



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ "ΔΗΜΗΤΡΑ"



ΑγροΕΤΑΚ
Ερευνητικά και Τεχνολογικά Αναπτυξιακά
Έργα Καινοτομίας

ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΛΙΑΣ, ΥΠΟΤΡΟΠΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΠΕΛΟΥ

ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ

του έργου με ΚΥΠΕ 3667/226

Ανάπτυξη ταχέος αναλυτικού πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων σε ελαιόλαδα, κατά τα διαφορετικά στάδια ωριμότητας του ελαιοκάρπου

Δρ. ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

Χημικός

ΧΑΝΙΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2015



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ"

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η γεύση και το άρωμα είναι σημαντικά κριτήρια ποιότητας για το παρθένο ελαιόλαδο. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που προκαλούν τη γεύση ή μη-γεύση είναι ως εκ τούτου, το κλειδί για τον έλεγχο της ποιότητας του ελαιολάδου. Το παρθένο ελαιόλαδο, έχει μια λεπτή και ξεχωριστή γεύση που το διακρίνει από άλλα βρώσιμα φυτικά έλαια. Το χαρακτηριστικό άρωμα του εξαρτάται



από πολλές πτητικές ενώσεις που προέρχονται από την αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μέσω μιας αλυσίδας ενζυματικών αντιδράσεων, γνωστών ως η οδός της λιποξυγενάσης, η οποία λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της εξαγωγής του λαδιού. Οι ενώσεις με πέντε και έξι άτομα άνθρακα (C5 και C6) και ιδιαίτερα οι C6 γραμμικές ακόρεστες και κορεσμένες αλδεΐδες αντιπροσωπεύουν το πιο σημαντικό κλάσμα των πτητικών ενώσεων που περιέχονται σε υψηλής ποιότητας παρθένα ελαιόλαδα. (Angerosa, κ.α., 2000). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι ενώσεις και το αντίστοιχο αίσθημα γεύσης ή οσμής που προκαλούν.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικό αίσθησης και πτητικές ενώσεις που το δημιουργούν.

Ένωση/ χαρακτηριστικό	Ενώσεις
EVOO / χόρτο	2-trans-εξενάλη, 1-εξανόλη, 1-πεντεν-3-όνη
EVOO / φρουτώδης	οξικός εξυλεστέρας, 3-cis-εξενάλη, 3-cis-εξανόλη, 3-cis-οξικός εξενυλ-εστέρας
Ατροχάδο / ζυμωμένο	2-trans-εξενόλη, 2-φαινυλ-αιθανόλη, 2/3-μεθυλοβουτανόλη
Μουχλιασμένο	οκτανάλη, 1-οκτεν-3-όνη, 1-οκτεν-3-όλη, 2/3-μεθυλοβουτανόλη
Κρασώδες / ξυδάτο	οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη, οξικό οξύ
Μούργα	ισοβουτανικός αιθυλεστέρας, ισοβουτυρικό οξύ, βουτυρικό οξύ, προποϊονικό οξύ
Ταγγό	εξανάλη, 2-trans-επτανάλη

Η γενετική επίδραση που σχετίζεται με την ποικιλία είναι από τις πιο σημαντικές πτυχές που επηρεάζουν τη σύνθεση των πτητικών ενώσεων του ελαιολάδου. Ωστόσο, τόσο οι κλιματικές όσο και εδαφολογικές συνθήκες της ελαιοκαλλιέργειας μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση των πτητικών ενώσεων των ελαιολάδων που λαμβάνονται από την ίδια ποικιλία (Angerosa, κ.α., 2004). Επίσης, οι πτητικές ενώσεις επηρεάζονται και από την μέθοδο εξαγωγής του ελαιολάδου (διφασικός ή τριφασικός φυγοκεντρικός διαχωριστήρας) στο ελαιοτριβείο.

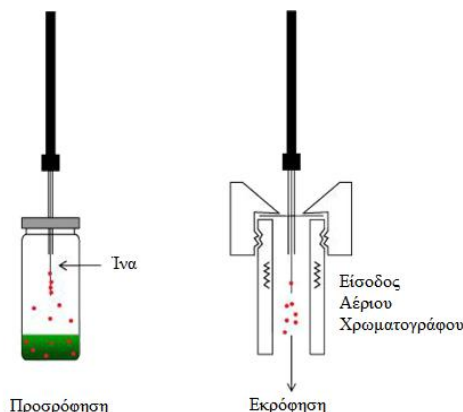


Σκοπός του έργου είναι η ανάπτυξη ενός απλού και γρήγορου αναλυτικού πρωτοκόλλου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σημαντικών πτητικών ενώσεων που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιολάδου. Στόχος του έργου είναι η εφαρμογή του αναλυτικού πρωτοκόλλου σε ελαιόλαδα από διαφορετικές ποικιλίες και σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας του ελαιοκάρπου. Επίσης, στόχος είναι το πρωτόκολλο αυτό στο μέλλον να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο από εργαστήρια που ελέγχουν την ποιότητα του ελαιολάδου.



ΜΕΘΟΔΟΙ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την ανάπτυξη του αναλυτικού πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων στα ελαιόλαδα. Η SPME είναι μια γρήγορη διαδικασία, δεν απαιτεί διαλύτες και πολύπλοκο εργαστηριακό εξοπλισμό. Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιείται μια επικαλυμμένη, από κατάλληλο υλικό, ίνα από silica (silica fiber) που περιέχεται σε μια σύριγγα. Η ίνα είτε βυθίζεται



στο δείγμα είτε εκτίθεται στον υπερκείμενο όγκο πάνω από το δείγμα. Οι ουσίες που μας ενδιαφέρουν προσροφώνται στο υλικό της ίνας. Στη συνέχεια, αφού έχει επέλθει ισορροπία η ίνα επανατραβάται στη σύριγγα και η σύριγγα απομακρύνεται από το δείγμα. Η σύριγγα εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου, όπου γίνεται θερμική εκρόφηση των ουσιών και στη συνέχεια γίνεται η ανάλυσή τους (Pawliszyn, 1997). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται γραφικά η διαδικασία της SPME. Η SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση υγρών, στερεών και αέριων δειγμάτων.

Σχήμα 1. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)

Σε αυτή τη μελέτη, οι ενώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν: 1-πεντεν-3-όλη, 2-πεντανόνη, 3-πεντανόνη, trans-2-πεντενάλη, 1-πεντανόλη, 3-εξανόλη, εξανόλη, trans-2-εξεν-1-αλη, cis-3-εξεν-1-όλη, 1-εξανόλη, ενώ η 2-εννεανόνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (I.S).

Για την υλοποίηση του έργου ακολουθήθηκαν τα παρακάτω στάδια.

Αρχικά εξετάστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάλυση των πτητικών ενώσεων στον αέριο χρωματογράφο με φασματογράφο μάζας (θερμοκρασιακό πρόγραμμα, θερμοκρασία εισαγωγέα, ροή φέροντος αερίου). Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συνθήκες Αέριου Χρωματογράφου

Αέριος Χρωματογράφος	
Στήλη	HP-5ms Ultra Inert (Agilent 19091S-433) 30m×250μm×0.25μm
Ροή φέροντος αερίου	1 mL/min
θερμοκρασία εισαγωγέα	260 °C
Φούρνος: Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα	40 °C (5 min) 5 °C/min στους 60 °C 15 °C/min στους 280 °C (2 min)

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την SPME. Αυτοί οι παράγοντες είναι η ποσότητα δείγματος, η θερμοκρασία δείγματος, ο χρόνος εκχύλισης. Για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων στα ελαιόλαδα χρησιμοποιήθηκε η ίνα 50/30 μm divinylbenzene/Carboxen/



polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS). Οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συνθήκες SPME.

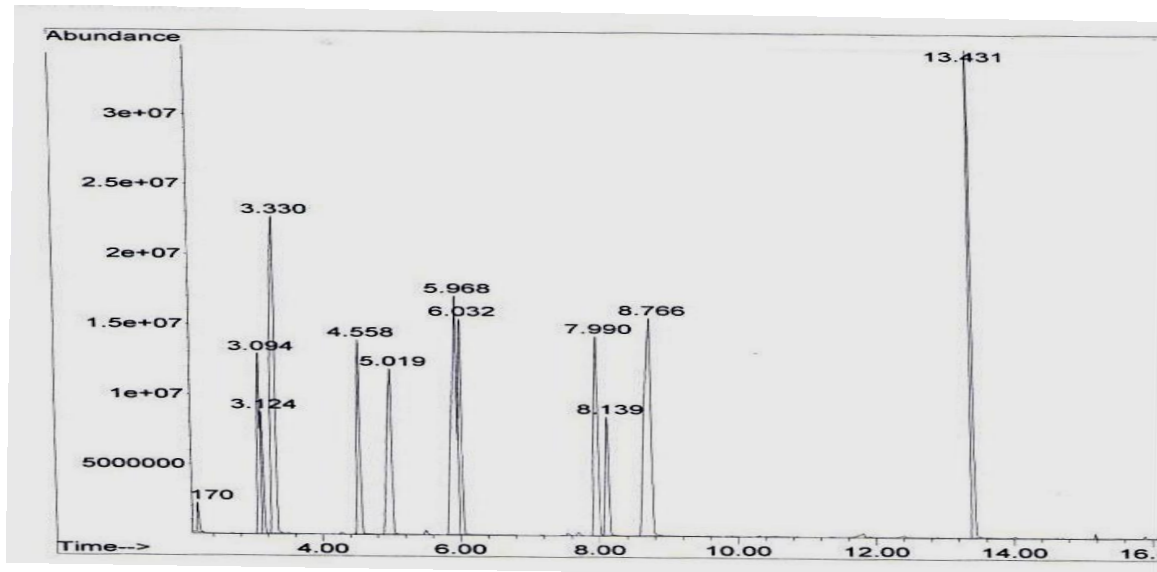
Βέλτιστες Συνθήκες SPME	
Ίνα	50/30 μm DVB/CAR/PDMS
Όγκος δείγματος	5 mL (μπουκαλάκι 15 mL)
Χρόνος Εκχύλισης	45 min
Θερμοκρασία Εκχύλισης	40 °C
Χρόνος Εκρόφησης	5 min 260 °C
Ανάδευση	900 rpm

Αφού βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες εκχύλισης υπολογίστηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου (η γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και η επαναληψιμότητα) τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

Ένωση	Χρόνος Συγκράτησης (min)	Γραμμικότητα (ppb)	Σχετική Τυπική Απόκλιση %	Όριο Ανίχνευσης (ppb)
1-πεντεν-3-όλη	3,094	5-500	3,4	1,2
2-πεντανόνη	3,124	5-500	5,5	1,5
3-πεντανόνη	3,33	5-250	8,4	0,9
trans-2-πεντενάλη	4,558	5-500	2,2	1,3
1-πεντανόλη	5,019	5-500	5,3	1,1
3-εξανόλη	5,968	25-250	7,8	7,5
εξανάλη	6,032	5-500	9,5	1,1
trans-2-εξεν-1-αλη	7,990	5-1000	5,7	1,3
cis-3-εξεν-1-όλη	8,139	5-500	3,2	1,4
1-εξανόλη	8,766	5-250	4,1	1,2
2-εννεανόνη (I.S)	13,431			

Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα των δέκα πτητικών ενώσεων και του εσωτερικού προτύπου με αέριο χρωματογράφο και φασματογράφο μάζας. Οι χρόνοι συγκράτησης των ουσιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.



Σχήμα 2. Χρωματογράφημα των πτητικών ενώσεων.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των πτητικών οργανικών ενώσεων με πέντε και έξι άτομα άνθρακα σε δείγματα ελαιολάδου. Τα δείγματα ελαιολάδου προήρθαν από τέσσερις ποικιλίες ελιάς **Κορωνέικη, Θιακή, Κουτσουρελιά και Δαφνελιά** και σε δυο διαφορετικά στάδια ωριμότητας (**στάδιο 1**: πράσινο με λίγο ιώδες και **στάδιο 2**: ιώδες με λίγο πράσινο). Αυτές οι ποικιλίες, καλλιεργούνται κάτω από τις ίδιες εδαφοκλιματικές συνθήκες στην Εθνική Συλλογή Ποικιλιών Ελιάς του Ινστιτούτου Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου στα Χανιά. Οι καρποί της ελιάς συλλέχθηκαν με το χέρι κατά τη διάρκεια της ελαιοκομικής περιόδου 2014. Το ελαιόλαδο παράχθηκε σε ένα σύστημα εργαστηριακής κλίμακας (το οποίο βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου), όπου η μάλαξη της πάστας ελιάς έγινε στους 28 °C για 30 λεπτά και χωρίς προσθήκη νερού κατά τη διαδικασία εκχύλισης του ελαιολάδου.

Τα ελαιόλαδα που παράχθηκαν την ελαιοκομική περίοδο 2014 αναλυθήκαν άμεσα ως προς τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους (οξύτητα, K_{270} , K_{232} , υπεροξείδια) με βάση τους κανονισμούς (ΕΚ) της επιτροπής των ευρωπαϊκών κοινοτήτων (1991R2568 – EL) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης τα ελαιόλαδα ανήκουν στην κατηγορία των εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων.

Πίνακας 5. Ποιοτικά χαρακτηριστικά ελαιολάδων από τις τέσσερις ποικιλίες.

Ποικιλία ελιάς	Οξύτητα	K_{232}	K_{270}	ΔΚ	Υπεροξείδια
ΔΑΦΝΕΛΙΑ 1	0,17	1,95	0,18	-0,00430	1,33
ΔΑΦΝΕΛΙΑ 2	0,19	1,76	0,17	-0,00348	4,05
ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ 1	0,42	1,65	0,12	-0,00144	1,55
ΚΟΡΩΝΕΪΚΗ 2	0,45	1,74	0,15	-0,00174	6,8
ΘΙΑΚΗ 1	0,23	2,07	0,15	-0,00136	12,7
ΘΙΑΚΗ 2	0,22	1,77	0,13	-0,00006	8,45
ΚΟΥΤΣΟΥΡΕΛΙΑ 1	0,20	1,48	0,10	-0,00215	5,0
ΚΟΥΤΣΟΥΡΕΛΙΑ 2	0,34	1,63	0,14	-0,00215	3,7





Επίσης, στα ελαιόλαδα που προέκυψαν από τις τέσσερις ποικιλίες και τα δυο διαφορετικά στάδια ωριμότητας εφαρμόστηκε το αναλυτικό πρωτόκολλο για τις πτητικές ενώσεις και τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7. Όσα ελαιόλαδα δεν αναλύονται άμεσα για πτητικές ενώσεις πρέπει να φυλάσσονται σε καταψύκτη στους -18 °C.

Πίνακας 6. Ποσοτικά αποτελέσματα

Ποσοτικά Αποτελέσματα				
	1-πεντεν-3-όλη (ppm)	εξανάλη (ppm)	trans-2-εξεν-1-αλη (ppm)	cis-3-εξεν-1-όλη (ppm)
Κορωνέικη 1	0,016	1,10	1,6	0,67
Κορωνέικη 2	0,013	0,56	1,8	0,89
Θιακή 1	0,019	1,60	5,8	1,80
Θιακή 2	0,056	0,18	5,3	1,37
Κουτσουρελιά 1			4,0	1,12
Κουτσουρελιά 2			7,0	1,35
Δαφνελιά 1		0,30	9,2	
Δαφνελιά 2		0,20	1,4	

Πίνακας 7. Ποιοτικά αποτελέσματα

Ποιοτικά Αποτελέσματα					
	1-πεντεν-3-όνη	2-πεντεν-1-όλη	trans-2-εξεν-1-όλη	3-εξενάλη	2,4 εξαδιενάλη
Κορωνέικη 1	v	v	-	v	v
Κορωνέικη 2	v	v	-	v	v
Θιακή 1	v	v	-	v	v
Θιακή 2	v	v	-	-	-
Κουτσουρελιά 1	v	-	-	v	v
Κουτσουρελιά 2	v	-	-	v	v
Δαφνελιά 1	-	-	v	-	-
Δαφνελιά 2	-	-	v	-	-

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα οι πτητικές ενώσεις στα ελαιόλαδα μεταβάλλονται ανάλογα με την ποικιλία και το στάδιο ωριμότητας του ελαιοκάρπου.





ΕΚΛΑΪΚΕΥΣΗ

Εφαρμογή αναλυτικού πρωτοκόλλου σημαντικών πτητικών ενώσεων σε ελαιόλαδα

Για την εφαρμογή του αναλυτικού πρωτοκόλλου των πτητικών ενώσεων στα ελαιόλαδα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME). Η SPME είναι μια γρήγορη διαδικασία και δεν απαιτούνται διαλύτες. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:



1. Σε σκουρόχρωμο μπουκαλάκι των 15 mL τοποθετούμε ένα μαγνητάκι.
2. Βάζουμε 5 mL δείγματος στο μπουκαλάκι.
3. Βάζουμε κατάλληλο όγκο εσωτερικού προτύπου και κλείνουμε το μπουκαλάκι με καπάκι με septum.
4. Τοποθετούμε το μπουκαλάκι σε υδατόλουτρο (40 °C).
5. Τρυπώντας το septum με τη σύριγγα (στην οποία βρίσκεται η ίνα) εισάγουμε την ίνα στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος.
5. Αφήνουμε για 45 λεπτά με ανάδευση 900 στροφές το λεπτό.

6. Η ίνα επανατραβάται στη σύριγγα και η σύριγγα εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου.

7. Αφού τελειώσει η ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο, ταυτοποιούμε τις κορυφές και ποσοτικοποιούμε τις ενώσεις για τις οποίες έχουμε καμπύλη αναφοράς.

8. Για όσες ουσίες δεν έχουμε καμπύλη αναφοράς, μπορούμε να τις ταυτοποιήσουμε μέσω της βιβλιοθήκης του φασματογράφου μάζας και να δώσουμε μόνο ποιοτικά αποτελέσματα.

9. Πάντα σε κάθε δείγμα γίνονται 2 επαναλήψεις.





ΟΦΕΛΗ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα οφέλη που προκύπτουν από το έργο είναι τα εξής:

- Η τεχνική της SPME είναι απλή καθώς δεν απαιτείται πολύπλοκος εξοπλισμός και προετοιμασία δείγματος.
- Είναι χαμηλού κόστους καθώς κάθε ίνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλά δείγματα και μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα πολλές ουσίες, οπότε πολύ γρήγορα και σχετικά οικονομικά μπορεί να εφαρμοστεί από αναλυτικά εργαστήρια για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων σε ελαιόλαδα.
- Είναι φιλική προς το περιβάλλον αφού δεν γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών.
- Η μέθοδος δεν είναι πολύπλοκη, οπότε μπορεί να εφαρμοστεί από τους ενδιαφερόμενους χωρίς ιδιαίτερη εκπαίδευση.
- Το αναλυτικό πρωτόκολλο μπορεί γρήγορα να πληροφορήσει τον ενδιαφερόμενο ελαιοπαραγωγό για την ποιότητα του ελαιολάδου ως προς τις πτητικές ενώσεις.
- Το αναλυτικό πρωτόκολλο μπορεί να εφαρμοστεί σε περισσότερες από μια ελαιοκομικές περιόδους, ώστε να μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα για το πόσο και πως επηρεάζουν οι κλιματολογικές συνθήκες τις πτητικές ενώσεις στα ελαιόλαδα.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την περαιτέρω ανάπτυξη πρωτοκόλλων για τον προσδιορισμό ουσιών που επηρεάζουν την ποιότητα του ελαιολάδου.

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο εντάσσεται στην Πράξη «*Εκπόνηση σχεδίων Ερευνητικών & Τεχνολογικών Αναπτυξιακών Έργων Καινοτομίας (ΑγροΕΤΑΚ)*» με MIS 453350, στο πλαίσιο του ΕΠ «ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ, ΕΣΠΑ 2007-2013. Το έργο συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και από Εθνικούς πόρους (ΕΣΠΑ 2007-2014), το οποίο συντονίζεται από το **ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Ελιάς Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου, Χανιά**. Υπεύθυνος Παρακολούθησης: Δρ. Κουμπούρης Γεώργιος

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R., Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. Food Chemistry, 68 (2000), 283–287

Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro GF., Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, Journal of Chromatography A, 1054 (2004) 17–31

Pawliszyn J., Solid Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997

