύ<sup>b</sup></b>	138,91	138,94
	135,05	135,04
<b>ρ - κουμαρικό οξύ<sup>b</sup></b>	137,81	137,82
	135,12	135,13
<b>Ρουτίνη<sup>b</sup></b>	138,67	138,68
	138,63	138,65
	137,45	137,39
	136,54	136,46
<b>Καμφερόλη<sup>b</sup></b>	141,77	141,70
<b>Κερκετίνη<sup>b</sup></b>	141,92	141,78
<b>Λουτεολίνη- 7-Ο-γλυκοζίδιο<sup>b</sup></b>	138,60	138,61
	138,52	138,51

<sup>a</sup> Παραπομπή 119: Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, 50, 2207-2213.

<sup>b</sup> Παραπομπή 116: Christophoridou, S.; Spyros, A.; Dais, P.; *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. **2001**, 170, 139-157.

Στον πίνακα 4.8 παρατηρούμε ότι σε ορισμένες ενώσεις η χημική μετατόπιση αυτών στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR του εκχυλίσματος και της πρότυπης ένωσης, διαφέρει. Για παράδειγμα, η κορυφή της ρουτίνης σε  $\delta$  135,13, στο φάσμα του εκχυλίσματος εμφανίζεται σε  $\delta$  135,06. Επίσης στο βανιλικό οξύ η κορυφή σε  $\delta$  135,17 εμφανίζεται σε  $\delta$  135,06. Η μικρή αυτή μετατόπιση μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική πολικότητα που παρουσιάζουν τα διαλύματα του μίγματος των πολυφαινολών στον ελαιόκαρπο και των μεμονωμένων προτύπων ενώσεων. Για την διασαφήνιση των ακριβών χημικών μετατοπίσεων των πολυφαινολών μέσα στο εκχύλισμα του ελαιοκάρπου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσθήκης γνωστών ποσοτήτων προτύπων ουσιών, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.7.

### **5.1.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ $^{31}\text{P}$ NMR**

Μετά τον προσδιορισμό των άγνωστων κορυφών του φάσματος  $^{31}\text{P}$ -NMR, πραγματοποιήθηκε η μαθηματική επεξεργασία σύμφωνα με τους τύπους που έχουν περιγραφεί επίσης στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 3.8). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 5.4** Ποσοτική σύσταση (μmol/g ελαιοκάρπου) πολυφαινολών, γλυκόζης και βιταμίνης E σε επιτραπέζιο ελαιοκάρπο με την φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR.

<b>ΕΝΩΣΗ / ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Ελεύθερη υδροξυτυροσόλη	6,51	2,62	5,77	1,19	0,94	1,82	3,20
Ελεύθερη τυροσόλη	3,97	2,75	3,74	2,22	3,06	1,28	4,19
α-D-γλυκόζη	3,52	0,00	9,58	1,42	0,87	1,55	4,72
β-D-γλυκόζη	1,49	0,00	1,26	1,29	0,94	0,35	1,01
Μασлинικό οξύ	5,25	3,25	6,35	4,07	9,39	4,48	13,49
Βιταμίνη E	0,00	0,00	2,10	0,00	2,47	0,44	0,00
Ολική υδροξυτυροσόλη	15,52	11,92	19,53	11,83	35,66	2,66	15,51
Ολική τυροσόλη	4,01	1,68	4,04	1,75	2,36	0,69	1,26
p-κουμαρικό οξύ	0,80	0,00	0,57	0,24	0,81	0,56	0,00
Βανιλικό οξύ	2,00	0,37	3,18	1,19	1,47	0,17	0,00
Ρουτίνη	0,53	0,00	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00
Λουτεολίνη	0,29	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Βανιλίνη	0,11	0,14	0,06	0,11	0,49	0,00	0,10
ο-κουμαρικό οξύ	0,13	0,00	0,16	0,33	0,51	0,00	0,44
Καμφερόλη	0,00	0,00	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00
Κερκετίνη	0,00	0,00	0,17	0,00	0,53	0,28	0,63
Λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίδιο	0,16	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00
Ολικές πολυφαινόλες	39,28	22,73	45,24	23,26	55,22	11,94	38,82



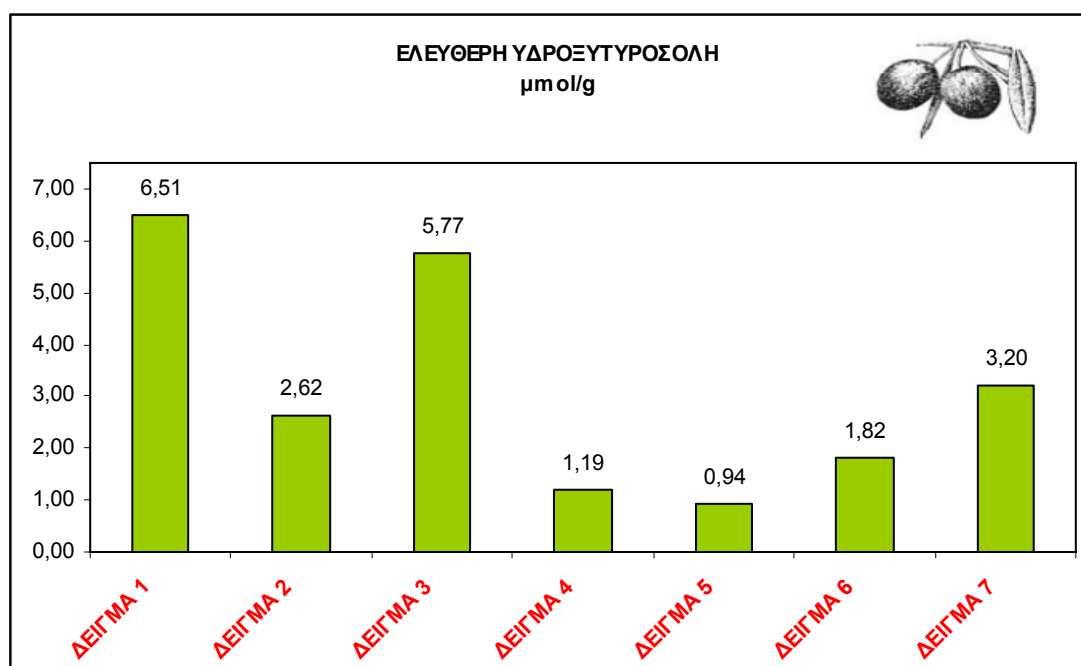
Παρατηρώντας τον πίνακα 5.4 και την ποσοτική σύσταση του ελαιοκάρπου σε πολυφαινόλες εντοπίζονται αρκετές διαφορές τόσο στα δείγματα όσο και στις πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν. Στην αλειφατική περιοχή η ελεύθερη υδροξυτυροσόλη, εμφανίζεται από 0,94  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 5) έως 6,51  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 1), ενώ η ελεύθερη τυροσόλη εμφανίζεται σε συγκέντρωση 1,28  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 6) έως 4,19  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 7). Η  $\alpha$ -D-γλυκόζη αλλά και η  $\beta$ -D-γλυκόζη απουσιάζουν από το δείγμα 2 ενώ η περιεκτικότητα του ελαιοκάρπου στα υπόλοιπα δείγματα κυμαίνεται από 0,87  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 5) έως 9,58  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 3) για την  $\alpha$ -D-γλυκόζη και από 0,35  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 6) έως 1,49  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 1) για την  $\beta$ -D-γλυκόζη. Το μασλινικό οξύ εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα του ελαιοκάρπου με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δείγμα 7 (13,49  $\mu\text{mol/g}$ ). Τέλος η βιταμίνη E προσδιορίστηκε μόνο στα δείγματα 3, 5 και 6 σε αρκετά ικανοποιητική συγκέντρωση, από 0,44  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 6) έως 2,47  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 5).

Στην αρωματική περιοχή, η ολική υδροξυτυροσόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με την ολική τυροσόλη, ενώ η καμφερόλη εμφανίζεται μόνο στα δείγματα 3 και 4. Επίσης η κερκετίνη απουσιάζει από τα δείγματα 1, 2 και 4, ενώ η λουτεολίνη-7-O-γλυκοζίδιο, η ρουτίνη και λουτεολίνη ανιχνεύτηκαν μόνο στα δείγματα 1 και 3 με μαύρο ελαιοκάρπο ελληνικής προέλευσης. Το *p*-κουμαρικό οξύ βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,24  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 4) έως 0,81  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 5) ενώ το *o*-κουμαρικό οξύ απουσιάζει από τα δείγματα 2 και 6. Το βανιλικό οξύ απουσιάζει μόνο από το δείγμα 6 και περιέχεται σε συγκέντρωση 0,17  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 6) έως 3,18  $\mu\text{mol/g}$  (δείγμα 3). Μετατρέποντας τα αποτελέσματα των ολικών πολυφαινολών, αυτών που προαναφέρθηκαν, σε  $\mu\text{mol/}$  ξηρή ελιά λαμβάνουμε τον παρακάτω πίνακα:

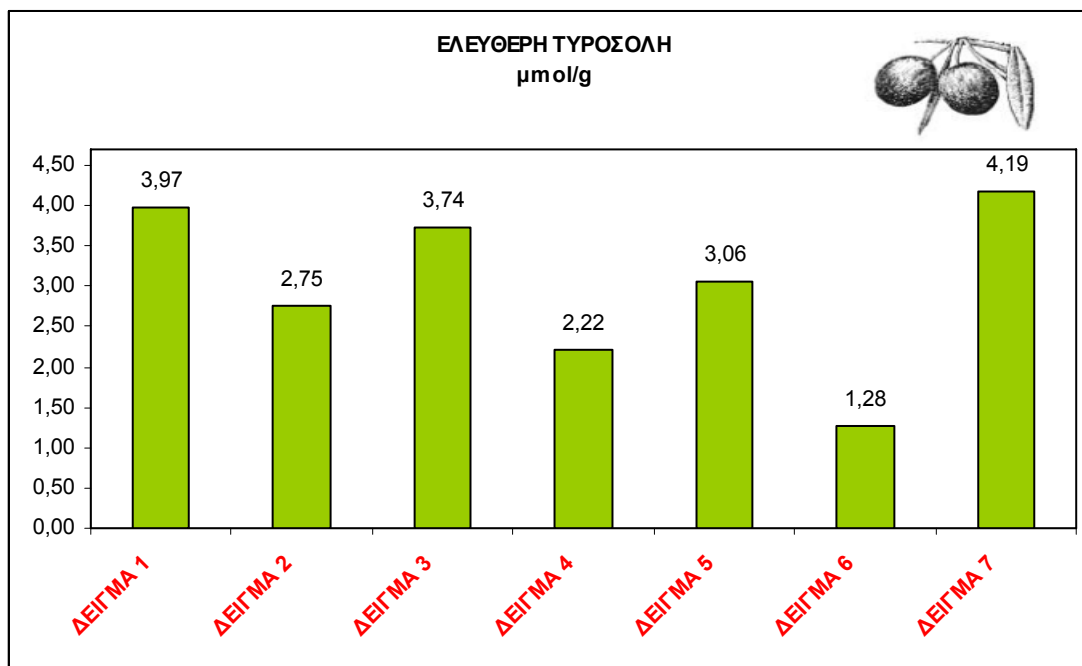
**Πίνακας 5.5** Ολικές πολυφαινόλες (μολ/ξηρή ελιά) για τα δείγματα ελαιοκάρπου που εξετάστηκαν.

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΛΙΚΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ
1	94,77
2	28,04
3	55,07
4	22,79
5	36,70
6	7,63
7	45,45

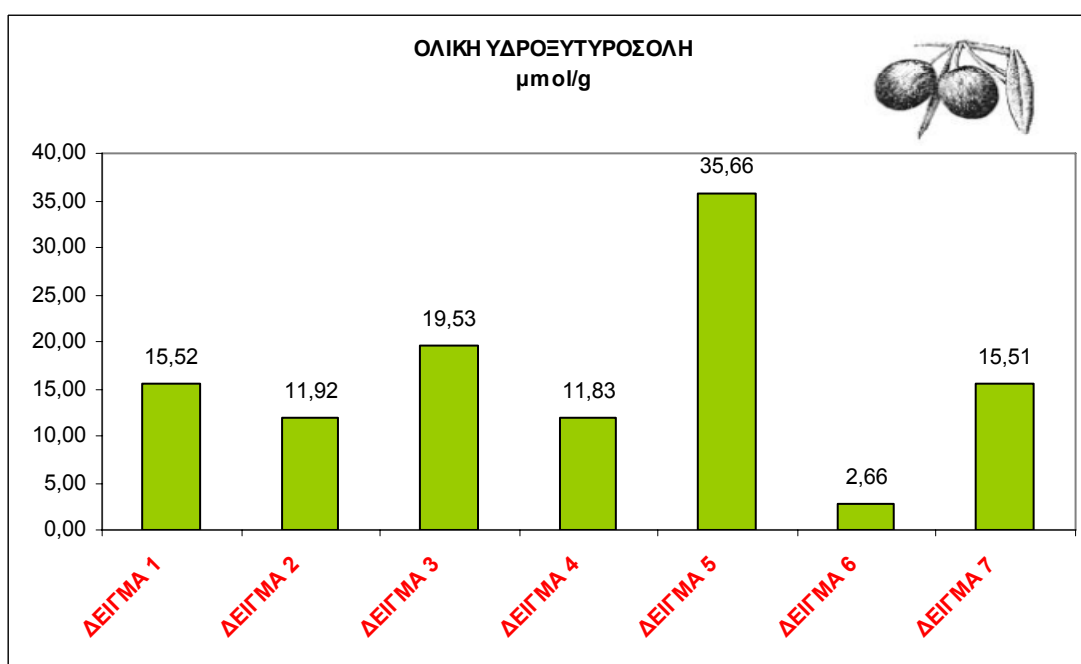
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παριστάνονται γραφικά η περιεκτικότητα των πιο σημαντικών πολυφαινολών που υπάρχουν στον ελαιοκάρπο, δηλαδή της ελεύθερης τυροσόλης, υδροξυτυροσόλης, των δεσμευμένων μορφών αυτών καθώς και των ολικών πολυφαινολών ανά δείγμα επιτραπέζιου ελαιοκάρπου.



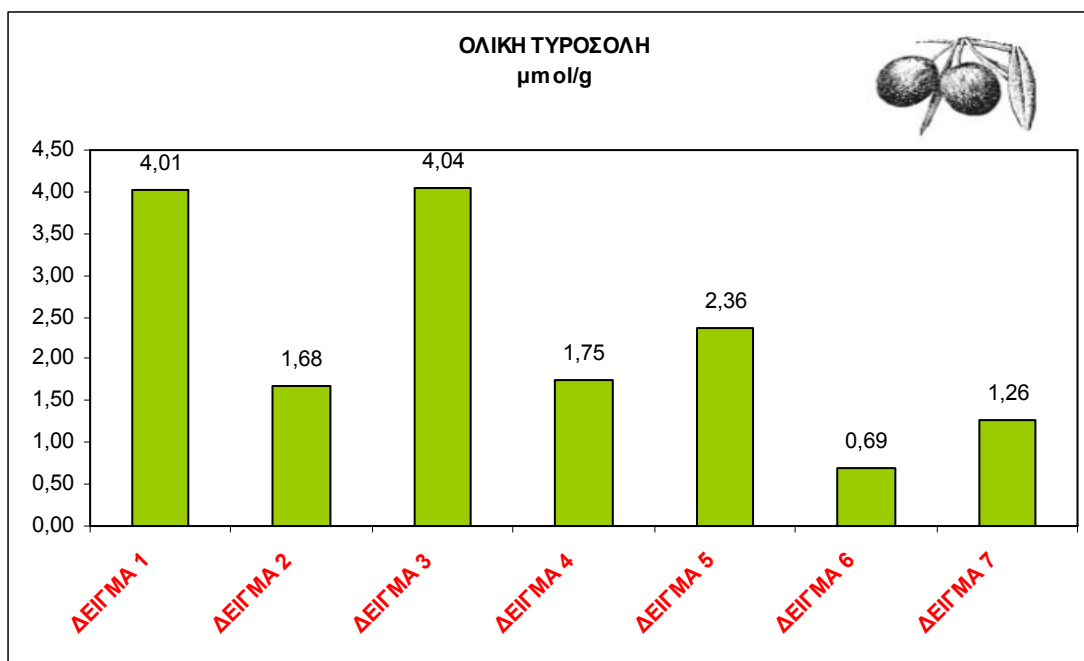
**Σχήμα 5.3** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ελεύθερη υδροξυτυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



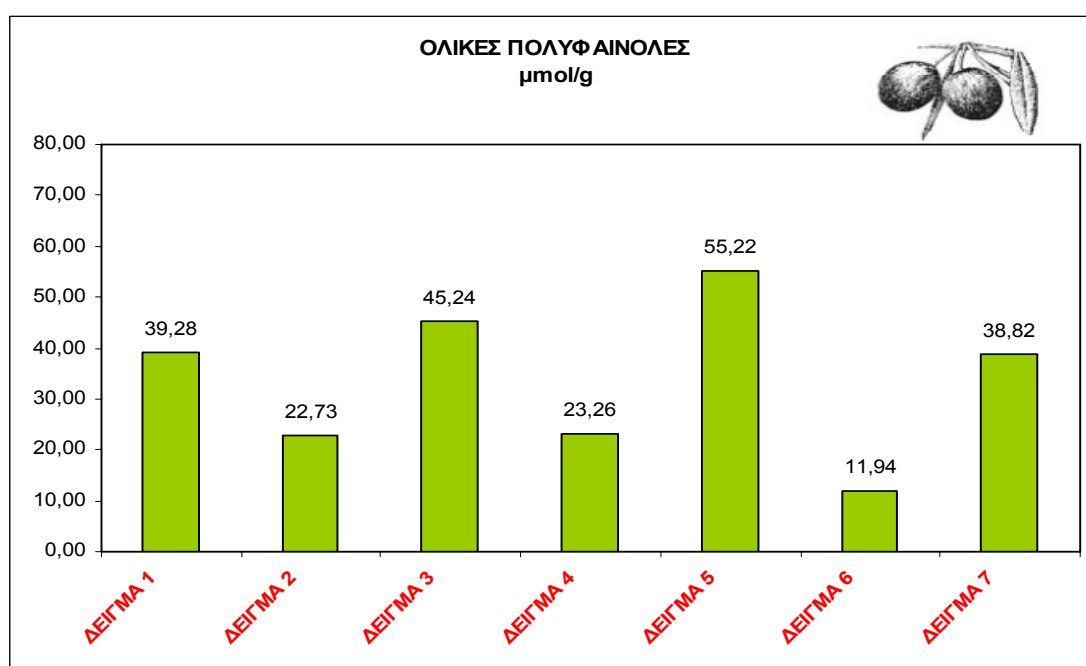
**Σχήμα 5.4** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ελεύθερη τυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



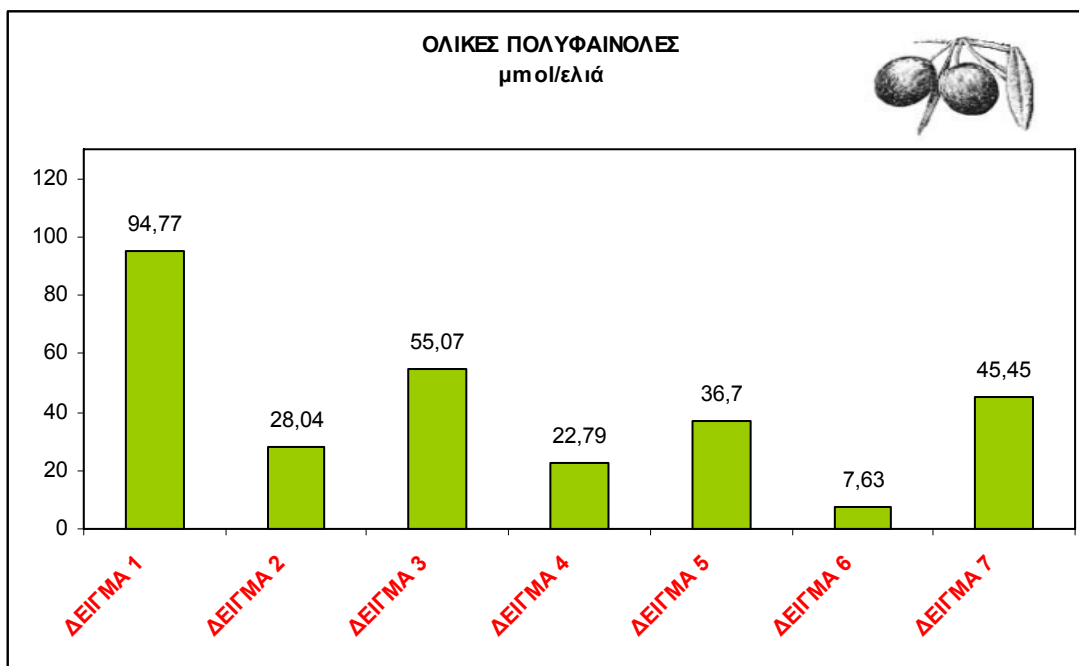
**Σχήμα 5.5** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολική υδροξυτυροσόλη (μmol/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



**Σχήμα 5.6** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολική τυροσόλη (μολ/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



**Σχήμα 5.7** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολικές πολυφαινόλες (μολ/g) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.



**Σχήμα 5.8** Σύσταση ελαιοκάρπου σε ολικές πολυφαινόλες (μολ/ελιά) για τα δείγματα που εξετάστηκαν.

## 5.2 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΜΟΤΗΤΑ

Η αξιοπιστία της μεθόδου  $^{31}\text{P}$ -NMR για ποσοτική ανάλυση των πολυφαινολών αντανακλάται επίσης στην επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων. Η επαναληψιμότητα του πειράματος  $^{31}\text{P}$ -NMR εξετάστηκε με τη λήψη πολλών διαφορετικών φασμάτων  $^{31}\text{P}$ -NMR χρησιμοποιώντας το ίδιο δείγμα εκχυλίσματος πολυφαινολών από επιτραπέζιο ελαιόκαρπο του εμπορίου. Για την εξέταση της αναπαραγωγιμότητας χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο προετοιμασίας του δείγματος για πολλά διαφορετικά δείγματα μιας συγκεκριμένης ποικιλίας και κάθε φορά και λήφθηκε φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Μετά από ολοκλήρωση και μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, λαμβάνονται τα πειραματικά αποτελέσματα της μέτρησης της επαναληψιμότητας (φάσματα  $^{31}\text{P}$ -NMR του ίδιου δείγματος) και της αναπαραγωγιμότητας (8 διαφορετικά δείγματα) τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα για την δεσμευμένη υδροξυτυροσόλη

που προσδιορίσαμε, στον επιτραπέζιο ελαιόκαρπο. Η επαναληψιμότητα βρέθηκε 2,85% (ή σε όρους τυπικής απόκλισης  $2,50 \pm 0,07$ ), ενώ η αναπαραγωγημότητα βρέθηκε 4,07% (ή σε όρους τυπικής απόκλισης  $2,74 \pm 0,11$ )

**Πίνακας 5.6** Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης της επαναληψιμότητας του πειράματος  $^{31}\text{P}$ -NMR.

<i><b>ΕΝΩΣΗ</b></i>	<i><b>ΟΛΙΚΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ</b></i>
<b>Μέτρηση</b>	
<b>1</b>	2,55
<b>2</b>	2,48
<b>3</b>	2,39
<b>4</b>	2,45
<b>5</b>	2,50
<b>6</b>	2,60
<b>7</b>	2,46
<b>8</b>	2,58
<b>Μέσος όρος</b>	2,50
<b>Τυπική απόκλιση</b>	0,07
<b>% Επαναληψιμότητα</b>	2,85

**Πίνακας 5.7** Πειραματικά αποτελέσματα μέτρησης της αναπαραγωγιμότητας της διαδικασίας εκχύλισης.

<b>ΕΝΩΣΗ</b>	<b>ΟΛΙΚΗ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ</b>
<b>Μέτρηση</b>	
<b>1</b>	2,66
<b>2</b>	2,67
<b>3</b>	2,64
<b>4</b>	2,71
<b>5</b>	2,74
<b>6</b>	2,68
<b>7</b>	2,97
<b>8</b>	2,83
<b>Μέσος όρος</b>	2,74
<b>Τυπική απόκλιση</b>	0,11
<b>% Αναπαραγωγιμότητα</b>	4,07

### 5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την προσεκτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που απεικονίζουν την περιεκτικότητα του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου σε πολυφαινόλες, εξάγουμε ορισμένα συμπεράσματα:

Σχετικά με την υγρασία του ελαιοκάρπου:

1. Η υγρασία του επιτραπέζιου ελαιοκάρπου που μελετήθηκε, είναι αρκετά υψηλή. Η τιμή της κυμαίνεται από 47,20% έως και 82,49% με τα πιο χαμηλά ποσοστά να παρουσιάζονται στα δείγματα μαύρου ελαιοκάρπου ποικιλίας Καλαμών και βιολογικής καλλιέργειας.

Σχετικά με την γεωγραφική προέλευση και ποικιλία του ελαιοκάρπου:

1. Τα δείγματα που προέρχονται από την Ελλάδα (N<sup>ο</sup>1 - N<sup>ο</sup>4), είναι πλούσια τόσο σε ποικιλία πολυφαινολών (βρέθηκαν 12 πολυφαινόλες με την φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR) όσο και σε συνολικό ποσοστό αυτών. Τα επίπεδα της περιεκτικότητας των πολυφαινολών στον ελληνικό

επιτραπέζιο ελαιόκαρπο ποικιλίας Καλαμών κυμαίνονται από 22,73 έως 45,24  $\mu\text{mol/g}$ .

2. Η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη στην ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή τους κατέχουν τα υψηλότερα επίπεδα πολυφαινόλων για τον ελληνικό ελαιόκαρπο.
3. Τα οξέα *p*-κουμαρικό, *o*-κουμαρικό και βανιλικό ανιχνεύθηκαν και στα τέσσερα ελληνικά δείγματα, σε αντίθεση με την ρουτίνη και λουτεολίνη που ανιχνεύθηκαν μόνο στα δείγματα του μαύρου ελαιοκάρπου.
4. Η καμφερόλη εμφανίστηκε μόνο στα δείγματα που προέρχονται από βιολογική καλλιέργεια, ενώ η κερκετίνη ανιχνεύθηκε μόνο στον μαύρο ελαιόκαρπο βιολογικής καλλιέργειας.
5. Τα δείγματα από την Ισπανία (N<sup>ο</sup>6, N<sup>ο</sup>7) δεν περιέχουν ποικιλία πολυφαινόλων σε σχέση με τον ελληνικό ελαιόκαρπο.
6. Το συνολικό ποσοστό σε πολυφαινόλες είναι ικανοποιητικό με την μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται για την ποικιλία Sevillanes (N<sup>ο</sup>7).
7. Και στα δυο ισπανικά δείγματα (N<sup>ο</sup>6, N<sup>ο</sup>7) δεν ανιχνεύθηκε η ρουτίνη και λουτεολίνη, όπως και για τα δυο ελληνικά δείγματα.
8. Από τις Ισπανικές ποικιλίες που αναλύθηκαν μόνο η ποικιλία Picholine βρέθηκε να περιέχει Βιταμίνη E (N<sup>ο</sup>6).
9. Το δείγμα από το Μαρόκο (N<sup>ο</sup>5) περιέχει μεγάλο ποσοστό σε πολυφαινόλες. Αξιοσημείωτη είναι η σύγκριση αυτού με την ίδια ποικιλία από την Ισπανία (N<sup>ο</sup>6). Το ισπανικό δείγμα εμφάνισε πολύ μικρό ποσοστό σε πολυφαινόλες, πράγμα που επισημαίνει τον ρόλο της γεωγραφικής προέλευσης στα συστατικά, γενικότερα, του ελαιοκάρπου.
10. Το μαροκινό δείγμα (N<sup>ο</sup>5), δείχνει να περιέχει μεγαλύτερα ποσοστά σε υδροξυτυροσόλη, τόσο στην ελεύθερη όσο και στην δεσμευμένη μορφή της, σε σχέση με το δείγμα της ίδιας ποικιλίας από την Ισπανία (N<sup>ο</sup>6).
11. Το μαροκινό δείγμα (N<sup>ο</sup>5), περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα Βιταμίνης E σε σχέση με το ισπανικό δείγμα.

Επομένως, η χώρα που καλλιεργείται το φυτό, το κλίμα αλλά και η ποικιλία του ελαιοκάρπου διαφοροποιεί την περιεκτικότητά του σε πολυφαινόλες.



#### Σχετικά με την επεξεργασία του ελαιοκάρπου:

1. Τα δείγματα του μαύρου ελαιοκάρπου (N<sup>ο</sup>1, N<sup>ο</sup>3), έχουν επεξεργαστεί όπως ο φυσικός μαύρος ελαιοκάρπος που διατηρείται σε άλμη, εμφανίζουν παρόμοιο ποσοστό σε πολυφαινόλες. Τα επίπεδα συγκέντρωσης για κάθε πολυφαινόλη είναι παρόμοια.
2. Τα δείγματα του πράσινου ελαιοκάρπου έχουν επεξεργαστεί με τον Ισπανικό τρόπο επεξεργασίας (Spanish style). Το ποσοστό σε πολυφαινόλες είναι παρόμοιο για τα δείγματα N<sup>ο</sup>2, N<sup>ο</sup>4, N<sup>ο</sup>6 (11,94 έως 23,26 μmol/g), ενώ σε υψηλότερα επίπεδα βρίσκονται τα δείγματα N<sup>ο</sup>5, και N<sup>ο</sup>7 (38,82 έως 55,22 μmol/g).
3. Οι πολυφαινολικές ενώσεις ρουτίνη και λουτεολίνη εμφανίζονται μόνο στα δείγματα μαύρου ελαιοκάρπου ποικιλίας Καλαμών. Επιπλέον, οι υπόλοιπες ποικιλίες πράσινου ελαιοκάρπου, που αναλύθηκαν, υπόκεινται σε διαφορετική επεξεργασία (Spanish-style, American-type) και δεν περιέχουν αυτές τις ουσίες, που πιθανόν να αποβάλλουν αυτές τις ουσίες στην άλμη στην οποία συντηρούνται.  
Επομένως ο τύπος επεξεργασίας και συντήρησης είναι σημαντικός παράγοντας για την περιεκτικότητα του καρπού σε πολυφαινόλες.

#### **5.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΦΡΕΣΚΟ ΩΡΙΜΟ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟ**

Οι κύριες πολυφαινόλες που έχουν βρεθεί σε φρέσκο ελαιοκάρπο, είναι η τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη σε ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή<sup>121-125</sup>. Σε μεγάλη αφθονία βρίσκεται η ελευρωπαΐνη, η οποία είναι συνδυασμός του oleoside-11-methyl ester και της υδροξυτυροσόλης<sup>126</sup> και είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση του μη επεξεργασμένου ελαιοκάρπου. Επίσης, έχουν βρεθεί και άλλα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης, όπως η διμεθυλοελευρωπαΐνη<sup>127</sup>, η άγλυκη μορφή της ελευρωπαΐνης<sup>126</sup> και τα γλυκοζίδια της υδροξυτυροσόλης<sup>128</sup>. Τα επίπεδα της υδροξυτυροσόλης και των παραγώγων της σε φρέσκο ώριμο ελαιοκάρπο κατάλληλο για επιτραπέζια χρήση από την Ελλάδα, Ιταλία, Πορτογαλία και Ισπανία βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,65 έως 2,79 μmol/g (100 έως 430 mg/kg) και 23,81 έως 36,39 μmol/g, αντίστοιχα<sup>129</sup>. Σε φρέσκο ελαιοκάρπο από την Ιταλία ανιχνεύθηκε και το βερμπασκοσίδιο να

κυμαίνεται από 0,24 έως 4,88  $\mu\text{mol/g}$  (160 έως 3200  $\text{mg/kg}$ )<sup>130</sup>. Το βερμπασκοσίδιο είναι το κύριο παράγωγο του υδροξυκινναμικού οξέος που έχει βρεθεί στον ελαιόκαρπο<sup>131</sup>. Η τυροσόλη στην ελεύθερη μορφή της και δεσμευμένη, βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,22 έως 1,16  $\mu\text{mol/g}$  (30 έως 160  $\text{mg/kg}$ ) και από 1,23 έως 1,88  $\mu\text{mol/g}$ , αντίστοιχα<sup>129</sup>. Ωστόσο το λιγκστροσίδιο δεν έχει βρεθεί σε φρέσκο ώριμο ελαιόκαρπο.

Άλλες φαινολικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε φρέσκο ελαιόκαρπο, είναι οι ανθοκυαννίνες, οι φλαβονοειδής ενώσεις και τα φαινολικά οξέα<sup>121</sup>. Σε μεγάλη συγκέντρωση έχουν προσδιοριστεί η κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίδιο και η κυανιδίνη-3-Ο-ρουτινοζίδιο<sup>132</sup>. Τα επίπεδά τους έχουν βρεθεί να είναι από 0,11 έως 1,96  $\mu\text{mol/g}$  (50 έως 880  $\text{mg/kg}$ ) και από 0,42 έως 5,37  $\mu\text{mol/g}$  (250 έως 3200  $\text{mg/kg}$ ) αντίστοιχα. Η ρουτίνη (κερκετίνη-3-Ο-γλυκοζίδιο) και η λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο είναι οι δυο κύριες φλαβονοειδής ενώσεις που έχουν βρεθεί σε φρέσκο ελαιόκαρπο<sup>131,133</sup> και σε ποσοστά 0,24 έως 1,42  $\mu\text{mol/g}$  (110 έως 660  $\text{mg/kg}$ ) και 0,01 έως 1,34  $\mu\text{mol/g}$  (5 έως 600  $\text{mg/kg}$ ) αντίστοιχα<sup>126,134</sup>. Τα οξέα βανιλικό, υδροξυβενζοϊκό, υδροξυκινναμικό και καφεϊκό έχουν βρεθεί στην σάρκα του φρέσκου ελαιοκάρπου<sup>135</sup>. Από αυτά τα οξέα, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκεται το *p*-κουμαρικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό του βανιλικού οξέος βρέθηκε από 0,24 έως 0,95  $\mu\text{mol/g}$  (40 έως 120  $\text{mg/kg}$ ), του καφεϊκού οξέος από 0,05 έως 0,50  $\mu\text{mol/g}$  (10 έως 90  $\text{mg/kg}$ ), ενώ του *o*-κουμαρικού οξέος και του *p*-κουμαρικού οξέος από 0,14 έως 1,16  $\mu\text{mol/g}$  (20 έως 170  $\text{mg/kg}$ ) και από 0,07 έως 1,37  $\mu\text{mol/g}$  (από 10 έως 200  $\text{mg/kg}$ ), αντίστοιχα.

Σε προηγούμενες μελέτες πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πολυφαινολών τόσο σε επιτραπέζιο ελαιόκαρπο (επεξεργασμένο) όσο και στην άλμη. Ο R.W. Owen και συνεργάτες<sup>135</sup> προσδιόρισαν πολυφαινόλες σε ελαιόκαρπο αλλά και άλμη. Το ποσοστό στις βασικές πολυφαινόλες τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη που βρέθηκε σε μαύρο ελαιόκαρπο είναι 37,5  $\mu\text{mol/g}$  (5780  $\text{mg/kg}$ ) και 2,89  $\mu\text{mol/g}$  (400  $\text{mg/kg}$ ) αντίστοιχα. Σε πράσινο ελαιόκαρπο τα ποσοστά αυτά είναι αρκετά μικρότερα αφού η τυροσόλη βρέθηκε σε ίχνη ενώ η υδροξυτυροσόλη βρέθηκε να κυμαίνεται σε 29,1  $\mu\text{mol/g}$  (4480  $\text{mg/kg}$ ). Αξιόλογα είναι τα ποσοστά σε πολυφαινόλες που βρέθηκαν στην άλμη των δειγμάτων αυτών στην συγκεκριμένη μελέτη. Το ποσοστό σε τυροσόλη είναι 0,06  $\text{g/l}$ , σε υδροξυτυροσόλη 0,6  $\text{g/l}$  για τον

μαύρο ελαιόκαρπο, ενώ για τον πράσινο ελαιόκαρπο η τυροσόλη βρίσκεται σε ίχνη, ενώ η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη είναι 1,37 g/l.

Ο Vincenzo Marsilio και συνεργάτες<sup>137</sup> προσδιόρισαν πολυφαινόλες σε φρέσκο ελαιόκαρπο αλλά και επεξεργασμένο. Στην διάρκεια των εκπλύσεων με νερό για την απομάκρυνση του NaOH, κατά την επεξεργασία τους για την απομάκρυνση της ελευρωπαΐνης αλλά και της πικράδας που προσδίδει αυτή, το ποσοστό σε φαινόλες μειώνεται σημαντικά. Αξιοσημείωτη είναι η συμπεριφορά της υδροξυτυροσόλης, όπου λόγω της μεγαλύτερης διαλυτότητας που παρουσιάζει, ελαττώνεται σημαντικά.

Στην παρούσα εργασία η ελευρωπαΐνη δεν προσδιορίστηκε εφόσον τα δείγματα είχαν υποστεί κατεργασία για την απομάκρυνση της πικράδας που αυτή η ένωση προσδίδει. Το ποσοστό της ελεύθερης υδροξυτυροσόλης κυμαίνεται από 0,94 έως 6,51  $\mu\text{mol/g}$  (144,91 έως 1003,58 mg/kg), ενώ της ελεύθερης τυροσόλης από 1,28 έως 4,19  $\mu\text{mol/g}$  (176,73 έως 578,51 mg/kg). Αντίθετα, το ποσοστό σε ολική υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη κυμαίνεται από 2,66 έως 35,66  $\mu\text{mol/g}$  και 0,69 έως 4,04

Επιπρόσθετα, στην εργασία αυτή, ανιχνεύθηκαν και τα οξέα ο-κουμαρικό και *p*-κουμαρικό σε επίπεδα συγκέντρωσης από 0,13 έως 0,51  $\mu\text{mol/g}$  (21,34 έως 83,72 mg/kg) και 0,24 έως 0,81  $\mu\text{mol/g}$  (39,40 έως 132,97 mg/kg), αντίστοιχα. Επίσης, το βανιλικό οξύ βρέθηκε σε συγκέντρωση από 0,17 έως 3,18  $\mu\text{mol/g}$  (28,59 έως 534,72 mg/kg) ενώ το μασλινικό οξύ από 3,25 έως 13,49  $\mu\text{mol/g}$  (1535,17 έως 6372,14 mg/kg). Το βερμπασκοσίδιο δεν ανιχνεύθηκε στα εξεταζόμενα δείγματα με την φασματοσκοπία <sup>31</sup>P-NMR.

Από τις φλαβονοειδής ενώσεις προσδιορίστηκαν η ρουτίνη (κερκετίνη-3-Ο-γλυκοζίδιο) και η λουτεολίνη-7-Ο-γλυκοζίδιο σε επίπεδα 0,53  $\mu\text{mol/g}$  (246,12 mg/kg) και από 0,14 έως 0,16  $\mu\text{mol/g}$  (62,77 έως 71,74 mg/kg), αντίστοιχα. Η λουτεολίνη προσδιορίστηκε σε επίπεδα από 0,29 έως 0,33  $\mu\text{mol/g}$  (83,01 έως 94,46 mg/kg). Αντίθετα, οι ενώσεις κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίδιο και κυανιδίνη-3-Ο-ρουτινοζίδιο, που έχουν προσδιοριστεί σε φρέσκο ελαιόκαρπο, δεν ανιχνεύθηκαν σε επεξεργασμένο ελαιόκαρπο.

Τέλος, οι ενώσεις καμφερόλη και κερκετίνη βρέθηκαν σε αρκετά υψηλά ποσοστά από 0,33 έως 0,67  $\mu\text{mol/g}$  (94,46 έως 191,78 mg/kg) και από 0,17 έως 0,63  $\mu\text{mol/g}$  (51,38 έως 190,41 mg/kg), αντίστοιχα ενώ τα οξέα

υδροξυβενζοϊκό, υδροξυκινναμικό και καφεϊκό δεν προσδιορίστηκαν στα δείγματα.

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα από την βιβλιογραφία για το φρέσκο ελαιόκαρπο από Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, αλλά και τα πειραματικά αποτελέσματα της εργασίας αυτής για τον επεξεργασμένο ελαιόκαρπο, λαμβάνουμε τον παρακάτω ενδεικτικό πίνακα: Επίσης ο ίδιος πίνακας περιέχει την συγκέντρωση πολυφαινολών, οι οποίες προσδιορίστηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης<sup>112</sup>.

**Πίνακας 5.8** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για φρέσκο ελαιόκαρπο (από βιβλιογραφία<sup>121-137</sup>,  $\mu\text{mol/g}$ ) και επεξεργασμένο ελαιόκαρπο, από την παρούσα εργασία ( $\mu\text{mol/g}$ ) και από χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (από βιβλιογραφία<sup>112</sup>  $\mu\text{mol/g}$ ).

<b>ΕΝΩΣΗ</b>	<b>ΦΡΕΣΚΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ</b>	<b>ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ (<sup>31</sup>P-NMR)</b>	<b>ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΟΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΣ (RPLC)</b>
Ελεύθερη υδροξυτυροσώλη	0,65-2,79	0,94-6,51	1,65-4,94
Ελεύθερη τυροσώλη	0,22-1,16	1,28-4,19	0,17-1,20
Ολική υδροξυτυροσώλη	23,81-36,39	2,66-35,66	-
Ολική τυροσώλη	1,23-1,88	0,69-4,04	
Βερμπασκοσίδιο	0,24-4,88	0	-
Ρουτίνη	0,24-1,42	0,53	-
Λουτεολίνη	0	0,29-0,33	0,01-0,26
Λουτεολίνη -7-O-γλυκοζίδιο	0,01-1,34	0,14-0,16	-
Κυανιδίνη-3-O-γλυκοζίδιο	0,11-1,96	0	-
Κυανιδίνη-3-O-ρουτινοζίδιο	0,42-5,37	0	-
ο-κουμαρικό οξύ	0,07-1,37	0,13-0,51	-
p-κουμαρικό οξύ	0,14-1,16	0,24-0,81	-
Βανιλικό οξύ	0,24-0,95	0,17-3,18	-
Καφεϊκό οξύ	0,05-0,50	0	-
Μασλινικό οξύ	0	3,25-13,49	-
Καμφερόλη	0	0,33-0,67	-
Κερκετίνη	0	0,17-0,63	-

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής με παλαιότερες εργασίες τόσο σε επεξεργασμένο ελαιόκαρπο όσο και σε φρέσκο ώριμο ελαιόκαρπο, παρατηρούμε μεγάλες αποκλίσεις. Ο τρόπος επεξεργασίας του ελαιοκάρπου αλλά και η παραμονή του στην άλμη κατά την αποθήκευση και συντήρηση του έχει μεγάλες επιπτώσεις στην συνολική συγκέντρωση των πολυφαινολών. Ένα τμήμα των φαινολικών ενώσεων του καρπού καταστρέφεται κατά την επεξεργασία, ενώ ένα άλλο τμήμα τους μεταφέρεται στην άλμη. Ωστόσο, ο καρπός που διατίθεται για επιτραπέζια χρήση είναι πλούσιος στις αντιοξειδωτικές αυτές ενώσεις.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

## ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε διγλυκερίδια (1,2-DGs και 1,3-DGs), ολικές στερόλες, οξύτητα, ελαιοκάρπου από δυο διαφορετικές περιοχές κατά το στάδιο ωρίμανσής. Επίσης, ανιχνεύθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά πολυφαινόλες σε επιτραπέζιο ελαιοκάρπο διαφορετικής ποικιλίας, προέλευσης και τρόπου επεξεργασίας. Για την ανάλυση του ελαιοκάρπου χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$ -NMR. Η μέθοδος συνίσταται στην φωσφιτυλίωση των υδροξυλικών ομάδων και την ανίχνευση των φωσφιτυλιωμένων παραγώγων τους στο φάσμα  $^{31}\text{P}$ -NMR, με βάση τις χημικές μετατοπίσεις. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με το εσωτερικό πρότυπο της κυκλοεξανόλης.

Η απομόνωση των διγλυκεριδίων έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης του ελαιοκάρπου. Στα εκχυλίσματα, ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά, τόσο η ύπαρξη των 1,3-DGs, τα οποία συνυπάρχουν με τα 1,2-DGs, αν και σε διαφορετική αναλογία. Κατά την ωρίμανση, τα 1,2-DGs παρουσιάζουν σχετική μείωση, ενώ τα 1,3-DGs παρουσιάζουν σχετική αύξηση.

Ως προς την ποσοτική σύσταση του ελαιοκάρπου σε πολυφαινόλες, το υψηλότερο ποσοστό κατέχει πράσινος ελαιοκάρπος, ενώ για δείγματα ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής προέλευσης, το ποσοστό αυτό διαφέρει σημαντικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε δείγματα μαύρου και πράσινου ελαιοκάρπου εντοπίστηκε η Βιταμίνη E (τοκοφερόλη -α).

Οι διαφοροποιήσεις αυτές οφείλονται στην ποικιλία του καρπού, στην χώρα προέλευσης και το κλίμα της, αλλά και στον τρόπο επεξεργασίας. Οι δύο διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας (Spanish-style, American-type) προκαλούν σημαντικές απώλειες πολυφαινολών στον ελαιοκάρπο και πιθανών να μεταβαίνουν στην άλμη στην οποία συντηρούνται.

Τέλος αποδείχθηκε ότι η μεθοδολογία που στηρίζεται στην φασματοσκοπία  $^{31}\text{P}$ -NMR είναι πολύ αποτελεσματική για την ανάλυση

πολύπλοκων δειγμάτων με πολλά συστατικά, όπως τα εκχυλίσματα του ελαιοκάρπου.



1. Giorgio Bianchi; Lipids and phenols in table olives; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2003**, 105, 229–242.
2. V. Marsilio; M. De Angelis; Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table olive purposes; *Food Chemistry*, **2001**, 72, 485-490.
3. N. Frega; G. Lercker; La composizione dei lipidi della drupa di olivo durante la maturazione; *Agrochimica*, **1985**, 29, 300-307.
4. N. Frega; F. Bocci; G. Lercker; Composizione lipidica della drupa di olivo di due cultivars della zona del Chianti in funzione della maturazione. Nota I: trigliceridi ed acidi grassi; *Riv. Ita. Sost. Grasse*, **1991**, 68, 69-74.
5. G. Bianchi; C. Murelli; G. Vlahov; Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3503-3506.
6. G. Bianchi; G. Vlahov; Composition of lipid classes in the morphologically different parts of the olive fruit, cv. *Coratina* (*Olea europaea* Linn.); *Fat Sci. Technol*, **1994**, 96, 72-77.
7. M. Solinas; L. Di Giovacchino; A. Cucurachi; I polifenoli delle olive e dell'olio di oliva; *Ann. Ist. Speriment. Elaiotec*, **1975**, 5, 105-126.
8. M.J. Amiot; A. Fleuriet; J.J. Machie; Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation; *J. Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 823-826.
9. M.J. Amiot; A. Fleuriet; J.J. Macheix; Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation; *Phytochemistry*, **1989**, 28, 67-69.
10. A. Romani; N. Mulinacci; P. Pinelli; Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L.; *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 964-967.
11. Giorgio Bianchi; Lipids and phenols in table olives; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2003**, 105, 229–242.
12. Danielle Ryan; Michael Antolovich; Biotransformations of phenolic compounds in *Olea Europeae* L.; *Scientia Horticulturae*, **2002**, 92, 47-176.
13. Nicola Uccella; Olive biophenols; Biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes; *Trends in Food Science & Technology*, **2001**, 11, 315–327.
14. Danielle Ryan; Michael Antolovich; Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*; *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 445, 67–77.
15. Manuel Brenes-albuena; Pedro Garcia-Garcia; Phenolic Compounds Related to the Black Color Formed during the Processing of Ripe Olives; *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1192-1196.

16. Vincenzo Marsilio; Cristina Campestre; Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing; *Food Chemistry*, **2001**, 74, 55-60.
17. Manuel Brenes; Antonio Garrido; Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives; *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 479- 484.
18. Lorenzo Bastoni; Nicola Ucella; Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance; *Food Chemistry*, **2001**, 73, 145-151.
19. Danielle Ryan; Kevin Robards; Changes in phenolic content of olive during maturation; *International Journal of Food Science and Technology*, **1999**, 34, 265-274.
20. Georgios Blekas; Constantinos Harizanis; Maria Tsimidou; Dimitrios G. Boskou; Biophenols in Table Olives; *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 3688- 3692.
21. Concepción Romero; Manuel Brenes; Khaled Yousfi; Pedro Garcia; Aranzazu Garcia; Antonio Garrido; Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives; *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 479-484.
22. Armandodoriano Bianco, Nicola Ucella; Biophenolic components of olives. *Food Research International*, **2000**, 33, 475- 485.
23. Danielle Ryan; Paul D. Prenzler; Shimon Lavaee; Michael Antolovich; Kevin Robards; Quantitative Changes in Phenolic Content during Physiological Development of the Olive (*Olea europaea*) Cultivar Hardy's Mammoth *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2532-2538
24. Maurizio Servili; Maura Baldioli; Roberto Selvaggini; Alceo Macchioni; and Gianfrancesco Montedoro; Phenolic Compounds of Olive Fruit: One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Nuzhenide and Its Distribution in the Constitutive Parts of Fruit; *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 12-18.
25. R. Limioli; R. Consonni; A. Ranalli; G. Bianchi; L. Zetta, 1H NMR Study of Phenolics in the Vegetation Water of Three Cultivars of *Olea europaea*; Similarities and Differences; *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, 2040-2048.
26. Marco Esti; Luciano Cinquanta; Phenolic Compounds in Different Olive Varieties; *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, 32-35.
27. Manuel Brenes-Balbuena; Pedro Garcia-Garcia; Phenolic Compounds Related to the Black Color Formed during the Processing of Ripe Olives; *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1192-1196.
28. P. Goupy; A. Fleuriet; M.J. Amiot; J.J. Macheix; Enzymatic browning, oleuropein content, and diphenol oxidase activity in olive cultivars (*Olea europaea* L.); *J. Agric. Food Chem.*; **1991**, 39, 92-95.

29. M.J. Amiot; A. Fleuriet; J.J. Macheix; Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation; *Phytochemistry*, **1989**, 28, 67-69.
30. A. Romani; N. Mulinacci; P. Pinelli; F.F. Vincieri; A. Cimato; Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L; *J. Agric. Food Chem.*; **1999**, 47, 964-967.
31. L. Bastoni; A. Bianco; F. Piccioni; N. Uccella; Biophenolic profile in olives by NMR; *Food Chemistry*, **2001**, 73, 145-151.
32. L. Di Giovacchino; Olive harvesting and olive oil extraction. In Olive oil. Chemistry and Technology. Ed. D. Boskou AOCS Press, Champaign, IL (USA) **1996**, 12-51.
33. N. Frega; F. Bocci; G. Lercker; Composizione lipidica della drupa di olivo di due cultivars della zona del Chianti in funzione della maturazione. Nota I: trigliceridi ed acidi grassi; *Riv. Ita. Sos; Grasse*, **1991**, 68, 69-74.
34. Apostolos Spyros, Angelos Philippidis, and Photis Dais; Kinetics of Diglyceride Formation and Isomerization in Virgin Olive Oils by Employing <sup>31</sup>P NMR Spectroscopy. Formulation of a Quantitative Measure to Assess Olive Oil Storage History; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 157-164.
35. Ana Jimhez; Rafael Guillen; Coral Sbchez; Juan Ferndndez-Bolafios; Antonia Heredia; Changes in texture and cell wall polysaccharides of olive fruit during "Spanish green olive" processing; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43, 2240-2246.
36. Donaire J. P. ; Sanchez-Raya ; A. J., Lopez-Gorge; J., Recalde, L. ; Etudes physiologiques et biochimiques de l'olive. 1. Variation de la concentration de divers metabolites pendant son cycle evolutif; *Agrochimica*, **1977**, 21, 311-321.
37. Fernandez Diez ; M. J. ; **1975**; The olive. In A. C. Hulme, The biochemistry of fruits and their products (vol. 2) (pp. 263-267). New York: Academic Press.
38. Lewis, D. H.; Smith, D. C.; Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants; *New Phytologist*, **1967**, 66, 143-184.
39. Cevdet Nergiza; Yesim Engez; Compositional variation of olive fruit during ripening; *Food Chemistry*, **2000**, 69, 55-59.
40. Fernández Diez, M.J. ; Castro Ramos, R., Garrido Fernández; Biotecnología de la aceituna de mesa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Instituto de la Grasa; **1985**; Madrid y Sevilla.
41. Nosti Vega ; M., Castro Ramos ; R. de and Vásquez Ladrón, R.; Composición y valor nutritivo de algunas variedades españolas de aceitunas de

mesa. VI. Cambios Debidos a los procesos de elaboración ; *Grasas y Aceites*, **1984**, 35, 11-14.

42. Manoukas, A.G., Grimanis, A. and Mazomenos, B. Aminoacido Composition of three cultivars of olive fruit; *J. Agric. Food Chem*; **1978**, 21, 215-217.

43. Fernández Díez M.J.; Castro Ramos R.; Garrido Fernández A.; González Cancho F.; González Pellissó F.; Nosti Vega M.; Heredia Moreno A.; Mínguez Mosquera M.I.; Rejano Navarro L.; Durán Quintana M.C.; Sánchez Roldán F.; García García P.; Castro Gómez Millán A; **1985** *Bioteología de la aceituna de mesa*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de la Grasa, Madrid y Sevilla.

44. Nosti Vega M. and Castro Ramos R. Composición y valor nutritivo de algunas variedades españolas de aceitunas de mesa. VII. Aceitunas negras oxidadas. *Grasas y Aceites*, **1985**, 36, 203-206.

45. Donaire, J.P., Belver, A., Rodríguez García, M.I. and Megías, L.; Lipid biosynthesis, oxidative enzyme activities and cellular changes in growing olive fruit.; *R. Esp. Fisiología*, **1984**, 40, 191-204.

46. Vázquez Roncero ; A. and Mancha Perelló, M. ; Transformaciones de los glicéridos durante la maduración de la aceituna. Variaciones de los di y triglicéridos.; *Grasas y Aceites*, **1970**, 21, 124-132.

47. Wonder, M.; Lavee, S.; Epstein, E. Identification and seasonal changes of glucose, fructose and mannitol in relation to oil accumulation during fruit development in *Olea europea* (L.); *Scientia Horticulturae*, **1988**, 36, 47-54.

48. Danielle Ryan; Kevin Robards; Changes in phenolic content of olive during maturation; *International Journal of Food Science and Technology*, **1999**, 34, 265-274.

49. Fernández Díez, M.J. and González Pellissó, F. Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. II Acidez y pH del jugo. Determinación de ácidos oxálico, cítrico y málico. *Grasas y Aceites*, 1956, 7, 185-9

50. International Olive Oil Council, IOOC (**1980**) *Unified qualitative standard applying to table olives in international trade*, IOOC, Madrid.

51. A. Garrido Fernández; M.J Fernández Díez; M.R. Adams; *Table olives production and processing*; Chapman and Hall editions; pp23-45.

52. Balatsouras, G.D. (**1967**) Processing the naturally ripe (black) olives, in *Proceedings of the International Olive Oil Seminar*, Perugia-Spoleto, Italy, pp 491-550.

53. Balatsouras, G.D., **1982**; *The olive tree, in Contemporary Oleiculture*, Vol I, Mairomatic & Co, Athens (in Greek) Aligizakis, E.M.,

54. Patac de las Traviesas, L.; Cadahía Cicuendez, P ; Campo Sánchez, E. del.; **1954**, *Tratado de olivicultura*. Sindicato Nacional del Olivo, Madrid.
55. URL [www.International Olive Oil Council](http://www.InternationalOliveOilCouncil.org), IOOC
56. M. J. Amiot ; M. Tacchini; A. Fleuriet; J. J. Macheix; Le processus technologique de desamerisation des olives: caracterisation des fruits avant et pendant le traitement alcalin ; *Sciences des aliments*, **1990**, 10, 619-631.
57. M. Brenes Balbuena; P. Garcia Garcia; A. Garrido Fernandez; Phenolic compounds related to the black colour formed during the processing of ripe olives; *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1192-1196.
58. A. Vazquez Roncero ; M. L. Janer del Valle; Evolucion de los polifenoles durante el aderenzo de aceitunas verdes. I. Estudio cualitativo; *Grasas Aceites*, **1977**, 28, 421-426.
59. M. Brenes; A. de Castro; Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing; *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 77, 353-358.
60. V. Marsilio; C. Campestre; L. Lanza; Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing.; *Food Chemistry*, **2001**, 74, 55-60.
61. A. Vazquez Roncero ; M. L. Janer del Valle ; Evolucion de los polifenoles durante el aderenzo de aceitunas verdes. I. Estudio cualitativo.; *Grasas Aceites*, **1977**, 28, 421-426.
62. M. Brenes; A. de Castro; Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing.; *J. Sci. Food Agric.*, **1998**, 77, 353-358.
63. V. Marsilio; C. Campestre; L. Lanza; Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing; *Food Chemistry*, **2001**, 74, 55-60.
64. F. Capozzi; A. Piperno; N. Uccella; Oleuropein site selective hydrolysis by technomimetic NMR experiments; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1623-1629.
65. F. Gaviña ; J. M. Viguera ; Transformaciones quimicas de la aceituna durante el aderezo. VII. ; Identificacion de un acido dihidroxiterpenico aislado de la lejia residual ; *Grasas Aceites*, **1964**, 15, 143-146.
66. F. Gaviña ; J. M. Viguera ; B. Abarca ; C. Polo ; V. Sanz ; Compuestos fenolicos de la lejia de aceituna “manzanilla” ; *Grasas Aceites*, **1973**, 24, 137-139.
67. M. Brenes; P. Garcia; M. C. Duran; A. Garrid; Concentration of phenolic compounds change in storage brines of ripe olives; *J. Food Sci.*, **1993**, 58, 347-350.
68. M. Amelio; E. De Muro; Naturally fermented black olives of *Taggiasca* variety (*Olea europaea* L.); *Grasas Aceites*, **2000**, 51, 429-439

69. Ruiz-Barba J.L., Rios-Sanchez R.M., Fedriani-Iriso C., Olias J.M., Rios J.L. and Jimenez-Diaz R. Bacterial effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*, *System. Appl. Microbiology*, **1990**, 13, 199-205.
70. Punchard N. A.; Kelly F. J.; *Free Radicals*, Punchard N. A.; Kelly F. J. (Eds.), Oxford University Press Inc., **1996**, New York, Chap. 1.
71. Μπαλατσούρας Γ., ΤΟ ΕΛΛΙΟΛΑΔΟ, Κεφάλαιο 5, σελ 228, **1997**, Αθήνα
72. Trichopoulou A.; Lagiou P.; Papas A.; Mediterranean Diet: Are Antioxidants Central to Its Benefits in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, chapter 6, p. 113.
73. Noguchi N.; Niki E.; Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, p. 3.
74. Niki E.; Free radicals in chemistry and biochemistry in *Food and Free Radicals*, Hiramatsu M.; Yoshikawa T.; Inoue M. (eds), **1997**, Plenum Press, New York, chapter 1, page 1.
75. Papadopoulos G.; Tsimidou M.; Boskou D.; Stability of Virgin Olive Oil, Assessment of Natural Antioxidants and Other Related Factors, *Dev. Food Sci.*, **1993**, 32, 321-326.
76. Noguchi N.; Niki E.; Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, p. 3.
77. Fukumoto L.R.; Mazza G.; "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds"; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 3597-3604.
78. Papadopoulos, G., and Boskou, D., Antioxidant effect of natural phenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **1991**, 68, 669-671.
79. Montedoro, G., F.; Servili M; Baldioli M; Miniati E; Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **1992a**, 40, 1571-1576.
80. Manna C.; Galletti P.; Cucciolla V.; Moltedo O.; Leone A.; Zappia V.; The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4 dihydroxy)ethanol counteracts reactive oxygen reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J. Nutrition*, **1997**, 127, 2, 286-292.
81. Miller N.; Rise-Evans C.; Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: antioxidant activity assessed using the ABTS• + radical cation.; *British Food Journal*, **1997**, 99/2 57-62.

82. Kafatos A.; Diet, Antioxidants, and Health – Case Study: The Cretan Experience *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*, Papas M., CRC Press, New York, **1999**, chapter 7, page 119.11 23
83. Fernandez-Moyano A.; Mangas M.A.; Albis T.; Guinda A.; Lanzon A.; Montilla C.; Villar J.; Palma F.; Digon D.; Garcia-Luna P.P.; Effects of olive oil minor components over fibrinolytic enzyme system in hipercholesteromic rats. Book Of Abstracts, 4.P.154, *11<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis*, Paris, October, **1997**.
84. Visioli F.;Bellosta S.; Galli C.;Cardioprotective properties of olive oil-derived polyphenols. Book Of Abstracts, 4.P.191, *11<sup>th</sup> International Symposium on Atherosclerosis*, Paris, October, **1997**.
85. Wiseman, S.A.; Mathot J.N.N.J.; de Fouw M.J.; Tijbur, Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation on rabbits. *Atherosclerosis*, **1996**, 120,15-23.
86. Aviram M.; Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrofages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants, *Eur. J. Clinical Chem.*, **1996**, 34, 8, 599-608.
87. Ferrara L.A.; Raimondi A.S.; D'Episcopo L.; Guida L.; Guida L.; Russo A.D.; Marotta T.; Olive oil and reduced need for antihypertensive medications; *Archives of Internal Medicine*, **2000**, 160, 6, 837-842.
88. Visioli F.; Bellosta S.; Galli C.; Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages.; *Life*, **1997**, 62, 6, 541-546.
89. Visioli F.; Bellomo G.; Galli C.; Free Radical-Scavenging Properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1998**, 247, 1, 60-64.
90. Manna C.; Galletti P.; Cucciolla V.; Montedoro G.; Zappia V.; Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J. Nutr. Biochem.*, **1999**, 10:159-165.
91. Manna C.; Galletti P.; Maisto G.; Cucciolla V.; D'Angelo S.; Zappia V.;Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol on Caco-2 cells.; *FEBS Letters*, **2000**, 470, 341-344.
92. Bisignano G.; Tomaino A.; Lo Cascio R. ; Crisafi G. ; Uccella N. ; Saija A.,On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, 51, 971-974.
93. Ramos-Nino M.E.; Clifford M.N.; Addams M.R.; Quantitative structure-activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*; *J. Appl Bacteriol.*, **1996**, 80, 303-10.

94. Nergiz, C.; and Unal, K.; *J. Sci. Food Agric.*, **1991**, 56, 79.
95. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; and Boskou, D.; *Food Chem.*, **1992**, 44, 141.
96. Gutfinger, T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, 58, 966.
97. Villeneuve, F.; Abravanel, G.; Moutounet, M.; and Alibert, G.; *J. Chromatogr.*, **1982**, 234, 131.
98. Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; and Miniati, E.; *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, 40, 1577.
99. Andersen, J. M.; and Pedersen, W. B.; *J. Chromatogr.*, **1983**, 259, 131.
100. Brenes, M.; Garcia, P.; Duran, M. C.; and Garrido, A.; *J. Food Sci.*, **1992**, 58, 347.
101. Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sanchez, A. H.; and Garrido, A.; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2702.
102. Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V. L.; Sanjust di Teulada, M. T.; Karim dos Santos, M.; and Bandino, G.; *J. Chromatogr., A*, **1997**, 768, 207.
103. Wulf, L. W.; and Nagel, C. W.; *J. Chromatogr.*, **1976**, 116, 271.
104. Angerosa, F.; d'Alessandro, N.; Konstantinou, P.; and Di Giacinto, L.; *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1802.
105. Angerosa, F.; d'Alessandro, N.; Corana, F.; and Mellerio, G.; *J. Chromatogr., A*, **1996**, 736, 195.
106. Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; and Boskou, D.; *Food Chem.*, **1992**, 44, 53.
107. Zunin, P.; Evangelisti, F.; Pagano, M. A.; and Tiscornia, E.; *Riv Ital Sostanze Grasse*, **1995**, 72, 55.
108. Amiot, M.-J., Fleuriet, A.; and Macheix, J.-J.; *J Agric. Food Chem.*, **1986**, 34, 823.
109. Spyros A.; Dais P.; Application of <sup>31</sup>P-NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 802-805.
110. Jiang Z.H.; Argyropoulos D.; Granada A.; Correlation analysis of <sup>31</sup>P-NMR chemical shifts with substituent effects of phenols.; *Magnetic Resonance in Chemistry*, **1995**, 33, 375-382.
111. Alfonso Ranalli, Luciano Pollastray, Stefania Contento, Giuseppina Di Loreto Emilia Iannucci, Lucia Lucera, And Francesca Russi; Acylglycerol and Fatty Acid Components of Pulp, Seed, and Whole Olive Fruit Oils. Their Use to Characterize Fruit Variety by Chemometrics., *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3775-3779.



112. Georgios Blekas, Constantinos Vassilakis, Constantinos Harizanis, Maria Tsimidou, And Dimitrios G. Boskou; Biophenols in Table Olives., *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3688-3692.
113. Danielle Ryan, Paul D. Prenzler, Shimon Lavaee, Michael Antolovich, Kevin Robards. Quantitative Changes in Phenolic Content during Physiological Development of the Olive (*Olea europaea*) Cultivar Hardy's Mammoth. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2532–2538.
114. Zwierzak A. Cyclic organophosphorus compounds. I. Synthesis and infrared spectral studies of cyclic hydrogen phosphites and thiophosphites. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 2501-2512.
115. Morales, M.T.; Tsimidou, M. The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties*, Aparicio, R.; Harwood, J., Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**; Chapt. 12, p.451.
116. Christophoridou, S.; Spyros, A.; Dais, P.; <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy of polyphenol-containing olive oil model compounds. *Phosphorus, Sulfur and Silicon.* **2001**, *170*, 139-157.
117. A. Garrido Fernández, M.J. Fernández Diez and M.R. Adams; Table Olives. Production and Processing. 72-75
118. G. Vogel and J. Browse, Preparation of radioactively Labeled Synthetic sn-,2-Diacylglycerols for Studies of Lipid Metabolism, *Analytical Biochemistry*, **1995**, *224*, 61-67.
119. Fronimaki, P.; Spyros, A.; Christophoridou, S.; Dais, P. Determination of the diglyceride content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 2207-2213.
120. Διδακτορική διατριβή, Ανάπτυξη και εφαρμογή νέων αναλυτικών τεχνικών με βάση την φασματοσκοπία NMR για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαινολικών ενώσεων στο παρθένο ελαιόλαδο. Χριστοφορίδου Στυλιανή, 2005, 188.
121. Macheix, J.-J.; Fleuriet, A.; Billot, J. *Fruit Phenolics*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; Vol. 92, pp 111-112.
122. Ryan, D.; Robards, K. Phenolic compounds in olives. *Analyst* **1998**, *123*, 31R-44R.
123. Borzillo, A.; Iannotta, N.; Uccella, N. Oinotria table olives: Quality evaluation during ripening and processing by biomolecular components. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *212*, 113-121.

124. Uccella, N. Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, 11, 328-339.
125. Saija, A.; Uccella, N. Olive biophenols; functional effects on human wellbeing. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, 11, 357- 363.
126. Panizzi, L.; Scarpati, M. L.; Oriente, G. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital.* **1960**, 90, 1449-1485.
127. Ragazzi, E.; Veronese, G.; Guiotto, A. The demethyloleuropein, a new glucoside extracted from ripe olives. *Ann. Chim.* **1973**, 63, 13-20.
128. Bianco, A.; Mazzei, R. A.; Melchioni, C.; Romeo, G.; Scarpati, M. L.; Sorieno, A.; Uccella, N. Microcomponents of olive oils III. Glucosides of 2-(3,4 dihydroxyphenyl) ethanol. *Food Chem.* **1998**, 63, 461-464.
129. Bastoni, L.; Bianco, A.; Piccioni, F.; Uccella, N. Biophenolic profile in olives by nuclear magnetic resonance. *Food Chem.* **2001**, 73, 145-151.
130. Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F.; Cimato, A. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 964-967.
131. Amiot, M.-J.; Fleuriot, A.; Macheix, J.-J. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, 34, 823-826.
132. Va'zquez Roncero, A.; Maestro Dura'n, R. Los colorantes anthocianicos de la aceituna madura. I. Estudio cualitativo. *Grasas Aceites* **1970**, 21, 208-214.
133. Vlahov, G. Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 58, 157-159.
134. Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 32-35.
135. Bianco, A.; Uccella, N. Biophenolic components of olives. *Food Res. Int.* **2000**, 33, 475-485.
136. R.W. Owen, R. Haubner, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41, **2003**, 703–717
137. Vincenzo Marsilio, Christina Campestre, Barbara Lanza; Phenolic Compounds change during California-style ripe olive processing., *Food Chemistry* **2001** 74 ,55-60.