

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΩΤΟΝΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ  
ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ-ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ  
ΚΑΙ ΛΕΙΖΕΡ, ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

---

***ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΟΠΤΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΚΑΙ  
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ  
ΝΟΘΕΙΑΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ***

---

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Β. ΦΡΑΓΚΟΥΛΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2019**

**UNIVERSITY OF CRETE**  
**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**  
**GENERAL DEPARTMENT OF POST-GRADUATE STUDIES**



**INSTITUTE OF PHOTONICS FOR AGROFOODS AND  
ENVIRONMENT, INSTITUTE OF ELECTRONIC STRUCTURE  
AND LASER FOUNDATION OF RESEARCH AND  
TECHNOLOGY HELLAS**

**MASTER OF SCIENCE**

---

***APPLICATION OF OPTICAL SPECTROSCOPY AND  
STATISTICAL DATA ANALYSIS FOR THE  
CHARACTERIZATION, QUALITY CONTROL AND  
ADULTERATION DETECTION OF MILK AND OLIVE OIL***

---

**NIKOLAOS V. FRAGKOULIS**

**HERAKLION, 2019**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**1. Σπύρος Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής,  
Τμήμα Χημείας, ΠΚ (Επιβλέπων)**

**2. Βελεγράκης Μιχάλης, Ερευνητής Α', Ινστιτούτο  
Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, ΙΤΕ (Συνεπιβλέπων)**

**3. Σαμαρτζής Πέτρος, Ερευνητής Β', Ινστιτούτο  
Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, ΙΤΕ**

## Ευχαριστίες

Με το πέρας της μεταπτυχιακής μου διατριβής, θα ήθελα, καταρχάς, να ευχαριστήσω τον ερευνητή Δρ. Μιχάλη Βελεγράκη για την εμπιστοσύνη και την σημαντική καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, που δουλέψαμε μαζί αυτά τα δυόμισι χρόνια, για το ιδανικό κλίμα εργασίας που διασφάλισαν.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τους Απόστολο Σπύρο και Πέτρο Σαμαρτζή που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την εργασία μου ως μέλη της τριμελούς επιτροπής εξέτασης.

Τέλος, αφιερώνω από καρδιάς την παρούσα εργασία στους γονείς μου, Βασίλη και Μαρία, στην αδερφή μου Αλεξάνδρα και στην γιαγιά μου Ειρήνη που συνέβαλαν με τον δικό τους τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκειά της.

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Φραγκούλης Νικόλαος**

Email: [nikosfragkoulis94@gmail.com](mailto:nikosfragkoulis94@gmail.com)

Διεύθυνση: Α. Μήτσα 9, Τ.Κ. 71201, Ηράκλειο

Ημ. Γέννησης: 02/12/1994

Κινητό: 6936489677, Σταθερό: 2810283659

## **Εργασιακή Εμπειρία**

---

- **Πρακτική εργασία στη Χημική Υπηρεσία Κρήτης**, αναλύσεις τροφίμων και ποτών, Ιούλιος 2016-Σεπτέμβριος 2016
- **Θέση έκτακτου προσωπικού στο Ίδρυμα Ηλεκτρονικής Δομής & Λέιζερ (ΙΗΔΛ)**, Μάιος 2018

## **Διδακτική Εμπειρία**

---

- **Βοηθός στο εργαστήριο Γενικής Χημείας**, Σεπτέμβριος 2017-Μάιος 2018

## **Εκπαίδευση**

---

- **Βαρβάκειο Πειραματικό Λύκειο** (με βαθμό 18,3)
- **Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας**, 2012-2017, βαθμός πτυχίου: 7,65
- **Πτυχιακή εργασία:** Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ολικών πολυφαινολών σε δείγματα ελαιολάδου με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR  
Υπεύθυνος καθηγητής: κ. Απόστολος Σπύρος, Αξιολόγηση: 10 (δέκα)
- **Εισαγωγή στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Χημείας**, Φεβρουάριος 2017
- **Εκπαίδευση στο Ίδρυμα Ηλεκτρονικής Δομής & Λέιζερ (ΙΗΔΛ) στον Ποιοτικό Προσδιορισμό και Ανάλυση Τροφίμων και Ποτών με τη χρήση Οπτικής Φασματοσκοπίας**, Σεπτέμβριος 2017  
Υπεύθυνος Ερευνητής: κ. Βελεγράκης Μιχάλης

## **Συνέδρια- Σεμινάρια**

---

- "Spectroscopic Analysis of Greek Extra Virgin Olive oil: Origin discrimination and Adulteration studies" (Poster), 11th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis", Σεπτέμβριος 2019

- "Greek Honey and Milk Spectroscopic Analysis: Botanical classification, Origin discrimination and adulteration studies" (Poster), 11th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis", Σεπτέμβριος 2019
- "Analysis of Greek Extra Virgin Olive oil by Spectroscopic Methods: Quality Control, Classification and Adulteration Studies" (Poster), 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days (25-29 Σεπτεμβρίου 2018)
- "Optical Spectroscopic Techniques in the Classification and Quality Control of AgroFoods" (Poster), 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days (25-29 Σεπτεμβρίου 2018)
- 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, Σεπτέμβριος 2017
- Total Phenolics Determination and Profiling in Olive Oil by NMR Spectroscopy (Poster), 19th Postgraduates Conference on Chemistry (2-4 Μαΐου 2017)
- «Biophotonics and molecular imaging-BiMI SummerSchool», 27- 31/7/2015

### **Διακρίσεις**

---

- Βραβείο καλύτερου poster στο συνέδριο 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days το οποίο διοργανώθηκε στα Χανιά Κρήτης 25-29 Σεπτεμβρίου 2018 με τίτλο "Analysis of Greek Extra Virgin Olive Oil by Spectroscopic Methods: Quality Control, Classification and Adulteration Studies"

### **Κύρια αντικείμενα ενδιαφέροντος**

---

- Χημεία Τροφίμων
- Εξειδικευμένες φασματοσκοπικές τεχνικές
- Κλινική Χημεία και Κλινική Ανάλυση

### **Δεξιότητες**

---

- Εμπειρία στη χρήση εργαστηριακού εξοπλισμού και οργάνων, εμπειρία στις φασματοσκοπικές τεχνικές (UV-Vis-NIR, Raman, FT-IR, φασματοσκοπία φθορισμού), υγρής και αέριας χρωματογραφίας, , βασικές γνώσεις χρήσης φασματομέτρου NMR
- Ταχύτητα μάθησης, προσαρμοστικότητα, προθυμία, υπευθυνότητα

## ***Ξένες Γλώσσες***

---

**Αγγλικά:** Proficiency (Michigan), **Γαλλικά:** B1

## ***Η/Υ***

---

- Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον Windows 7/8/10
- Γνώσεις Ms Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook), Matlab, OriginLab και Labview

## ***Διάφορα***

---

- Κάτοχος διπλώματος αυτοκινήτου κατηγορίας Β
- Ταξίδια, Πεζοπορίες (Μέλος πεζοπορικής ομάδας «Προπατώ στην Κρήτη»), Μπάσκετ

# CURRICULUM VITAE

## NIKOLAOS FRAGKOULIS

### PERSONAL DETAILS

Date of Birth: 02/12/1994  
Marital status: single  
Military obligations: Unfulfilled  
Nationality: Greek

### CONTACT INFO

E-mail: [nikosfragkoulis94@gmail.com](mailto:nikosfragkoulis94@gmail.com)  
Address: 9, A. Mitsa st., 71201, Heraklion Crete, Greece  
Phone number: +30 6936489677, +30 2810283659

### **Work experience**

---

- **Temporary post at Institute of Electronic Structure & Laser (IESL)**, May 2018
- **Internship at Chemicals Agency of Crete**, food and beverage analysis, July 2016-September 2016

### **Teaching experience**

---

- **General Chemistry Laboratory Assistant**, September 2017-May 2018

### **Education**

---

- **General Chemistry Post Graduate Program**, February 2017-Today
- **Institute of Electronic Structure & Laser (IESL)**, Training in Qualitative Determination and Food and Beverage Analysis using Optical Spectroscopy, September 2017-Today Supervisor: Mr. Βελεγράκης Μιχάλη
- **University of Crete, Department of Chemistry**, 2012-2017, bachelor's degree: Very Good (7,65)

**Degree thesis:** Developing methods to identify total polyphenols in olive oil samples using NMR spectroscopy, Supervisor: Mr. Apostolos Spyros, Degree grade: Excellent: (10)

- **Varvakeio Experimental High School** (18,3)



### **Conferences-Seminars**

---

- "Spectroscopic Analysis of Greek Extra Virgin Olive oil: Origin discrimination and Adulteration studies" (Poster), 11th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis", September 2019
- "Greek Honey and Milk Spectroscopic Analysis: Botanical classification, Origin discrimination and adulteration studies" (Poster), 11th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis", September 2019
- "Analysis of Greek Extra Virgin Olive oil by Spectroscopic Methods: Quality Control, Classification and Adulteration Studies" (Poster), 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days, 25-29 of September 2018
- "Optical Spectroscopic Techniques in the Classification and Quality Control of AgroFoods" (Poster), 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days, 25-29 of September 2018
- 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, September 2017
- Total Phenolics Determination and Profiling in Olive Oil by NMR Spectroscopy (Poster), 19th Postgraduates Conference on Chemistry, 2-4 of May 2017
- «Biophotonics and molecular imaging-BiMI SummerSchool», 27-31 of July 2015

### **Distinctions**

---

Best poster prize in the 11<sup>th</sup> Aegean Analytical Chemical Days Conference with title: "Analysis of Greek Extra Virgin Olive Oil by Spectroscopic Methods: Quality Control, Classification and Adulteration Studies", Chania, Crete, 25-29 of September 2018

### **Main Interests**

---

- Food Chemistry
- Specialized Spectroscopic Techniques
- Clinical Chemistry and Clinical Analysis

### **Skills**

---

- Experienced in use of laboratory equipment
- Experienced in spectroscopic techniques (UV-Vis-NIR, Raman, FT-IR, fluorescence spectroscopy), gas and liquid chromatography
- Basic knowledge of using NMR spectrometer
- Fast learner, resilient, willing and responsible

### ***Languages***

---

- **English:** Excellent command: Certificate of Proficiency of the University of Michigan
- **French:** Good command: Certificate of B1 (Intermediate)

### ***Technical Skills***

---

- Windows 7, 8 and 10
- Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook)
- Matlab, OriginLab και Labview

### ***Other***

---

- Holder of a car driving license
- Member of the hiking group "Propato in Crete"

### ***Interests***

---

- Travelling
- Playing Basketball

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Περίληψη</b> .....	14
<b>Abstract</b> .....	15
<b>Σκοπός Διατριβής</b> .....	16
<b>Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Υπόβαθρο</b> .....	17
1.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία.....	17
1.2 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους- Ορατού (UV-VIS).....	17
1.3 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου.....	20
1.4 Φασματοσκοπία ATR- FTIR.....	22
1.5 Φασματοσκοπία σκέδασης Raman.....	24
1.6 Φασματοσκοπία Διάχυτης Ανάκλασης.....	25
1.7 Φασματοσκοπία Φθορισμού.....	26
Βιβλιογραφία.....	30
<b>Κεφάλαιο 2. Στατιστική Ανάλυση και Χημειομετρία</b> .....	31
2.1 Εισαγωγή.....	31
2.2 Χημειομετρικές μέθοδοι.....	31
2.3 Προεπεξεργασία Δεδομένων.....	35
Βιβλιογραφία.....	35
<b>Κεφάλαιο 3. Οργανολογία</b> .....	36
3.1 Οργανολογία φασματοσκοπίας απορρόφησης.....	36
3.2 Οργανολογία φασματοσκοπίας φθορισμού.....	37
3.3 Οργανολογία φασματοσκοπίας FT-IR.....	38
3.4 Οργανολογία φασματοσκοπίας Raman.....	38
Βιβλιογραφία.....	40
<b>Κεφάλαιο 4. Μελέτη στο Γάλα</b> .....	41
4.1 Εισαγωγή.....	41

4.1.1 Διαδικασία παραγωγής γάλακτος.....	42
4.1.2 Παράγοντες που επιδρούν στην σύσταση του γάλακτος.....	43
4.1.3 Κατηγορίες Γάλακτος.....	44
4.1.4 Νοθεία στο γάλα.....	45
4.1.5 Χημική Σύσταση.....	46
Βιβλιογραφία.....	50
4.2 Διάκριση εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων γάλακτος βάσει λιποπεριεκτικότητας και ζωικής προέλευσης.....	52
4.2.1 Αποτελέσματα.....	53
4.2.2 Στατιστική Ανάλυση.....	62
4.3 Νοθεία στο Γάλα.....	75
4.3.1 Αποτελέσματα.....	75
4.3.2 Στατιστική Ανάλυση.....	78
4.4 Διάκριση δειγμάτων πρόβειου γάλακτος βάσει γεωγραφικής προέλευσης.....	83
4.4.1 Αποτελέσματα.....	84
4.4.2 Στατιστική Ανάλυση.....	91
Βιβλιογραφία.....	96
<b>Κεφάλαιο 5. Μελέτη στο Ελαιόλαδο.....</b>	<b>97</b>
5.1 Εισαγωγή.....	97
5.1.1 Διαδικασία Παραγωγής.....	98
5.1.2 Κατηγορίες Ελαιολάδου.....	99
5.1.3 Ποικιλίες ελιάς.....	101
5.1.4 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου .....	101
5.1.5 Νοθεία στο ελαιόλαδο.....	104
Βιβλιογραφία.....	106
5.2 Ανίχνευση νοθείας εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου με σπορέλαια.....	108
5.2.1 Αποτελέσματα.....	108
5.2.2 Στατιστική Ανάλυση.....	119

5.3 Ανίχνευση νοθείας στο ελαιόλαδο σε ποικιλιακές μίξεις και μίξεις περιοχών.....	142
5.3.1 Αποτελέσματα.....	144
5.3.2 Στατιστική Ανάλυση.....	159
5.4 Μελέτη ελαιολάδου με φασματοσκοπία Raman.....	190
5.4.1 Αποτελέσματα.....	190
5.4.2 Στατιστική Ανάλυση.....	195
Βιβλιογραφία.....	202
<b>Κεφάλαιο 6. Μελέτη βλέννας σαλιγκαριού.....</b>	<b>203</b>
6.1 Εισαγωγή.....	203
6.2 Αποτελέσματα.....	204
Βιβλιογραφία.....	210
<b>Κεφάλαιο 7 Συμπεράσματα.....</b>	<b>211</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις μέρες μας, ο ποιοτικός έλεγχος των τροφίμων κρίνεται υψίστης σημασίας. Συχνά σχετίζεται με αναλυτικές μεθόδους και τεχνικές που είναι κοστοβόρες και χρονοβόρες. Επομένως, έχει ανακύψει η ανάγκη για την εφαρμογή εναλλακτικών προσεγγίσεων οι οποίες είναι χαμηλού κόστους, μη καταστρεπτικές και που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικές με την ταυτότητα και την ποιότητα των προϊόντων αγροδιατροφής. Στην παρούσα διατριβή έγινε εφαρμογή φασματοσκοπίας απορρόφησης, FT-IR, φθορισμού και διάχυτης ανάκλασης σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση σε εμπορικά διαθέσιμα δείγματα γάλακτος με σκοπό τον συσχετισμό των δειγμάτων με την ζωική τους προέλευση και την λιποπεριεκτικότητα καθώς και σε δείγματα πρόβειου γάλακτος από διαφορετικές περιοχές της Κρήτης με σκοπό την διάκρισή τους κατά τον τρόπο εκτροφής τους και συνεπώς τη γεωγραφική τους προέλευση. Μελετήθηκε επίσης η νόθευση του γάλακτος με νερό και γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης. Ένα άλλο τρόφιμο το οποίο μελετήθηκε είναι το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της φασματοσκοπίας απορρόφησης και Raman σε συνδυασμό με στατιστική ανάλυση με σκοπό την μελέτη της νοθείας Κρητικού εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου με σπορέλαια. Διερευνήθηκαν με τις ίδιες μεθόδους επίσης οι μίξεις τριών ποικιλιών ελαιόλαδου της Λέσβου καθώς και οι μίξεις ελαιολάδου ίδιας ποικιλίας από τρεις διαφορετικές περιοχές με σκοπό την διάκρισή τους. Τέλος, έγιναν κάποιες βασικές μελέτες σε βλέννα σαλιγκαριού, ένα βασικό συστατικό στην βιομηχανία των καλλυντικών. Οι έρευνες αυτές καταδεικνύουν τις δυνατότητες της οπτικής φασματοσκοπίας να γίνει μια επαρκής εναλλακτική επιλογή έναντι των κλασικών αναλυτικών τεχνικών.

Λέξεις κλειδιά: Φασματοσκοπία, απορρόφηση, φθορισμός, FT-IR, Raman, γάλα, ελαιόλαδο, βλέννα, στατιστική ανάλυση

## ABSTRACT

Quality control in food products is of great importance nowadays. It is often associated with modern analytical methods and procedures which are expensive and time consuming. So, the need has arisen of alternative approaches that are of low cost, non-destructive, can provide rapid information regarding the identity and quality of agrofoods products. In this contribution, absorption, FT-IR, fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy coupled with statistical analysis has been applied in commercially available milk samples so as to correlate them with the different animal origin and the fat percentage. Additionally, sheep milk samples from different breeding sites in Crete have been studied in order to be discriminated according to their geographical origin. The adulteration of milk with water and milk of different species was also studied. Another product that was studied is the extra virgin olive oil. We used absorption and Raman spectroscopy with statistical data analysis to study Cretan extra virgin olive oil adulterated with seed oils. and also varietal and regional mixes of extra virgin olive oil. The mixtures of three different varieties of Lesvos olive oil as well as the mixtures of olive oil of the same variety coming from three different places were also investigated in order to discriminate them. Finally, some basic studies have been conducted in snail mucus, an important ingredient in cosmetics industry. These studies demonstrate the potential of the optical spectroscopy as a sufficient alternative to the classical analytical methods.

Keywords: Spectroscopy, absorption, fluorescence, FT-IR, Raman, milk, olive oil, mucus, statistical analysis

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής υπήρξε η εφαρμογή των τεχνικών της οπτικής φασματοσκοπίας σε συνδυασμό με την στατιστική ανάλυση στην ανάλυση τροφίμων και προϊόντων βιολογικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, τα υπό ανάλυση δείγματα ήταν το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, το γάλα και η βλέννα του σαλιγκαριού.

Συνήθως τα τρόφιμα μελετώνται με τις κλασσικές αναλυτικές τεχνικές που παρέχουν πλήρη ανάλυση όσον αφορά την σύσταση και τις ιδιότητες του προϊόντος. Οι τεχνικές αυτές είναι όμως ακριβές, χρονοβόρες και απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό για την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών. Η εφαρμογή των φασματοσκοπικών τεχνικών στην ανάλυση των προαναφερθέντων προϊόντων αποτελεί μια καινούρια προσέγγιση. Οι τεχνικές αυτές είναι απλές, οικονομικές και γρήγορες και μπορούν να δώσουν πολλές σημαντικές πληροφορίες. Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων με την στατιστική ανάλυση μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή πολύ χρήσιμων συμπερασμάτων. Η στατιστική μπορεί να αναδείξει ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα στα δείγματα καθώς και να συσχετίσει τα φασματοσκοπικά δεδομένα με δεδομένα από άλλες τεχνικές.

Στην μελέτη του γάλακτος έγινε εφαρμογή της φασματοσκοπίας απορρόφησης, φθορισμού, FT-IR και διάχυτης ανάκλασης. Στην μελέτη του ελαιολάδου έγινε εφαρμογή της φασματοσκοπίας απορρόφησης και της φασματοσκοπίας Raman ενώ στην μελέτη της βλέννας έγινε εφαρμογή της φασματοσκοπίας φθορισμού.

Το ελαιόλαδο και το γάλα είναι δύο πολύ σημαντικά προϊόντα με αξιοσημείωτη διατροφική αλλά και οικονομική αξία, ειδικά στην Ελλάδα. Αναπόδραστα, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον γύρω από την μελέτη αυτών των τροφίμων ως προς τον χαρακτηρισμό και τον ποιοτικό τους έλεγχο καθώς και η διερεύνηση του φαινομένου της νοθείας. Στο γάλα πραγματοποιήθηκε κατάταξη των δειγμάτων ως προς την ζωική προέλευση, την λιποπεριεκτικότητα και ως προς την γεωγραφική τους προέλευση. Στο ελαιόλαδο μελετήθηκαν δείγματα ως προς την βοτανική τους προέλευση (ποικιλία) και ως προς την γεωγραφική προέλευση. Και στα δύο τρόφιμα μελετήθηκε επίσης η ανίχνευση νοθείας. Όσον αφορά την βλέννα του σαλιγκαριού, την βασική πρώτη ύλη πολλών καλλυντικών, πραγματοποιήθηκε βασική έρευνα με σκοπό την εξαγωγή κάποιων συμπερασμάτων για την σύσταση της βλέννας και την εξάρτηση της από την ηλικία του ζώου.

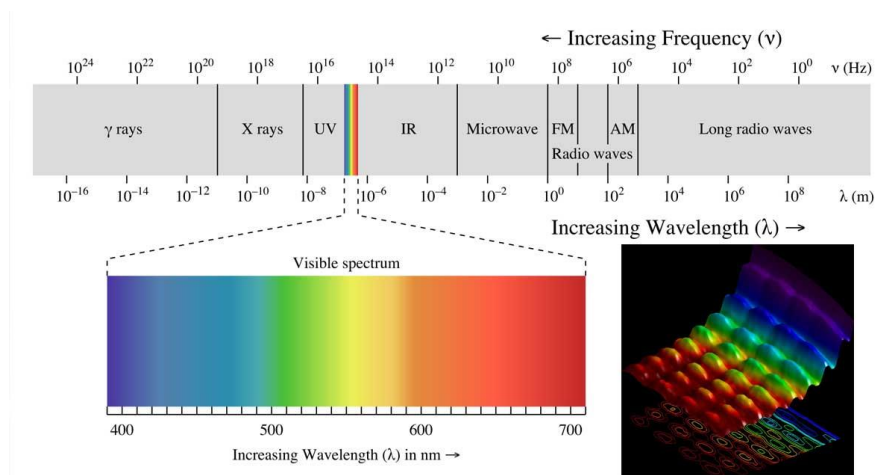


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

## 1.1 Ηλεκτρομαγνητική Ακτινοβολία

Η φασματοσκοπία μελετά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία έχει τόσο κυματική όσο και σωματιδιακή φύση. Με βάση την κυματική της φύση, αποτελείται από κύματα ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου [1]. Τα κύματα αυτά διαδίδονται με την ταχύτητα του φωτός  $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ , ενώ η συχνότητά τους συνδέεται άμεσα και καθορίζει την ενέργεια την οποία μεταφέρουν.

Βάσει της σωματιδιακής της φύσης, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συνίσταται από φωτόνια, η ενέργειά των οποίων υπολογίζεται από τη σχέση  $E=hf$ . Με βάση την ενέργεια, το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται σε περιοχές, εκτεινόμενο από τις υψηλής συχνότητας ( $10^{22} \text{ Hz}$ ) ακτίνες-γ μέχρι και τα πολύ χαμηλής συχνότητας ( $10^3 \text{ Hz}$ ) υπερμακρά ραδιοκύματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.1:



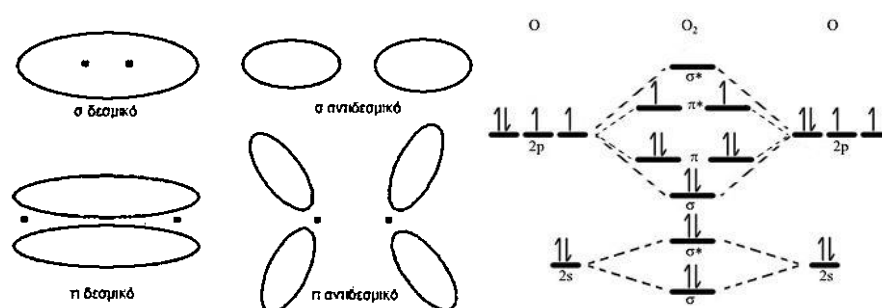
Εικόνα 1.1. Περιοχές ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και σχέσεις μήκους κύματος-συχνότητας [2]

## 1.2 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους- Ορατού (UV-VIS)

Ως απορρόφηση εν γένει ορίζεται η δέσμευση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την ύλη. Σε μοριακό επίπεδο, η απορρόφηση ανάγεται σε διεργασίες των μορίων κατά την αλληλεπίδρασή τους με την ακτινοβολία. Στο υπεριώδες-ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι διεργασίες είναι κυρίως ηλεκτρονικής φύσεως αλλά υπάρχει συνεισφορά και από δονητικό-περιστροφικές κινήσεις των μορίων.

Όπως ορίζει η κβαντομηχανική, τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε μοριακά τροχιακά. Περιγράφουν την κατανομή των ηλεκτρονίων σε ένα μόριο, όπως τα ατομικά τροχιακά σε ένα άτομο. Η αλληλεπίδραση δύο ατομικών τροχιακών οδηγεί σε δύο

μοριακά τροχιακά, από τα οποία το ένα έχει χαμηλότερη ενέργεια από τα δυο αρχικά ατομικά τροχιακά και ονομάζεται δεσμικό ενώ το άλλο υψηλότερη και ονομάζεται αντιδεσμικό. Ανάλογα την γεωμετρία της αλληλεπικάλυψής τους, τα τροχιακά χωρίζονται σε  $\sigma$  και  $\pi$ . Τα  $\sigma$  προκύπτουν με αξονική επικάλυψη ατομικών τροχιακών και ο δεσμός που προκύπτει λέγεται *σίγμα δεσμός*. Τα  $\pi$  προκύπτουν με πλευρική επικάλυψη ατομικών τροχιακών και ο αντίστοιχος δεσμός που προκύπτει ονομάζεται *π δεσμός*. Τα δεσμικά μοριακά τροχιακά ( $\sigma$ ,  $\pi$ ) συγκεντρώνουν τη μέγιστη ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταξύ των συνδεόμενων ατόμων διατηρώντας παράλληλα τη χαμηλότερη ενέργεια του συστήματος (θεμελιώδης κατάσταση), ενώ τα αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$ ) συγκεντρώνουν την ελάχιστη ηλεκτρονιακή πυκνότητα και χαρακτηρίζονται από υψηλή ενέργεια (διεγερμένη κατάσταση). Μία τρίτη κατηγορία μοριακών τροχιακών είναι τα μη δεσμικά ( $n$ ), τα οποία δεν συμμετέχουν στους δεσμούς μεταξύ των ατόμων και διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια <sup>[3]</sup>.



Εικόνα 1.2 Μοριακά τροχιακά (Δεσμικά και Αντιδεσμικά) α) δομή στον χώρο β) Κατανομή ηλεκτρονίων στα MO του  $O_2$

Το φαινόμενο της απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος λαμβάνει χώρα όταν ηλεκτρόνια από δεσμικά και μη δεσμικά τροχιακά μεταβαίνουν σε αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά (Εικόνα 3.2β). Η πιο πιθανή ηλεκτρονική μετάβαση είναι αυτή από το υψηλότερο ενεργειακά κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) στο χαμηλότερο ενεργειακά μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO). Το ποσό της ενέργειας που απαιτείται για να διεγερθεί ένα ηλεκτρόνιο εξαρτάται από την διαφορά ενέργειας μεταξύ της θεμελιώδους και της διεγερμένης κατάστασης. Όσο μικρότερη η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων (θεμελιώδης-διεγερμένη), τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να συμβεί μια μετάπτωση μεταξύ τους<sup>[3]</sup>.

Όταν η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δύο αυτών τροχιακών (HOMO-LUMO) αντιστοιχεί σε επίπεδα ενέργειας του υπεριώδους-ορατού τμήματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (200-800 nm), η μοριακή δομή η οποία διαθέτει τέτοια τροχιακά καλείται χρωμοφόρα ομάδα. Οι χρωμοφόρες ομάδες είναι συνήθως μοριακές δομές με διπλούς δεσμούς και ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ενώ η παρατηρούμενη απορρόφηση οφείλεται σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις από μη δεσμικά  $n$  και δεσμικά  $\pi$  μοριακά τροχιακά σε  $\pi^*$  αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά .

Συζυγιοκοί διπλοί δεσμοί., δηλαδή εναλλαγή διπλών μονών δεσμών -C=C=C=C=C-C- μειώνουν την ενεργειακή διαφορά μεταξύ π δεσμικών και π\* αντιδεσμικών μοριακών τροχιακών [3].

Η κάθε ηλεκτρονική κατάσταση αποτελείται από αρκετά δονητικά επίπεδα. Αυτά, με την σειρά τους, αποτελούνται, το κάθε ένα, από αρκετά περιστροφικά επίπεδα. Οι ενεργειακές διαφορές μεταξύ των δονητικών επιπέδων είναι αρκετά μικρότερες από αυτές των ηλεκτρονιακών καταστάσεων και οι ενεργειακές διαφορές μεταξύ των περιστροφικών επιπέδων είναι ακόμα μικρότερες από αυτές των δονητικών. Η διέγερση ενός ηλεκτρονίου περιλαμβάνει μια μετάπτωση από οποιοδήποτε δονητικό και περιστροφικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης σε οποιοδήποτε δονητικό και περιστροφικό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης, έχοντας ως αποτέλεσμα σε πολλαπλές απορροφήσεις με μικρή διαφορά στο μήκος κύματος που συνθέτουν πολύ ευρείες ταινίες(μπάντες) απορρόφησης.

Για τη μέτρηση του φαινομένου της απορρόφησης εισάγεται η έννοια της διαπερατότητας, η οποία υπολογίζεται από τη σχέση (2) όπου  $I_0$  η αρχική ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και  $I$  η ένταση της ακτινοβολίας μετά τη διέλευσή της από το μέσο απορρόφησης.

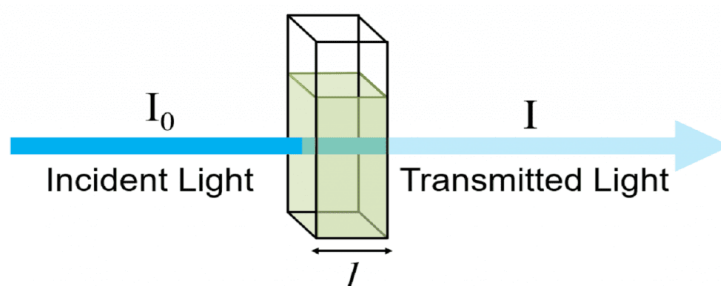
$$T = I/I_0 \quad (1)$$

Εάν θεωρηθεί ότι η απορρόφηση είναι το μοναδικό φαινόμενο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μείωση της έντασης της αρχικής ακτινοβολίας (η σκέδαση του φωτός θεωρηθεί αμελητέα), τότε ισχύει ο νόμος Beer-Lambert, βάσει του οποίου η απορρόφηση ισούται με τον αρνητικό λογάριθμο της διαπερατότητας:

$$A = -\log(T) = -\log(I/I_0) \quad (2)$$

Για τιμή απορρόφησης  $A=1$  το 1/10 της αρχικής ακτινοβολίας διέρχεται από το μέσο απορρόφησης, ενώ για τιμή  $A=2$  μόνο το 1/100. Όταν το μέσο απορρόφησης είναι κάποιο διάλυμα χημικής ουσίας η οποία απορροφά ακτινοβολία, ο νόμος Beer-Lambert εκφράζεται μέσω της σχέσης (3):  $A = \epsilon c l$  (3)

όπου  $A$ : η υπολογιζόμενη τιμή απορρόφησης,  $\epsilon$ : η μοριακή απορροφητικότητα της χημικής ουσίας σε  $M^{-1} cm^{-1}$ ,  $c$ : η συγκέντρωση της χημικής ουσίας σε  $M$  και  $l$ : το μήκος της κυψελίδας σε  $cm$  (οπτική διαδρομή) [4]. Η απορρόφηση είναι αδιάστατο μέγεθος.



Εικόνα 1.3: Διέλευση φωτός από δείγμα [5]

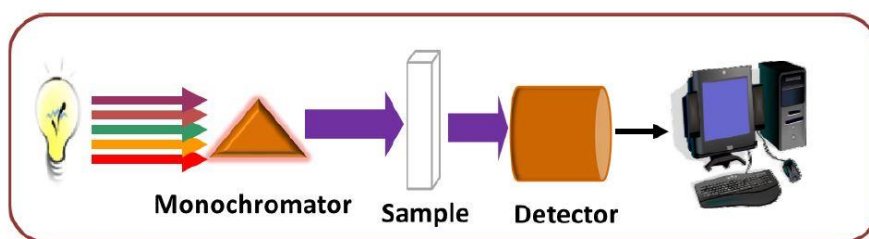
Σε διαλύματα με περισσότερες από μία χημικές ουσίες, ισχύει η αρχή της προσθετικότητας, με τη συνολική απορρόφηση να προκύπτει από το αλγεβρικό άθροισμα των επιμέρους απορροφήσεων.

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n) \cdot l \quad (4)$$

Οι προϋποθέσεις για να ισχύει ο νόμος των Beer-Lambert είναι<sup>[6]</sup>:

- Μοναδικός μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας και της ουσίας να είναι η απορρόφηση.
- Η προσπίπτουσα ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική.
- Ο όγκος του διαλύματος να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένος.
- Τα σωματίδια που απορροφούν να μην αλληλεπιδρούν χημικά με τα άλλα σωματίδια του διαλύματος

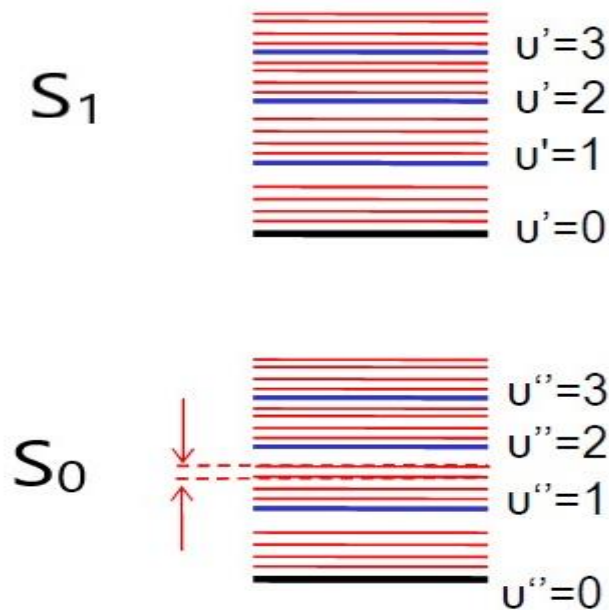
Η συνήθης οργάνολογία για τη μέτρηση του φαινομένου της απορρόφησης είναι το φασματοφωτόμετρο. Το φασματοφωτόμετρο αποτελείται από μία λυχνία δευτερίου ως πηγή ακτινοβολίας για το UV, μία λυχνία αλογόνου για το ορατό και το εγγύς-υπέρυθρο, ένα πρίσμα ή φράγμα περίθλασης το οποίο επιτελεί τον ρόλο του μονοχρωμάτορα, μία κυψελίδα από χαλαζία (η οποία δεν απορροφά στο UV) για την τοποθέτηση των διαλυμάτων, τα οπτικά μέρη της διάταξης (φακοί, κάτοπτρα, κλειστρά), έναν φωτοπολλαπλασιαστή ή κάποιο φωτοαγωγικό υλικό το οποίο λειτουργεί ως ανιχνευτής του οπτικού σήματος, ένας μετατροπέας του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό και ένα σύστημα καταγραφής των δεδομένων, όπως φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 1.4. :Τυπική πειραματική διάταξη για τη μέτρηση του φαινομένου της απορρόφησης

### 1.3 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου <sup>[7]</sup>

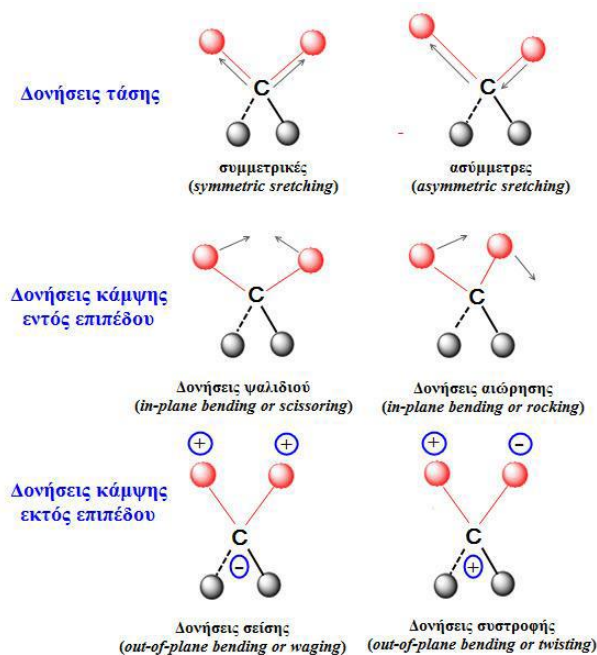
Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου μελετάται η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Η υπέρυθρη ακτινοβολία δε διαθέτει αρκετή ενέργεια για να προκαλέσει τα είδη των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων που συναντώνται στην υψηλότερης ενέργειας ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία. Η απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή του υπέρυθρου προκαλεί διεγέρσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών σταθμών δόνησης και περιστροφής του μορίου, ενώ το μόριο παραμένει στη θεμελιώδη ηλεκτρονική κατάσταση.



Εικόνα 1.5: Ηλεκτρονιακές, δονητικές (μπλε χρώμα) και περιστροφικές στάθμες ενός μορίου

Απαραίτητη προϋπόθεση για να απορροφήσει υπέρυθη ακτινοβολία ένα μόριο είναι να υποστεί περιοδική μεταβολή η διπολική ροπή του. Όσο μεγαλύτερη η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο μεγαλύτερη η χαρακτηριστική απορρόφηση στο IR. Ένα μόριο απορροφά ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Επομένως τα ομοκυρηνικά διατομικά μόρια δεν απορροφούν και δεν μπορούν να εντοπιστούν με την φασματοσκοπία IR.

Υπάρχουν δύο μορφές δονήσεων. Οι δονήσεις έκτασης όπου περιγράφουν τη συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους και οι δονήσεις κάμψης όπου μεταβάλλεται η γωνία μεταξύ δύο δεσμών. Οι δονήσεις έκτασης διακρίνονται σε συμμετρική και ασύμμετρη και οι δονήσεις κάμψης σε ψαλιδιού, αιώρησης, σείσης και συστροφής.



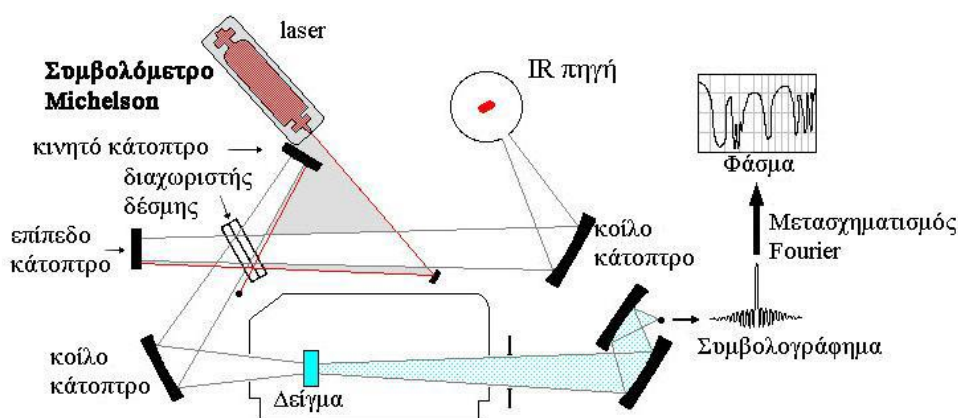
Εικόνα 1.6. Κανονικοί τρόποι δόνησης ενός μορίου [8]

Η κάθε κορυφή που εμφανίζεται σε ένα φάσμα IR αντιστοιχεί σε καθορισμένη δονητική κίνηση συγκεκριμένου δεσμού μεταξύ ατόμων. Το εγγύς υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος καλύπτει την περιοχή από 800 - 2500 nm (12500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Οι παρατηρούμενες κορυφές στα φάσματα NIR, είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των θεμελιωδών δονητικών μεταβάσεων αλλά και των υπέρτονων αυτών (1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup>, 3<sup>ης</sup> τάξης). Οι μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα από τη θεμελιώδη κατάσταση χαρακτηρίζονται ανάλογα με το δονητικό επίπεδο στο οποίο μεταβαίνουν ως πρώτη υπέρτονος όπου  $u=0 \rightarrow u=2$ , δεύτερη υπέρτονος  $u=0 \rightarrow u=3$  κλπ. Οι πιο συνηθισμένες κορυφές αποδίδονται σε δεσμούς C-C, C-H, N-H, O-H και C=O. Στο μέσο υπέρυθρο φάσμα (mid IR) παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ η άπω υπέρυθρη περιοχή (far IR) παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος.

#### **1.4 Φασματοσκοπία ATR- FTIR** [8]

Στον ίδιο κλάδο της φασματοσκοπίας υπέρυθρου υπάρχει και η φασματοσκοπία FTIR (Fourier Transform IR). Το φασματοφωτόμετρο FT-IR δίνει ίδιες πληροφορίες με το κλασικό φασματοφωτόμετρο, ωστόσο το πλεονέκτημα της τεχνικής FT-IR είναι η ύπαρξη συμβολόμετρου αντί μονοχρωμάτορα στο φασματοφωτόμετρο. Το πιο διαδεδομένο είναι το συμβολόμετρο Michelson. Αποτελείται από δύο κάθετα μεταξύ τους κάτοπτρα, ένα σταθερό και ένα κινητό, και ανάμεσά τους βρίσκεται ο διαχωριστής δέσμης. Το συμβολόμετρο επιτρέπει να φτάνουν στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι διαδοχικά, όπως στα συμβατικά

φασματοφωτόμετρα. Για τον λόγο αυτό είναι πολύ πιο γρήγορη τεχνική από την συμβατική φασματοσκοπία IR. Οι μαθηματικοί μετασχηματισμοί Fourier είναι απαραίτητοι για την μετατροπή των raw data σε φάσμα. Παρακάτω φαίνεται μια τυπική πειραματική διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου FTIR:

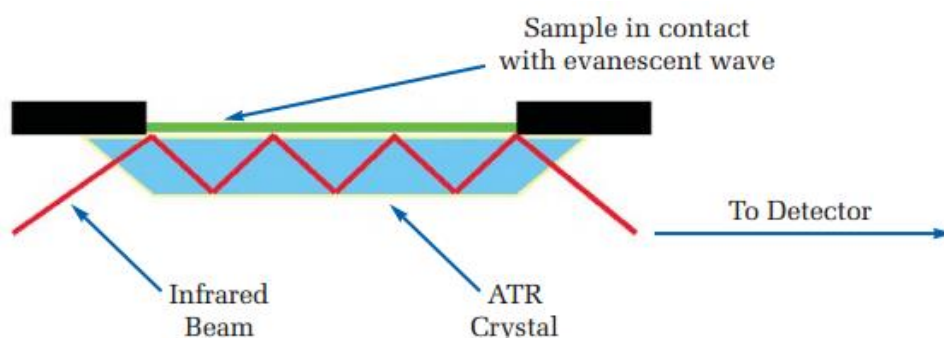


Εικόνα 1.7: Τυπική πειραματική διάταξη φασματοφωτόμετρου FT-IR<sup>[8]</sup>

Η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή κατευθύνεται στον διαχωριστή δέσμης όπου διαχωρίζεται σε δύο ίσης έντασης και συχνότητας δέσμες, εκ των οποίων η μία προσπίπτει στο σταθερό κοίλο κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και στη συνέχεια, αφού ανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Ο διαχωριστής δέσμης είναι κατασκευασμένος από KBr ένα υλικό που δεν απορροφά στο IR. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον θάλαμο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές. Στον ανιχνευτή το οπτικό σήμα μετατρέπεται σε ηλεκτρικό. Λαμβάνεται το συμβολογράφημα το οποίο αφού υποστεί μετασχηματισμό Fourier, δίνει το πραγματικό φάσμα IR.

Για την ανάλυση υλικών και δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις συμβατικές φασματοσκοπικές μεθόδους διαπερατότητας, όπως είναι τα στερεά, χρησιμοποιούνται οι τεχνικές ανάκλασης IR. Η πιο γνωστή ίσως τεχνική είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance – ATR) για χρήση κυρίως σε επιφανειακές αναλύσεις. Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης,  $n_1$ ) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης,  $n_2$ ). Ο κρύσταλλος που χρησιμοποιείται συνήθως είναι γερμάνιο (Ge), σεληνίδιο του ψευδαργύρου (ZnSe) και διαμάντι. Απαιτείται καλή επαφή του κρυστάλλου με το δείγμα. Κατά την ανάκλαση, η ακτινοβολία εισέρχεται στο δείγμα σε βάθος ίσο με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας IR και υφίσταται μικρή απορρόφηση. Στη συνέχεια υφίσταται πολλαπλές ανακλάσεις και η απορρόφηση

αυξάνεται σημαντικά. Η τεχνική αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτεί προεπεξεργασία του δείγματος.



Εικόνα 1.8: Σχηματικά απεικόνιση του φαινομένου ATR<sup>[8]</sup>

### **1.5 Φασματοσκοπία σκέδασης Raman** <sup>[7]</sup>

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μία δονητική μοριακή τεχνική. Το φαινόμενο στο οποίο βασίζεται αυτή η τεχνική είναι η ανελαστική σκέδαση του φωτός από την ύλη. Οι κορυφές σε ένα φάσμα Raman αντιστοιχούν σε χαρακτηριστικούς δονητικούς τρόπους μορίων.

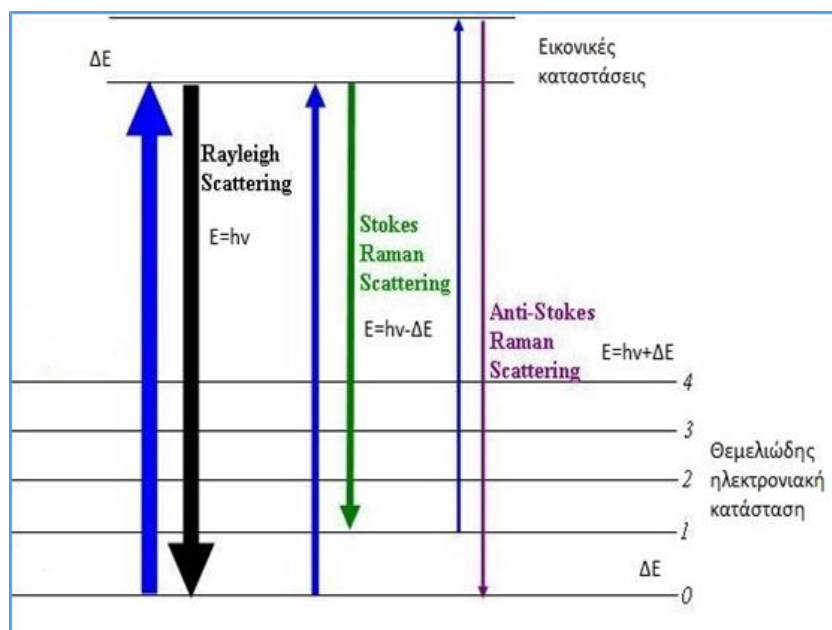
Κατά τη διαδικασία του φαινομένου Raman έχουμε διέγερση του μορίου σε μία εικονική ενεργειακή κατάσταση (virtual state) μέσω της ακτινοβολίας από laser και στη συνέχεια εκπομπή των φωτονίων κατά την αποδιέγερση. Το κύριο μέρος των φωτονίων παραμένουν ενεργειακά αμετάβλητα και αποδιεγείρονται στην κατώτερη ενεργειακά στάθμη (τότε έχουμε την λεγόμενη σκέδαση Rayleigh), ενώ ένα πολύ μικρό μέρος σκεδάζεται με μεταβολή της ενέργειάς του (σκέδαση Raman). Η αλλαγή στην ενέργεια δίνει πληροφορίες σχετικά με τις δονητικές καταστάσεις στο μόριο.

Η ενέργεια που σκεδάζεται αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου (98%) από ακτινοβολία συχνότητας παρόμοιας με αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (σκέδαση Rayleigh), αλλά ένα μέρος της αποτελείται από μερικές διακεκριμένες συχνότητες άνω και κάτω από τη συχνότητα της προσπίπτουσας. Η σκέδαση αυτή ονομάζεται Raman. Επειδή αυτό το φαινόμενο είναι τόσο ασθενές, απαιτούνται ισχυρές μονοχρωματικές πηγές ακτινοβολίας laser.

Κατά την ανελαστική σκέδαση δύο διαδικασίες μπορεί να πραγματοποιηθούν και να οδηγήσουν σε δύο διαφορετικά είδη φασματικών γραμμών. Οι φασματικές γραμμές των οποίων η συχνότητα είναι μικρότερη της συχνότητας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας laser καλούνται γραμμές Stokes και οφείλονται στη σύγκρουση φωτονίων με μόρια που βρίσκονται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση, ενώ οι φασματικές γραμμές με συχνότητα μεγαλύτερη καλούνται γραμμές anti-Stokes και οφείλονται στη σύγκρουση φωτονίων με μόρια που βρίσκονται σε διεγερμένες ενεργειακά δονητικές καταστάσεις. Στη δεύτερη αυτή περίπτωση η περίσσεια



ενέργειας μεταφέρεται στα φωτόνια καθώς τα μόρια επανέρχονται στην αρχική θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση.



Εικόνα 1.9: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων φαινομένου Raman [7]

Οι γραμμές anti-Stokes είναι ασθενέστερες από τις γραμμές Stokes γιατί καθορίζονται από τους πληθυσμούς στις δονητικές καταστάσεις που λαμβάνουν μέρος στην μετάβαση. Ο λόγος είναι ότι πολύ λίγα μόρια βρίσκονται εξ αρχής σε διεγερμένη δονητική κατάσταση.

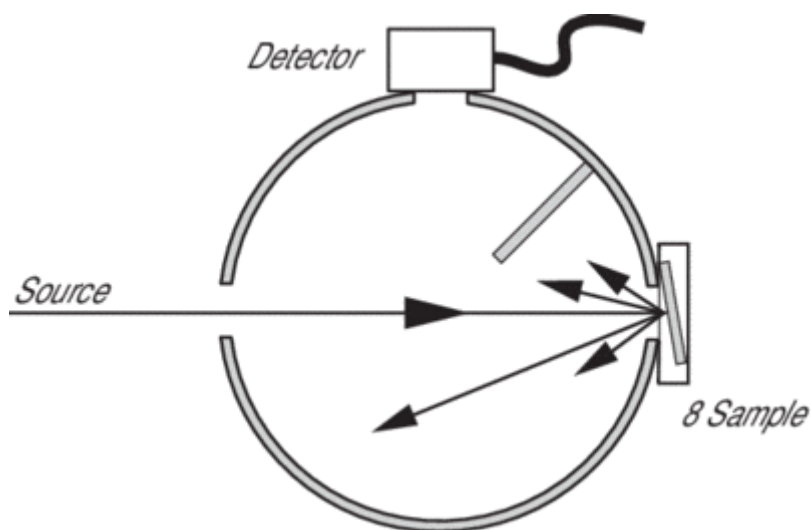
Για να είναι μια μετάβαση ενεργή κατά Raman, πρέπει να υπάρχει μεταβολή πολωσιμότητας κατά την ταλάντωση του μορίου. Η πολωσιμότητα είναι η σταθερά επιδεικτικότητα πόλωσης του μορίου και εκφράζει την ευκολία με την οποία το ηλεκτρονικό νέφος ενός μορίου μπορεί να μετατοπιστεί. Το γεγονός λοιπόν ότι δεν βασίζεται στην μεταβολή της διπολικής ροπής δηλώνει ότι μπορεί να ανιχνεύσει και τα ομοπυρηνικά διατομικά μόρια, εν αντιθέσει με την φασματοσκοπία IR. Ωστόσο το βασικό της μειονέκτημα είναι ότι βασίζεται σε ένα ασθενές φαινόμενο ενώ πολλές φορές ο φθορισμός του δείγματος, σαν φαινόμενο, μπορεί να υπερκαλύψει την σκέδαση Raman.

### 1.6 Φασματοσκοπία Διάχυτης Ανάκλασης<sup>[8]</sup>

Όταν μια δέσμη φωτός προσπίπτει στην επιφάνεια ενός στερεού δείγματος, η ανακλώμενη υπόκειται σε δύο φαινόμενα: την κατοπτρική ανάκλαση και τη διάχυτη ή διαχεόμενη ανάκλαση. Το ίδιο φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί και σε ένα υγρό υπό την προϋπόθεση ότι δεν είναι διαυγές. Στη πρώτη περίπτωση οι παράλληλες ακτίνες της δέσμης φωτός ανακλώνται υπό γωνία, ίση με τη γωνία πρόσπτωσης,

παραμένοντας παράλληλες μεταξύ τους. Η διάχυτη ανάκλαση παρατηρείται κατά την πρόσπτωση φωτός σε αδρές επιφάνειες, όπου οι τυχαία κατανεμημένες επιφάνειες των σωματιδίων του υλικού ανακλούν την ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις. Ένα μέρος της ακτινοβολίας εισέρχεται στο υλικό. Από τα μόρια του υλικού η ακτινοβολία απορροφάται σε ένα ποσοστό και σκεδάζεται. Τμήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας απορροφάται από τα γειτονικά μόρια με αποτέλεσμα το κλάσμα της ακτινοβολίας που εξέρχεται από την επιφάνεια του υλικού να είναι μειωμένο κατά ένα παράγοντα ανάλογο της απορρόφησης. Κατά συνέπεια η παρατηρούμενη διάχυτη ανάκλαση μειώνεται αντιστρόφως ανάλογα από την απορρόφηση.

Η αποτελεσματική συλλογή της διάχυτης ανάκλασης ενός μέσου πραγματοποιείται, συνήθως, με σφαίρα ολοκλήρωσης (integrating sphere). Η σφαίρα ολοκλήρωσης αποτελείται από μία σφαιρική κοιλότητα επενδυμένη με υλικό υψηλής ανακλαστικότητας, για το μελετώμενο εύρος μηκών κύματος. Διαθέτει τρεις οπές: μία για την είσοδο της δέσμης, μία για την τοποθέτηση του δείγματος και η τρίτη που οδηγεί στην είσοδο του ανιχνευτή. Ο ρόλος της σφαίρας ολοκλήρωσης είναι η καθοδήγηση της διάχυτης ακτινοβολίας από την επιφάνεια του δείγματος, μέσω ανακλάσεων στο εσωτερικό της σφαιρικής κοιλότητας, στη θέση ανίχνευσης της ακτινοβολίας. Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η συλλογή της διάχυτης ακτινοβολίας από όλες τις κατευθύνσεις με σκοπό την ενίσχυση του καταγραφόμενου σήματος. Είναι μια τεχνική που διέπεται από τις ίδιες αρχές με την φασματοσκοπία NIR, πραγματοποιείται στο ίδιο φασματικό εύρος και στο ίδιο μηχάνημα, υπό την προϋπόθεση φυσικά ότι το μηχάνημα διαθέτει σφαίρα ολοκλήρωσης.

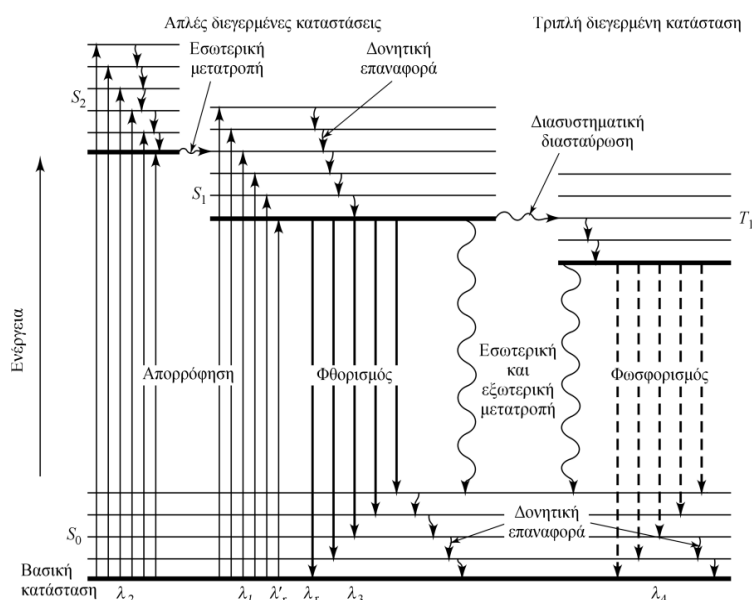


Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση σφαίρας ολοκλήρωσης [9]

### **1.7 Φασματοσκοπία Φθορισμού**<sup>[6]</sup>

Κατά την φωτοδιέγερση ενός μορίου, η ενέργεια που προσλαμβάνεται με την απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο άτομο αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους με επακόλουθη αποδιέγερση των διεγερμένων ηλεκτρονίων στη βασική κατάσταση συννηθέστερα με τη μορφή θερμότητας αλλά και

πολύ συχνά με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωταύγεια και χωρίζεται σε δύο επιμέρους κατηγορίες ανάλογα τον χρόνο ζωής του φαινομένου. Χαρακτηρίζεται ως φθορισμός όταν η εκπομπή διαρκεί  $10^{-9}$ -  $10^{-6}$  sec και ως φωσφορισμός όταν διαρκεί  $10^{-4}$ - $10$  sec. Η γενική αρχή της φωτοδιέγερσης και εκπομπής συνοψίζεται στο διάγραμμα Jablonski:



Εικόνα 1.11. Διάγραμμα Jablonski ενός φωτοφωταυγάζοντος συστήματος [6]

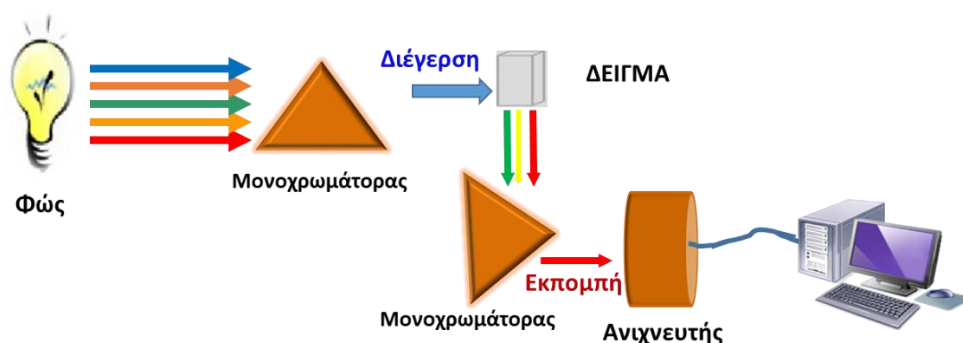
Στο διάγραμμα Jablonski, περιγράφεται ο μηχανισμός διέγερσης και αποδιέγερσης ενός μορίου. S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> και S<sub>2</sub> είναι κατά σειρά η θεμελιώδης, 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση. Κάθε μία από τις καταστάσεις αυτές έχει πολλά δονητικά επίπεδα. Κατά την απορρόφηση ενέργειας, μόρια μεταβαίνουν από την S<sub>0</sub> σε διάφορα δονητικά επίπεδα των S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>. Έπειτα, πραγματοποιείται αποδιέγερση των μορίων των S<sub>1</sub> και S<sub>2</sub> στα χαμηλότερα δονητικά τους επίπεδα μέσω δονητικής επαναφοράς. Σε αυτήν τη διαδικασία δεν εκπέμπονται φωτόνια.

Από την S<sub>2</sub> το μόριο μπορεί να μεταβεί σε ισοενεργειακή δονητική στάθμη της S<sub>1</sub> (δονητική στάθμη με ενέργεια ίση με αυτή της S<sub>2</sub>), διεργασία που ονομάζεται εσωτερική μετατροπή ή (πολύ σπάνια) σε ισοενεργειακή στάθμη τριπλής κατάστασης με διεργασία που ονομάζεται διασυστημική διασταύρωση. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η αποδιέγερση προς την βασική κατάσταση μέσω ενός συνδυασμού μηχανισμών. Η προτιμώμενη πορεία προς τη βασική κατάσταση είναι αυτή που ελαχιστοποιεί τον χρόνο ζωής της διεγερμένης κατάστασης.

Η μετάπτωση από singlet καταστάσεις στη θεμελιώδη S<sub>0</sub> χαρακτηρίζεται από εκπομπή ακτινοβολίας και αποτελεί τον φθορισμό ενώ η αποδιέγερση από triplet κατάσταση με εκπομπή ακτινοβολίας αποτελεί το φαινόμενο του φωσφορισμού.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το εκπεμπόμενο φως είναι χαμηλότερης ενέργειας από το φως που απορροφήθηκε, άρα το μήκος κύματος θα είναι μεγαλύτερο και το χρώμα διαφορετικό. Όπως προαναφέρθηκε, μετά την εκπομπή του φωτός το φθορίζον μόριο επανέρχεται στη θεμελιώδη κατάσταση και μετά μπορεί να απορροφήσει ξανά φωτόνιο και να πραγματοποιηθεί φθορισμός πολλαπλές φορές. Γι' αυτόν τον λόγο ο φθορισμός αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης, πολύ πιο ευαίσθητη από την φασματοσκοπία απορρόφησης.

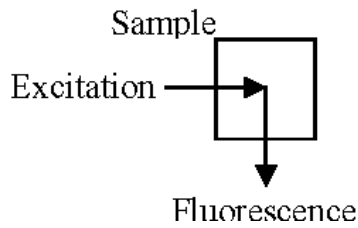
Η συνήθης οργανολογία για τη μέτρηση του φθορισμού είναι το φασματοφθορισμόμετρο το οποίο αποτελείται από μία λυχνία ξένου ή λυχνία υδραργύρου ως πηγή ακτινοβολίας για το υπεριώδες και ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, έναν μονοχρωμάτορα ο οποίος ρυθμίζει το μήκος κύματος διέγερσης και έναν δεύτερο μονοχρωμάτορα ο οποίος ρυθμίζει το μήκος κύματος εκπομπής, μία κυψελίδα για τα υγρές μορφής δείγματα, οπτικά εξαρτήματα όπως φακοί εστίασης και κάτοπτρα για τη συλλογή και τη μετάδοση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, έναν φωτοπολλαπλασιαστή για την ανίχνευση του οπτικού σήματος και ένα σύστημα καταγραφής των δεδομένων. Μία τυπική πειραματική διάταξη φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



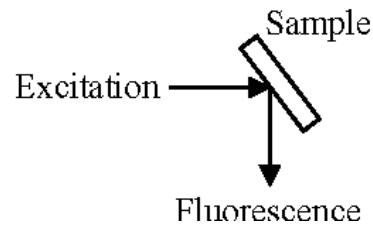
Εικόνα 1.12: Στοιχειώδης πειραματική διάταξη φασματοφθορισμόμετρου

Η πιο συνηθισμένη γεωμετρία για τη μέτρηση του φαινομένου είναι αυτή της ορθής γωνίας (Right Angle), κατά την οποία σχηματίζεται μία γωνία  $90^\circ$  μεταξύ της ακτινοβολίας διέγερσης και της ακτινοβολίας εκπομπής. Η γεωμετρία αυτή είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φθορισμού σε αραιά διαλύματα φθορίζουσών ουσιών, τα οποία δεν εμφανίζουν έντονα φαινόμενα αυτοαπορρόφησης, ενώ σε αυτήν τη γωνία ελαχιστοποιούνται φαινόμενα σκέδασης (ελαστική Rayleigh ή ανελαστική Raman) και ανάκλασης. Σε περιπτώσεις δειγμάτων στερεάς μορφή ή σε πυκνά διαλύματα με έντονα φαινόμενα αυτοαπορρόφησης, όπως το γάλα, χρησιμοποιείται η γεωμετρία της εμπρόσθιας όψης (Front face). Στη γεωμετρία αυτή το φθορίζον υλικό ακτινοβολείται υπό γωνία  $30^\circ - 60^\circ$  ως προς την κάθετο της όψης του, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από αυτό.

## Right-angle fluorescence



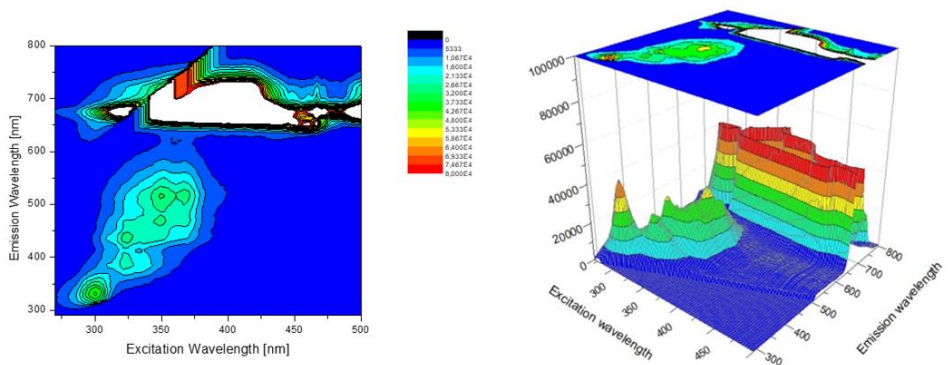
## Front-face fluorescence



Εικόνα 1.13: Γεωμετρία ορθής γωνίας και εμπρόσθιας όψης<sup>[10]</sup>

Η απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού γίνεται και αυτή με τη μορφή φασμάτων. Διακρίνουμε τρεις κατηγορίες φασμάτων: φάσματα εκπομπής, όταν κατά τη μέτρηση το μήκος κύματος διέγερσης παραμένει σταθερό, ενώ μεταβάλλεται το μήκος κύματος εκπομπής, φάσματα διέγερσης όταν το μήκος κύματος εκπομπής παραμένει σταθερό, ενώ μεταβάλλεται το μήκος κύματος διέγερσης και φάσματα σύγχρονης σάρωσης, όταν μεταβάλλεται ταυτόχρονα το μήκος κύματος εκπομπής και το μήκος κύματος διέγερσης.

Μία άλλη μορφή απεικόνισης του φαινομένου του φθορισμού, η οποία συνηθίζεται σε περιπτώσεις δειγμάτων με περισσότερα από ένα φθορίζοντα συστατικά είναι αυτή των χαρτών φθορισμού (Excitation Emission Matrices, EEM). Οι χάρτες αυτοί προκύπτουν από την προβολή φασμάτων εκπομπής σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης ή από την προβολή φασμάτων διέγερσης σε διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής. Μέσω αυτών των χαρτών λαμβάνεται μία πλήρης εικόνα για τον συνολικό φθορισμό του εκάστοτε δείγματος. Στην δισδιάστατη απεικόνιση, ο άξονας χ απεικονίζει το μήκος κύματος διέγερσης, ο άξονας γ απεικονίζει το μήκος κύματος εκπομπής ενώ η ένταση του φθορισμού απεικονίζεται βάσει της χρωματικής διακύμανσης, πάντα σύμφωνα με το υπόμνημα.



Εικόνα 1.14: Δισδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση χάρτη φθορισμού

Όλες αυτές οι φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν ως κοινό σημείο ότι είναι χαμηλού κόστους, είναι πολύ γρήγορες, είναι μη καταστρεπτικές για τα δείγματα, δεν απαιτούν εξειδικευμένο και γνωστικά καταρτισμένο προσωπικό για την χρήση τους και μπορούν να παράσχουν χρήσιμες πληροφορίες στον χαρακτηρισμό ενός τροφίμου. Δεν μπορούν

να συγκριθούν ως προς την ακρίβεια και το πλήθος των πληροφοριών με τις κλασσικές αναλυτικές τεχνικές (HPLC, GC-MS, Φασματοσκοπία NMR) που όμως έχουν μεγάλο κόστος και οι αναλύσεις τους διαρκούν πολύ ενώ και το προσωπικό χειρισμού των μηχανημάτων καλείται να είναι εξειδικευμένο. Μπορούν να αποτελέσουν μια πολύ ικανοποιητική εναλλακτική των μεθόδων αυτών, ακόμη και συμπληρωματική αυτών, με τον συνδυασμό τους με την στατιστική ανάλυση αλλά και την μηχανική μάθηση.

### **Βιβλιογραφία**

1. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία: Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΘΕΜΑΤΑ. 2008, 19-22
2. <https://imgur.com/gallery/1Zfn8>
3. Τοσσιδης, Ι. Α. Χημεία Ενώσεων Συναρμογής. Εκδόσεις Ζήτη. Θεσσαλονίκη. Ελλάδα (2001).
4. Daniel C.Harris. (2007). Ποσοτική χημική ανάλυση ΤΟΜΟΣ ΙΙ.Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
5. <https://www.edinst.com/blog/the-beer-lambert-law/>
6. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Skoog, Holler, Crouch, 6η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007
7. Julio de Paula , P. Atkins. (2010). Φυσικοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
8. Κουή Μ., Αβελίδης Ν., Θεοδωρακάς Π. Μη καταστρεπτικές φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών. Εκδόσεις Κάλλιπος. Αθήνα. Ελλάδα. (2015), 190-206.
9. <https://www.newport.com/t/integrating-sphere-fundamentals-and-applications>
10. Sadecka J., Tothova J. (2007): Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification – a review. Czech J. Food Sci., 25: 159-173.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ<sup>[1], [2]</sup>

### **2.1 Εισαγωγή**

Η Χημειομετρία ορίζεται ως το επιστημονικό πεδίο το οποίο χρησιμοποιεί τη στατιστική, τα μαθηματικά και την επιστήμη των υπολογιστών με σκοπό τον καλύτερο σχεδιασμό ενός πειράματος και τη βέλτιστη αξιολόγηση των δεδομένων τα οποία προκύπτουν από αυτό. Σήμερα, με την συστηματική χρήση των υπολογιστών και τα προγράμματα της στατιστικής ανάλυσης καθίσταται δυνατή η πλήρης επεξεργασία μεγάλων συνόλων δεδομένων με ελάχιστη απώλεια πληροφοριών. Οι κύριοι στόχοι των πολυπαραγοντικών μεθόδων στην αναλυτική χημεία περιλαμβάνουν τη μείωση των δεδομένων, την ομαδοποίηση, την ταξινόμηση και κατηγοριοποίηση των παρατηρήσεων καθώς και την μοντελοποίηση των σχέσεων που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ των μεταβλητών, ανάλογα το μαθηματικό μοντέλο που χρησιμοποιείται.

Οι μέθοδοι αυτές στοχεύουν στη μελέτη και στην περιγραφή των δεδομένων (Pattern Recognition Methods) και χωρίζονται σε αυτές στις οποίες παρέχεται κάποια αρχική πληροφορία για τα δεδομένα (Supervised Methods) και σε αυτές στις οποίες δεν παρέχεται καμία απολύτως πληροφορία (Unsupervised Methods), αλλά η πιθανή πληροφορία και ομαδοποίηση προκύπτει μετά τη διερευνητική χημειομετρική τους ανάλυση.

Ενώ οι μέθοδοι ανάλυσης είναι πολλοί, σε αυτήν την ενότητα θα παρουσιαστούν οι τέσσερις μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων στην παρούσα εργασία. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Matlab R2015b με το PLS\_Toolbox 8.1.

### **2.2 Χημειομετρικές μέθοδοι**

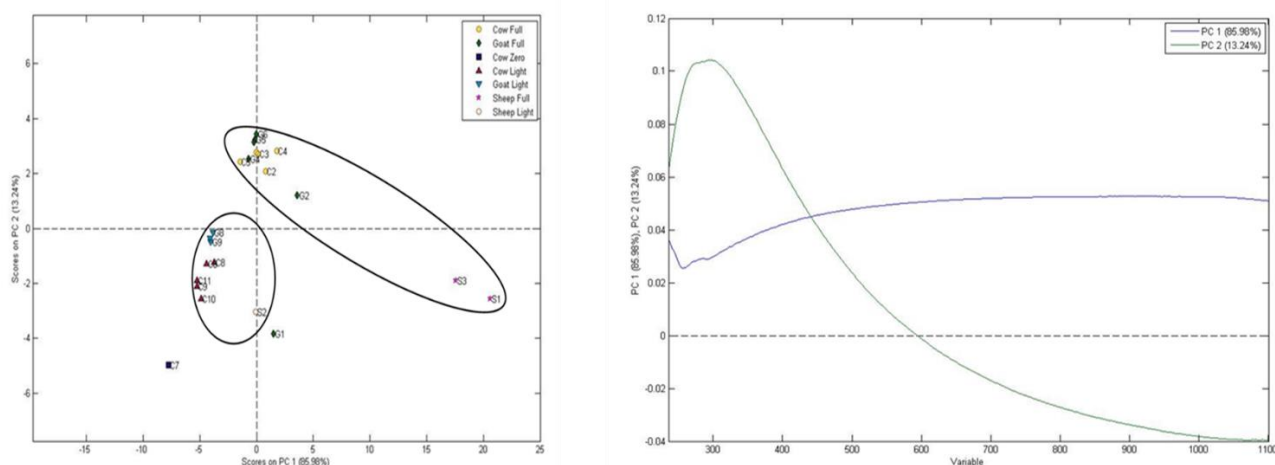
#### Ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA)

Η Principal Components Analysis (PCA) ανήκει στην κατηγορία των διερευνητικών μεθόδων στις οποίες δεν παρέχεται κάποια αρχική πληροφορία (Unsupervised Method). Αποτελεί μία από τις παλαιότερες και πιο διαδεδομένες μεθόδους για την αρχική διερεύνηση δεδομένων με πολλές μεταβλητές, στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους (Κύριες Συνιστώσες). Η διαδικασία γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι κύριες συνιστώσες να περιγράφουν το μέγιστο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων.

Ο συνολικός αριθμός των κυρίων συνιστωσών μπορεί να είναι μέχρι και ίσος με τον αρχικό αριθμό των μεταβλητών, αλλά συνήθως οι πρώτες κύριες συνιστώσες, περιγράφουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων. Όσο

μεγαλύτερο είναι το ποσοστό της πρώτης κύριας συνιστώσας, τόσο σημαντικότερος είναι ο κύριος άξονας που προκύπτει. Επομένως η πρώτη κύρια συνιστώσα περιγράφει το μεγαλύτερο ποσοστό συνεισφοράς ενώ οι επόμενες διαδοχικές συνιστώσες περιγράφουν διαδοχικά μικρότερα ποσοστά συνεισφοράς. Η προβολή των τιμών των πρώτων κύριων συνιστωσών σε ένα γράφημα δημιουργεί τα Score Plots. Με τα Score Plots επιτυγχάνεται η απεικόνιση των δειγμάτων ως σημεία σε ένα δισδιάστατο ή τρισδιάστατο χώρο, ανάλογα τον αριθμό των κυρίων συνιστωσών οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στο γράφημα. Στην περίπτωση της ανάλυσης φασματοσκοπικών δεδομένων, κάθε σημείο αντιστοιχεί σε ένα ολόκληρο φάσμα, το φάσμα του δείγματος. Μέσω αυτής της απεικόνισης είναι δυνατόν να αναδειχθούν ενδιαφέροντα στοιχεία για τα δείγματα, όπως ομοιότητες ή διαφορές μεταξύ αυτών, ομαδοποιήσεις και εντοπισμός δειγμάτων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τα οποία διαφοροποιούνται και ξεχωρίζουν (Outliers).

Η συνεισφορά των αρχικών μεταβλητών στις κύριες συνιστώσες γίνεται με τα Loading Plots. Όσο μεγαλύτερη η απόκλιση από το μηδέν στον κάθετο άξονα τόσο μεγαλύτερη η συνεισφορά της μεταβλητής (στην περίπτωση των φασματοσκοπικών δεδομένων η μεταβλητή αυτή είναι συνήθως φασματική περιοχή) στην κύρια συνιστώσα. Το πρόσημο της απόκλισης δεν έχει ιδιαίτερη φυσική σημασία. Τα Loading Plots των φασματοσκοπικών δεδομένων συνηθίζεται να έχουν τη μορφή φάσματος. Η συγκεκριμένη μορφή απεικόνισης προσφέρει τη δυνατότητα χημικής ερμηνείας των διαφόρων τάσεων που έχουν ήδη εντοπιστεί από τα Score Plots.



Εικόνα 2.1: Ενδεικτικό Score Plot και Loading Plot της μεθόδου PCA

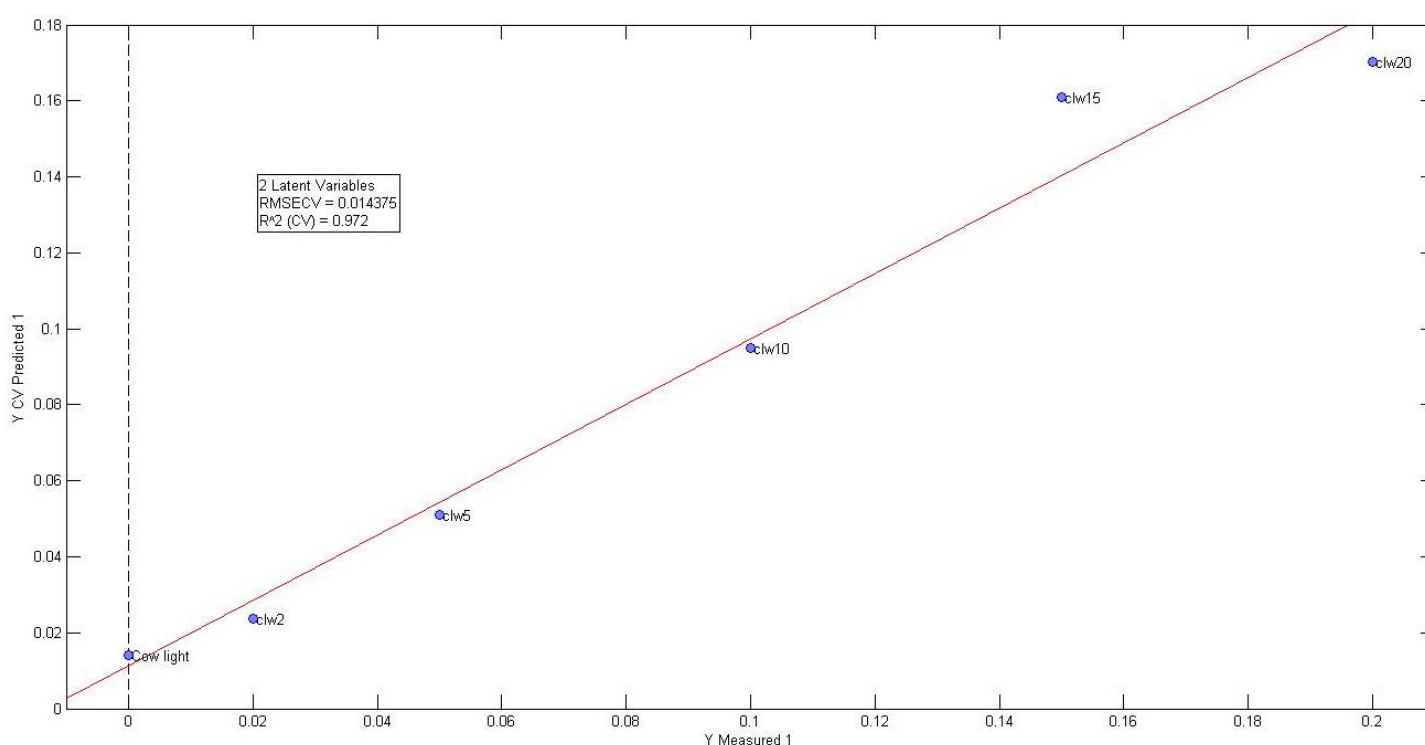
### Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS Regression)

Η Partial Least Squares (PLS) Regression χρησιμοποιεί δεδομένα με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης και ανήκει στις πολυπαραμετρικές μεθόδους βαθμονόμησης. Είναι supervised μέθοδος. Η τεχνική λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο όπως η ανάλυση κυρίων συνιστωσών, στοχεύοντας στη μείωση των αρχικών



μεταβλητών και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους, οι οποίοι σε αυτήν την περίπτωση ονομάζονται λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables).

Για την αξιολόγηση της ικανότητας αυτής της μεθόδου στη μοντελοποίηση και στη συσχέτιση των δεδομένων, χρησιμοποιούνται δείκτες όπως ο συντελεστής συσχέτισης, το σφάλμα πρόβλεψης μετά την εσωτερική αξιολόγηση (Root Mean Square Error of Cross Validation, RMSECV) και ο συντελεστής  $R^2$  που παίρνει τιμές στο εύρος από 0 έως 1. Το RMSECV υπολογίζεται σε ίδιες μονάδες με αυτές της ζητούμενης ιδιότητας. Τιμές  $R^2$  κοντά στη μονάδα θεωρούνται ιδανικές και εμφανίζουν ένα πολύ γραμμικό μοντέλο πρόβλεψης, ενώ όσο μικρότερη η τιμή των σφαλμάτων πρόβλεψης τόσο καλύτερη η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου.



Εικόνα 2.2: Ενδεικτικό Score Plot της μεθόδου PLS

### Ανάλυση διακριτότητας μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)

Η Partial Least Squares- Discriminant Analysis (PLS-DA) είναι μέθοδος κατηγοριοποίησης και ανήκει στις περιγραφικές μεθόδους στις οποίες παρέχονται πληροφορίες για τα δεδομένα (Supervised Pattern Recognition Methods). Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να είναι μία ομάδα στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα

(γεωγραφική προέλευση, ζωική προέλευση, κ.α). Οι παρεχόμενες πληροφορίες δύνανται να έχουν προκύψει μετά από μία αρχική χημειομετρική διερεύνηση ή να είναι προκαθορισμένες με κριτήρια ανεξάρτητα της πειραματικής διαδικασίας, από κάποια εξωτερική πηγή. Σκοπός των μεθόδων κατηγοριοποίησης, είναι η αξιολόγηση των δεδομένων, όσον αφορά στην ικανότητά τους ή όχι, να κατατάσσουν τα δείγματα στις προκαθορισμένες ομάδες λαμβάνοντας υπόψιν τις ήδη δοσμένες πληροφορίες. Και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί λανθάνουσες μεταβλητές για Ο συνήθης τρόπος παρουσίασης των αποτελεσμάτων τα οποία προκύπτουν από αυτές τις μεθόδους, είναι μέσω τετραγωνικών πινάκων κατάταξης (Confusion Matrices). Οι πίνακες αυτοί αποτελούνται από σειρές που αναπαριστούν την πραγματική ομάδα στην οποία ανήκουν τα δείγματα και στήλες που αναπαριστούν την προβλεπόμενη ομάδα. Παράλληλα όπως και οι υπόλοιπες μέθοδοι, παρέχει και score plot και loading plot.

Σε μία ιδανική περίπτωση κατηγοριοποίησης, ο πίνακας αυτός εμπεριέχει μηδενικές τιμές για όλα τα στοιχεία του, εκτός από αυτά που βρίσκονται στη διαγώνιο.

Πίνακας 2.1: Ενδεικτικός Πίνακας Κατάταξης PLS-DA

	Actual Class A	Actual Class B	Actual Class C
Predicted as Class A	$N_A$	0	0
Predicted as Class B	0	$N_B$	0
Predicted as Class C	0	0	$N_C$

#### Παλινδρόμηση κυρίων συνιστωσών (PCR)

Η Principal Components Regression (PCR) όπως η PLS χρησιμοποιεί δεδομένα με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης και ανήκει στις πολυπαραμετρικές μεθόδους βαθμονόμησης. (Multivariate Calibration Methods). Είναι supervised μέθοδος. Η τεχνική στοχεύει στη μείωση των αρχικών μεταβλητών και στον εντοπισμό γραμμικών συνδυασμών τους. Στην προκειμένη περίπτωση, οι γραμμικοί συνδυασμοί αυτοί ονομάζονται Principal Components.

Και σε αυτή τη μέθοδο regression, για την αξιολόγησή της στη δημιουργία γραμμικών μοντέλων και στη συσχέτιση των δεδομένων, χρησιμοποιούνται οι δείκτες RMSECV και  $R^2$ . Πρακτικά δεν διαφοροποιείται σε μεγάλο βαθμό από την PLS.

## **2.3 Προεπεξεργασία Δεδομένων**

Η προ-επεξεργασία των δεδομένων έχει ως σκοπό είτε την εξάλειψη φαινομένων τα οποία δεν σχετίζονται με το προς μελέτη φαινόμενο, είτε την ανάδειξη συγκεκριμένων στοιχείων των δεδομένων που δύναται να έχουν κάποια ιδιαίτερη σημασία. Οι τεχνικές αυτές χωρίζονται στις παρακάτω ομάδες: Transformations, Filtering, Normalization, Scaling and Centering. Η επιλογή του τρόπου προεπεξεργασίας εξαρτάται από τη φύση των δεδομένων, τη χημειομετρική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί και τον στόχο της χημειομετρικής ανάλυσης. Δεν υπάρχει κάποιος συγκεκριμένος κανόνας για το ποια τεχνική προεπεξεργασίας θα δώσει τα ιδανικά αποτελέσματα στην εκάστοτε ανάλυση, αλλά προκύπτει κατόπιν δοκιμών. Παρακάτω καταγράφονται οι τεχνικές που βρήκαν εφαρμογή στην παρούσα διατριβή.

### **Τεχνικές Προεπεξεργασίας**

- Μέθοδος Mean Centering [Scaling and Centering]
- Μέθοδος Standard Normal Variate (SNV) [Normalization]
- Μέθοδος Ομαλοποίησης (Smoothing) [Filtering]
- Μέθοδος Παραγωγίσης Δεδομένων (1<sup>st</sup> Derivative) [Filtering]
- Μέθοδος Λογαρίθμησης (Log 10) [Transformations]

### **Βιβλιογραφία**

1. Richard G. Brereton, (2003) Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant
2. Paul Gemperline, (2006) Practical Guide to Chemometrics

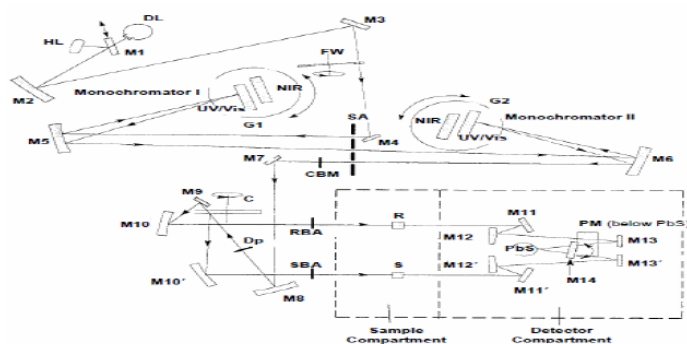
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

### 3.1 Οργανολογία φασματοσκοπίας απορρόφησης

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες, ορατό καθώς και στο εγγύς υπέρυθρο χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer-Lambda 950. Πρόκειται για ένα φασματοφωτόμετρο το οποίο καλύπτει τις περιοχές από 175 έως 3300nm έχοντας υψηλής διακριτικής ικανότητας και πιο συγκεκριμένα στο UV-Vis <math><0.05\text{ nm}</math> και στο NIR <math><0.20\text{ nm}</math>. Το συγκεκριμένο όργανο αποτελείται από ένα οπτικό σύστημα διπλής δέσμης, δύο πηγές ακτινοβολίας (λυχνία δευτερίου και βολφραμίου), θέσεις για την τοποθέτηση των κυψελίδων του δείγματος και της αναφοράς, δύο μονοχρωμάτορες, έναν φωτοπολλαπλασιαστή R6872 και ένα αισθητήρα PbS <sup>[1]</sup>. Όπως φαίνεται παρακάτω στην εικόνα είναι ένα πλήρες οπτικό σύστημα με φίλτρα, σχισμές, φακούς και κάτοπτρα.



Εικόνα 3.1: Φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer-Lambda 950



Εικόνα 3.2 : Σχεδιάγραμμα του εσωτερικού του φασματοφωτόμετρου Perkin-Elmer Lambda 950

Για τη μέτρηση της απορρόφησης στο υπεριώδες και ορατό χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1900, το οποίο καλύπτει τις περιοχές από τα 190nm έως 1100nm. Το συγκεκριμένο σύστημα αποτελείται από ένα οπτικό σύστημα διπλής δέσμης, δύο πηγές ακτινοβολίας (λυχνία δευτερίου και αλογόνου), θέσεις για την τοποθέτηση των κυψελίδων του δείγματος και της αναφοράς, μονοχρωμάτορα τύπου Czerny-Turner και έναν ανιχνευτή (silicon photodiode) <sup>[2]</sup>.

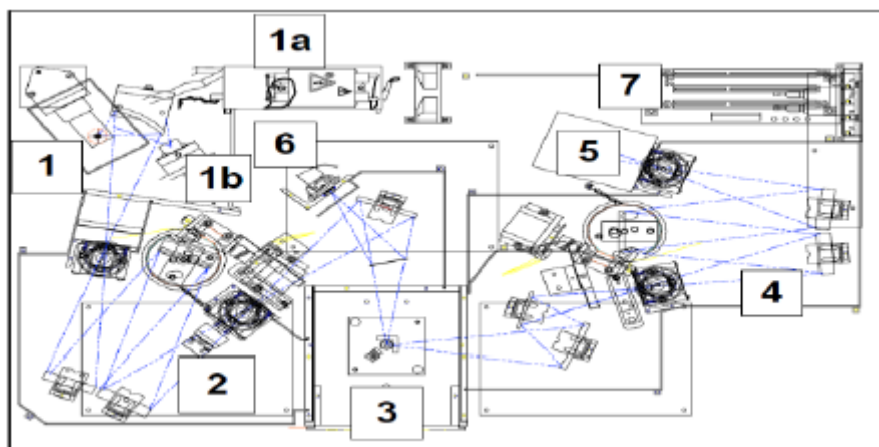


Εικόνα 3.3: Φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1900

Ανάλογα με την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που απαιτούνταν για μελέτη για το κάθε προϊόν γινόταν η επιλογή του καταλληλότερου φασματοφωτόμετρου.

### 3.2 Οργανολογία φασματοσκοπίας φθορισμού

Για τη μέτρηση του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φασματοφθορισμόμετρο Fluoromax-P, Horiba. Το όργανο αποτελείται από μια λυχνία ξένου ισχύος 150watt, η οποία λειτουργεί ως μία συνεχής πηγή ακτινοβολίας στο υπεριώδες και στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, ένα μονοχρωμάτορα διέγερσης (220-600nm), ένα μονοχρωμάτορα εκπομπής (290-850nm) τύπου Czerny-Turner, σχισμές, κλείστρα, φακούς, κάτοπτρα και ένα φωτοπολλαπλασιαστή τύπου R928P με εύρος ανίχνευσης 180-850 nm <sup>[3]</sup>. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το εσωτερικό του φασματοφθορισμόμετρου καθώς και στο πίνακα η αντιστοίχιση των εκάστοτε μερών του.



Εικόνα 3.4: Σχεδιάγραμμα του εσωτερικού του φασματοφθορισμόμετρου Fluoromax-P, Horiba

Πίνακας 3.1: Πίνακας με μέρη εσωτερικού του φασματοφθορισμόμετρου Fluoromax-P της Horiba

1	Λυχνία ξένου- Xe
1a	Τροφοδοτικό λυχνίας ξένου
1b	Λυχνία Xenon flash
2	Μονοχρωμάτορας διέγερσης
3	Θέση τοποθέτησης δείγματος
4	Μονοχρωμάτορας εκπομπής
5	Ανιχνευτής σήματος με φωτοπολλαπλασιαστή τύπου R928P
6	Ανιχνευτής (φωτοδίοδος και μονάδα λήψης ρεύματος)
7	Χειριστήριο οργάνου

### **3.3 Οργανολογία φασματοσκοπίας FT-IR<sup>[4]</sup>**

Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε Φασματοφωτόμετρο Υπέρυθρου Μετασχηματισμού Fourier (FTIR), Nicolet 6700 thermoscientific του οίκου Thermo Electron Corporation εξοπλισμένο με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR), όπου και καταγράφηκαν τα φάσματα στην περιοχή του μέσου υπερύθρου μεταξύ  $4.000-400\text{ cm}^{-1}$ . Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν  $4\text{ cm}^{-1}$ , ενώ κάθε τελικό FTIR φάσμα προέκυπτε από τον μέσο όρο 64 σαρώσεων (scans). Το πλεονέκτημα αυτού του φασματοφωτομέτρου ήταν ότι παρείχε τη δυνατότητα καταγραφής των φασμάτων χωρίς να είναι απαραίτητη η οποιαδήποτε επεξεργασία ή ομογενοποίηση των δειγμάτων. Η διόρθωση του υποβάθρου πραγματοποιείται πριν από την μέτρηση του κάθε δείγματος. Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Omnic που έφερε το φασματοφωτόμετρο.

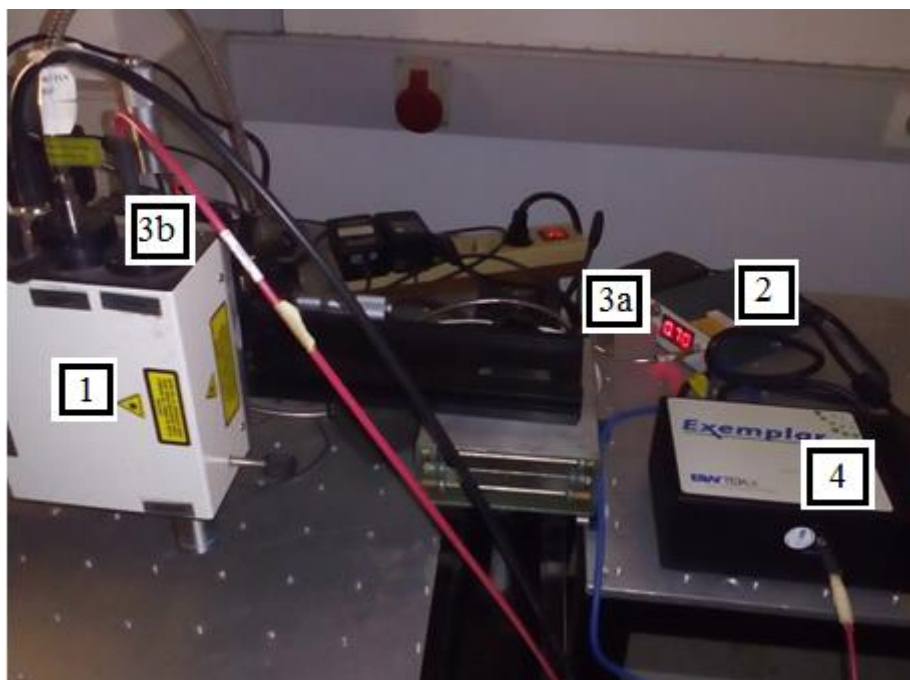


*Εικόνα 3.5: Φασματόμετρο Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier (FTIR) Nicolet 6700 Thermoscientific, με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR)*

### **3.4 Οργανολογία φασματοσκοπίας Raman**

Για τη λήψη των φασμάτων Raman χρησιμοποιήθηκε ένα φορητό φασματόμετρο Raman της εταιρείας (HE 785, Horiba Jobin Yvon, France). Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε ένα συνεχές laser ημιαγωγών με εκπομπή στα 785 nm. Το laser συνδέεται με την οπτική κεφαλή του συστήματος μέσω οπτικής ίνας ενός μέτρου και διαμέτρου 100μm. Εντός της οπτικής κεφαλής υπάρχουν τα απαραίτητα οπτικά (φακοί, καθρέπτες, φίλτρα) που κατευθύνουν τη δέσμη και βοηθούν στη διέγερση του δείγματος και στη συλλογή του σήματος. Επιπλέον υπάρχουν μία πηγή led και μία πολυχρωματική κάμερα που προσφέρουν μία σαφή/ευκρινή εικόνα της υπό έρευνα επιφάνειας του δείγματος. Πολύ σημαντική είναι η ύπαρξη εντός της οπτικής κεφαλής του συστήματος ενός φίλτρου (edge filter) που αποκόπτει τα φωτόνια που έχουν σκεδαστεί ελαστικά (785 nm) να περάσουν στον ανιχνευτή και επιτρέπει τη διέλευση σε φωτόνια που έχουν σκεδαστεί ανελαστικά, με συχνότητες μεγαλύτερες από 785 nm (791-1066 nm). Μια δεύτερη οπτική ίνα (μήκους 2 μέτρων και διαμέτρου 100μm) συνδέει την οπτική κεφαλή με το φασματόμετρο (Exemplar Plus) της εταιρείας (B&WTEK) που αποτελείται από μονοχρωμάτορα με φράγμα περίθλασης και ανιχνευτή CCD (charge couple device). Το συγκεκριμένο φασματόμετρο παρέχει

μετρήσεις σε φασματικό εύρος (Raman shift)  $98-3362\text{ cm}^{-1}$ , με διακριτική ικανότητα  $8-10\text{ cm}^{-1}$ .



1	Οπτική κεφαλή (περιέχει: καθρέφτες, κάτοπτρα, φίλτρο, κάμερα-μικροσκόπιο και led για ακτινοβολήση δείγματος)
2	Laser (διόδου συνεχές, λexc: 785 nm)
3a	Οπτική ίνα που συνδέει το laser με την οπτική κεφαλή
3b	Οπτική ίνα που συνδέει την οπτική κεφαλή με το φασματόμετρο
4	Φασματόμετρο (μονοχρωμάτορας και ανιχνευτής CCD)

Εικόνα 3.6: Πειραματική διάταξη για μέτρηση Raman.

## **Βιβλιογραφία**

1. LAMBDA 950 UV/Vis/NIR Spectrophotometer. [Online] Perkin Elmer.  
<http://www.perkinelmer.com/product/lambda-950-uv-vis-nir-spectrophotometer-1950>
2. UV-1900 UV-VIS Spectrophotometer. [Online] Shimadzu.  
[https://www.shimadzu.com/an/molecular\\_spectro/uv/uv-1900/index.html](https://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/uv-1900/index.html)
3. Fluoromax Series [Online] Horiba Scientific.  
<http://www.horiba.com/uk/scientific/products/fluorescencespectroscopy/steady-state/fluoromax/fluoromax-series-524/>
4. Nicolet 6700 Thermoscientific, ATR mode [ONLINE]  
<https://mmrc.caltech.edu/FTIR/Nicolet/Nicolet%206700%20brochure.pdf>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως γάλα εννοείται το έκκριμα του μαστικού αδένου των θηλαστικών που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μία ορισμένη ηλικία. Επίσημα ορίζεται ότι «γάλα είναι το απαλλαγμένο από το πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς και χωρίς διακοπή αρμέγματος, υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δε βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης». <sup>[1]</sup> Όταν ο όρος γάλα δεν συνοδεύεται από κάποιο άλλο χαρακτηρισμό, τότε εννοείται γάλα το οποίο προέρχεται από αγελάδα, είναι νωπό, πλήρες σε λιπαρά, δεν έχει υποστεί συμπύκνωση και δεν περιέχει πρόσθετες άλλες ύλες.

Το γάλα είναι θρεπτικό, λευκό ή ελαφρώς κιτρινωπό υγρό που αποτελεί βιολογικό έκκριμα των μαστών των θηλαστικών. Αποτελεί την πρώτη και μοναδική τροφή για το νεογέννητο μωρό, καθώς και για όλα τα νεογέννητα θηλαστικά. Ο άνθρωπος είναι το μοναδικό ζώο που επιλέγει να καταναλώνει γάλα και στην μετέπειτα ζωή του. Περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά εκ των οποίων μερικά είναι τόσο σπάνια, ώστε δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στη φύση. Αποτελεί την πιο πλήρη φυσική τροφή επειδή περιέχει συστατικά που εφοδιάζουν τον οργανισμό με ενέργεια (λίπος, λακτόζη), με δομικά συστατικά (πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα) και με επαρκείς ποσότητες βιταμινών και ιχνοστοιχείων για την πραγματοποίηση των βιοχημικών διεργασιών που είναι απαραίτητες για την ζωή.

Γενικά, η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος συνίσταται από πέντε (5) είδη ζώων: βοοειδή, βουβάλια, αίγες, πρόβατα και καμήλες. Σύμφωνα με τα στατιστικά δεδομένα του FAO για το έτος 2009, το παγκόσμιο γάλα που παρήχθη, υπολογίστηκε στα 696,9 εκατομμύρια kg<sup>3</sup> από τα οποία το 83,3% είναι αγελαδινό, το 13% βουβαλίσιο, το 2,2% κατσικίσιο, το 1,3% πρόβειο και το 0,2% γάλα καμήλας.

Μεγάλο μέρος της παγκόσμιας οικονομίας βασίζεται στην παραγωγή γάλακτος. Τα βοοειδή αποτελούν το σημαντικότερο είδος για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτή τη στιγμή, ο αριθμός των ζώων που αναπαράγονται με σκοπό τη γαλακτοκομία είναι μεγάλος. Διαφορετικές περιοχές ανά τον κόσμο έχουν προσαρμόσει την παραγωγή γάλακτος, ανάλογα με το είδος του ζώου που εκτρέφουν σε κάθε τόπο, ανάλογα το κλίμα του εκάστοτε τόπου. Ενδεικτικό παράδειγμα τέτοιας προσαρμογής αποτελεί το γάλα της καμήλας που καταναλώνεται σε χώρες της Αφρικής ή το γάλα από το λάμα για τις χώρες της Νότιας Αμερικής.

Η μεγάλη απήχηση που έχει σαν τρόφιμο έχει κινήσει το ενδιαφέρον και της ακαδημαϊκής κοινότητας. Έχει μελετηθεί στο παρελθόν σε όλο τον κόσμο με αρκετές αναλυτικές τεχνικές όπως την HPLC <sup>[2]</sup> και την GC-MS <sup>[3]</sup> αλλά και με φασματοσκοπικές τεχνικές. <sup>[4], [5]</sup> Πρόσφατα έχει ξεκινήσει η μελέτη του και με την τεχνική των omics (metabolomics, proteomics κλπ) <sup>[6]</sup>

#### **4.1.1 Διαδικασία παραγωγής γάλακτος** <sup>[7], [8]</sup>

Το γάλα ξεκινάει την πορεία του με την άμελξη των ζώων της κτηνοτροφικής μονάδας. Απαιτείται φυσικά η ψύξη του γάλατος σε ψυχόμενες δεξαμενές αποθήκευσης με σκοπό την διατήρηση της βέλτιστης ποιότητας και την ελάχιστη δυνατή εμφάνιση μικροοργανισμών. Κατόπιν, ειδικά βυτιοφόρα-ψυγεία οχήματα παραλαμβάνουν το νωπό γάλα με σκοπό την μεταφορά του στην μονάδα επεξεργασίας της βιομηχανίας.

Το πρώτο στάδιο καθαρισμού που υφίσταται το νωπό γάλα είναι συνήθως με την τεχνική της διαύγασης. Κατά τη διαύγαση το γάλα καθαρίζεται με φυγοκέντριση και επιπλέον επιτυγχάνεται απόσπηση, απομάκρυνση δηλαδή των οσμών και απομάκρυνση των σωματικών κυττάρων. Το γάλα απαλλάσσεται από ορατές προσμίξεις αλλά το μικροβιακό φορτίο του δεν επηρεάζεται. Στη συνέχεια, το γάλα θερμαίνεται στους 63-65 °C για μικρό χρονικό διάστημα και φυλάσσεται για λίγες μέρες στις δεξαμενές.

Στο στάδιο της τυποποίησης, τμήμα του λιπαρού μέρους γάλακτος διαχωρίζεται από το γάλα με σκοπό την προσαρμογή στις προδιαγραφές του προϊόντος πχ γάλα άπαχο ή χαμηλό σε λιπαρά. Η κρέμα γάλακτος διαχωρίζεται από το λιπαρό μέρος με φυγοκέντριση σε φυγοκεντρικούς διαχωριστές με δίσκους και χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρέμας γάλακτος ή βουτύρου.

Το γάλα έπειτα παστεριώνεται. Η παστερίωση, όπως αναφέρθηκε, είναι η θερμική επεξεργασία του γάλακτος με σκοπό την καταστροφή των παθογόνων και μη μικροοργανισμών. Η παστερίωση αποσκοπεί στην ελάχιστη δυνατή θέρμανση που είναι ικανή να καταστήσει το γάλα ακίνδυνο για τους καταναλωτές, προκειμένου να μείνουν κατά το δυνατόν ανεπηρέαστα τα θρεπτικά στοιχεία του γάλακτος.

Η παστερίωση πραγματοποιείται σε ανοξείδωτο λέβητα με διπλά τοιχώματα, υπό συνεχή ανάδευση για 30 min στους 63 - 65°C. Μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε θερμοεναλλάκτες με πλάκες όπου εξασφαλίζεται η ροή του γάλακτος ανάμεσα σε συστοιχία παράλληλων μεταλλικών πλακών (15 min) στους 72- 75°C (H.T.S.T.: High Temperature Short Time). Οι γαλακτοβιομηχανίες συνήθως επιλέγουν την δεύτερη μέθοδο. Μετά την ψύξη του, το γάλα ομογενοποιείται υπό συνθήκες υψηλής πίεσης (150-250 atm ) και θερμοκρασίας (65-70 °C) και αφήνεται σε ηρεμία για 48 ώρες. Η διαδικασία αυτή έχει σκοπό την βελτίωση της υφής και της λευκότητας του γάλατος.

Ειδικές κατηγορίες προϊόντων γάλατος απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία: αποστείρωση (γάλα UHT), συμπύκνωση μέσω θέρμανσης υπό κενό και ξήρανση στους 150 °C (γάλα σε σκόνη). Ειδική αναφορά πρέπει να γίνει στο σακχαρούχο γάλα, που λόγω της παρουσίας ζάχαρης, συντηρεί το γάλα χωρίς την απαίτηση αποστείρωσης.

#### **4.1.2 Παράγοντες που επιδρούν στην σύσταση του γάλακτος**

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του γάλακτος είναι:

- Το είδος το ζώου: Όλα τα είδη γάλακτος περιέχουν τα ίδια συστατικά, όμως σε διαφορετικές αναλογίες. Το πρόβειο γάλα είναι πιο πλούσιο γάλα σε στερεά συστατικά εν σχέση με το κατσικίσιο και το αγελαδινό. <sup>[7]</sup>
- Η φυλή του ζώου: Είναι σημαντικό η φυλή του ζώου να είναι προσαρμοσμένη στα ιδιαίτερα στοιχεία της περιοχής. Όσο περισσότερο γάλα παράγει μία φυλή, τόσο πιο φτωχό είναι το γάλα σε λίπος και πρωτεΐνη. <sup>[9]</sup>
- Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου: Ως γαλακτική περίοδος ορίζεται το παραγωγικό διάστημα κατά το οποίο το ζώο, δίνει γάλα, από τον τοκετό μέχρι τη διακοπή της γαλακτοπαραγωγής και διακρίνεται σε τρεις περιόδους: η περίοδος πρωτογάλακτος, η κανονική περίοδος γάλακτος και οι δύο τελευταίες εβδομάδες της γαλακτικής περιόδου. Η παραγωγή αγγίζει το ζενίθ της κατά την κανονική περίοδο γάλακτος. Το γάλα που αρμέγεται εκείνη την περίοδο υστερεί σε θρεπτικά συστατικά. <sup>[10]</sup>
- Η διατροφή των ζώων: Η σύσταση του γάλακτος του ζώου διαφοροποιείται ανάλογα την ποσότητα αλλά και την ποιότητα της τροφής που προσλαμβάνει. Αν το ζώο διατρέφεται με ποσότητα τροφής μικρότερη των ενεργειακών του αναγκών τότε παράγει μικρότερη ποσότητα από το κανονικό. Αν η τροφή του ζώου είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τότε αυτό θα αποτυπωθεί και στο γάλα, αφού θα έχει λίπος με παρόμοια σύσταση. Στα ζώα που βασίζονται στην βόσκηση, το είδος των φυτών του βοσκοτόπου που τρώνε παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. <sup>[11]</sup>
- Το έδαφος και το κλίμα: Στις ημιορεινές ή ορεινές περιοχές οι εκτροφές των ζώων είναι συνήθως εκτατικές, ενώ στις πεδινές περιοχές οι εκτροφές είναι κατά κύριο λόγο εντατικές. Οι εντατικές εκτροφές έχουν μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος με σύσταση αισθητά ασθενέστερη σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη σε σχέση με τις εκτατικές εκτροφές. <sup>[12]</sup>
- Η εποχή του έτους: Η σύσταση του γάλακτος κατά τη διάρκεια του έτους εμφανίζουν εποχιακές μεταβολές. Το γάλα είναι ασθενέστερο από άποψη συστάσεως σε στερεά συστατικά (πρωτεΐνες, λίπος και λακτόζη) την άνοιξη και το καλοκαίρι σε σύγκριση με τις άλλες εποχές. <sup>[13]</sup>
- Οι ασθένειες των μαστών: Η ποιότητα και ποσότητα του γάλακτος επηρεάζονται από τις ασθένειες των μαστών του ζώου με πιο συχνή την μαστίτιδα. Προκαλεί αλλοίωση της σύνθεσης του γάλακτος. Γάλα που προέρχεται από ζώο προσβεβλημένο από μαστίτιδα χαρακτηρίζεται από αλλοιωμένα θρεπτικά συστατικά. Αν η ασθένεια είναι σοβαρή, τότε το γάλα κρίνεται ως ακατάλληλο.

### **4.1.3 Κατηγορίες Γάλακτος** <sup>[7],[14]</sup>

Στην Ελλάδα τα είδη γάλακτος που πωλούνται και καταναλώνονται ευρύτατα είναι το αγελαδινό, το κατσικίσιο και το πρόβειο. Σε πολύ μικρότερη κλίμακα, διατίθενται βουβαλίσιο γάλα και γάλα γαϊδούρας.

Το πρόβειο γάλα έχει περισσότερες θερμίδες από το αγελαδινό και το πρόβειο, κυρίως λόγω του υψηλότερου ποσοστού του σε λιπαρά. Το πρόβειο γάλα έχει μεγαλύτερο τυροκομικό δυναμικό, δηλαδή μία συγκεκριμένη ποσότητα πρόβειου γάλακτος μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη παραγωγή τυριού σε σχέση με την αντίστοιχη ποσότητα αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος. Ο λόγος είναι το μεγαλύτερο ποσοστό του σε καζεΐνες. Για το λόγο αυτό, το πρόβειο γάλα πήζει πιο γρήγορα, ακόμα και εντός ψυγείου, επομένως χαλάει πιο γρήγορα. Το χρώμα του γάλακτος είναι λευκό, λόγω της σκέδασης του φωτός από τα λιποσφαίρια που περιέχονται. Ωστόσο, το αγελαδινό γάλα έχει κιτρινωπή απόχρωση λόγω της παρουσίας β-καροτενίου.

Το γάλα, μέσω μιας διαδικασίας φυγοκέντρισης μπορεί να υποστεί αφαίρεση λιπαρών. Ανάλογα την εμπορική κατηγορία στην οποία ο κατασκευαστής θέλει να ανήκει, μπορεί εκτός από πλήρες να είναι light (με μερική αφαίρεση λιπαρών) ή άπαχο (με ολική αφαίρεση λιπαρών). Με την μείωση της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος, παρατηρείται και οπτική διαφοροποίηση. Το λευκό διάλυμα μετατρέπεται σε ένα άχρωμο διαυγές διάλυμα.

Ανάλογα τις διεργασίες και τις τροποποιήσεις που έχει υποστεί, το γάλα μπορεί να χωριστεί στις παρακάτω κατηγορίες:

- *Νωπό γάλα*: το γάλα που διατίθεται στην κατανάλωση χωρίς να έχει υποστεί κάποια θερμική επεξεργασία πέρα από την διήθηση και την ψύξη.
- *Φρέσκο γάλα*: το νωπό γάλα που έχει υποστεί παστερίωση σε θερμοκρασία 72°C για περίπου 15 δευτερόλεπτα, έχει διάρκεια ζωής περίπου 3 με 5 μέρες και μετά την επεξεργασία του θα πρέπει να αποθηκευτεί στο ψυγείο σε θερμοκρασία 1 – 4°C.
- *Γάλα υψηλής παστερίωσης*: το γάλα που δέχεται θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασία 100° C για περίπου 7 με 15 δευτερόλεπτα, έχει διάρκεια ζωής περίπου 35 μέρες και μετά την επεξεργασία του θα πρέπει να αποθηκευτεί στο ψυγείο σε θερμοκρασία 1 – 4°C.
- *Γάλα Μακράς Διαρκείας ή UHT (Ultra High Temperature)*: Αποστείρωση σε πολύ ψηλή θερμοκρασία για πολύ μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως για 1 δευτερόλεπτο στους 135°C). Έχει διαφορετική γεύση λόγω θερμικής επεξεργασίας. Διατηρείται χωρίς να αλλοιώνεται για μερικούς μήνες, έχει ωστόσο χαμηλότερη θρεπτική αξία.

Εκτός από την θερμική επεξεργασία, το γάλα μπορεί να υποστεί και συμπύκνωση. Αφαιρείται από το γάλα ποσότητα νερού και αντ' αυτής προστίθεται ποσότητα κρέμας γάλακτος ή κάποιες φορές γάλα σε σκόνη. Το γάλα σε σκόνη προκύπτει από την ολική αφυδάτωση του γάλατος. Στο στερεό προϊόν του οποίου η κατά βάρος

περιεκτικότητα σε νερό δεν υπερβαίνει το 5% του τελικού προϊόντος. Αν στο συμπυκνωμένο γάλα προστεθεί ποσότητα ζάχαρης τότε προκύπτει το ζαχαρούχο γάλα. Τέλος, το γάλα μπορεί να επεξεργαστεί κατάλληλα προκειμένου να αποκτήσει την επιθυμητή και σύμφωνη με την ετικέτα γεύση του (πχ κακάο, με γεύσεις φρούτων) ή να υποστεί προσθήκη θρεπτικών συστατικών (πχ ενίσχυση βιταμινικού περιεχομένου, ενίσχυση σε ασβέστιο).

Χρήζουν ειδικής αναφοράς τα γάλατα φυτικής προέλευσης. Τα γάλατα αυτά γνωρίζουν μεγάλη απήχηση τα τελευταία χρόνια. Τα πιο γνωστά είδη γάλατος φυτικής προέλευσης είναι το γάλα σόγιας, το γάλα καρύδας και το γάλα αμυγδάλου.

Ακολουθεί ένας συνοπτικός πίνακας παρουσίασης των τυπικών κατηγοριών γάλατος:

Πίνακας 4.1.1: Είδη γάλακτος

Κριτήριο	Είδος
Γεύση	ξινόγαλο, κακάο, με γεύσεις φρούτων
Ενίσχυση	με βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία
Επεξεργασία	νωπό, παστεριωμένο, ομογενοποιημένο, συμπυκνωμένο, ζαχαρούχο
Μέθοδο εκτροφής ή παραγωγής	από ζώα ελευθέρως βοσκής, ζώα σε κτηνοτροφική μονάδα, οργανικό, βιολογικό
Προέλευση	ζωικής προέλευσης: αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο φυτικής προέλευσης: καρύδας, σόγιας, αμυγδάλου
Σύνθεση	πλήρες, χαμηλό σε λιπαρά, άπαχο
Συντήρηση	διαρκείας, σε σκόνη

#### **4.1.4 Νοθεία στο γάλα** <sup>[15], [16]</sup>

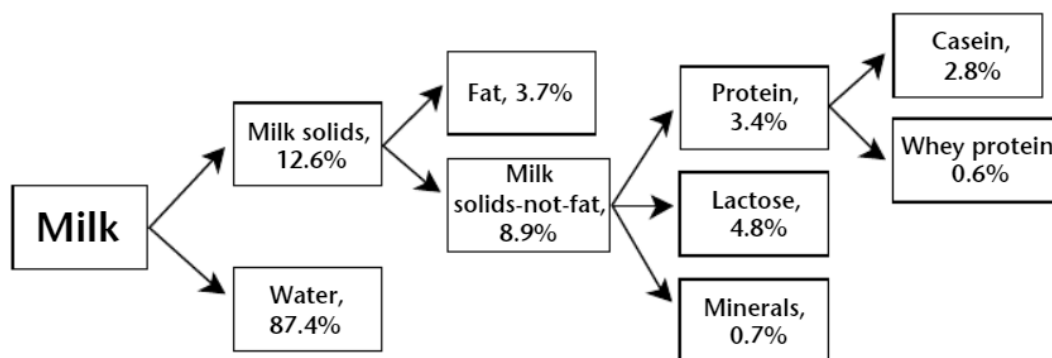
Η νοθεία του γάλακτος μπορεί να γίνει τόσο σε επίπεδο παραγωγών όσο και σε επίπεδο μονάδων επεξεργασίας του γάλακτος, με σκοπό την αύξηση του κέρδους. Η διαδικασία της νοθείας, δηλαδή η προσθήκη ουσιών στο φυσικό γάλα, οι οποίες τροποποιούν τη σύσταση αυτού, επιτυγχάνεται είτε με προσθήκη νερού σ' αυτό ή ανάμειξη διαφορετικών ειδών γάλακτος, ή αντικατάσταση του λίπους του γάλακτος με φθηνότερα λίπη φυτικής ή ζωικής προέλευσης με σκοπό το κέρδος. Η πιο συνηθισμένη τεχνική νοθείας είναι η αραιώση του γάλακτος με νερό. Η διαδικασία

αυτή ενώ δεν είναι επικίνδυνη για τους καταναλωτές, . Αντίθετα, η μείξη γάλακτος από ζώα διαφορετικής προέλευσης, μπορεί να εμφανίσει δυσμενείς αλλεργικές αντιδράσεις, ή να οδηγήσει ανθρώπους στην κατανάλωση γάλατος από ζώο το οποίο τους είναι απαγορευμένο για θρησκευτικούς λόγους.

- Νοθεία γάλακτος με προσθήκη νερού: Η προσθήκη νερού προκαλεί μείωση της οξύτητας, της λιποπεριεκτικότητας, του στερεού υπολείμματος άνευ λίπους, του ειδικού βάρους του γάλακτος και αύξηση της τιμής του σημείου πήξης, ενώ δεν επιδρά επί της τιμής του λίπους επί ξηρού.
- Νοθεία γάλακτος με μείωση λίπους: Η νοθεία στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιείται είτε με φυγοκέντριση του γάλακτος ή με προσθήκη φυγοκεντρισμένου γάλακτος στο πλήρες, με σκοπό την μείωση της λιποπεριεκτικότητας.
- Προσθήκη ξένων ουσιών στο γάλα<sup>[17]</sup> : Οι πιο συνηθισμένες ουσίες νοθευτές είναι το άμυλο, το κιτρικό νάτριο, η φορμαλδεΐδη και η ζάχαρη. Το άμυλο προστίθεται ως πηκτικό, το κιτρικό νάτριο λειτουργεί ως σταθεροποιητής και ως συντηρητικό, η ζάχαρη λειτουργεί σαν βελτιωτικό γεύσης ενώ η φορμαλδεΐδη προστίθεται ως αντιμικροβιακός παράγοντας, ειδικά στην περίπτωση ήδη νοθευμένου γάλακτος με νερό.
- Ανάμειξη διαφόρων ειδών γάλακτος: Η τιμή του πρόβειου γάλακτος είναι γνωστό ότι είναι σημαντικά υψηλότερης εκείνης του κατσικίσιου γάλακτος και του κατσικίσιου υψηλότερη από εκείνη του αγελαδινού γάλακτος. Αυτό επιτείνεται ακόμη περισσότερο από την εποχιακή διακύμανση της παραγωγής του πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος, τη μικρή διαθεσιμότητα και τη μικρή παγκόσμια παραγωγή τους. Έτσι πολλές φορές παράγεται γάλα που και γαλακτοκομικά προϊόντα που παρουσιάζονται σαν πρόβεια ή κατσικίσια και έχουν μεγάλη ποσότητα από αγελαδινό γάλα.

#### **4.1.5 Χημική Σύσταση**

Το γάλα μπορεί να περιγραφεί ως ένα κολλοειδές, ένα ομοιογενές διάλυμα δηλαδή στο οποίο υπάρχουν διασπαρμένα σωματίδια. Είναι υδατικό διάλυμα επομένως το κυριότερο μέρος της χημικής του σύστασης αποτελεί το νερό. Στα μη υδατικά συστατικά του γάλακτος περιέχονται τα λιπαρά, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη, οι βιταμίνες και τα μεταλλικά στοιχεία. Το περιεχόμενο του γάλακτος σε λιπαρά, πρωτεΐνες και λακτόζη προσδιορίζουν την διατροφική και εμπορική του αξία.



Εικόνα 4.1.1: Ενδεικτικό διάγραμμα συστατικών γάλακτος<sup>[8]</sup>

Ο πίνακας που παρατίθεται παρακάτω απεικονίζει τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στο γάλα ανάλογα την ζωική του προέλευση. Πιο πλούσιο σε λιπαρά και πρωτεΐνη εμφανίζεται αναμενόμενα το πρόβειο. Άξιο σχολιασμού είναι επίσης ότι το αγελαδινό γάλα έχει υψηλά επίπεδα λακτόζης εν συγκρίσει με το κατσικίσιο γάλα. Για τον λόγο αυτό, άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη πολύ συχνά προτιμούν την κατανάλωση κατσικίσιου γάλακτος σαν εναλλακτική.

Composition	Goat	Sheep <sup>a</sup>	Cow	Human
Fat (%)	3.8	7.9	3.6	4.0
Solids-not-fat (%)	8.9	12.0	9.0	8.9
Lactose (%)	4.1	4.9	4.7	6.9
Protein (%)	3.4	6.2	3.2	1.2
Casein (%)	2.4	4.2	2.6	0.4
Albumin, globulin (%)	0.6	1.0	0.6	0.7
Non-protein N (%)	0.4	0.8	0.2	0.5
Ash (%)	0.8	0.9	0.7	0.3
Calories/100 ml	70	105	69	68

Εικόνα 4.1.2 : Πίνακας Θρεπτικών συστατικών ανάλογα την ζωική προέλευση <sup>[18]</sup>

## Λιπαρά <sup>[14], [19]</sup>

Το λίπος είναι η ουσία που καθορίζει την ενεργειακή αξία του γάλακτος. Βρίσκεται στο γάλα με την μορφή λιποσφαιρίων διαμέτρου 0,1-10μm. Τα λιπίδια στο γάλα είναι κυρίως τριγλυκερίδια, σε ποσοστό 97% ενώ περιέχονται σε πολύ μικρές ποσότητες φωσφολιπίδια και ελεύθερες στερόλες. Πάνω από 400 διαφορετικά λιπαρά οξέα περιέχονται στο γάλα τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, και χωρίζονται σε βραχείας, μεσαίας και μακρικής αλυσίδας.. Στο γάλα περιέχονται περίπου 65% κορεσμένα, 27% μονοακόρεστα και 4% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Fatty acids profile in goat, sheep, and cow milk

Fatty acids (g 100g <sup>-1</sup> )	Goat	Sheep	Cow
C4:0; butyric	2.03 <sup>1</sup>	2.57 <sup>2</sup>	2.87 <sup>3</sup>
C6:0; caproic	2.78 <sup>1</sup>	1.87 <sup>2</sup>	2.01 <sup>3</sup>
C8:0; caprylic	2.92 <sup>1</sup>	1.87 <sup>2</sup>	1.39 <sup>3</sup>
C10:0; capric	9.59 <sup>1</sup>	6.63 <sup>2</sup>	3.03 <sup>3</sup>
C12:0; lauric	4.52 <sup>1</sup>	3.99 <sup>2</sup>	3.64 <sup>3</sup>
C14:0; myristic	9.83 <sup>1</sup>	10.17 <sup>2</sup>	10.92 <sup>3</sup>
C16:0; palmitic	24.64 <sup>1</sup>	25.1 <sup>2</sup>	28.7 <sup>3</sup>
C18:0; stearic	8.87 <sup>1</sup>	8.85 <sup>2</sup>	11.23 <sup>3</sup>
18:1 <i>cis</i> -9; oleic	18.65 <sup>1</sup>	20.18 <sup>2</sup>	22.36 <sup>3</sup>
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12; linoleic	2.25 <sup>1</sup>	2.32 <sup>2</sup>	2.57 <sup>3</sup>
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11; CLA	0.45 <sup>1</sup>	0.76 <sup>2</sup>	0.57 <sup>3</sup>
18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 ; $\alpha$ -linolenic	0.77 <sup>1</sup>	0.92 <sup>2</sup>	0.5 <sup>3</sup>
total n-6	1.78 <sup>4</sup>	2.97 <sup>5</sup>	2.83 <sup>6</sup>
total n-3	0.44 <sup>4</sup>	1.31 <sup>5</sup>	0.56 <sup>6</sup>
SFA	68.79 <sup>4</sup>	64.23 <sup>5</sup>	68.72 <sup>6</sup>
MUFA	24.48 <sup>4</sup>	29.75 <sup>5</sup>	27.40 <sup>6</sup>
PUFA	3.70 <sup>4</sup>	4.82 <sup>5</sup>	4.05 <sup>6</sup>
n-6/n-3	5.00 <sup>4</sup>	2.31 <sup>5</sup>	6.01 <sup>6</sup>
AI	2.88 <sup>4</sup>	2.21 <sup>5</sup>	2.55 <sup>6</sup>
TI	3.17 <sup>4</sup>	2.49 <sup>5</sup>	3.22 <sup>6</sup>
Total fat (g 100g <sup>-1</sup> )	4.27 <sup>1</sup>	6.09 <sup>2</sup>	3.76 <sup>3</sup>

SFA - saturated fatty acids; MUFA - monounsaturated fatty acids; PUFA - polyunsaturated fatty acids; AI - atherogenic index; TI - thrombogenic index.

Εικόνα 4.1.3: Κατανομή λιπαρών οξέων στα είδη γάλακτος [20]

Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα στερούνται διπλού δεσμού στη δομή τους. Τα κυριότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα στο γάλα είναι το παλμιτικό, το στεαρικό, το μυριστικό και το καπρικό οξύ, ενώ σε μικρότερη αναλογία βρίσκονται βουτυρικό, καπροϊκό, καπρυλικό και λαυρικό οξύ. Περιέχουν όλα άρτιο αριθμό ανθράκων στην αλυσίδα τους. Τα λιπαρά αυτά ανεβάζουν τα επίπεδα κακής χοληστερόλης στο αίμα, ιδιαίτερα όσα είναι μακράς αλυσίδας.

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν τουλάχιστον έναν διπλό δεσμό στην δομή τους, γεωμετρίας *cis* ή *trans*. Το κυριότερο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ είναι το ολεϊκό οξύ, που φέρει έναν *cis* διπλό δεσμό στον 9<sup>ο</sup> άνθρακα, το οποίο συναντάμε και στο ελαιόλαδο. Έχει ευεργετικές ιδιότητες για το καρδιαγγειακό σύστημα αφού μειώνει τα επίπεδα της κακής χοληστερόλης. Τα πιο σημαντικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό και τα ισομερή του που φέρουν δύο διπλούς δεσμούς και το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ που φέρει τρεις διπλούς δεσμούς. Ανήκουν στην κατηγορία των απαραίτητων λιπαρών οξέων αφού ο οργανισμός μας δεν δύναται να τα συνθέσει από μόνος του και επομένως καλείται να τα λάβει μέσω της τροφής.

### Πρωτεΐνες [14], [19]

Οι πρωτεΐνες στο γάλα περιέχουν πολλά από τα απαραίτητα για τον οργανισμό αμινοξέα, όσα δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του. Χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: στις πρωτεΐνες ορού και στις καζεΐνες. Το μίγμα αυτό των πρωτεϊνών είναι ετερογενές αφού οι πρωτεΐνες του ορού είναι διαλυτές στο νερό ενώ οι καζεΐνες είναι διεσπαρμένες στο νερό. Η αναλογία είναι περίπου 80% καζεΐνες και 20% πρωτεΐνες ορού. Η ανίχνευση της συνολικής ποσότητας των πρωτεϊνών στο γάλα, παραδοσιακά γίνεται με την μέθοδο Kjeldahl, όπου μετράται το σύνολο των αζωτούχων ενώσεων.

Οι καζεΐνες είναι μία οικογένεια φωσφοπρωτεϊνών και διακρίνονται σε  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνη και  $\alpha_{s2}$ -καζεΐνη,  $\beta$ -καζεΐνη,  $\gamma$ -καζεΐνη και  $\kappa$ -καζεΐνη. Το 40% του συνόλου των καζεϊνών απαντάται στην μορφή της  $\alpha_{s1}$ -καζεΐνης. Είναι αμφιπολικά μόρια, δηλαδή εμφανίζουν υδροφιλικές και υδροφοβικές ιδιότητες. Στο γάλα εμφανίζονται σε μορφή πορώδων σφαιριδίων που καλούνται μικκύλια καζεΐνης. Το ισοηλεκτρικό



σημείο αυτής την οικογένειας πρωτεϊνών είναι περίπου στο 4,6 ενώ το pH του γάλακτος είναι στο 6,6. Επομένως, με όξινη κατεργασία του γάλακτος, οι καζεΐνες καταβυθίζονται, ιδιότητα πολύ χρήσιμη για την διαδικασία της παραγωγής τυριού.

Οι πρωτεΐνες του ορού είναι σφαιρικά μόρια τα οποία περιέχονται στο γάλα και παραμένουν ακόμη και μετά την καταβύθιση των καζεϊνών. Οι πιο σημαντικές πρωτεΐνες είναι η β-λακτοσφαιρίνη και η α-λακταλβουμίνη. Σε μικρότερες ποσότητες υπάρχουν SA (serum albumin), ανοσοσφαιρίνες (IG), λακτοφερίνες και λακτοτρανσφερίνες. Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες έχει ξεχωριστό και πολύ σημαντικό ρόλο στον υγεία του ζώου. Για τον λόγο αυτό, οι πρωτεΐνες αυτές απομονώνονται και αποτελούν από μόνες τους συμπληρώματα διατροφής λόγω της ταχείας απορρόφησής τους από τους μύες.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος έχουν ευεργετικές ιδιότητες. Η σημαντικότερη είναι η ενίσχυση της πρόσληψης του ασβεστίου στον οργανισμό. Η ενίσχυση των οστών σε ασβέστιο συμβάλλει στην συνολική υγεία, ειδικά στα νεαρά άτομα. Ωστόσο, και στα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας η ενίσχυση σε ασβέστιο συμβάλλει στην αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Ακόμη η διεθνής βιβλιογραφία αναφέρει αντιυπερτασικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.<sup>[21]</sup> Πολλές φορές όμως οι πρωτεΐνες του γάλακτος ζωικής προέλευσης, και ειδικά της αγελάδας, μπορούν να προκαλέσουν αλλεργίες.

### **Λακτόζη**<sup>[14], [22]</sup>

Η λακτόζη αποτελεί τον κυριότερο υδατάνθρακα που περιέχεται στο γάλα. Καλείται και γαλακτοσάκχαρο. Ο δισακχαρίτης αντιστοιχεί στο 30% της θερμιδικής αξίας που έχει το γάλα. Η ανίχνευσή του συνήθως γίνεται μέσω της HPLC. Στο αποβουτυρωμένο γάλα, που απουσιάζουν τα λιπαρά, η λακτόζη αντιστοιχεί στο 52% του συνόλου των στερεών. Η λακτόζη υδρολύεται φυσικά στο λεπτό έντερο προς τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη. Η υδρόλυση αυτή πραγματοποιείται με την επίδραση του ενζύμου λακτάση.

Το ένζυμο αυτό παράγεται κανονικά στο έντερο του ανθρώπου και όσο μεγαλώνει, η ποσότητα που παράγεται, μειώνεται. Η ανεπαρκής παραγωγή λακτάσης στο έντερο οδηγεί στην δυσανεξία στη λακτόζη. Απουσία λακτάσης, πραγματοποιείται ζύμωση στο παχύ έντερο και η λακτόζη τρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Αντιμετωπίζεται με την λήψη προβιοτικών που περιέχουν και λακτάση.

### **Βιταμίνες**<sup>[14]</sup>

Οι βιταμίνες μεταξύ τους έχουν μεγάλη ποικιλία στις χημικές δομές που περιέχουν καθώς και στις λειτουργίες στις οποίες βοηθούν. Δεν μπορούν να ταξινομηθούν εύκολα βάσει της χημικής δομής τους, Η πιο βασική διαφοροποίηση που τις χωρίζει είναι η διαλυτότητα στο νερό. Τα προϊόντα που περιέχουν το λίπος του γάλακτος, όπως είναι το βούτυρο, περιέχουν σε μεγάλο βαθμό τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αλλά όχι τις υδατοδιαλυτές.

Στις μη υδατοδιαλυτές βιταμίνες ανήκουν οι: Βιταμίνη Α (Ρετινόλη), Βιταμίνη Ε (Τοκοφερόλη), Βιταμίνη D (Καλσιφερόλη) και η Βιταμίνη Κ (Φυλλοκινόνη).

Στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες ανήκουν κυρίως η βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ) αλλά και πολλές βιταμίνες του συμπλέγματος Β: Βιταμίνη Β1 (Θειαμίνη), Βιταμίνη Β2 (Ριβοφλαβίνη), Βιταμίνη Β3 (Νιασίνη), Βιταμίνη Β5 (Παντοθενικό οξύ), Βιταμίνη Β6 (Πυριδοξίνη), Βιταμίνη Β7 (Βιοτίνη), Βιταμίνη Β9 (Φυλλικό οξύ) και η Βιταμίνη Β12 (Κοβαλαμίνη)

### **Μεταλλικά στοιχεία**<sup>[14],[8]</sup>

Η συγκέντρωση των μεταλλικών στοιχείων είναι μία σημαντική πληροφορία για την θρεπτική αξία και τη διάρκεια ζωής του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων και είναι συναφής με τις φυσικοχημικές ισορροπίες. Αποτελούνται κυρίως από ασβέστιο, κάλιο, νάτριο και μαγνήσιο. Στα στοιχεία αυτά συμπεριλαμβάνονται και τα χλωριούχα, κιτρικά και φωσφορικά άλατα των μετάλλων αυτών. Η συγκέντρωση είναι κάτω από 1% στο γάλα, ωστόσο συμβάλλουν στην θερμική σταθερότητα, την πήξη και την συσσωμάτωση των σφαιριδίων λίπους κατά την ομογενοποίηση του γάλακτος.

### **Βιβλιογραφία**

1. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων κοινής χρήσης- Μέρος Α΄
2. Brescia, M. A. (2005). Food Chemistry Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations, 89, 139–147.
3. Dreiucker, J., & Vetter, W. (2011). Fatty acids patterns in camel , moose , cow and human milk as determined with GC / MS after silver ion solid phase extraction. Food Chemistry, 126(2), 762–771.
4. Belloque, J., Ramos, M., & Industriales, I. D. F. (2000). Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products, 10(1999).
5. Chem, F. (2003). Classification of Edible Oils by Employing 31 P and 1 H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis . A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils, 5715–5722.
6. Anagnostopoulos, A. K., Katsafadou, A. I., Pierros, V., Kontopodis, E., Fthenakis, G. C., Arsenos, G., ... Th, G. (2016). Milk of Greek sheep and goat breeds ; characterization by means of proteomics. Journal of Proteomics.
7. Ανδρικόπουλος, Ν. Κ. (n.d.). Τροφογνωσία, 283-296.
8. Burke N., Southern, M., Hogan, P., Hogan P., Ryan M. P., & Ryan, P. (n.d.). The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards and Quality

9. Bencini R. ,Pulina G., (1997) The quality of sheep milk. A review, Australian Journal of Experimental Agricultural 37,485-504
10. Bencini, R; Purvis, I. W. (1990). The yield and composition of milk from Merino sheep. Proceedings of the Australian Society of Animal Production 18: 144-147
11. Nudda, A., Mele, M.,Battacone, G.,Usai, M. G. and Macciotta, N. P.P. (2003). Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. Italian Journal of Animal Science 2(Suppl. 1):515-517.
12. Ανυφαντάκης Εμμανουήλ (2004), Τυροκομία: Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία, Εκδόσεις Σταμούλη
13. Perea S., de Labastida E.F., Nájera A.I., Chávarri F., Virto M., de Renovales M., Barron L.J.R. (2000): Seasonal changes in the fat composition of Lacha sheep's milk used for idiazabal cheese manufacture. European Food Research and Technology, 210: 318–323.
14. Leo M.L. Nollet, Fidel Toldra-Handbook of Dairy Foods Analysis
15. MoncayoS., S. Manzoor, J. D. Rosales, J. Anzano, J.O. Caceres, Qualitative and quantitative analysis of milk for the detection of adulteration by Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Food Chemistry 232 (2017), p. 322-328.
16. Azad, T., & Ahmed, S. (2016). Common milk adulteration and their detection techniques. International Journal of Food Contamination.
17. Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. Food Chemistry, 181, 31–37.
18. Park, Y. W., Ju, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk *ϋ*, 68, 88–113.
19. Jarvis, J. K., Mcbean, L. D., & Gregory, D. (2000). Handbook of Dairy Foods and Nutrition , Second Edition Library of Congress Cataloging-in-Publication Data
20. Markiewicz-Kęszycka M., Czyżak-Runowska G., Lipińska P., & Wójtowski J. (2013) Fatty acid profile of milk - a review
21. Patton S., (2004) Milk: its remarkable contribution to human health and well-being, Transaction Publishers
22. Goff, H. D., and Hill, A. R. (1993). Chemistry and physics. Dairy Science and Technology Handbook, Vol. 1. Y. H. Hui, Ed. VCH Publishers, New York.

## 4.2 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΒΑΣΕΙ ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

### Δείγματα

Μελετήθηκαν 23 εμπορικά διαθέσιμα δείγματα γάλακτος. Τα δείγματα αυτά ήταν διαφορετικά όσον αφορά την ζωική τους προέλευση αλλά και την λιποπεριεκτικότητά τους. Αγοράστηκαν 11 δείγματα αγελαδινού γάλακτος, 9 δείγματα κατσικίσιου γάλακτος και 3 δείγματα πρόβειου γάλακτος. Τα δείγματα αυτά ήταν πλήρη (full), ελαφριά (light) ή και εντελώς άπαχα (zero). Ο σκοπός της ποικιλίας των δειγμάτων είναι η κατά το δυνατόν πολυπαραγοντική μελέτη τους με τις τεχνικές της οπτικής φασματοσκοπίας. Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C με σκοπό την βέλτιστη διατήρησή τους. Λόγω του μικρού χρόνου ζωής του δείγματος μετά το άνοιγμα της συσκευασίας, όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την ίδια μέρα της αγοράς του δείγματος. Τα δείγματα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.2.1:Εμπορικά διαθέσιμα δείγματα

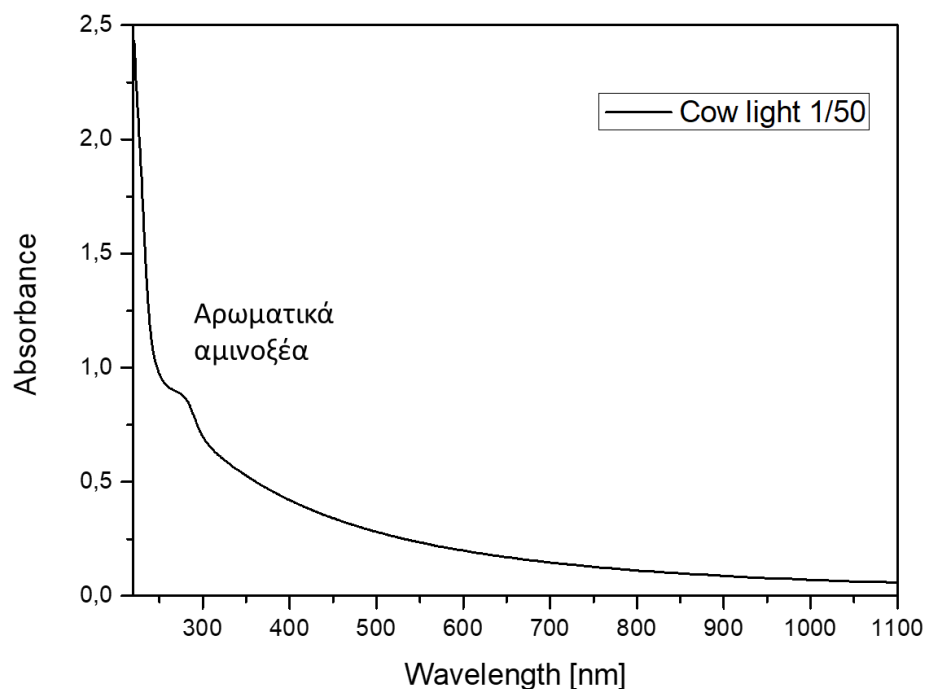
ΔΕΙΓΜΑ	ΜΑΡΚΑ	ΖΩΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΛΙΠΟΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
C1	NF	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	3,60%
C2	BK	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	3,50%
C3	Δ	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	3,50%
C4	OZ	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	3,70%
C5	M	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	3,50%
G1	A	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
G2	BK	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
G3	O	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
G4	OB	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
G5	Δ	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
G6	P	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	3,50%
C6	NF	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1,50%
C7	NF	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	0,00%
C8	BK	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1,50%
C9	Δ	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1,50%
C10	OZ	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1,50%
C11	M	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	1,50%
G7	O	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	1,50%
G8	OB	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	1,50%
G9	P	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	1,50%
S1	A	ΠΡΟΒΕΙΟ	6,00%
S2	A	ΠΡΟΒΕΙΟ	1,50%
S3	M	ΠΡΟΒΕΙΟ	5,50%

## 4.2.1 Αποτελέσματα

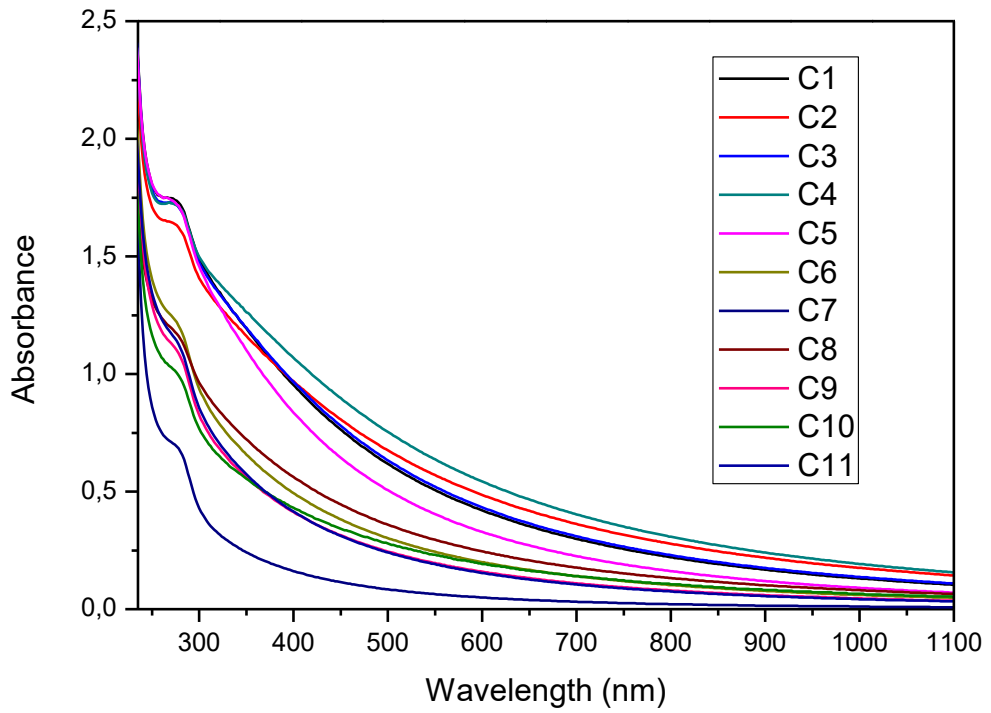
### Φασματοσκοπία Απορρόφησης

Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Shimadzu UV-1900. Το φάσμα λήφθηκε στην περιοχή 220-1100 nm, με βήμα 1nm και κυψελίδα χαλαζία πάχους 2mm. Τα δείγματα απαιτούν αραιώση 1/50 με απιονισμένο νερό. Ο μηδενισμός υποβάθρου πραγματοποιείται με απιονισμένο νερό.

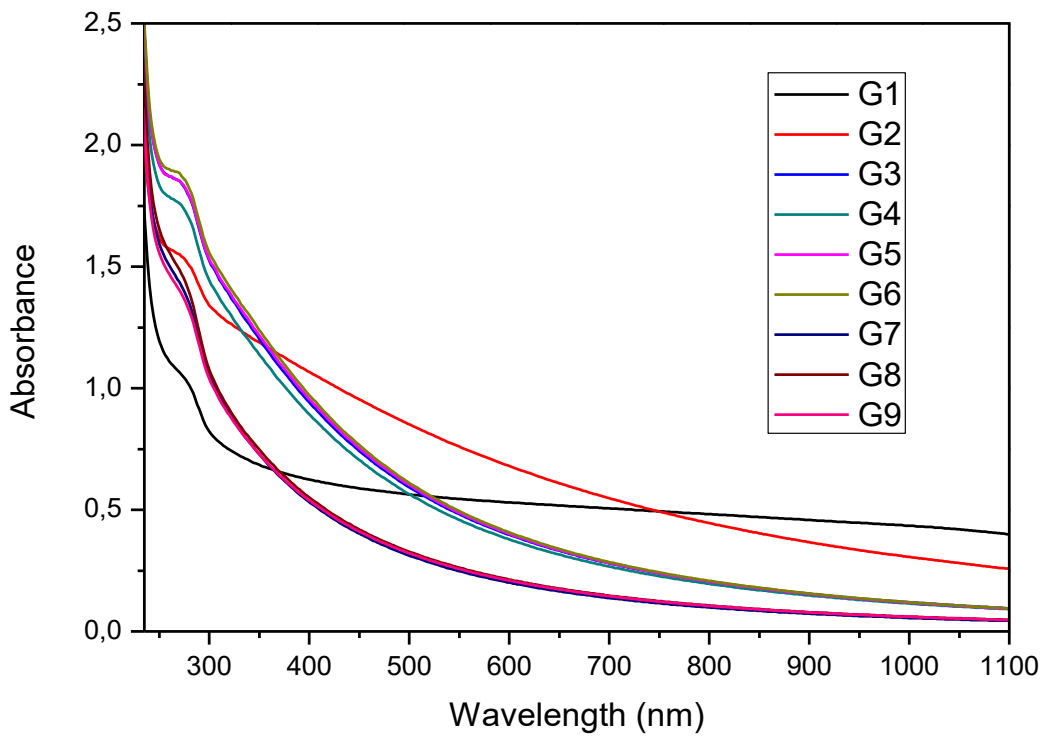
Παρακάτω εμφανίζεται ένα φάσμα απορρόφησης ενός δείγματος αγελαδινού γάλακτος light. Η κύρια κορυφή που εμφανίζεται είναι στα 270-280nm.<sup>[1]</sup> Οφείλεται στην παρουσία των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος (τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη). Παρατηρείται επίσης μία σταδιακή πορεία της καμπύλης προς υψηλότερες τιμές απορρόφησης από τα μικκύλια των λιπαρών του γάλακτος. Η συσσωμάτωσή τους δημιουργεί λιποσφαίρια, δομές που κάποιες φορές είναι μεγέθους συγκρίσιμου με το μήκος κύματος του φωτός.<sup>[1],[2]</sup>



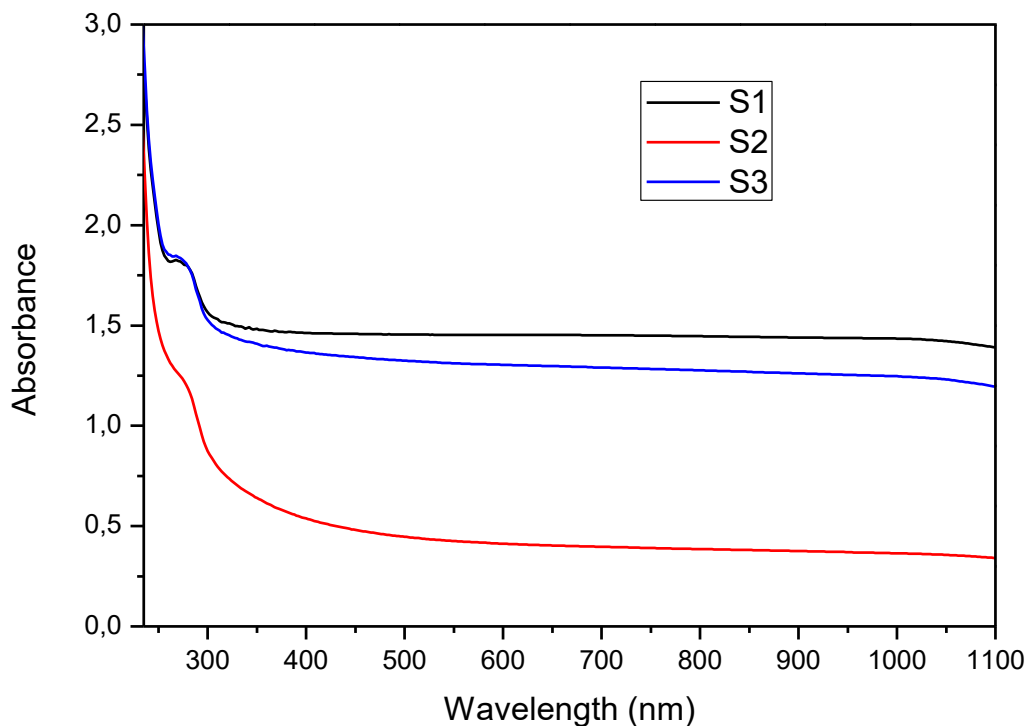
Εικόνα 4.2.1: Φάσμα απορρόφησης αγελαδινού γάλακτος



Εικόνα 4.2.2: Φάσματα αγελαδινού γάλακτος



Εικόνα 4.2.3: Φάσματα κατσικίσιου γάλακτος



Εικόνα 4.2.4: Φάσματα πρόβειου γάλακτος

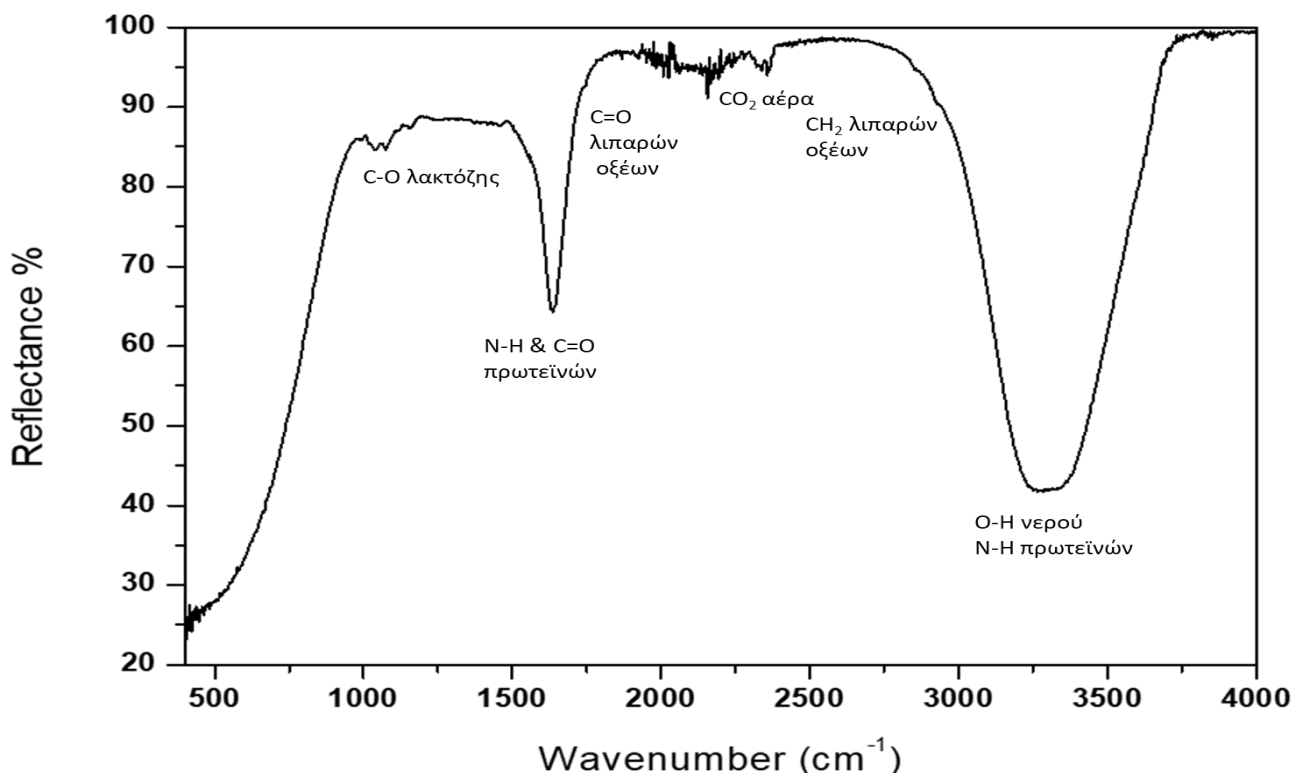
Στα αγελαδινά δείγματα υπάρχει σαφής διαχωρισμός ανάμεσα στα δείγματα διαφορετικής λιποπεριεκτικότητας. Τα πλήρη γάλατα (C1, C2, C3, C4, C5) βρίσκονται σε υψηλότερες τιμές απορρόφησης, ακολουθούν τα ελαφριά (C6, C8, C9, C10, C11) και στις χαμηλότερες τιμές βρίσκεται το άπαχο γάλα (C7). Το άπαχο γάλα είναι σχεδόν διαυγές και δεν εμφανίζει καθόλου το φαινόμενο της εσωτερικής ανάκλασης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η κορυφή στα 275 nm που αντιστοιχεί στα αρωματικά αμινοξέα του γάλακτος έχει παρόμοιο προφίλ σε όλα τα δείγματα, είναι ωστόσο μετατοπισμένη προς τα πάνω, ανάλογα την λιποπεριεκτικότητα του δείγματος.

Στα δείγματα του κατσικίσιου γάλακτος και πάλι παρατηρείται αυτή η διαφοροποίηση ανάμεσα στα πλήρη (G3, G4, G5, G6) και τα ελαφριά γάλατα (G7, G8, G9). Η αρωματική κορυφή έχει και πάλι παρόμοιο προφίλ για όλα τα δείγματα. Δύο δείγματα ξεφεύγουν από την συνολική εικόνα (G1 & G2) και αυτή η διαφοροποίηση ίσως οφείλεται στην φύση των δειγμάτων.

Στα πρόβεια δείγματα, το ελαφρύ δείγμα (S2) διαφοροποιείται από τα πλήρη. Τα πλήρη δείγματα (S1 & S3) βρίσκονται σε πολύ υψηλότερες τιμές λόγω της πολύ μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε λίπος. Σε αυτά τα δείγματα υπάρχει ένα σημαντικό offset από την baseline.

### Φασματοσκοπία FT-IR

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο μηχάνημα Thermo Electron Nicolet 6700 FTIR σε ATR mode το οποίο έφερε κρύσταλλο από διαμάντι. Τα δείγματα μετρήθηκαν άνευ αραιώσης. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο εύρος 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Λήφθηκαν 64 scans ενώ η διακριτική ικανότητα ήταν στους 4  $\text{cm}^{-1}$ .



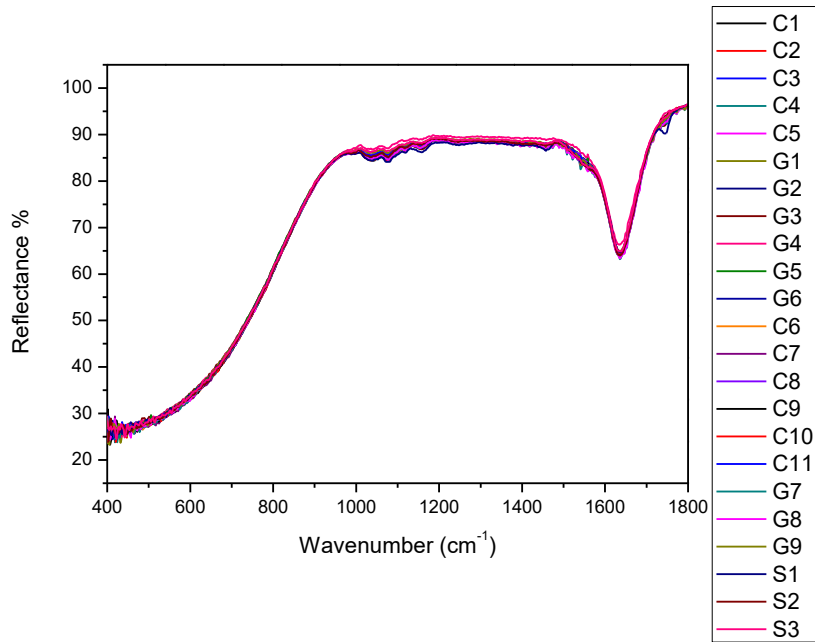
Εικόνα 4.2.5: Φάσμα γάλακτος FTIR

Στην περιοχή 1800-2400  $\text{cm}^{-1}$  εμπεριέχεται και η περιοχή που αντιστοιχεί στην δόνηση των μορίων  $\text{CO}_2$  του ατμοσφαιρικού αέρα που αναπόφευκτα υπάρχει στην αίθουσα της μέτρησης. Όπως φαίνεται και από το φάσμα, αποτελεί θόρυβο για την μέτρηση επομένως παραλείπεται από τα φάσματα. Χωρίζονται λοιπόν στις περιοχές 400-1800  $\text{cm}^{-1}$  και 2400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα για το σύνολο των δειγμάτων στις περιοχές αυτές.

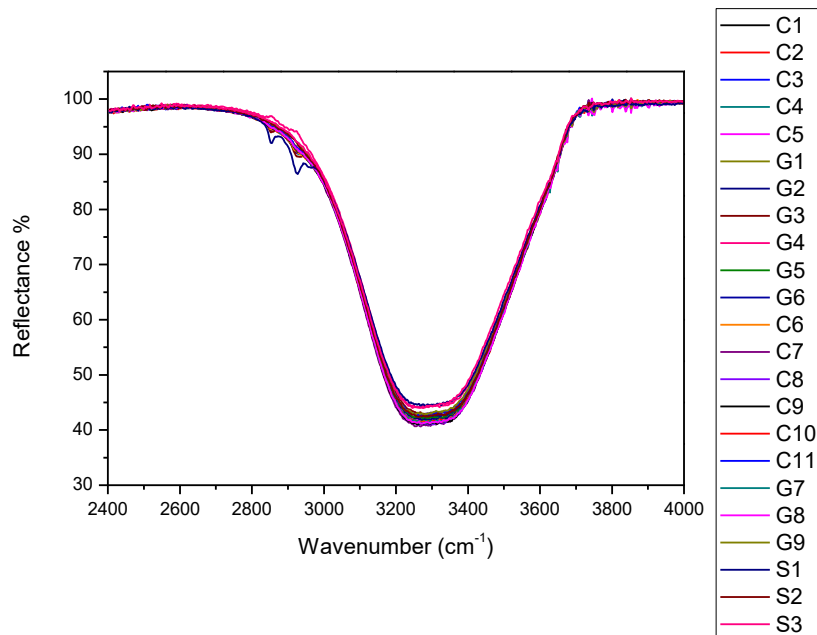
Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι η κορυφή στους 2900  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην έκταση του  $-\text{CH}_2$  των λιπαρών οξέων.<sup>[3]</sup> Η κορυφή στους 1500  $\text{cm}^{-1}$  περίπου συνδέεται με τον δεσμό N-H και τον δεσμό C=O των πρωτεϊνών του γάλακτος, ενώ η κορυφή στους 1700  $\text{cm}^{-1}$  ανατίθεται στον δεσμό C=O των λιπαρών οξέων. Η κορυφή στους 1100  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στον δεσμό C-O της λακτόζης. Η ευρύτερη μπάντα στην περιοχή 3000-



3600  $\text{cm}^{-1}$  αντιστοιχεί κυρίως στην δόνηση του δεσμού O-H του νερού και λιγότερο στον δεσμό N-H των πρωτεϊνών. [3],[4]



Εικόνα 4.2.6: Φάσματα FT-IR συνόλου δειγμάτων στην περιοχή 400-1800  $\text{cm}^{-1}$



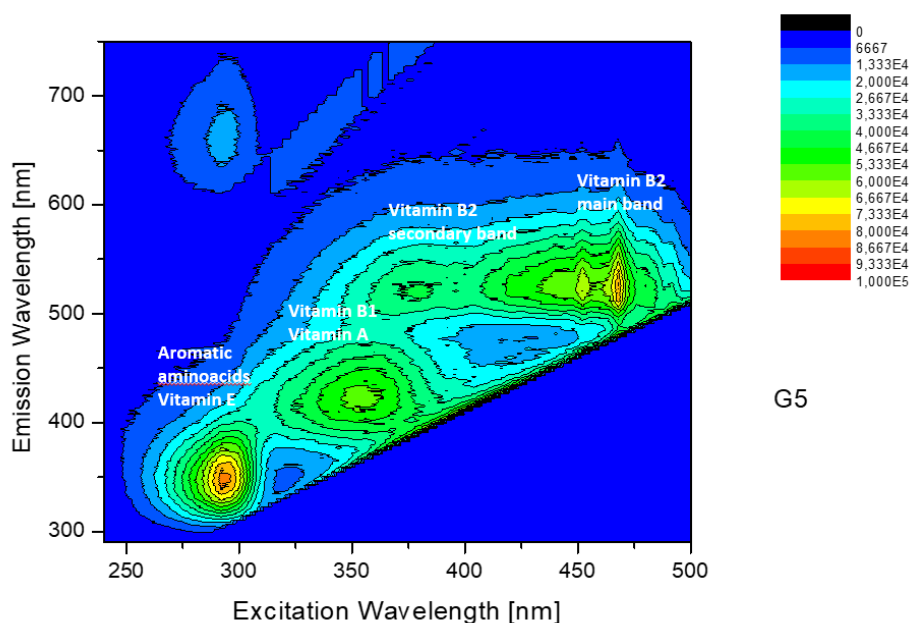
Εικόνα 4.2.7: Φάσματα FT-IR συνόλου δειγμάτων στην περιοχή 2400-4000  $\text{cm}^{-1}$

Από τα φάσματα αυτά δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα ως προς την σύγκριση των δειγμάτων, ωστόσο, αναμενόμενα τα δείγματα με την μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα (πλήρη πρόβεια S1 & S3) είναι αυτά που ξεχωρίζουν στις κορυφές που συνδέονται άμεσα με τα λιπαρά.

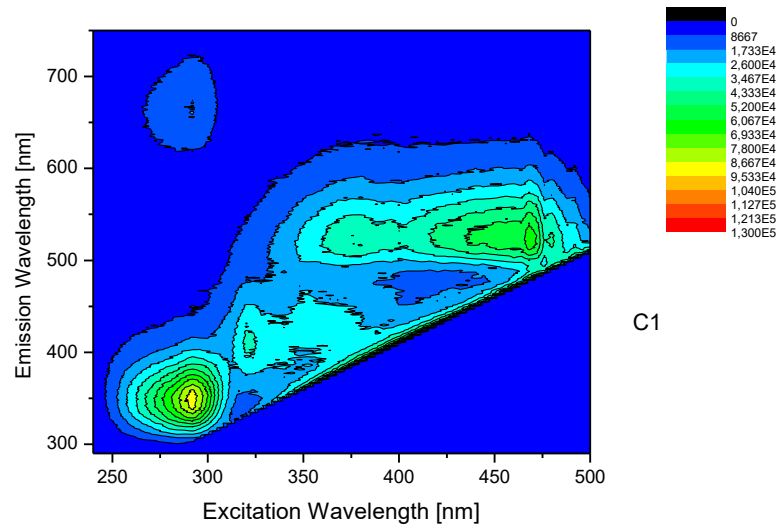
## Φασματοσκοπία Φθορισμού

Όργανο	Fluoromax P
Δείγματα	Χωρίς Αραίωση
Κυψελίδα	10mm από χαλαζία
Διάταξη κυψελίδας	35° Γεωμετρία Εμπρόσθιας Όψης (Front Face)
<b>Matrix Scan:</b>	
Μήκος Διέγερσης(Excitation Wavelength):	240-500 nm
Μήκος Εκπομπής(Emission Wavelength):	290-750 nm
Slits:	exc.1nm/em.1nm,
Integration time:	0,05 sec
Scans:	66 Scans

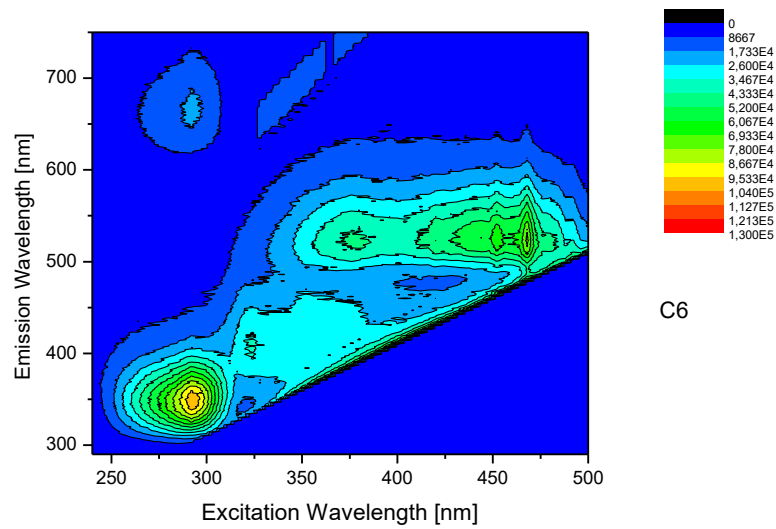
Το σύνολο των χαρτών φθορισμού (Excitation- Emission Matrices, EEMs) δεν θα παρατεθεί σε αυτό το τμήμα, αλλά βρίσκονται στο Παράρτημα. Θα παρατεθούν ενδεικτικά κάποιοι χάρτες προκειμένου να γίνει η ανάλυσή τους. Στον χάρτη φθορισμού εμφανίζονται οι φθοροφόρες ουσίες του γάλακτος. Στην περιοχή 300/350 nm (excitation/emission) εμφανίζεται ο φθορισμός των αρωματικών αμινοξέων του γάλακτος (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη) ενώ στην ίδια περιοχή αλλά σε μικρότερο βαθμό φθορίζει η βιταμίνη E. Στην περιοχή 360/420 nm (excitation/emission) εμφανίζεται ο φθορισμός της θειαμίνης (βιταμίνη B1) και ρετινόλη (βιταμίνη A). Στην περιοχή 470/500 nm (excitation/emission) εμφανίζεται η κύρια μπάντα της βιταμίνης B2 ενώ στην περιοχή 370/500 nm (excitation/emission) εμφανίζεται η δευτερεύουσα μπάντα της ίδιας ουσίας. <sup>[5],[6]</sup>



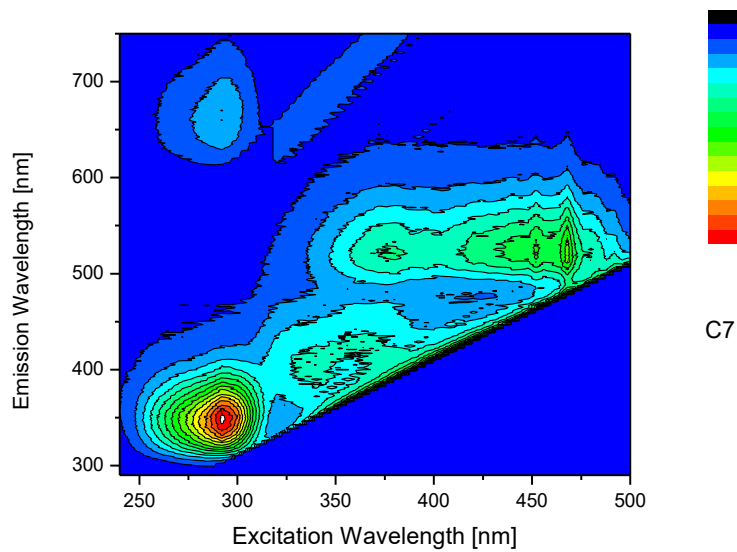
Εικόνα 4.2.8:Χάρτης φθορισμού κασικίσιου γάλακτος με ανάθεση



Εικόνα 4.2.9: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα πλήρους αγελαδινού γάλακτος

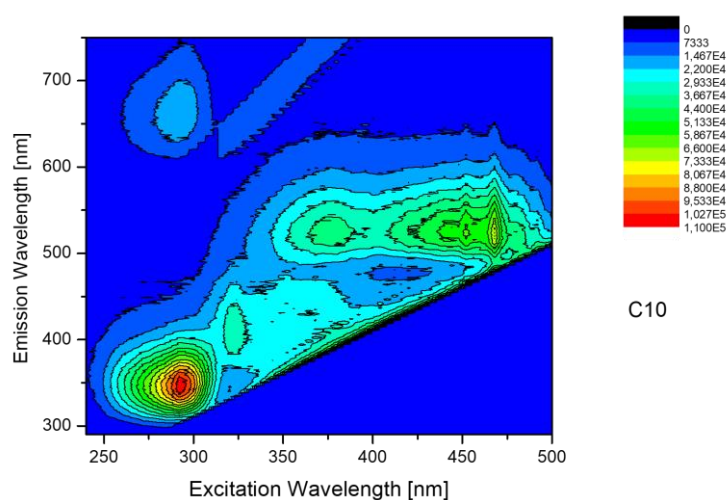


Εικόνα 4.2.10: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα light αγελαδινού γάλακτος

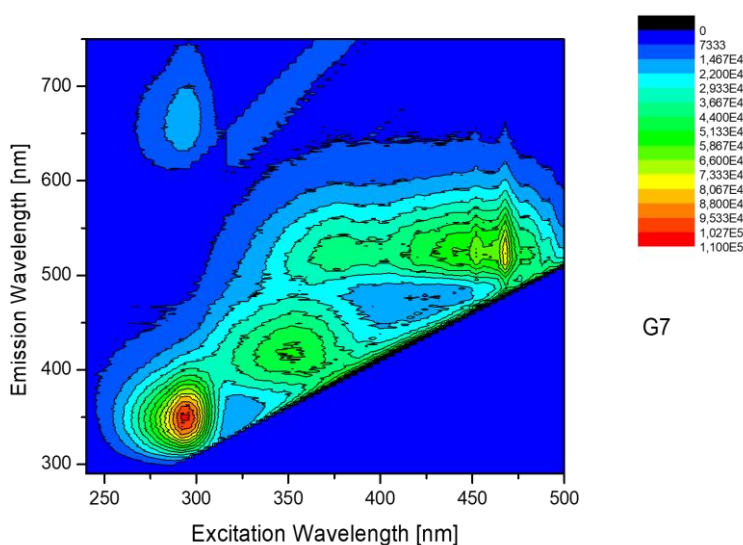


Εικόνα 4.2.11: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα άπαχου αγελαδινού γάλακτος

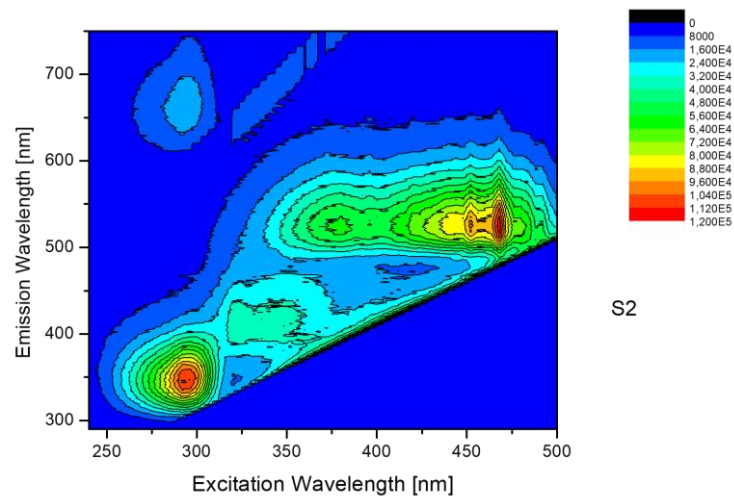
Οι παραπάνω τρεις χάρτες αντιστοιχούν σε αγελαδινό γάλα της ίδιας εταιρείας, σε διαφορετική λιποπερικτικότητα. Είναι κατά σειρά πλήρες, ελαφρύ και άπαχο. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι οι κορυφές που εμφανίζονται είναι οι ίδιες, που ανατίθενται στα αρωματικά αμινοξέα και στις βιταμίνες του γάλακτος. Αυτό που διαφοροποιείται είναι η ένταση του φαινομένου του φθορισμού. Η μείωση της λιποπερικτικότητας με την ταυτόχρονη διατήρηση των υπόλοιπων θρεπτικών στοιχείων σταθερών οδηγεί σε υψηλότερες τιμές έντασης φθορισμού. Αυτό ερμηνεύεται από την απουσία των λιπαρών τα οποία, ενώ δεν φθορίζουν, σκεδάζουν και συνεπώς παρεμποδίζουν μερικώς το φαινόμενο του φθορισμού.



Εικόνα 4.2.12: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα αγελαδινού γάλακτος light



Εικόνα 4.2.12: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα κατσικίσιου γάλακτος light



Εικόνα 4.2.13: Χάρτης φθορισμού σε δείγμα πρόβειου γάλακτος *light*

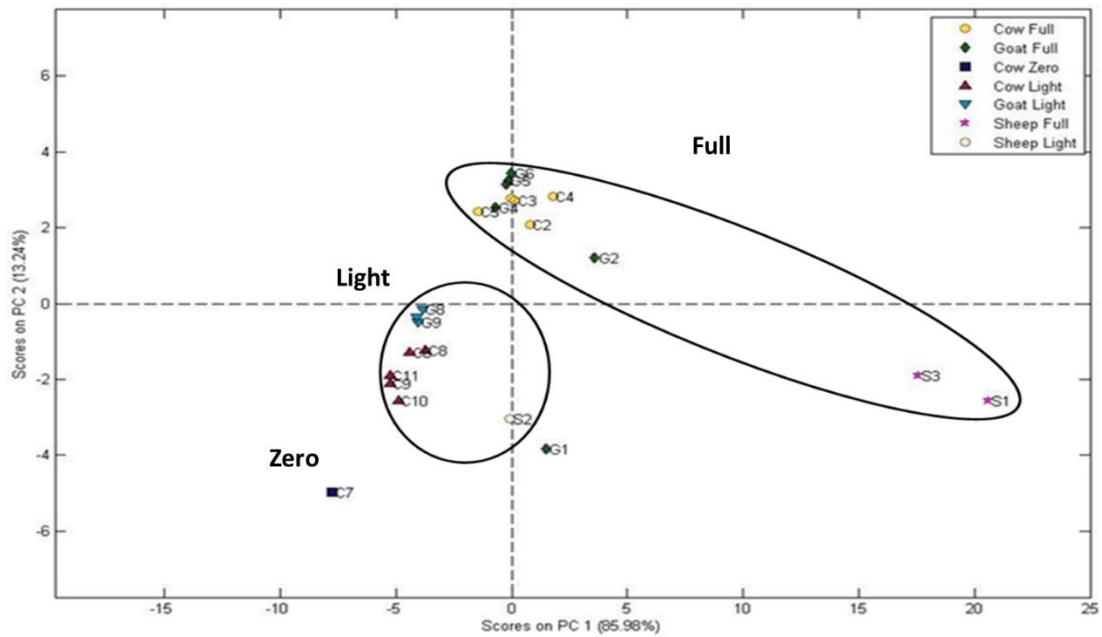
Η σύγκριση των χαρτών φθορισμού αγελαδινού, κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος, ίδιας λιποπεριεκτικότητας, δείχνει ότι οι κορυφές στα 300/350 nm (excitation/emission), 470/500 nm (excitation/emission) και 370/500 nm (excitation/emission) είναι κοινές για τα τρία γάλατα και αναμενόμενα το πρόβειο έχει μεγαλύτερη ένταση φθορισμού καθώς έχει πολύ πιο πλούσιο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ενώ έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιταμίνες E και B2. Η κορυφή που εμφανίζεται μόνο στα κατσικίσια δείγματα στην περιοχή 360/420 nm (excitation/emission) οφείλεται κυρίως στην βιταμίνη A. Το κατσικίσιο γάλα ενώ υστερεί στις υπόλοιπες βιταμίνες σε σχέση με το πρόβειο γάλα, έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη A από όλα τα γάλατα [7].

## **4.2.2 Στατιστική Ανάλυση**

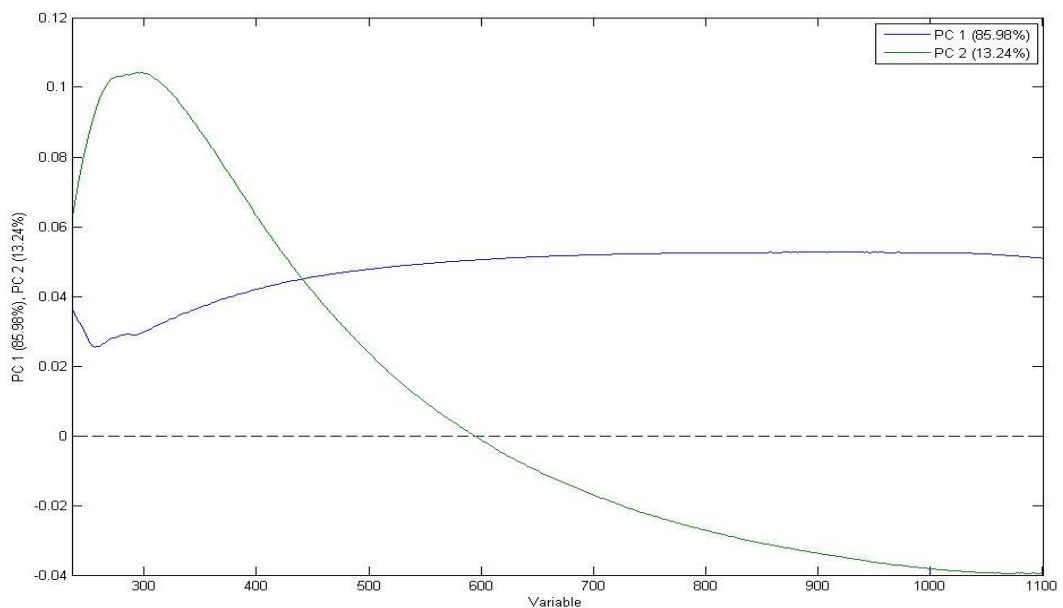
Τα δεδομένα που λήφθηκαν αναλύθηκαν με τα στατιστικά μοντέλα PCA και PLS-DA.

### **Δεδομένα Φασματοσκοπίας Απορρόφησης**

#### **Ανάλυση με PCA**



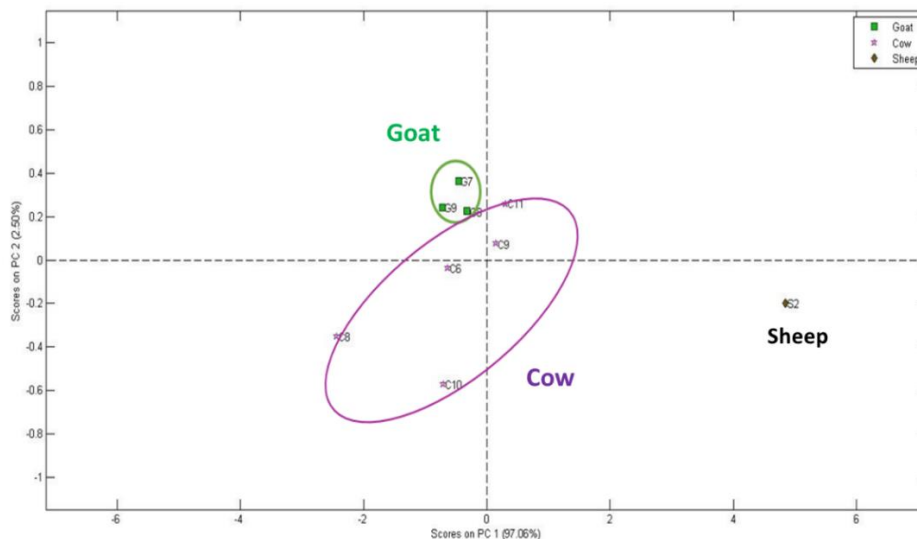
Εικόνα 4..2.14: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης στο σύνολο των δειγμάτων



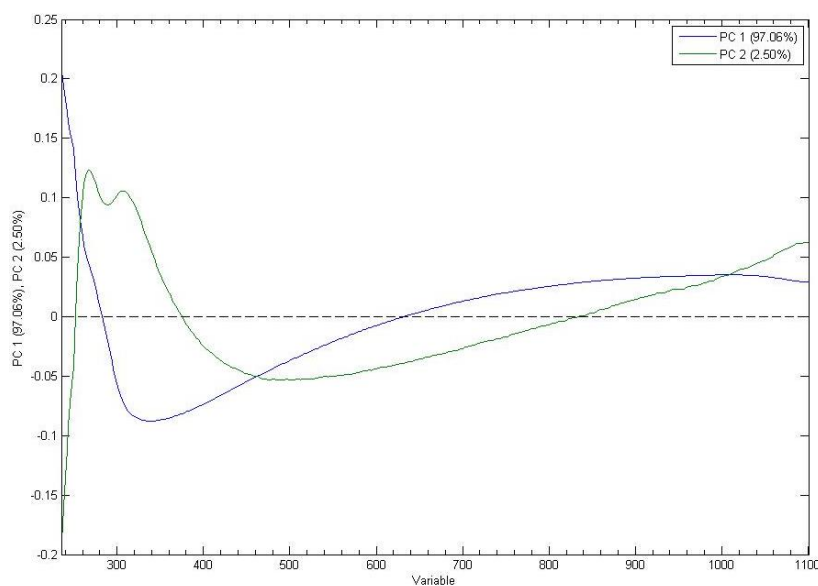
Εικόνα 4..2.15: Loading Plot δεδομένων απορρόφησης - Προεπεξεργασία με Mean Center

Οι 2 πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 99,20% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Με βάση το score plot έχει επιτευχθεί ένας σχεδόν απόλυτος διαχωρισμός όσον αφορά την λιποπεριεκτικότητα των δειγμάτων. Τα πλήρη ξεχωρίζουν από τα ελαφριά ενώ και το μοναδικό άπαχο δείγμα διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα. Τα δύο πρόβεια δείγματα βρίσκονται πολύ μακριά από τα υπόλοιπα δείγματα κυρίως λόγω της πολύ μεγαλύτερης λιποπεριεκτικότητάς τους. Υπενθυμίζεται ότι ενώ τα πλήρη αγελαδινά και κατσικίσια είναι στο 3,5% τα πλήρη πρόβεια είναι στο 5,5-6%. Το άπαχο αγελαδινό γάλα επίσης ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα δείγματα. Τα πλήρη αγελαδινά

και κατσικίσια δεν διαχωρίζονται στο απόλυτο. Όπως φαίνεται και από το loading plot, ο διαχωρισμός βασίζεται εν μέρει στην περιοχή κάτω από τα 300nm που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα, αλλά σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό παίζει και το offset της μέτρησης λόγω της παρουσίας των λιποσφαιρίων. Αυτό φαίνεται από το loading plot της PC1 που είναι μια ευθεία γραμμή πάνω από το 0.



Εικόνα 4.2.16: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης για τα light δείγματα

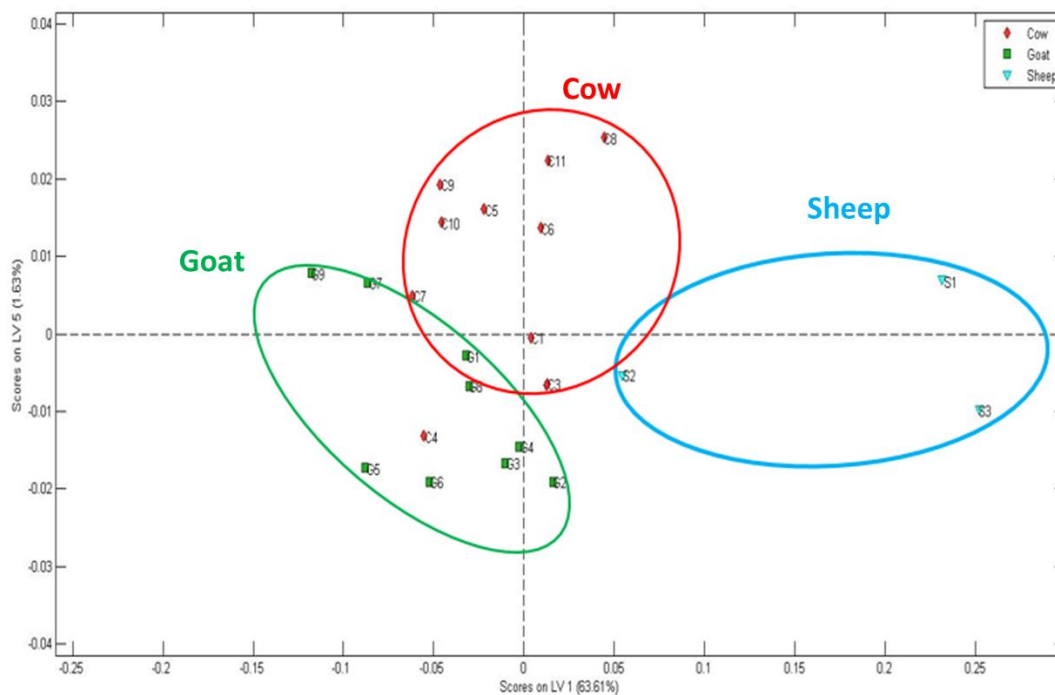


Εικόνα 4.2.17: Loading Plot δεδομένων απορρόφησης- Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center

Στα light δείγματα, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2.16, υπάρχει πλήρης διαχωρισμός ζωικής προέλευσης. Στα δείγματα αυτά, το ποσοστό σε λιπαρά είναι μικρότερο, επομένως το offset δεν είναι τόσο σημαντικό ώστε να συνεισφέρει στην ανάλυση. Οι 2 πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 99,56% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Πράγματι, όπως φαίνεται από τα loading plots, η μεγαλύτερη συνεισφορά είναι αποκλειστικά από την περιοχή κάτω από τα 400nm εκεί δηλαδή που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών του γάλακτος

## Ανάλυση με PLS-DA

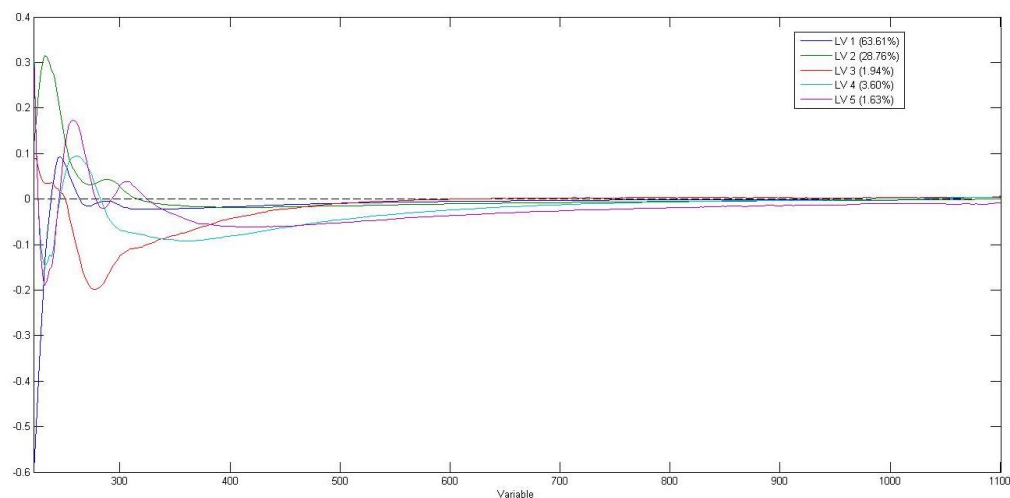
### Κατάταξη βάσει Ζωικής Προέλευσης



Εικόνα 4.2.16: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης για την Κατάταξη βάσει ζωικής προέλευσης

Πίνακας 4.2.2: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει ζωικής προέλευσης

	Cow	Goat	Sheep
Predicted as cow	10	0	1
Predicted as goat	1	9	0
Predicted as sheep	0	0	2

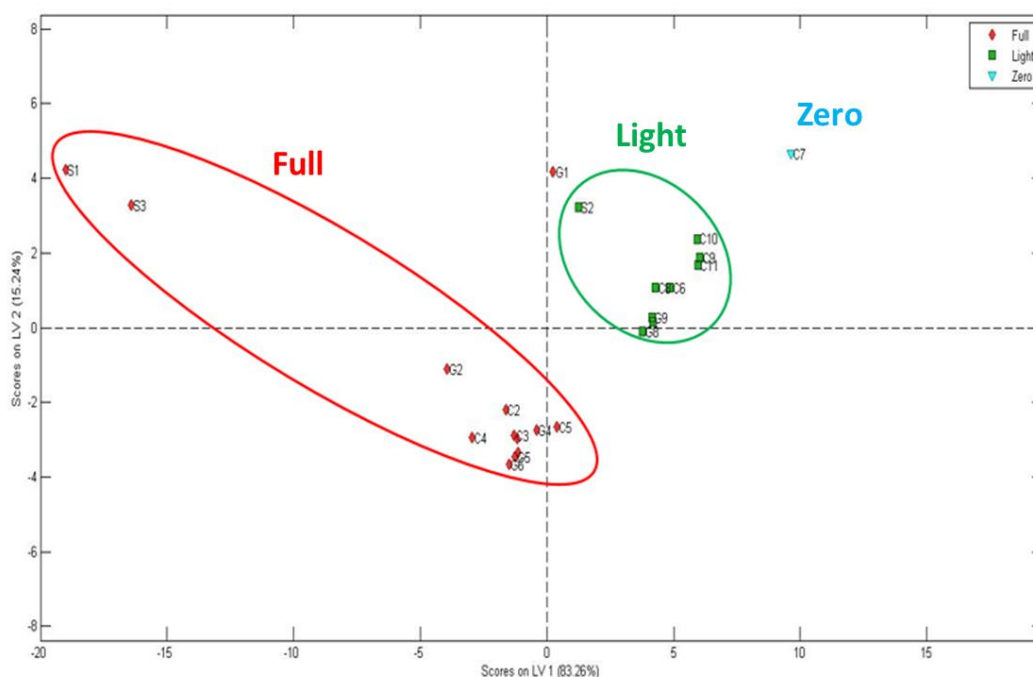


Εικόνα 4.2.17: Loading Plot δεδομένων απορρόφησης- Προεπεξεργασία με 1st derivative, Mean Center



Τα αποτελέσματα με βάση τα δεδομένα της PLS-DA δείχνουν ότι γίνεται επιτυχής πρόβλεψη της ζωικής προέλευσης στο σύνολο σχεδόν των δειγμάτων. Το loading plot δείχνει ότι στις 5 πρώτες latent variables που λήφθηκαν υπ' όψιν και αντιστοιχούν στο 99,54% συνεισφέρει κυρίως η περιοχή κάτω από τα 350nm δηλαδή η περιοχή που απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών του γάλακτος. Προβλέφθηκαν σωστά 10 στα 11 αγελαδινά δείγματα, 9 στα 9 κατσικίσια δείγματα και 2 στα 3 πρόβεια δείγματα.

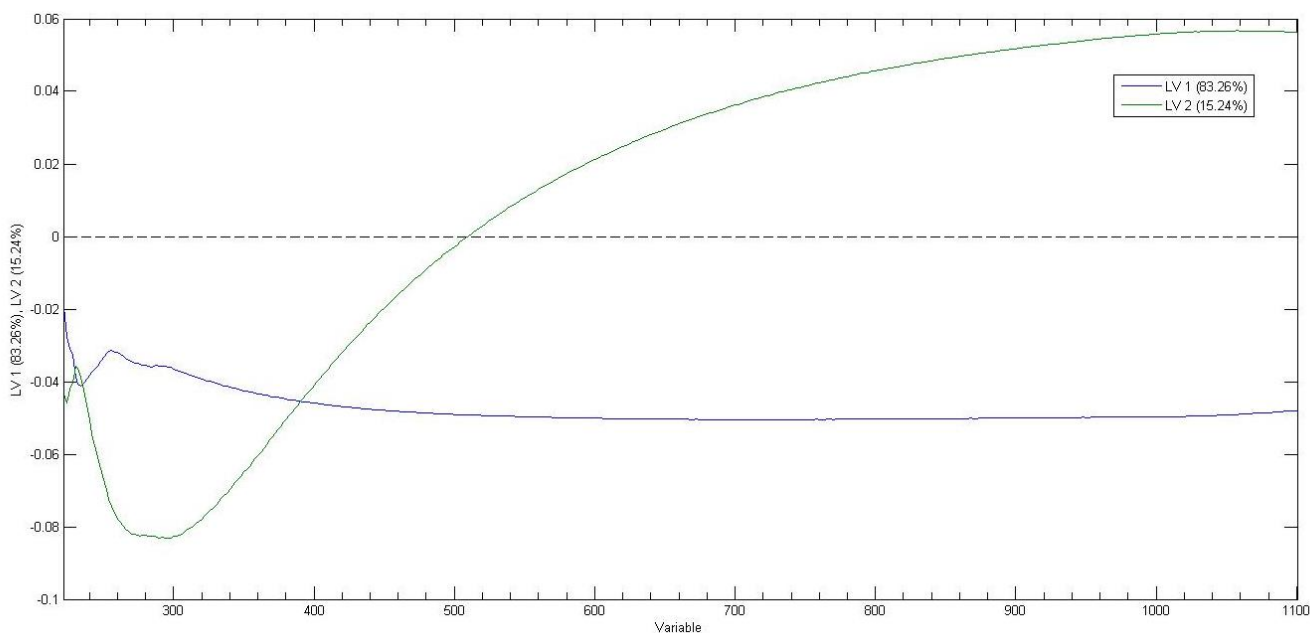
### Κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας



Εικόνα 4.2.18: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης για την Κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας

Πίνακας 4.2.3: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει λιποπεριεκτικότητας

	Full	Light	Zero
Predicted as Full	12	0	0
Predicted as Light	0	9	0
Predicted as Zero	1	0	1

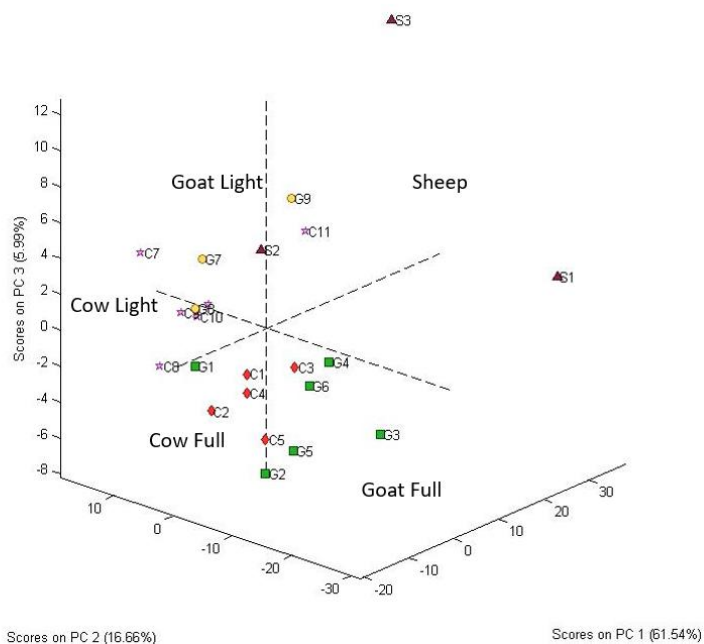


Εικόνα 4.2.19: Loading Plot δεδομένων απορρόφησης- Προεπεξεργασία με Mean Center

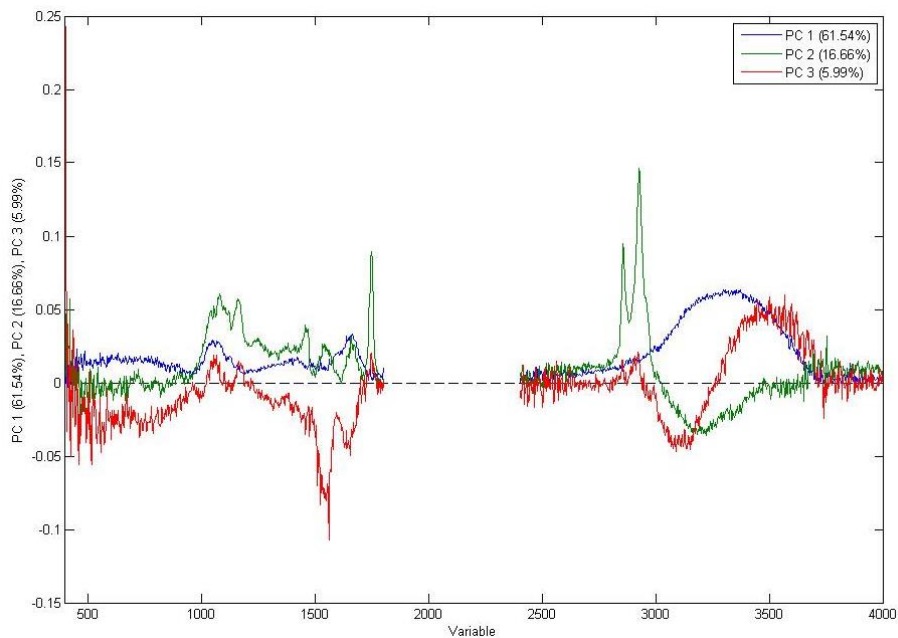
Τα αποτελέσματα της PLS-DA έδειξαν επιτυχή πρόβλεψη των δειγμάτων με βάση την λιποπεριεκτικότητα. Αναμενόμενα, στο loading plot, ιδιαίτερη βαρύτητα δείχνει να έχει και το offset που συνδέεται άμεσα με τα λιποσφαιρίδια του γάλακτος, καθώς επίσης και η περιοχή στην οποία απορροφούν τα αρωματικά αμινοξέα του γάλακτος. Το δείγμα G1 που δεν προβλέπεται σωστά μαζί με τα υπόλοιπα πλήρη δείγματα αποτελεί outlier για την ανάλυση, αφού η διαφοροποίησή του οφείλεται στα ξεχωριστά του χαρακτηριστικά σαν δείγμα.

## Δεδομένα Φασματοσκοπίας ATR-FTIR

### Ανάλυση με PCA



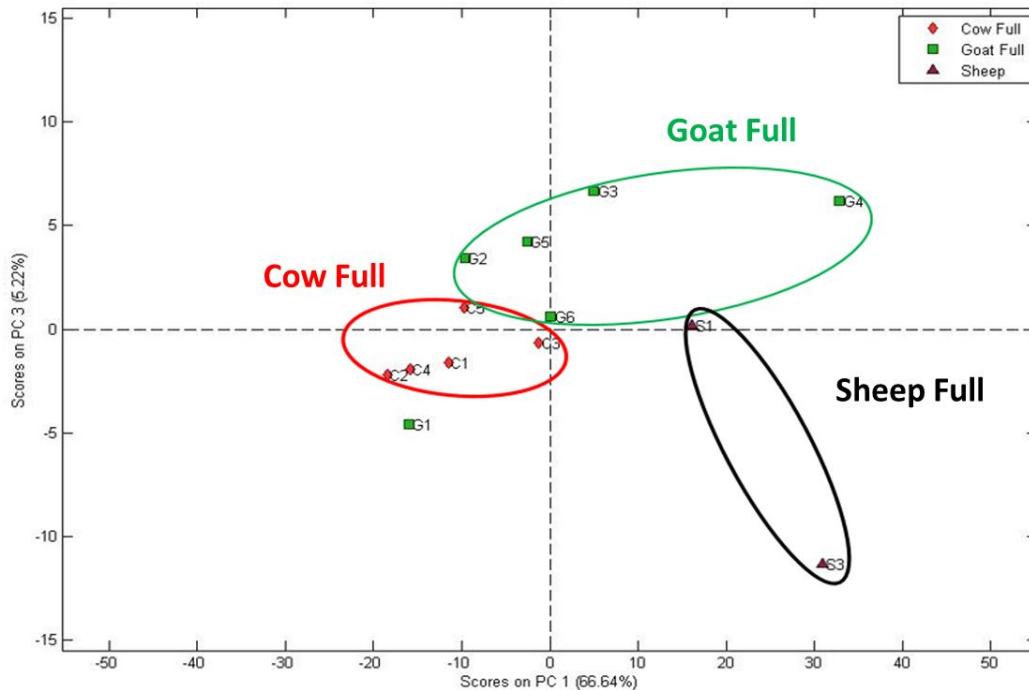
Εικόνα 4.2.20: Score Plot Δεδομένων FT-IR για το σύνολο των δειγμάτων



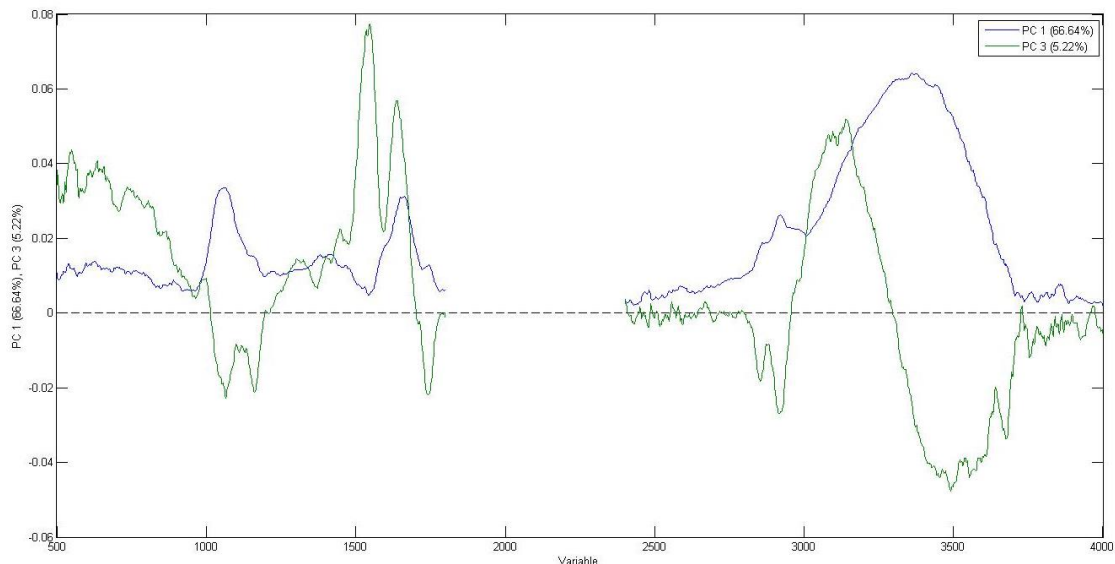
Εικόνα 4.2.21: Loading Plot Δεδομένων FT-IR- Προεπεξεργασία με Mean Center

Οι 3 πρώτες κύριες συνιστώσες ερμηνεύουν το 84,19% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Η διάκριση γίνεται από κοινού ως προς την ζωική προέλευση και την λιποπεριεκτικότητα. Την πιο μεγάλη συνεισφορά στην διάκριση των δειγμάτων φαίνεται να έχουν οι 2 κορυφές που συνδέονται με τα λιπαρά οξέα

(1700 & 2900  $\text{cm}^{-1}$ ) και η κορυφή που συνδέεται με την πρωτεΐνη (1500  $\text{cm}^{-1}$ ) ενώ σημαντική συνεισφορά εμφανίζει και η μπάντα του νερού. Τα δείγματα διακρίνονται πλήρως όσον αφορά την λιποπεριεκτικότητά τους και χωρίζονται. Η διάκριση βάσει ζωικής προέλευσης γίνεται σε πολύ ικανοποιητικό επίπεδο μόνο στα πλήρη δείγματα



Εικόνα 4.2.21: Score Plot Δεδομένων FT-IR για το σύνολο των δειγμάτων



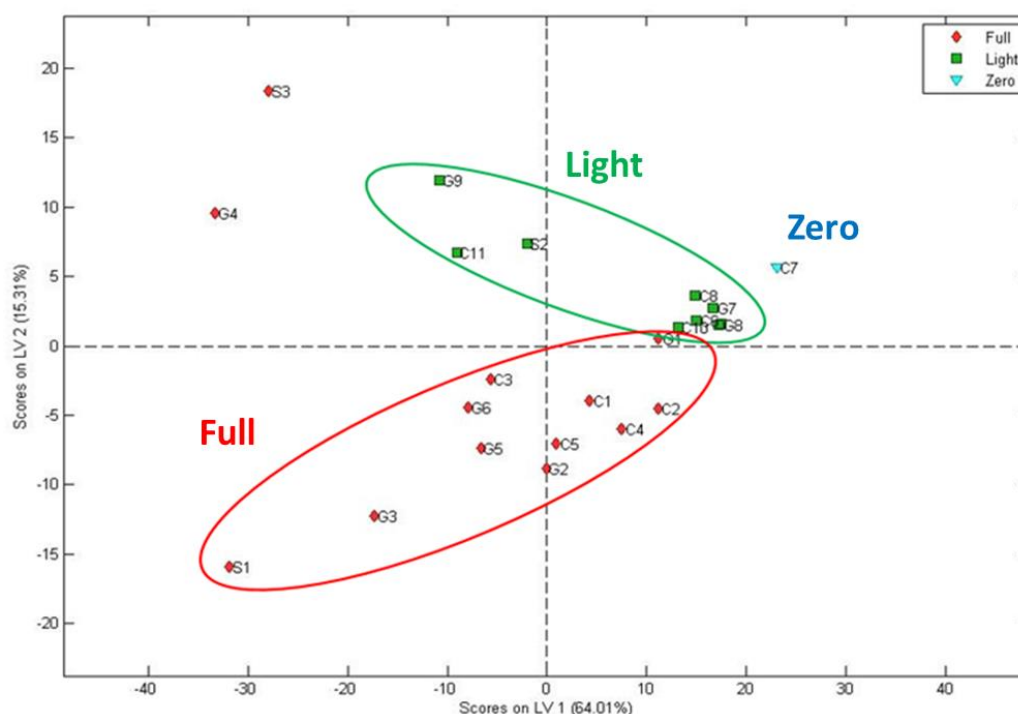
Εικόνα 4.2.22: Loading Plot Δεδομένων FT-IR- Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center

Στην επιμέρους ανάλυση που γίνεται στα full δείγματα (εικόνα 4.2.21) βλέπουμε πλήρη διαχωρισμό βάσει ζωικής προέλευσης (με την εξαίρεση του G1) . Οι 2 κύριες

συνιστώσες που ευθύνονται για τον διαχωρισμό ερμηνεύουν το 71,86% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Στην μελέτη αυτή τα αγελαδινά και τα κατσικίσια δείγματα έχουν ίδια λιποπεριεκτικότητα ενώ τα πρόβεια δείγματα έχουν μεγαλύτερο ποσοστό. Από το loading plot φαίνεται ότι οι κορυφές που συνεισφέρουν περισσότερο είναι της πρωτεΐνης και η ευρεία μπάντα του νερού, ενώ λιγότερο συνεισφέρουν οι κορυφές των λιπαρών και της λακτόζης. Από την στιγμή που η πλειοψηφία των δειγμάτων που μελετώνται εν προκειμένω έχουν την ίδια λιποπεριεκτικότητα, η διαφοροποίηση βασίζεται στα στοιχεία τα οποία είναι διαφορετικά, δηλαδή την πρωτεΐνη.

## Ανάλυση με PLS-DA

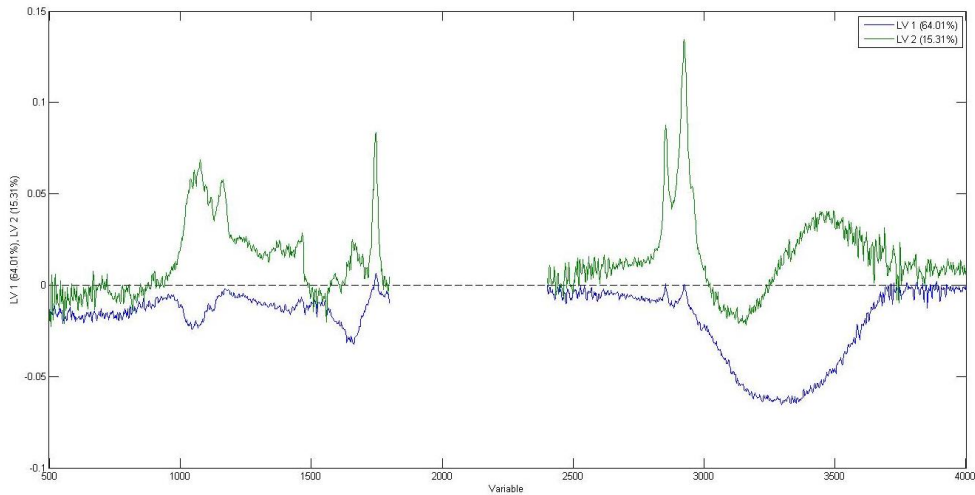
### Κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας



Εικόνα 4.2.23: Score Plot Δεδομένων FT-IR για την Κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας

Πίνακας 4.2.4: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει λιποπεριεκτικότητας

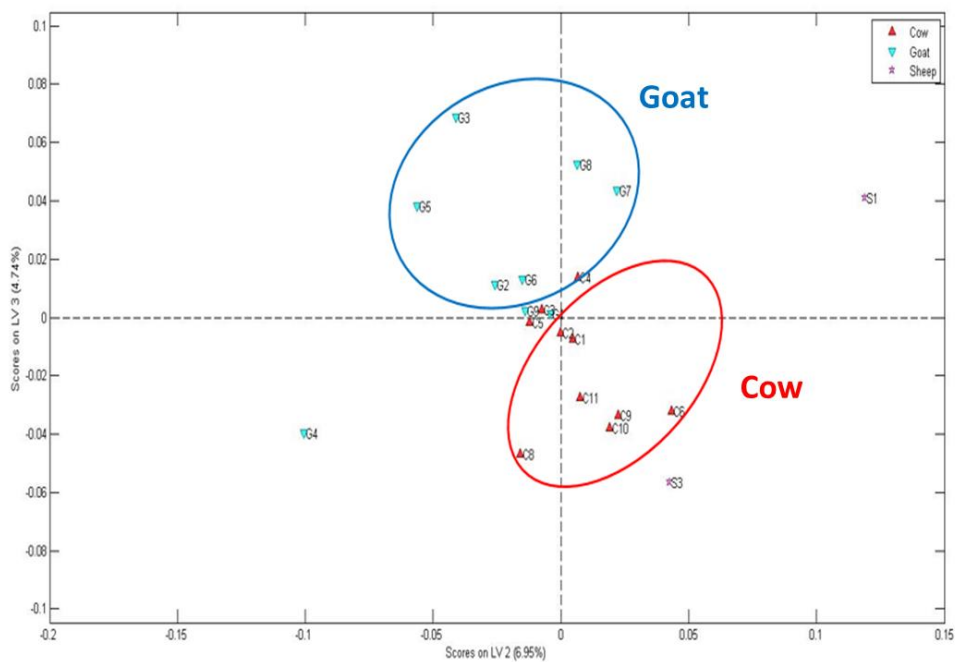
	Full	Light	Zero
Predicted as Full	11	1	0
Predicted as Light	2	8	0
Predicted as Zero	0	0	1



Εικόνα 4.2.24: Loading Plot Δεδομένων FT-IR- Προεπεξεργασία με, Mean Center

Η κατάταξη των δειγμάτων με βάση την λιποπεριεκτικότητά τους έδειξε ικανοποιητική πρόβλεψη αφού προβλέφθηκαν σωστά 11 στα 13 πλήρη δείγματα και 8 στα 9 ελαφριά. Οι κορυφές που εμφανίζονται να συνεισφέρουν στην πρόβλεψη των δειγμάτων είναι οι κορυφές των λιπαρών, στους 2900 και 1700  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ μικρότερη συνεισφορά έχουν η κορυφή της λακτόζης (1100  $\text{cm}^{-1}$ ) και η ευρεία μάντα του νερού. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα G1 είναι το ίδιο δείγμα που και στα προηγούμενα score plots του FT-IR διαφοροποιήθηκε σημαντικά από τα ομοειδή του τόσο στην μελέτη βάσει λιποπεριεκτικότητας, όσο και στην μελέτη βάσει ζωικής προέλευσης. Επομένως η συμπεριφορά του πιθανώς οφείλεται στην φύση του συγκεκριμένου δείγματος.

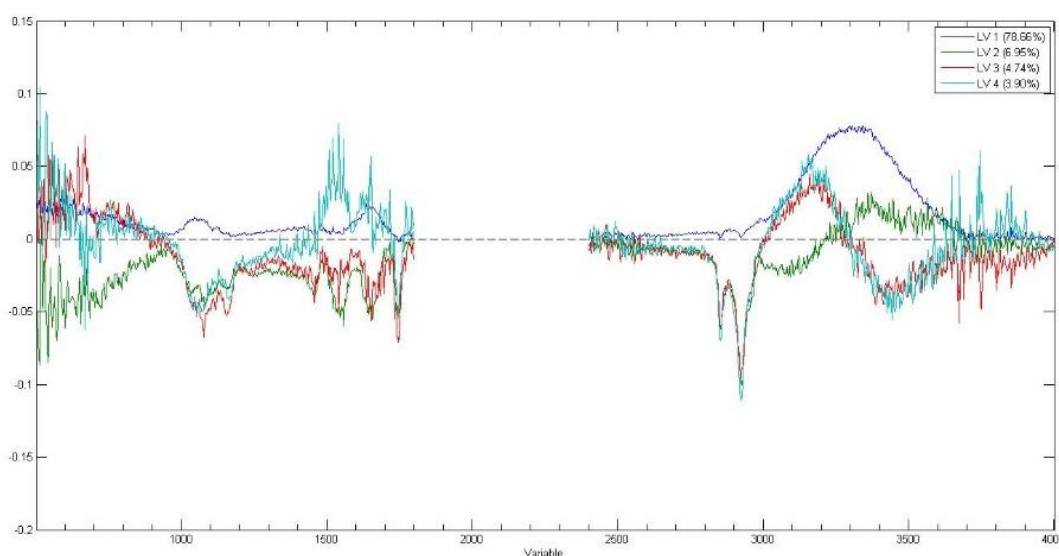
#### Κατάταξη βάσει ζωικής προέλευσης



Εικόνα 4.2.25: Score Plot Δεδομένων FT-IR για την Κατάταξη βάσει ζωικής προέλευσης

Πίνακας 4.2.5: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει ζωικής προέλευσης

	Cow	Goat	Sheep
Predicted as cow	9	3	1
Predicted as goat	1	6	0
Predicted as sheep	0	0	1



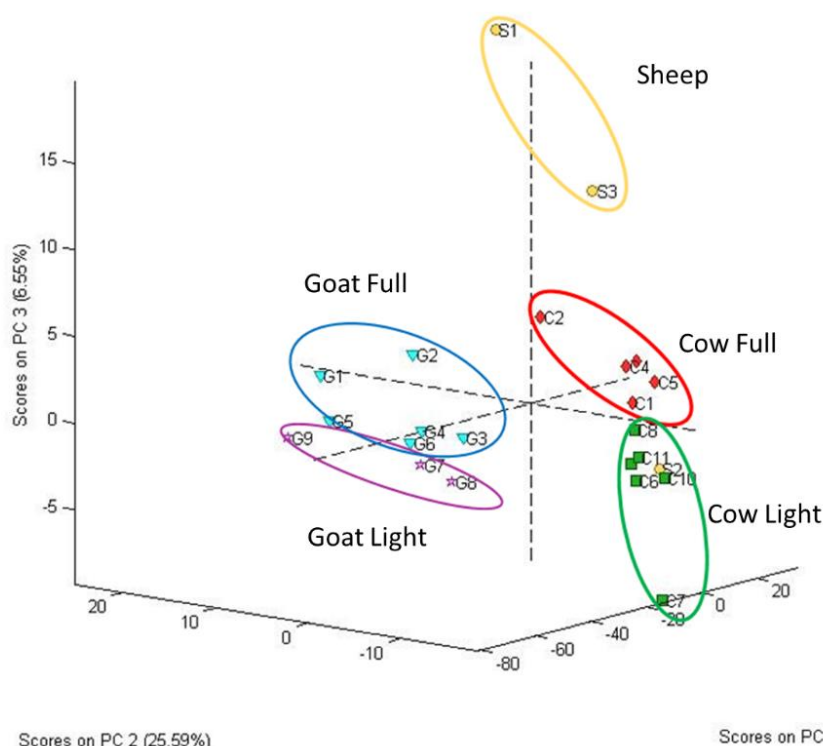
Εικόνα 4.2.26: Loading Plot Δεδομένων FT-IR- Προπεξεργασία με Log10, Mean Center

Για την μελέτη αυτή και την βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων κρίθηκε σκόπιμο να μην συμπεριληφθούν με τα υπόλοιπα δείγματα το πρόβειο ελαφρύ δείγμα (S2) και το άπαχο αγελαδινό (C7) αφού πρόκειται για τις 2 ακραίες περιπτώσεις των ομάδων τους. Τα δείγματα που παρέμειναν σε αυτήν την μελέτη ήταν τα πιο αντιπροσωπευτικά δείγματα των ομάδων τους. Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά μόνο για την πρόβλεψη ως προς τα αγελαδινά δείγματα όπου προβλέπονται σωστά 9 στα 10 δείγματα που συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν την μελέτη. Δεν τα πηγαίνει τόσο καλά στην πρόβλεψη των κατσικίσια και πρόβειων δειγμάτων.

Στις λανθάνουσες μεταβλητές στις οποίες βασίζεται η πρόβλεψη των δειγμάτων σύμφωνα με την ζωική τους προέλευση φαίνεται να συνεισφέρουν σε σημαντικό βαθμό οι κορυφές του νερού, της λακτόζης, των πρωτεϊνών και των λιπαρών. Η κορυφή στους  $2900\text{ cm}^{-1}$  που ανατίθεται στα λιπαρά εμφανίζεται να συνεισφέρει περισσότερο από τις υπόλοιπες κορυφές, πιθανόν επειδή αυτός είναι και ο παράγοντας με την μεγαλύτερη διακύμανση ανάμεσα στην γκάμα των δειγμάτων. Όλα τα παραπάνω συστατικά επηρεάζουν την συνολική εικόνα του γάλακτος και την διαφοροποίηση ανάμεσα στα ζωικά είδη και είναι λογικό να εμφανίζεται η συνεισφορά όλων των κορυφών κάποιο βαθμό.

## Δεδομένα Φασματοσκοπίας Φθορισμού

### Ανάλυση με PCA



Εικόνα 4.2.27: Score Plot Δεδομένων φθορισμού για το σύνολο των δειγμάτων

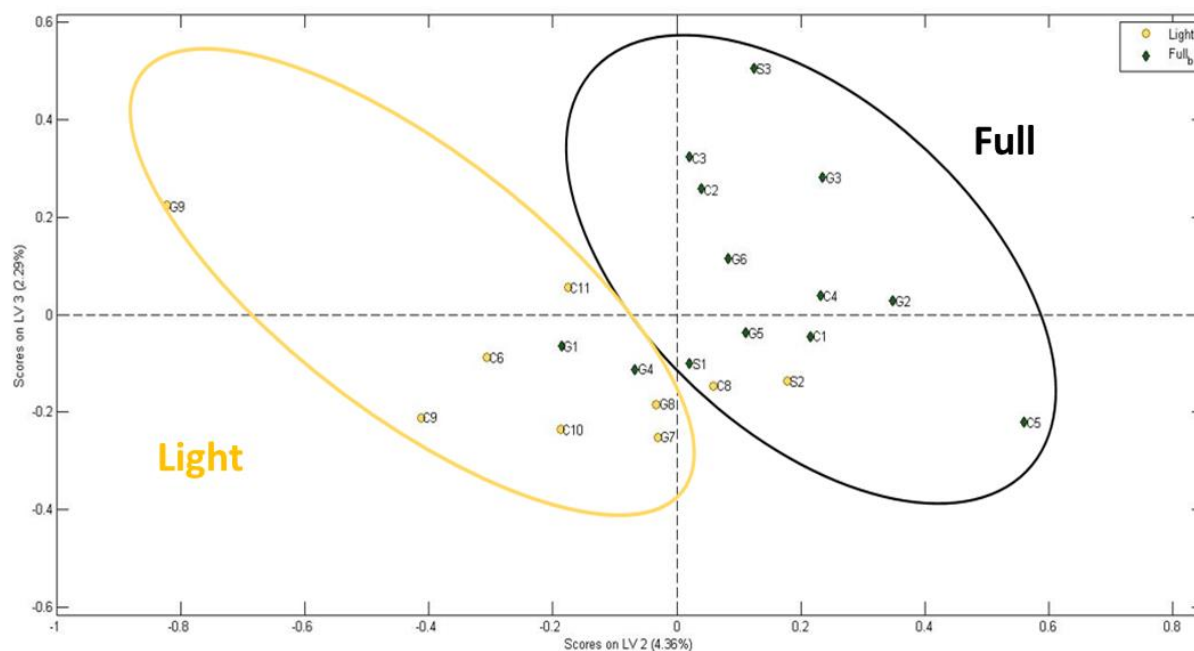
- Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center

Οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες περιγράφουν το 91,53% της διακύμανσης των φασματοσκοπικών δεδομένων. Η τρισδιάστατη προβολή απεικονίζει καλύτερα την διάκριση ανάμεσα στις 5 κατηγορίες. Τα δείγματα έχουν χωριστεί μικτά, βάσει ζωικής προέλευσης και λιποπεριεκτικότητας. Ο διαχωρισμός είναι σχεδόν καθολικός, αφού μόνο το S2 που είναι και το μόνο πρόβειο ελαφρύ δείγμα δεν κατατάσσεται με τα πρόβεια. Η χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητά του ωθεί το δείγμα σε υψηλότερη ένταση φθορισμού από τα υπόλοιπα πρόβεια δείγματα, όπως φαίνεται και στον ανάλογο χάρτη, στο παράρτημα. Εμφανίζεται ανάμεσα στα αγελαδινά light.



## Ανάλυση με PLS-DA

### Κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας



Εικόνα 4.2.28: Score Plot Δεδομένων φθορισμού για την κατάταξη βάσει λιποπεριεκτικότητας

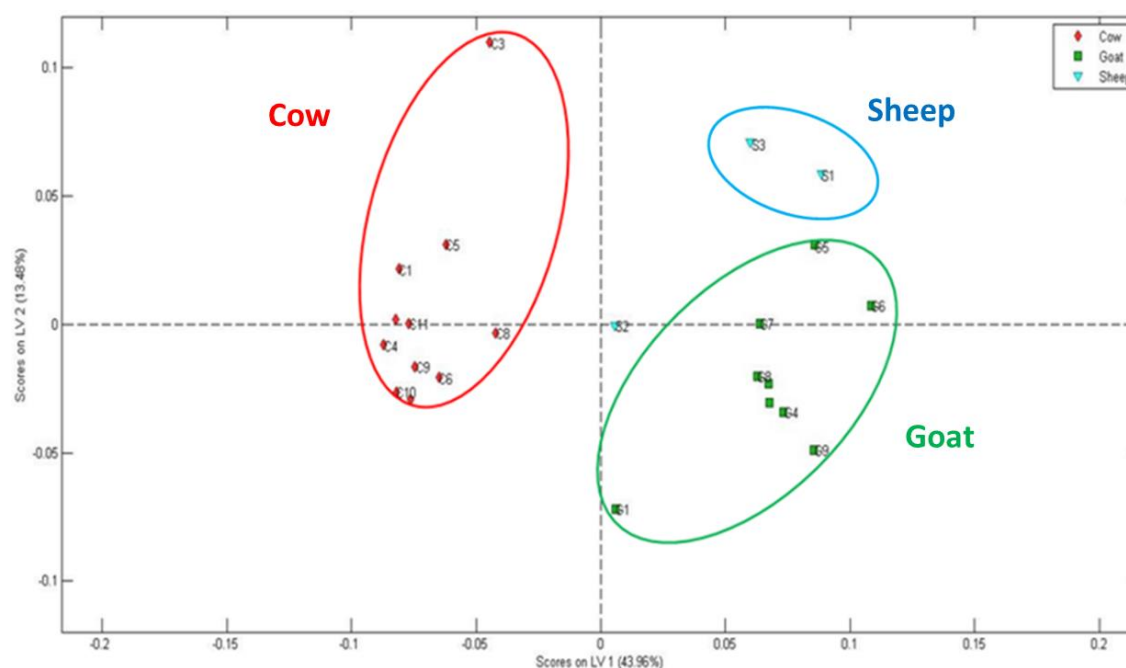
Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center

Πίνακας 4.2.6: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει λιποπεριεκτικότητας

	Full	Light
Predicted as Full	10	3
Predicted as Light	3	6

Η ανάλυση αυτή κάνει μία καλή αλλά όχι αρκετά ικανοποιητική διάκριση ανάμεσα στα πλήρη και τα ελαφριά γάλατα. Πρόβλεψε σωστά 6 στα 9 ελαφριά δείγματα και 10 στα 13 πλήρη δείγματα. Το άπαχο δείγμα κανονικά ορίζει μια κατηγορία μόνο του και βάσει έντασης φθορισμού ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα δείγματα. Ωστόσο κρίθηκε σκόπιμο σε αυτήν την ανάλυση να μην συμπεριληφθεί με τα υπόλοιπα δείγματα, αφού η προσθήκη του δεν προσφέρει κάτι στο μοντέλο πρόβλεψης. Προβλέφθηκαν σωστά 10 στα 13 πλήρη δείγματα και 6 στα 9 ελαφριά δείγματα.

### Κατάταξη βάσει ζωικής προέλευσης



Εικόνα 4.2.29: Score Plot Δεδομένων φθορισμού για την κατάταξη βάσει ζωικής προέλευσης  
Προεπεξεργασία με SNV, Mean Center

Πίνακας 4.2.7: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει ζωικής προέλευσης

	Cow	Goat	Sheep
Predicted as cow	11	0	0
Predicted as goat	0	8	1
Predicted as sheep	0	1	2

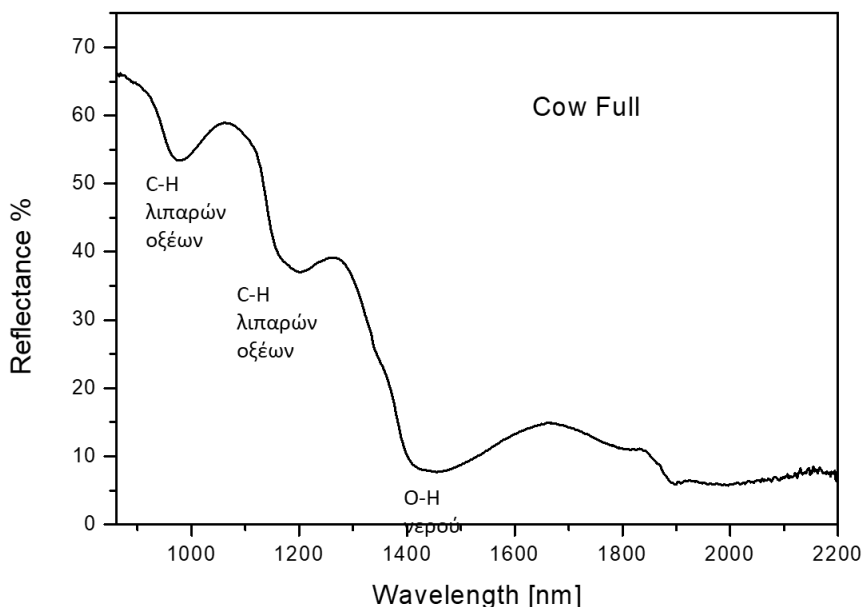
Από τα δεδομένα της PLS-DA διακρίνονται πλήρως τα αγελαδινά από τα κατσικίσια δείγματα. Η μέθοδος αυτή προβλέπει 11 στα 11 αγελαδινά δείγματα και 8 στα 9 κατσικίσια δείγματα ενώ προβλέπει και 2 στα 3 πρόβεια δείγματα. Η συμπεριφορά του πρόβειου light διαφοροποιείται σημαντικά από τα πλήρη και για τον λόγο αυτό δεν προβλέπεται μαζί με τα υπόλοιπα πρόβεια δείγματα. Ωστόσο όπως προκύπτει και από το score plot το πρόβειο light ξεχωρίζει και από τα κατσικίσια δείγματα εμφανίζοντας μια ξεχωριστή συμπεριφορά.

### 4.3 ΝΟΘΕΙΑ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Μια ακόμη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο στα γάλατα ήταν η μελέτη της νοθείας στο γάλα. Η νοθεία που εντοπίζεται πιο συχνά στην αγορά είναι η νόθευση γάλακτος με γάλα διαφορετικής ζωικής προέλευσης, συνήθως χαμηλότερης εμπορικής αξίας, και η νόθευση γάλακτος με νερό, που προφανώς αποτελεί το κυρίαρχο στοιχείο στο γάλα. Για τον λόγο αυτό δημιουργήθηκαν μίγματα πλήρους αγελαδινού γάλακτος με απιονισμένο νερό, αγελαδινού γάλακτος light με νερό, πλήρους κατσικίσιου γάλακτος με νερό και μίγμα κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα, ίδιας λιποπεριεκτικότητας. Κάθε μίγμα πραγματοποιήθηκε σε 5 διαφορετικές αναλογίες, ενδεικτικές των πραγματικών ποσοστών νοθείας της αγοράς, ήτοι 2%, 5%, 10%, 15% και 20%.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ακόμα μία φασματοσκοπική μέθοδος ώστε το τρόφιμο αυτό να χαρακτηριστεί με ακόμη μια τεχνική. Η τεχνική αυτή μάλιστα πλεονεκτεί της απορρόφησης στο ότι δεν απαιτεί αραιώση του δείγματος.<sup>[8]</sup> Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Perkin-Elmer Lambda 950, στην λειτουργία reflectance αφού το μηχάνημα διαθέτει σφαίρα ολοκλήρωσης. Το εύρος της μέτρησης ήταν 2200-860nm, το βήμα ήταν 2nm, και η κυψελίδα που χρησιμοποιήθηκε ήταν πάχους 2mm από χαλαζία.

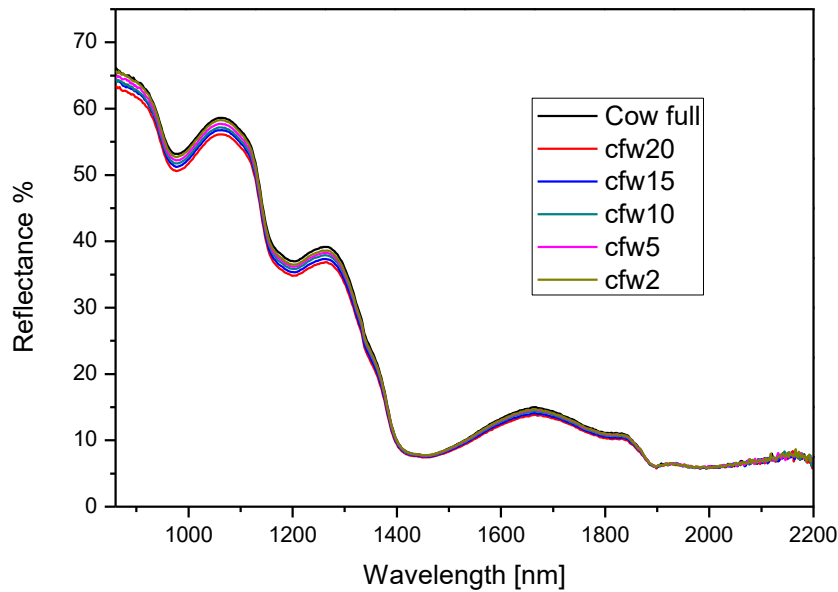
#### 4.3.1 Αποτελέσματα



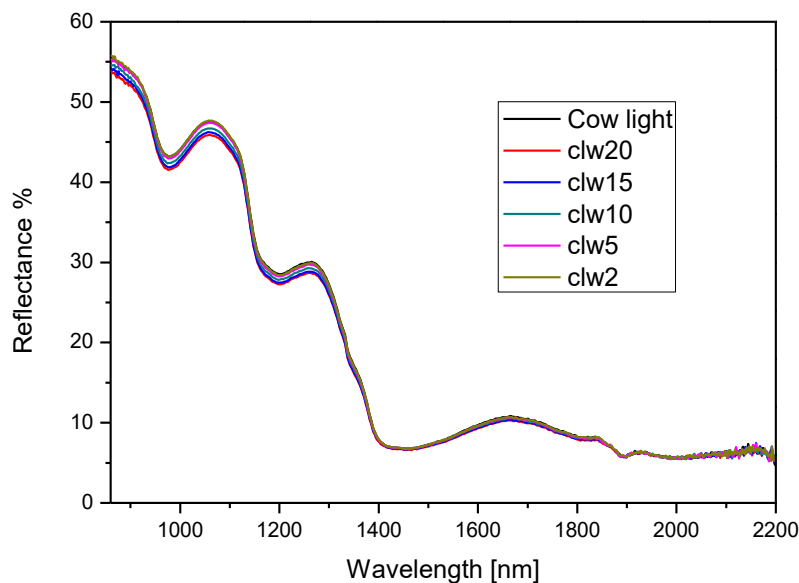
Εικόνα 4.3.1: Φάσμα ανάκλασης πλήρους αγελαδινού γάλακτος

Στο ενδεικτικό φάσμα που της εικόνας 4.3.1 εμφανίζονται κάποιες ευρείες μπάντες απορρόφησης. Σε ένα φάσμα ανάκλασης ο εντοπισμός της ταινίας απορρόφησης γίνεται στο ελάχιστο της μπάντας ανάκλασης.<sup>[8]</sup> Η ευρεία μπάντα απορρόφησης στα 1450nm ανατίθεται στην δόνηση του δεσμού O-H

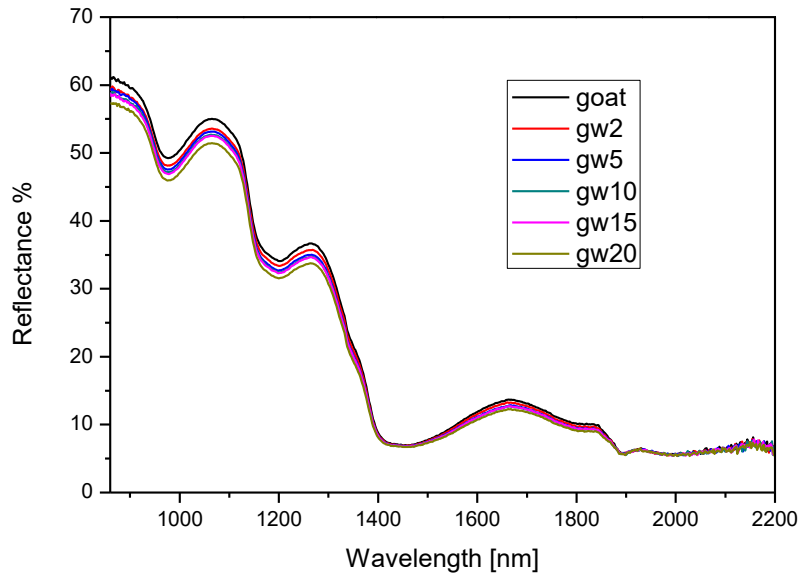
του νερού.<sup>[9]</sup> Οι ταινίες απορρόφησης στα 950nm και στα 1200nm ανατίθενται στον δεσμό C-H των λιπαρών που περιέχονται στο γάλα και βρίσκονται στο ελάχιστο των μπαντών ανάκλασης στα 870 και 1100 nm. <sup>[9],[10]</sup> Οι κορυφές που ανατίθενται στις πρωτεΐνες του γάλακτος επισκιάζονται από την ισχυρή παρουσία του νερού, στην περιοχή άνω των 2000nm ενώ σε μελέτες που έχουν γίνει σε σκόνη γάλακτος, εμφανίζονται.<sup>[9]</sup> Στο σύνολο των μετρημένων δειγμάτων, που εμφανίζονται παρακάτω, εμφανίζεται το ίδιο προφίλ κορυφών.



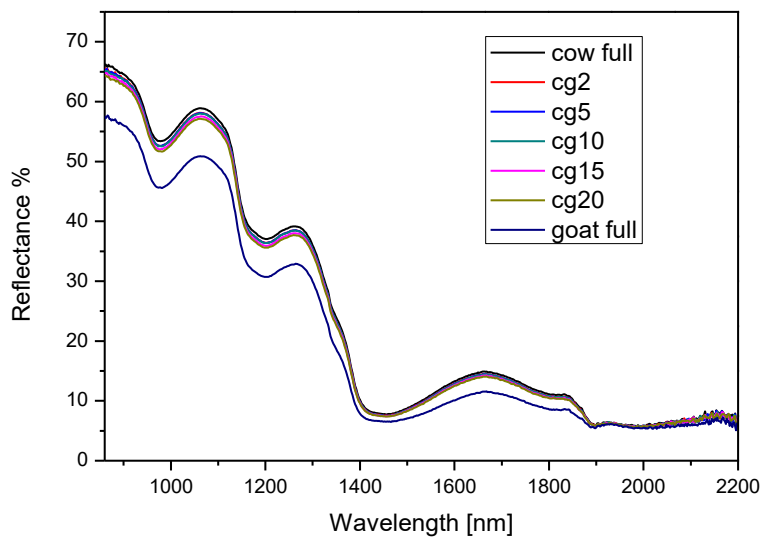
Εικόνα 4.3.2: Φάσματα ανάκλασης μίξεων πλήρους αγελαδινού γάλακτος με νερό



Εικόνα 4.3.3: Φάσματα ανάκλασης μίξεων αγελαδινού γάλακτος light με νερό



Εικόνα 4.3.4: Φάσματα ανάκλασης μίξεων πλήρους κατσικίσιου γάλακτος με νερό



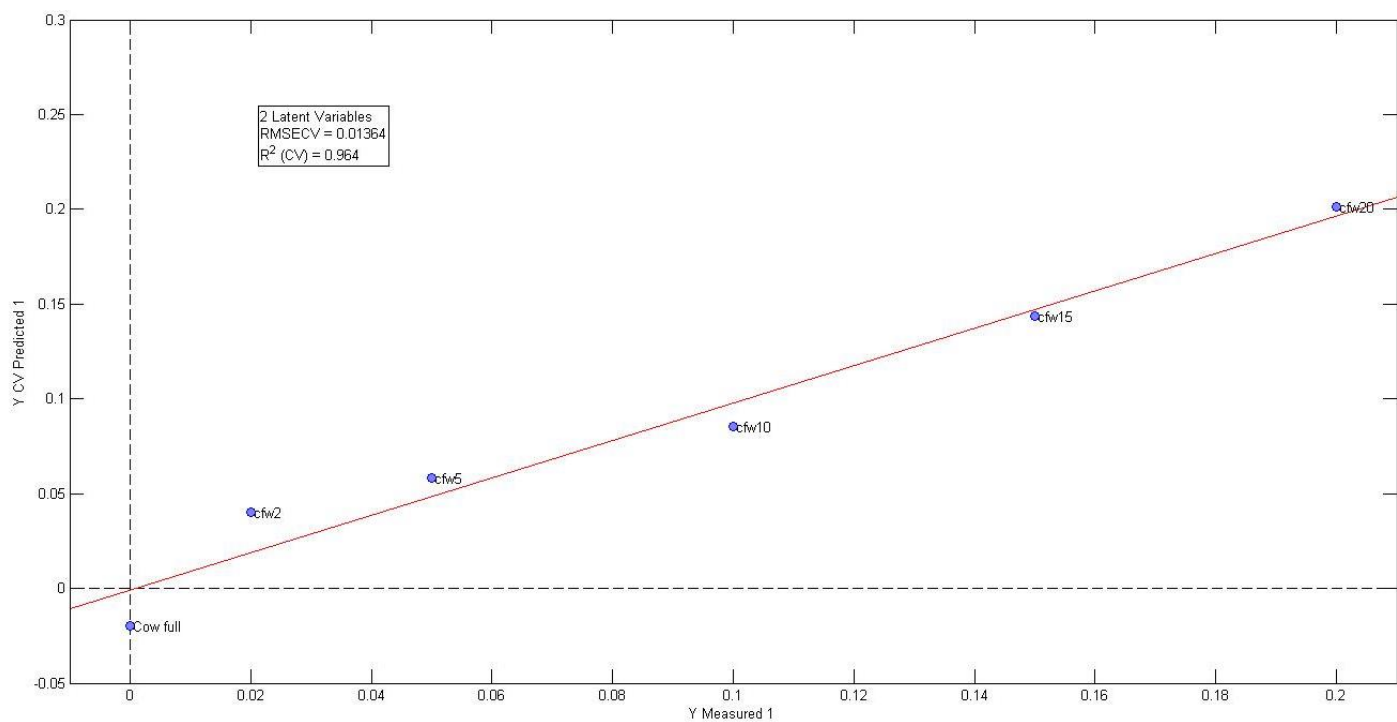
Εικόνα 4.3.5: Φάσματα ανάκλασης μίξεων πλήρους αγελαδινού γάλακτος με πλήρες κατσικίσιο γάλα

Από τα παραπάνω φάσματα, στις μίξεις γάλακτος νερού φαίνεται ότι η προσθήκη νερού επηρεάζει το φάσμα. Η αύξηση του ποσοστού σε νερό σε κάθε μίξη οδηγεί σε μικρότερη τιμή διάχυτης ανάκλασης, όπως φαίνεται και από την κατανομή των φασμάτων στο συνολικό φάσμα. Το γεγονός αυτό είναι λογικό αφού η αραιώση με νερό οδηγεί σε πιο διαυγή διαλύματα που ανακλούν λιγότερο. Όσον αφορά την μίξη αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος, η σταδιακή αύξηση της ποσότητας του κατσικίσιου γάλακτος στις μίξεις οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές ανάκλασης. Όπως έδειξαν τα απλά φάσματα αγελαδινού και κατσικίσιου γάλακτος, το κατσικίσιο γάλα ανακλά λιγότερο από το αγελαδινό. Το φαινόμενο λοιπόν είναι λογικό.

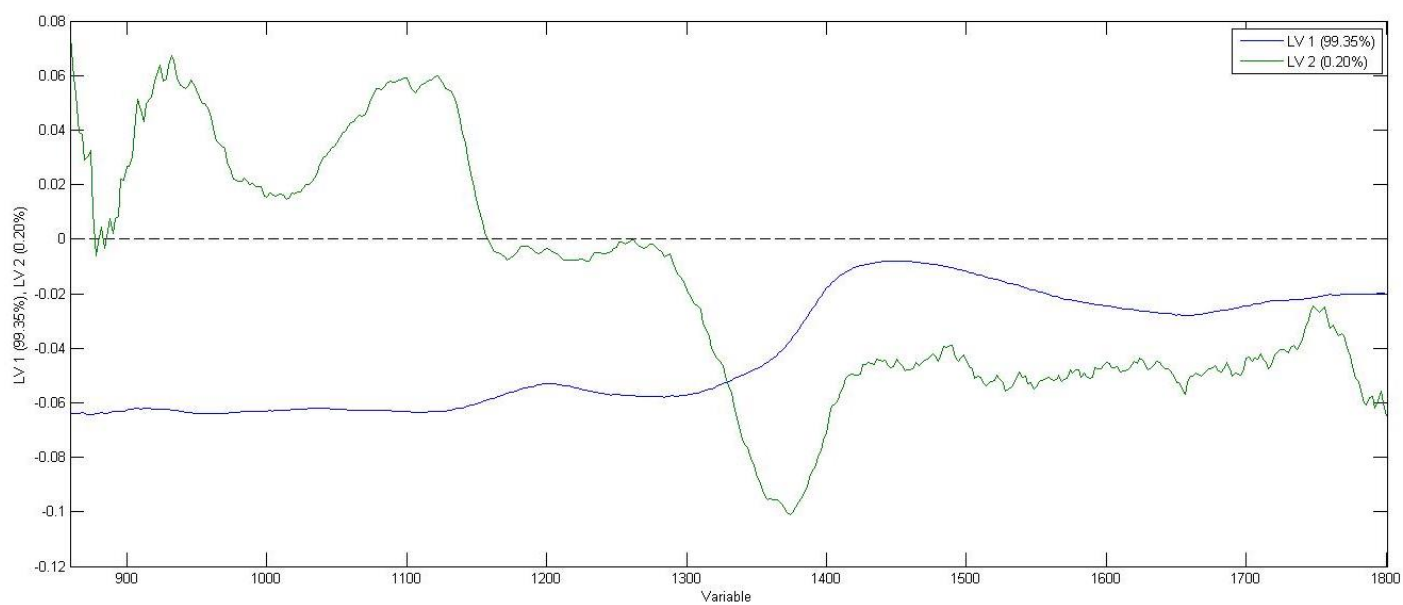
## 4.3.2 Στατιστική Ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε μελέτη με το στατιστικό μοντέλο PLS.

Πλήρες αγελαδινό γάλα- νερό

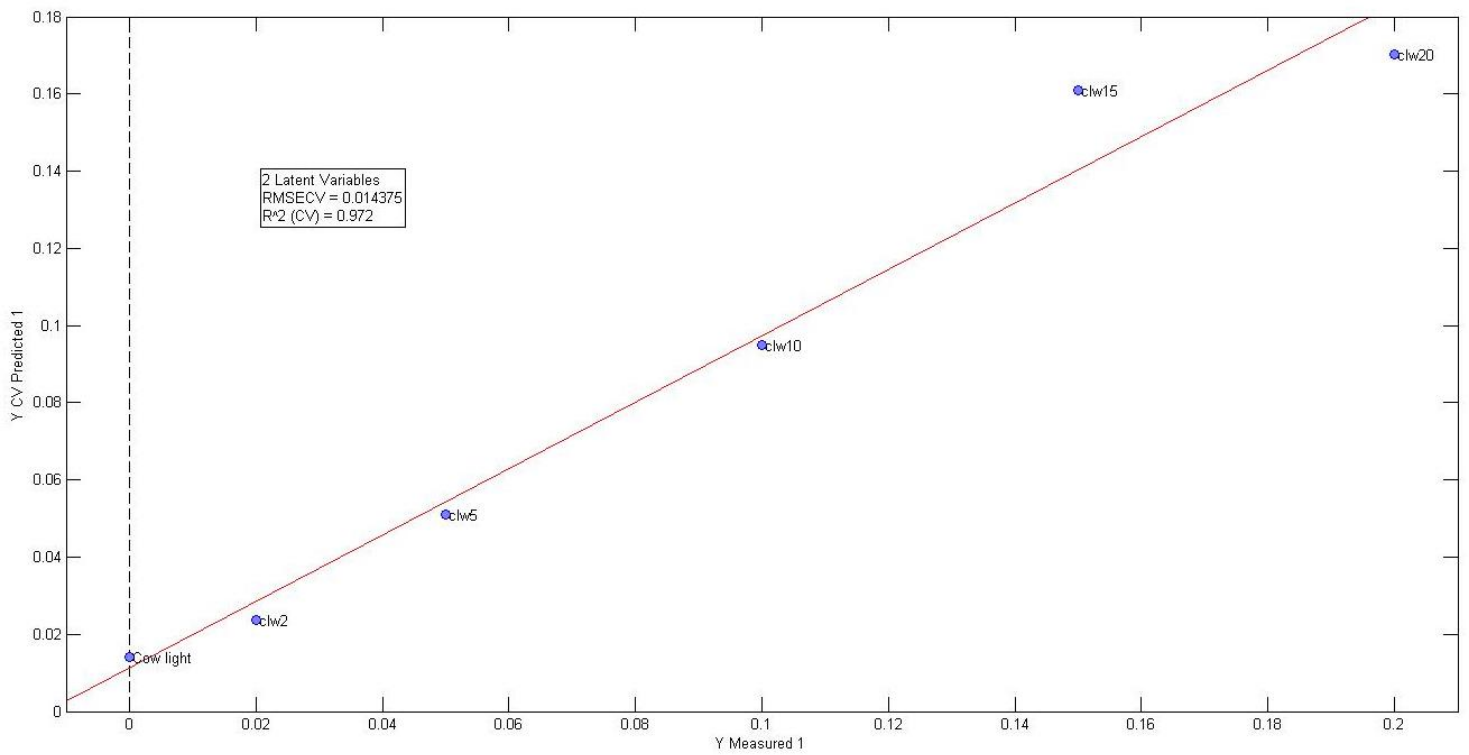


Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center

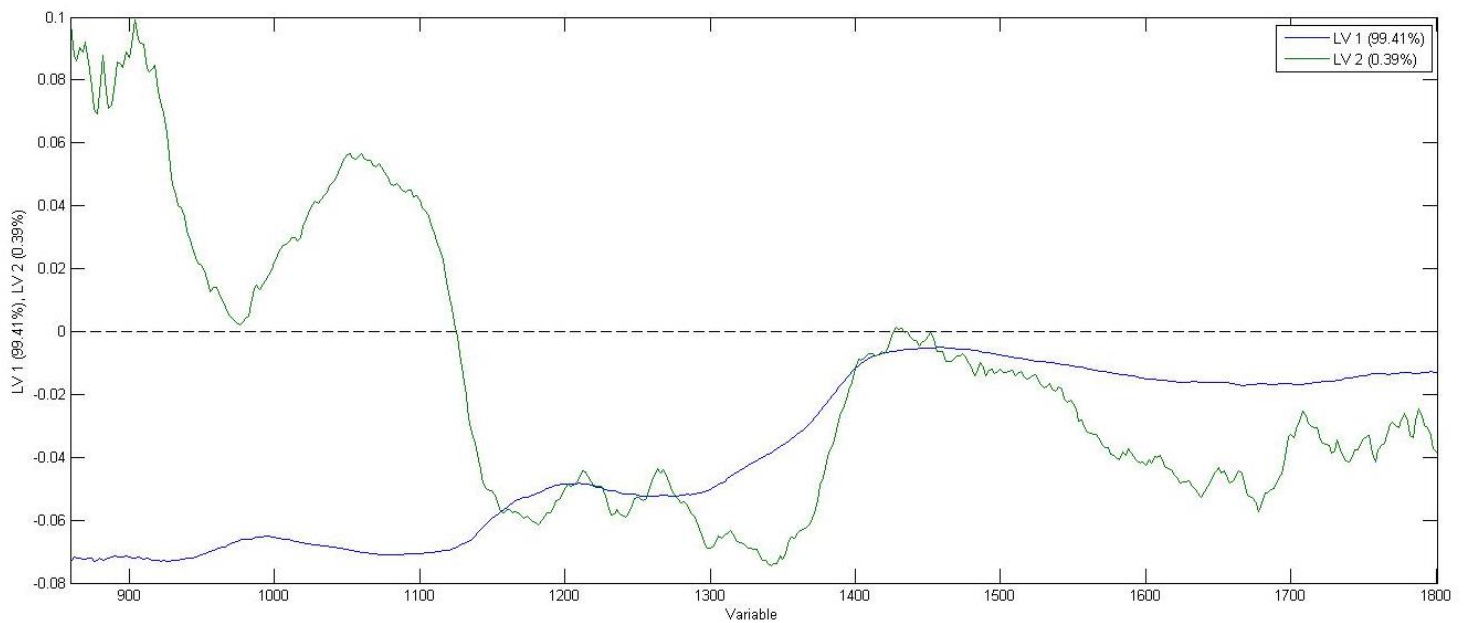


Εικόνα 4.3.6: Score Plot & Loading Plot για την μίξη αγελαδινό full-νερό

## Ελαφρύ αγελαδινό γάλα- νερό

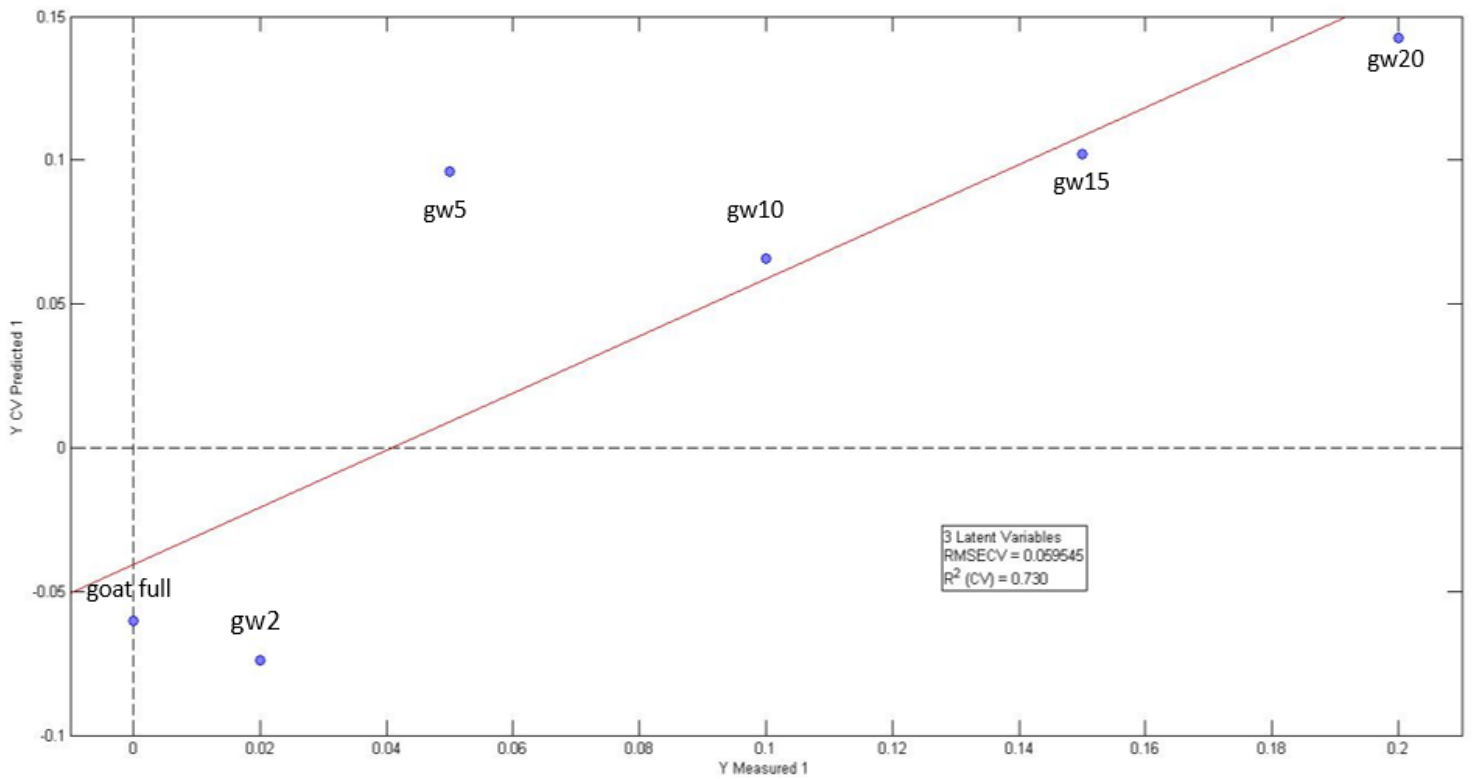


### Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center

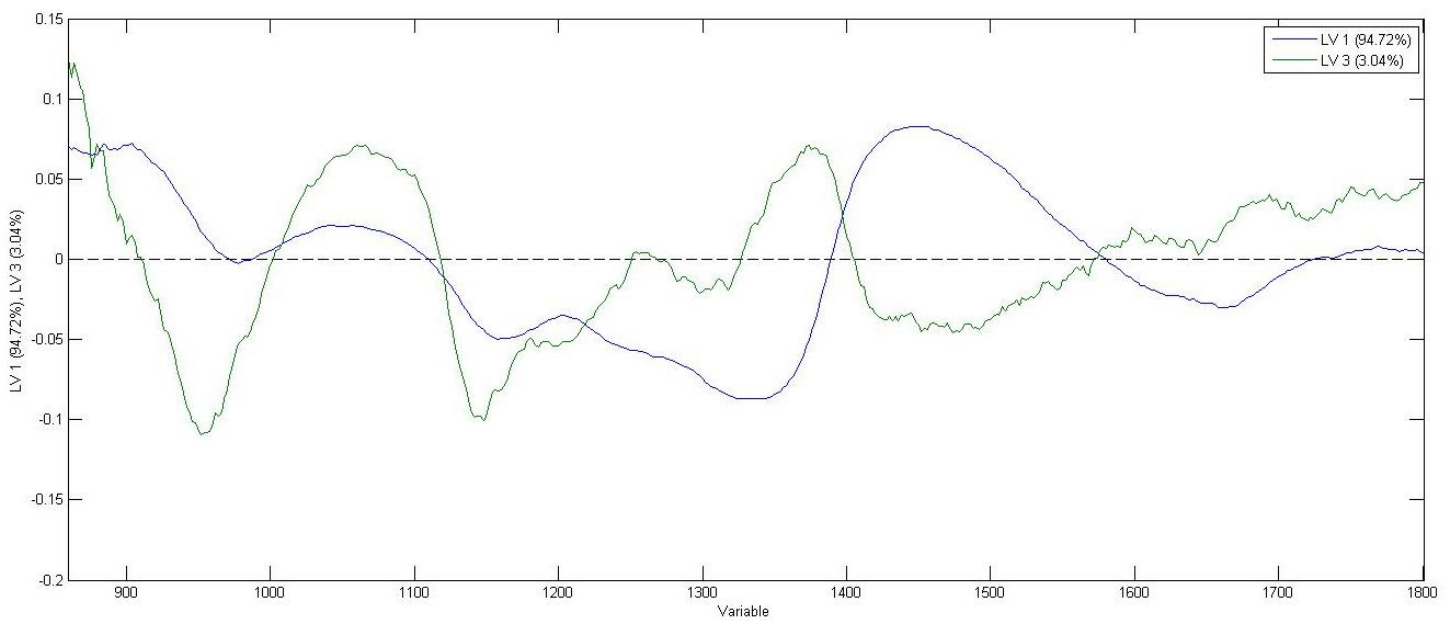


Εικόνα 4.3.7: Score Plot & Loading Plot για την μίξη αγελαδινό light-νερό

## Πλήρες κατσικίσιο γάλα- νερό



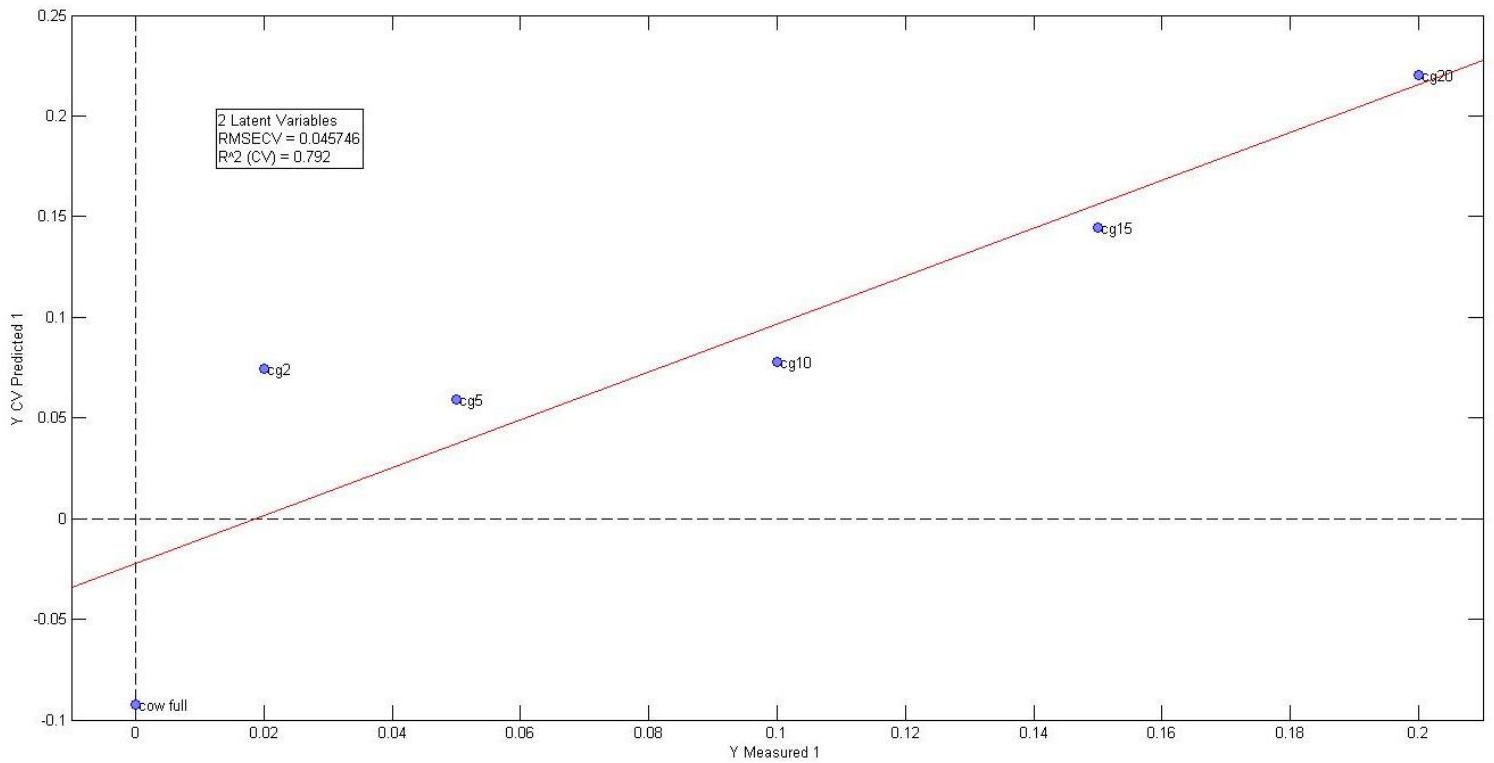
### Προεπεξεργασία με SNV, Mean Center



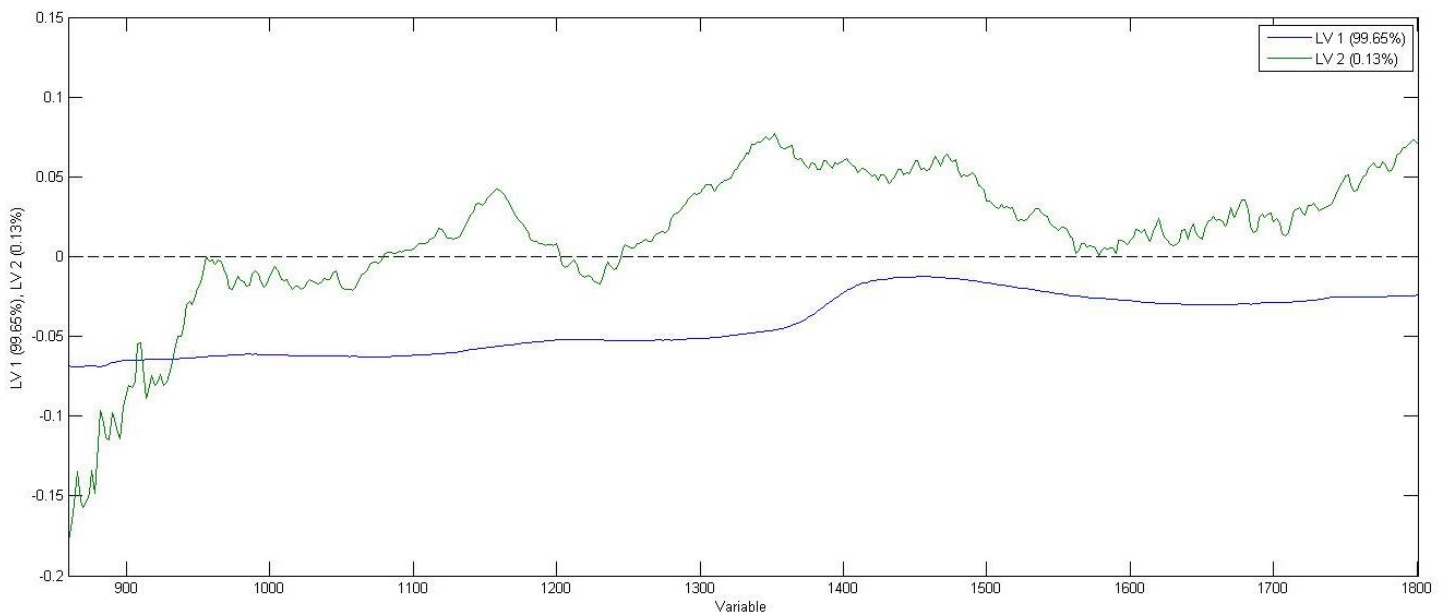
Εικόνα 4.3.8: Score Plot & Loading Plot για την μίξη κατσικίσιο full-νερό



## Πλήρες αγελαδινό γάλα- κατσικίσιο γάλα



### Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



Εικόνα 4.3.9: Score Plot & Loading Plot για την μίξη αγελαδινό full-κατσικίσιο full

Δεν συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα της μέτρησης από τα 1800nm και πάνω καθώς πρόσθεσαν στο μοντέλο πολύ θόρυβο, ενώ οι περιοχές αυτές δεν συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάλυση. Από τα παραπάνω score plots αλλά και τα loading plots που τα συνοδεύουν, προκύπτει ότι η PLS δημιούργησε πολύ ικανοποιητικά γραμμικά μοντέλα για τις μίξεις του αγελαδινού γάλακτος με το νερό, τόσο στο πλήρες όσο και στο ελαφρύ δείγμα. Τα  $R^2$  είναι 0,964 και 0,972, αντίστοιχα. Επίσης και το RMSECV στις δύο περιπτώσεις είναι πολύ χαμηλά (0,014 και στις δυο περιπτώσεις). Το μοντέλο που δημιουργήθηκε για την μίξη κατσικίσιου γάλακτος με νερό δεν είναι ικανοποιητικό έχει αισθητά χαμηλότερο  $R^2$  (0,730) και υψηλότερο RMSECV (0,060).

Τα loading plots στα αγελαδινά δείγματα δείχνουν ότι την μεγαλύτερη συνεισφορά έχουν οι μπάντες ανάκλασης των λιπαρών και σε μικρότερο βαθμό η μπάντα που ανατίθεται στο νερό. Η μετρούμενη ιδιότητα είναι η ανάκλαση οπότε οι μεγαλύτερες εστίες ανάκλασης συνεισφέρουν το μέγιστο. Το loading plot του κατσικίσιου γάλακτος δείχνει ότι οι ταινίες της απορρόφησης των λιπαρών αλλά και του νερού συνεισφέρουν κυρίως.

Η μίξη του αγελαδινού με το κατσικίσιο γάλα έδωσε και αυτή ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το  $R^2$  είναι 0,792 ενώ το RMSECV είναι σχετικά μεγάλο (0,046). Τα δύο γάλατα που βρίσκονται σε μίξη έχουν την ίδια λιποπεριεκτικότητα. Αναμενόμενα, στο loading plot δεν δείχνουν να συνεισφέρουν έντονα οι κορυφές των λιπαρών. Η συνεισφορά εμφανίζεται από την συνολική εικόνα του φάσματος, ενώ διακρίνεται να συνεισφέρει λίγο περισσότερο η μπάντα του νερού.

#### 4.4 ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΡΟΒΕΙΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΒΑΣΕΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Σε συνεργασία με τα Βιοερευνητικά Εργαστήρια λήφθηκαν τρεις σειρές δειγμάτων πρόβειου γάλακτος, από 4 περιοχές της Κρήτης. Κάθε σειρά περιείχε 6 δείγματα από κάθε περιοχή. Οι περιοχές αυτές είναι το Λασιθί, το Κεντρικό Ρέθυμνο, τα Αστερούσια και ο Νότιος Ψηλορείτης. Η γεωγραφική προέλευση σε ένα τρόφιμο όπως το γάλα είναι ένας σύνθετος όρος καθώς περιέχει τόσο τον εδαφοκλιματικό παράγοντα του κάθε τόπου όσο και τον παράγοντα της εκτροφής, αφού διαφορετικοί τόποι ακολουθούν διαφορετικό σύστημα εκτροφής των προβάτων.

Τα δείγματα μετρήθηκαν αυθημερόν καθώς το νωπό γάλα έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής. Τα δείγματα εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα:

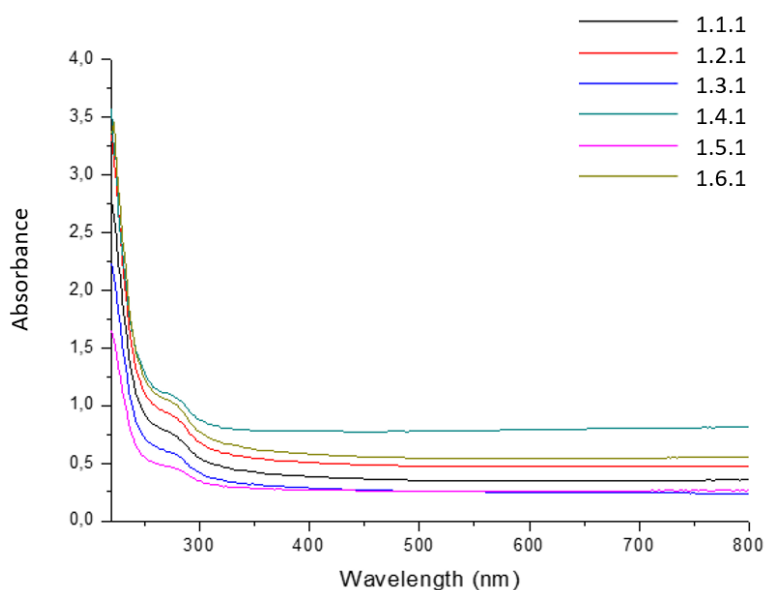
*Πίνακας 4.4.1: Σύνολο δειγμάτων*

<b>ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b>	<b>ΠΕΡΙΟΧΗ</b>
1.1	ΛΑΣΙΘΙ
1.2	ΛΑΣΙΘΙ
1.3	ΛΑΣΙΘΙ
1.4	ΛΑΣΙΘΙ
1.5	ΛΑΣΙΘΙ
1.6	ΛΑΣΙΘΙ
2.1	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
2.2	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
2.3	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
2.4	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
2.5	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
2.6	ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΡΕΘΥΜΝΟ
3.1	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
3.2	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
3.3	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
3.4	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
3.5	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
3.6	ΑΣΤΕΡΟΥΣΙΑ
4.1	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ
4.2	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ
4.3	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ
4.4	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ
4.5	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ
4.6	ΝΟΤΙΟΣ ΨΗΛΟΡΕΙΤΗΣ

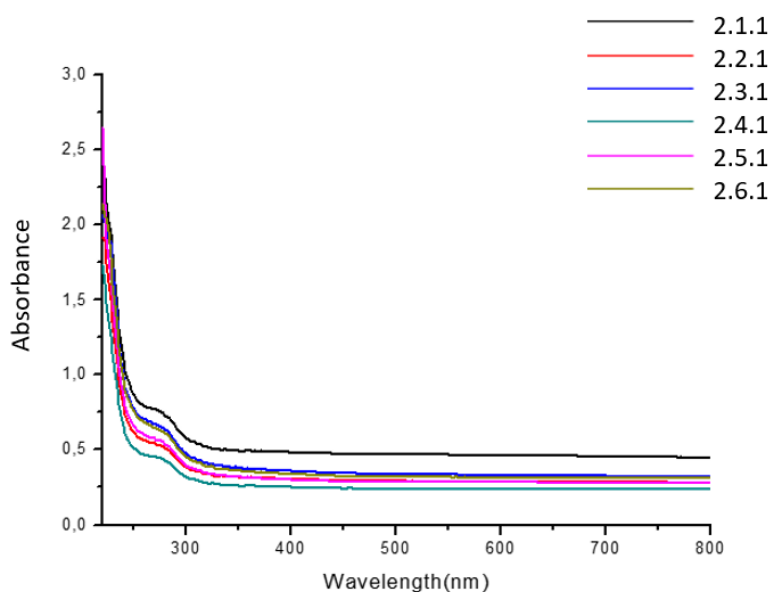
#### 4.4.1 Αποτελέσματα

#### Φασματοσκοπία Απορρόφησης

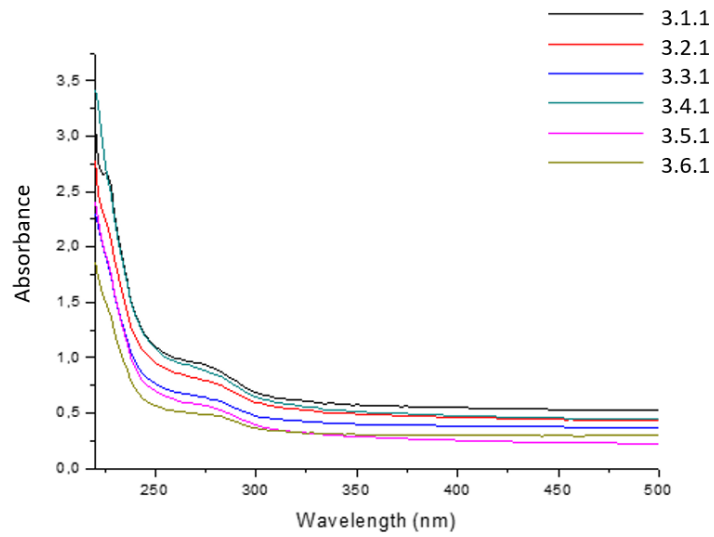
Τα δείγματα μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 950 στην περιοχή 220-800 nm (με την εξαίρεση των δειγμάτων Αστερουσίων της 1<sup>ης</sup> σειράς που μετρήθηκε στην περιοχή 220-500 nm) σε κυβέττα χαλαζία πάχους 2 mm. Τα δείγματα υπέστησαν αραίωση 1/125 με απιονισμένο νερό. Το βήμα της μέτρησης ήταν 2 nm και ο μηδενισμός υποβάθρου έγινε με απιονισμένο νερό. Ενώ δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα από τα φάσματα ως προς την σύγκριση των δειγμάτων, αξίζει να σημειωθεί το έντονο offset από το 0 που οφείλεται στην σκέδαση λόγω της υψηλής παρουσίας λιποσφαιρίων στα πρόβεια δείγματα.



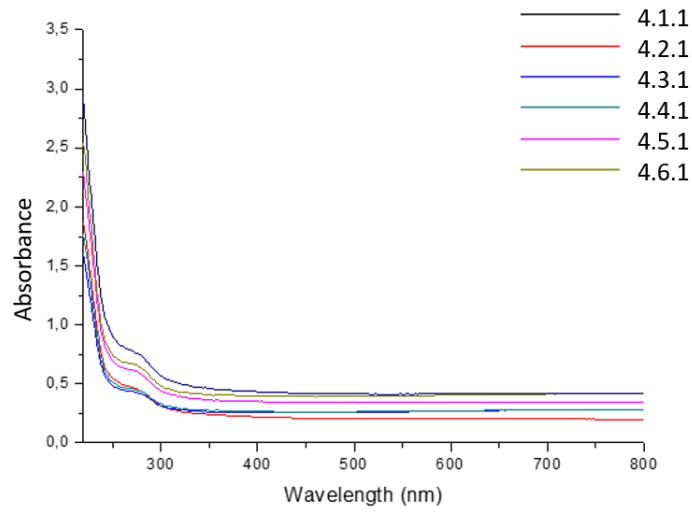
Εικόνα 4.4.1: Φάσματα απορρόφησης Λασιθίου- 1<sup>η</sup> σειρά



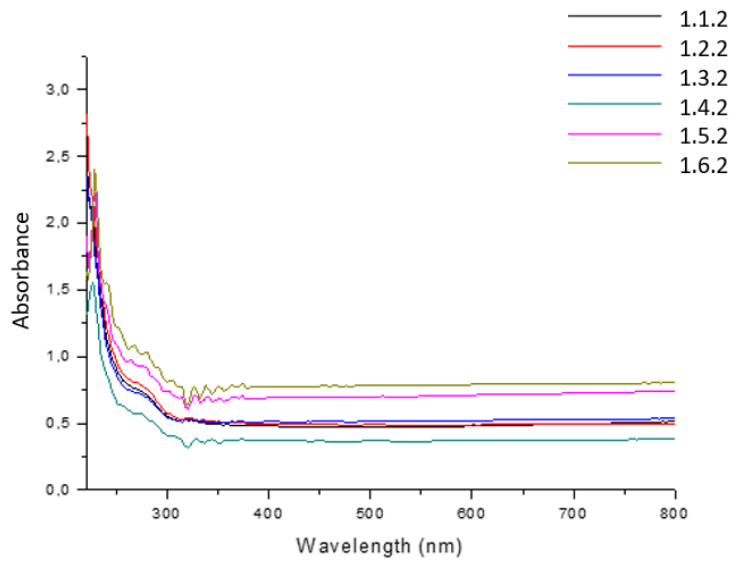
Εικόνα 4.4.2: Φάσματα απορρόφησης Κεντρικού Ρεθύμνου- 1<sup>η</sup> σειρά



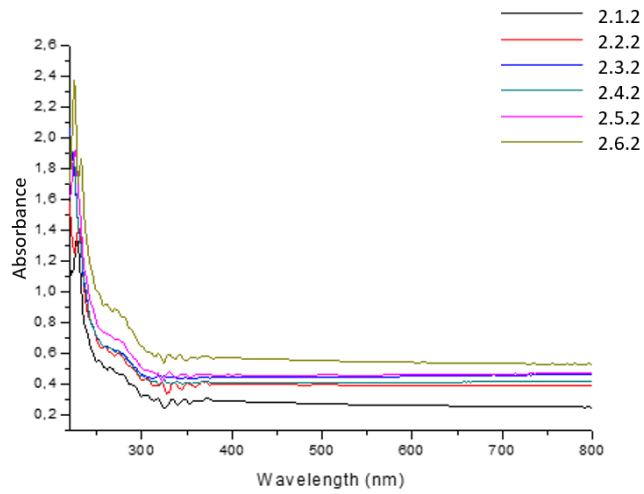
Εικόνα 4.4.3: Φάσματα απορρόφησης Αστερουσίων- 1<sup>η</sup> σειρά



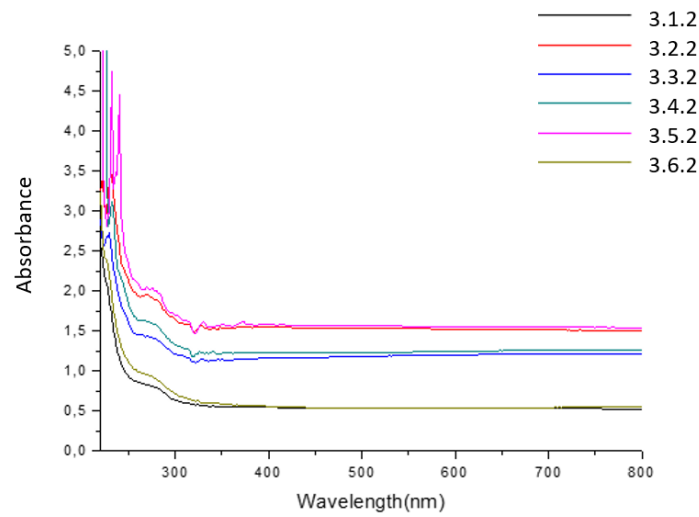
Εικόνα 4.4.4: Φάσματα απορρόφησης Νοτίου Ψηλορείτη- 1<sup>η</sup> σειρά



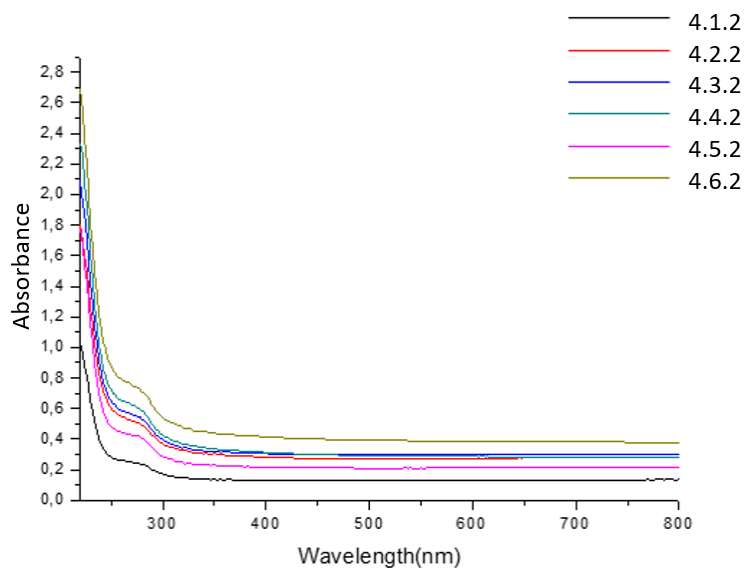
Εικόνα 4.4.5: Φάσματα απορρόφησης Λασιθίου- 2<sup>η</sup> σειρά



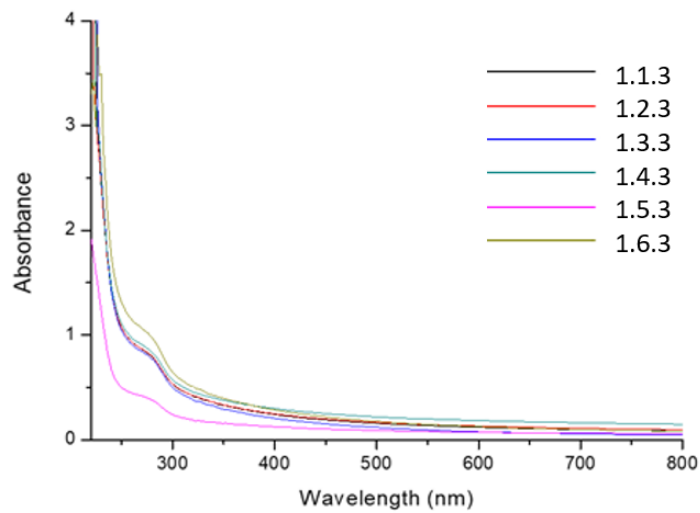
Εικόνα 4.4.6: Φάσματα απορρόφησης Κεντρικού Ρεθύμνου- 2<sup>η</sup> σειρά



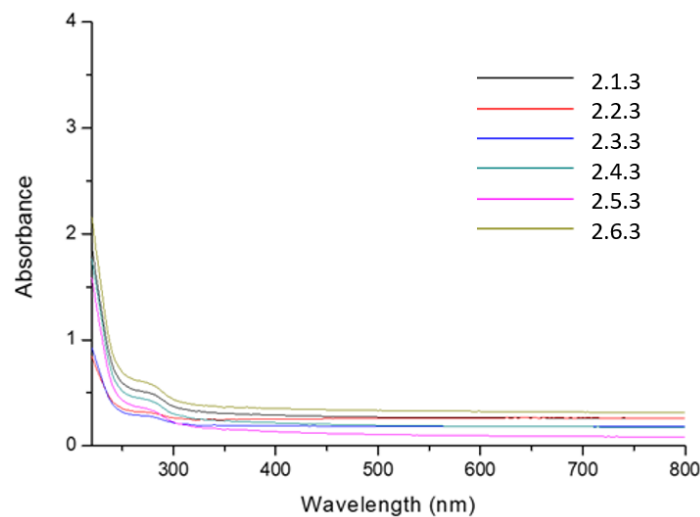
Εικόνα 4.4.7: Φάσματα απορρόφησης Αστερουσίων- 2<sup>η</sup> σειρά



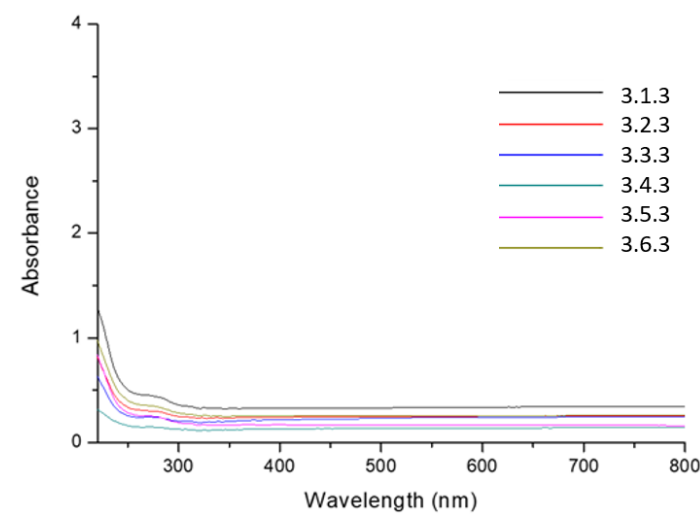
Εικόνα 4.4.8: Φάσματα απορρόφησης Νοτίου Ψηλορείτη- 2<sup>η</sup> σειρά



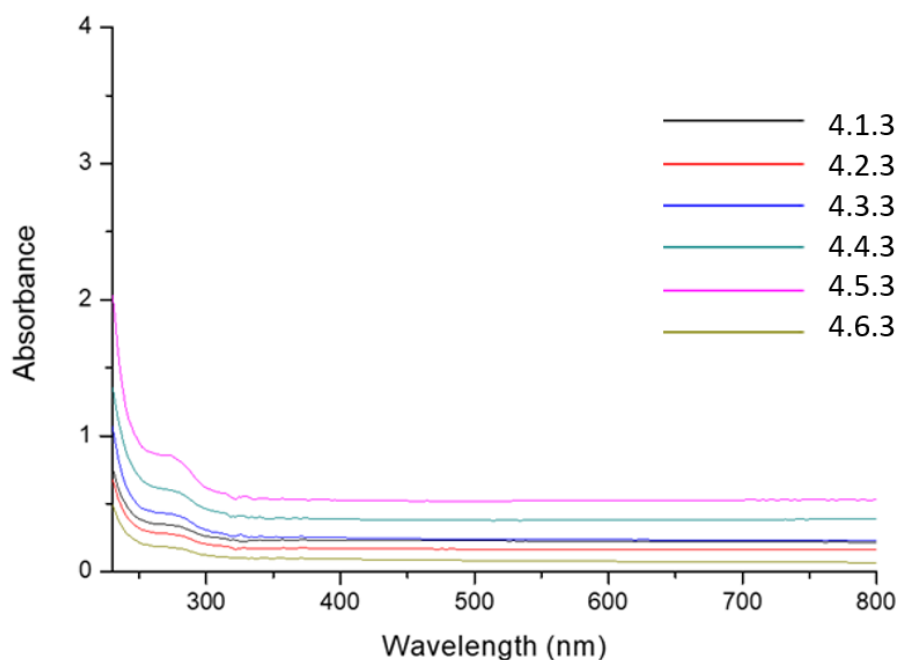
Εικόνα 4.4.9: Φάσματα απορρόφησης Λασιθίου- 3<sup>η</sup> σειρά



Εικόνα 4.4.10: Φάσματα απορρόφησης Κεντρικού Ρεθύμνου- 3<sup>η</sup> σειρά



Εικόνα 4.4.11: Φάσματα απορρόφησης Αστερουσίων- 3<sup>η</sup> σειρά



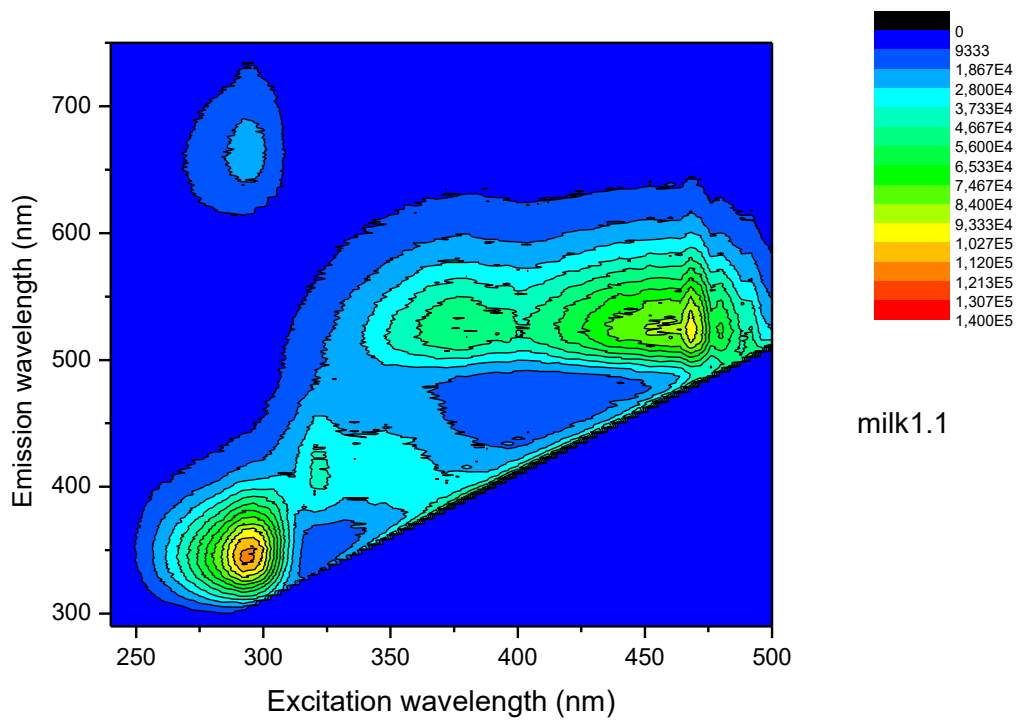
Εικόνα 4.4.12: Φάσματα απορρόφησης Νοτίου Ψηλορείτη- 3<sup>η</sup> σειρά

### Φασματοσκοπία Φθορισμού

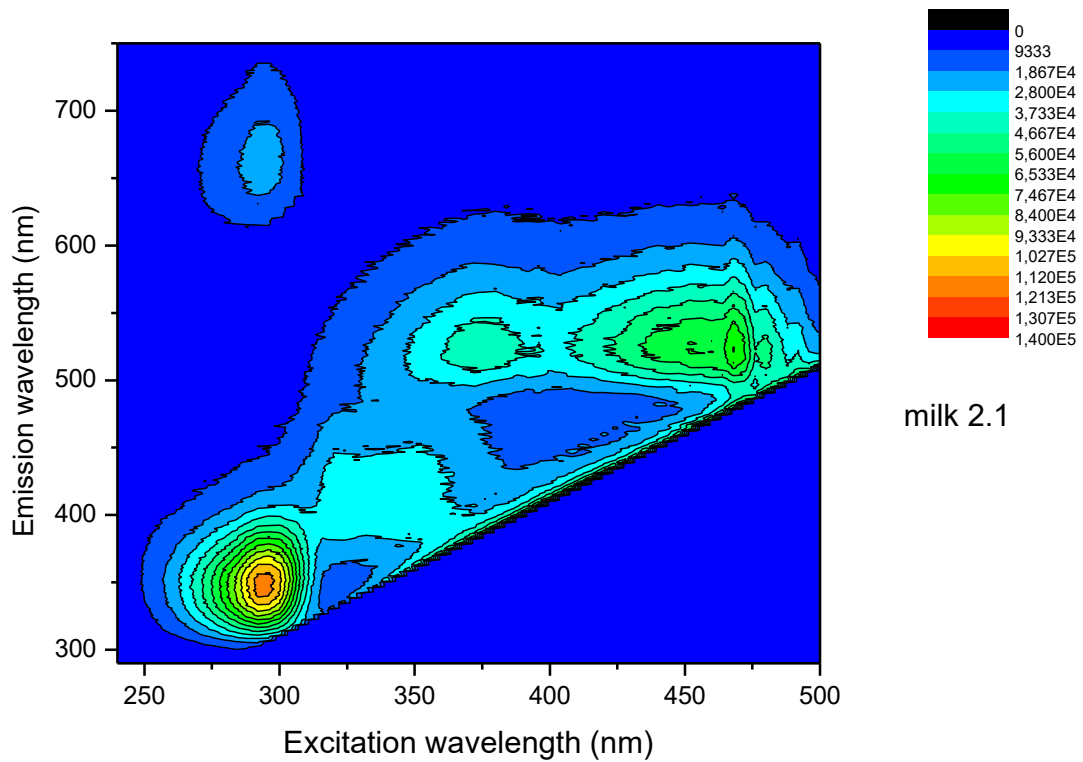
<b>Όργανο</b>	Fluoromax P
<b>Δείγματα</b>	Χωρίς Αραίωση
<b>Κυψελίδα</b>	10mm από χαλαζία
<b>Διάταξη κυψελίδας</b>	35 <sup>ο</sup> Γεωμετρία Εμπρόσθιας Όψης (Front Face)
<b>Matrix Scan:</b>	
Μήκος Διέγερσης(Excitation Wavelength):240-500 nm	
Μήκος Εκπομπής(Emission Wavelength):290-750 nm	
Slits: exc.1nm/em.1nm, Integration time: 0,05 sec	
Scans: 66 Scans	

Το σύνολο των χαρτών φθορισμού που μετρήθηκαν βρίσκεται στο σχετικό παράρτημα. Στο παρόν τμήμα θα εμφανιστεί ενδεικτικά ένας χάρτης φθορισμού από κάθε περιοχή.

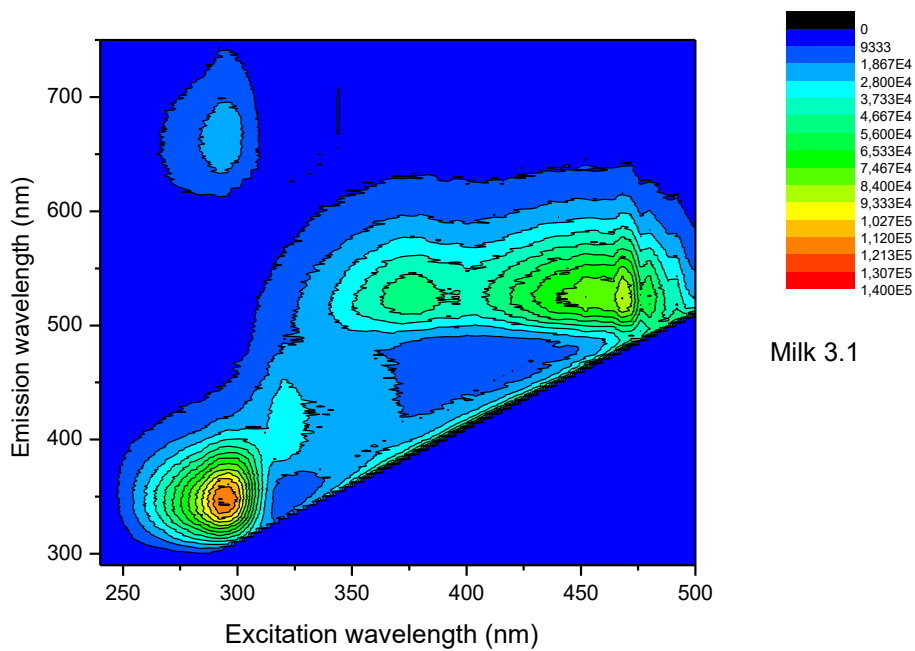




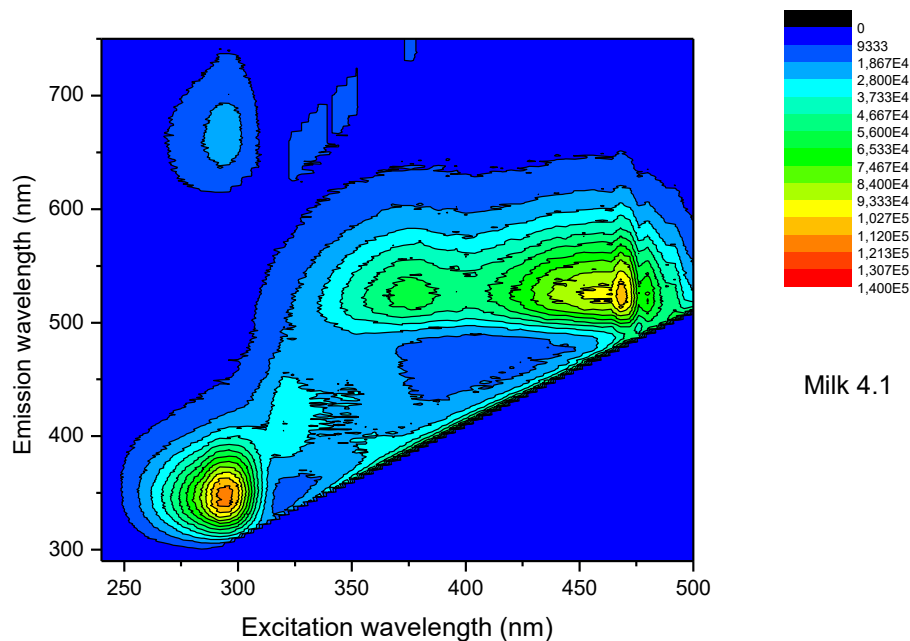
Εικόνα 4.4.13: Χάρτης φθορισμού δείγματος Λασιθίου



Εικόνα 4.4.14: Χάρτης φθορισμού δείγματος Κεντρικού Ρεθύμνου



Εικόνα 4.4.15: Χάρτης φθορισμού δείγματος Αστερουσίων



Εικόνα 4.4.16: Χάρτης φθορισμού δείγματος Νοτίου Ψηλορείτη

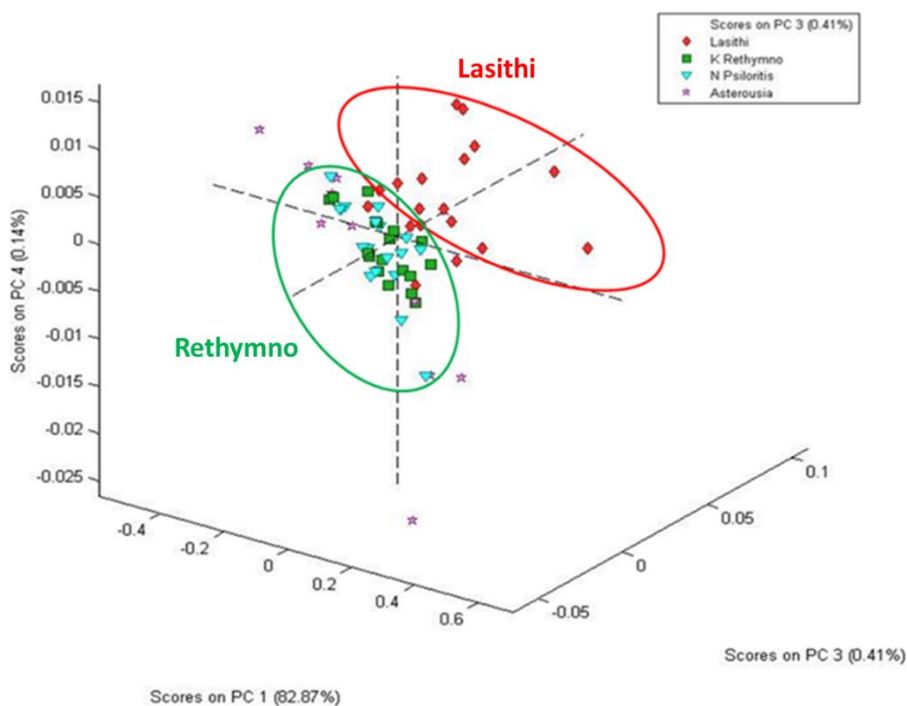
Ενώ από την σύγκριση των χαρτών φθορισμού δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, παρατηρείται ότι η κορυφή που φαίνεται να διαφοροποιεί τα δείγματα είναι στα 470/550nm και αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή φθορισμού της βιταμίνης B2 (ριβοφλαβίνη), όπως αναφέρθηκε. Κατά τα άλλα εμφανίζουν την αναμενόμενη εικόνα για ένα πρόβειο δείγμα. Στην σχετική βιβλιογραφία επιβεβαιώνεται ότι η περιοχή φθορισμού της βιταμίνης B2 διαφοροποιεί δείγματα από διαφορετικά υψόμετρα. <sup>[12]</sup>

## 4.4.2 Στατιστική Ανάλυση

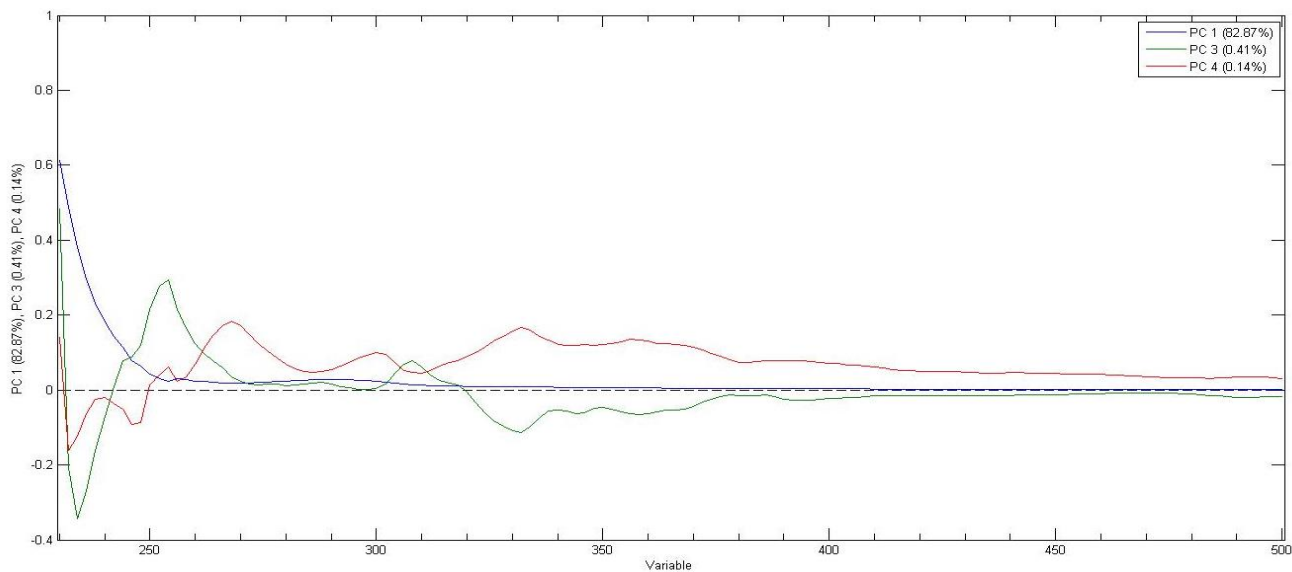
### Δεδομένα Φασματοσκοπίας Απορρόφησης

Στα συνολικά δεδομένα δεν συμπεριλήφθηκε η 1<sup>η</sup> σειρά των Αστερουσίων καθώς δεν είχε μετρηθεί στο ίδιο εύρος ημ όπως τα υπόλοιπα δείγματα.

### Ανάλυση με PCA



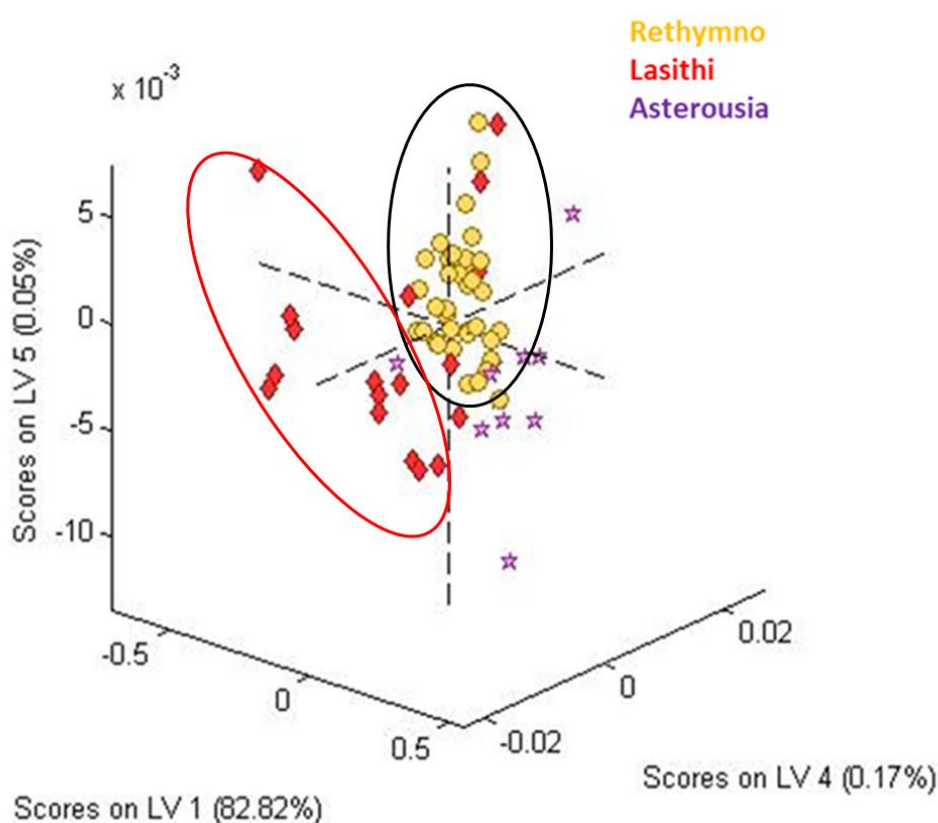
Εικόνα 4.4.17: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης



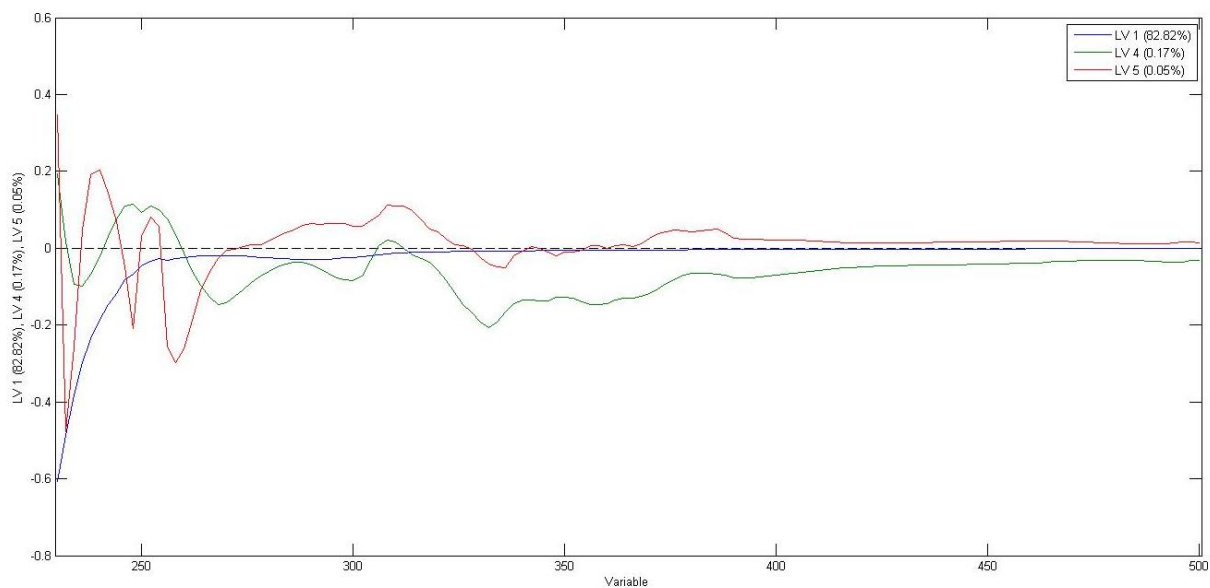
Εικόνα 4.4.18: Loading Plot Δεδομένων Απορρόφησης-Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center

Όπως φαίνεται από το παραπάνω score plot, τα δείγματα των Αστερουσίων δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν καλά. Επιτυγχάνεται πολύ καλή διάκριση ανάμεσα στα δείγματα του Λασιθίου και των περιοχών Κεντρικό Ρέθυμνο με Νότιο Ψηλορείτη. Τα δείγματα του Λασιθίου έρχονται από το οροπέδιο Λασιθίου, μια περιοχή ορεινή. Στις ορεινές περιοχές συνήθως η εκτροφή που ακολουθείται στα πρόβατα είναι η εκτατική. Στις περιοχές του Κεντρικού Ρεθύμνου και του Νοτίου Ψηλορείτη, που ανήκουν στον νομό Ρεθύμνου, το κλίμα είναι πιο πεδινό και η εκτροφή είναι εντατική ή ημιεντατική. Αναμενόμενα, αφού οι εδαφοκλιματικοί παράγοντες αλλά και η διατροφή των ζώων διαφέρουν αναμένονται διαφορές στα περισσότερα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος. Το loading plot δείχνει μεγαλύτερη συνεισφορά από την περιοχή κάτω από τα 280 nm που αντιστοιχούν στην απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος.

### Ανάλυση με PLS-DA



Εικόνα 4.4.19: Score Plot Δεδομένων Απορρόφησης



Εικόνα 4.4.20: Loading Plot Δεδομένων Απορρόφησης-Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center

Πίνακας 4.4.2: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει γεωγραφικής προέλευσης

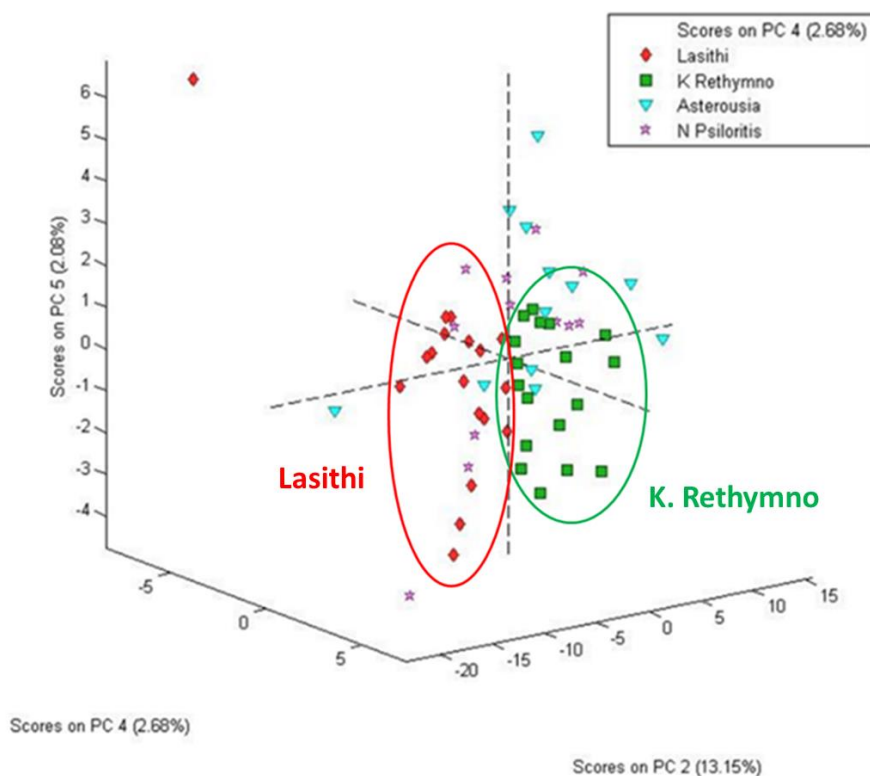
	Lasithi	Asterousia	Rethymno
Predicted as Lasithi	16	1	3
Predicted as Asterousia	0	7	3
Predicted as Rethymno	2	4	30

Η κατηγορία Ρέθυμνο περιέχει τα δείγματα των περιοχών Κεντρικό Ρέθυμνο και Νότιος Ψηλορείτης. Οι περιοχές αυτές εκτός των κοντινών εδαφοκλιματικών παραγόντων τους καθώς και το κοινό σύστημα εκτροφής, ανήκουν στον νομό Ρεθύμνης. Το score plot δείχνει πολύ καλό διαχωρισμό ανάμεσα στο Ρέθυμνο και το Λασιίθι. Το μοντέλο κατόρθωσε να κατηγοριοποιήσει σε πολύ καλό βαθμό τα δείγματα από το Λασιίθι (16 στα 18) και από το Ρέθυμνο (30 στα 36) ενώ σε ικανοποιητικό βαθμό κατηγοριοποιήθηκαν τα δείγματα των Αστερουσίων (7 στα 12). Τα δείγματα από την περιοχή αυτή που συμπεριλήφθηκαν είναι 12 αντί για 18 που μετρήθηκαν επομένως πιθανόν με το σύνολο των δειγμάτων να βελτιωνόταν το ποσοστό κατηγοριοποίησης. Το loading plot δείχνει και πάλι μεγαλύτερη συνεισφορά από την περιοχή κάτω από τα 280 nm που αντιστοιχεί στην περιοχή απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων των πρωτεϊνών του γάλακτος.

### Δεδομένα Φασματοσκοπίας Φθορισμού

Στα συνολικά δεδομένα δεν εμφανίζεται η 1<sup>η</sup> σειρά των Αστερουσίων και του Νοτίου Ψηλορείτη καθώς δεν έχουν μετρηθεί στο ίδιο φασματικό εύρος με τα υπόλοιπα δείγματα.

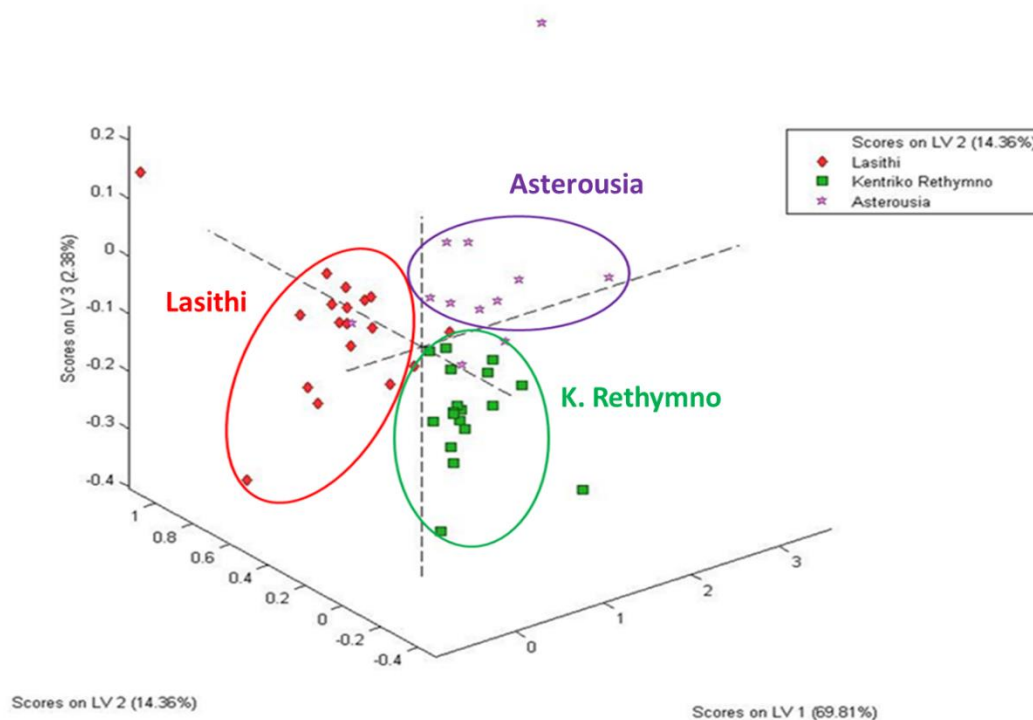
### Ανάλυση με PCA



Εικόνα 4.4.21: Score Plot Δεδομένων Φθορισμού-Προεπεξεργασία με Mean Center

Από το score plot προκύπτει ότι τα δείγματα του Λασιθίου και του Κεντρικού Ρεθύμνου διαχωρίζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό. Είναι οι 2 περιοχές που εμφανίζουν τις πιο μεγάλες εδαφοκλιματικές διαφορές από τις υπόλοιπες περιοχές υπό μελέτη. Οι διαφορετικές αυτές συνθήκες σε συνδυασμό με τις διαφορετικές πρακτικές εκτροφής, αποτυπώνονται και στην σύσταση του γάλακτος. Τα δείγματα του Νοτίου Ψηλορείτη δεν ομαδοποιούνται ενώ τα δείγματα των Αστερουσίων ομαδοποιούνται σε μικρό βαθμό, καθώς είναι κάπου στην μέση κλιματικά ως προς τις άλλες δύο περιοχές. Τα Αστερούσια είναι περιοχή ημιορεινή, με αρκετά χαμηλό όμως υψόμετρο ενώ η περιοχή του Νότιου Ψηλορείτη είναι ημιπεδινή.

## Ανάλυση με PLS-DA



Εικόνα 4.4.22: Score Plot Δεδομένων Φθορισμού-Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center

Πίνακας 4.4.3: Πίνακας κατάταξης δειγμάτων βάσει γεωγραφικής προέλευσης

	Lasithi	K. Rethymno	Asterousia
Predicted as Lasithi	16	0	1
Predicted as K. Rethymno	1	15	3
Predicted as Asterousia	1	3	8

Το score plot δείχνει πολύ καλό διαχωρισμό ανάμεσα στις περιοχές Λασίθι και Κεντρικό Ρέθυμνο που εμφανίζουν και τις πιο αισθητές διαφορές, ωστόσο, εμφανίζει και έναν ικανοποιητικό επιμέρους διαχωρισμό της περιοχής των Αστερουσιών. Το μοντέλο κατηγοριοποίησε σωστά 16 στα 18 δείγματα από το Λασίθι, 15 στα 18 δείγματα από το Κεντρικό Ρέθυμνο και 8 στα 12 δείγματα από την περιοχή των Αστερουσιών. Η παραπάνω διάκριση συνιστά μια ικανοποιητική διάκριση των δειγμάτων πρόβειου γάλακτος βάσει νομού.

## Βιβλιογραφία

1. Hansen, P. W. (n.d.). Spectroscopic Analyses on Dairy Products, 8-11.
2. Bogomolov, A., Melenteva, A., & Dahm, D. J. (2013). Technical note Fat globule size effect on visible and shortwave near infrared spectra of milk, (January). <https://doi.org/10.1255/jnirs.1076>
3. Nicolaou, N., Xu, Y., & Goodacre, R. (2010). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species, 5651–5660.
4. Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *FOOD CHEMISTRY*, 181, 31–37.
5. Møller Andersen C. et al. Fluorescence Spectroscopy: A Rapid Tool for Analyzing Dairy Products. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 720–729
6. Christensen J. *et al.* Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, *Chemical Reviews*, 2006,106
7. Jandal, J. M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk, 22, 177–185.
8. Κουή, Μ., Αβελίδης, Ν., Θεοδωρακέας Π. Μη καταστρεπτικές φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών. Εκδόσεις Κάλλιπος. Αθήνα. Ελλάδα. (2015), 131-163.
9. Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A. L., Polvillo, O., Fernández-Cabanás, V. M., & Carrizosa, J. (2016). Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats, *190*, 244–252.
10. Aernouts, B., Polshin, E., Lammertyn, J., & Saeys, W. (2011). Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: Reflectance or transmittance? *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5315–5329.
11. [https://oceclass.aua.gr/modules/document/file.php/OCDASA102/zp\\_th\\_2995\\_010b.pdf](https://oceclass.aua.gr/modules/document/file.php/OCDASA102/zp_th_2995_010b.pdf)
12. Karoui, R., Martin, B., & Dufour, É. D. (2005). Original article Potentiality of front-face fluorescence spectroscopy to determine the geographic origin of milks from the Haute-Loire department ( France ), 85, 223–236.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

### 5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της ελαίας της Ευρωπαϊκής (Olea Europaea) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές και σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου. <sup>[1]</sup> Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα αρχαιότερα αγαθά τα οποία παρήγαγαν και εμπορεύονταν οι λαοί, όντας αναπόσπαστο κομμάτι των διατροφικών τους επιλογών. Ακόμα και στις μέρες μας η Μεσογειακή διατροφή, που έχει ως ακρογωνιαίο λίθο την κατανάλωση ελαιολάδου, χαρακτηρίζεται ως η ιδανικότερη διατροφή.<sup>[2]</sup> Η διατροφή αυτή καλείται Μεσογειακή καθώς ακολουθείται ευρέως από τους λαούς στην λεκάνη της Μεσογείου. Στην Μεσόγειο καλλιεργούνται παραδοσιακά οι ελιές από τις οποίες προέρχεται το ελαιόλαδο και για τον λόγο αυτό οι χώρες που είναι πρώτες στην παραγωγή ελαιολάδου είναι η Ισπανία, η Ιταλία, η Ελλάδα και η Τυνησία. <sup>[3]</sup> Στην Ισπανία μάλιστα παράγεται πάνω από το 50% της παγκόσμιας παραγωγής.

Γενικά, το ελαιόλαδο ξεχωρίζει για τις ευεργετικές ιδιότητες που έχει. Έχει αντιοξειδωτικές <sup>[4]</sup> και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες <sup>[5]</sup> οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το φαινολικό του περιεχόμενο. Οι ενώσεις αυτές υπάρχουν σε μεγάλα ποσοστά στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο, και όσο ανώτερο είναι ποιοτικά το ελαιόλαδο, τόσο πιο έντονη είναι η παρουσία τους. Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο οφείλει το πικρό της γεύσης του στην έντονη παρουσία αυτών των ουσιών αλλά και των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών ενώσεων.<sup>[6]</sup> Ένας άλλος λόγος για τον οποίο ξεχωρίζει το ελαιόλαδο είναι ότι έχει πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα λεγόμενα καλά λιπαρά. Το γεγονός αυτό καθιστά το ελαιόλαδο ανθεκτικό στην οξείδωση.

Κάποιες από τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται στο ελαιόλαδο με σκοπό την αξιολόγησή του είναι η μέτρηση των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών, δηλαδή η γευσισγνωσία και η βαθμολόγησή του, η μέτρηση της οξύτητας στο ελαιόλαδο, η μέτρηση του αριθμού υπεροξειδίων του και η φασματοφωτομετρική μέτρηση στο υπεριώδες της σταθεράς  $K_f$ .

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα πιο μελετημένα τρόφιμα με πολλές αναλυτικές τεχνικές. Έχει μελετηθεί στο παρελθόν με χρωματογραφικές τεχνικές<sup>[7], [8]</sup> καθώς επίσης και με φασματοσκοπικές τεχνικές <sup>[9],[10]</sup>. Οι τελευταίες δύο μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα και μελετούν δείγματα ελαιολάδου της Κρήτης και την ανίχνευση της νόθευσής τους με διάφορα σπορέλαια. Η μία μελέτη χρησιμοποιεί την τεχνική της φασματοσκοπίας NMR, ενώ η άλλη μελέτη χρησιμοποιεί την τεχνική της φασματοσκοπίας απορρόφησης στο ορατό και την τεχνική της φασματοσκοπίας Raman.

### **5.1.1 Διαδικασία Παραγωγής**<sup>[11], [12]</sup>

Γενικά, το ελαιόλαδο παράγεται με τη λείανση των ελιών και την εκχύλιση του λαδιού με μηχανικά μέσα. Συνήθως, οι πράσινες ελιές παράγουν περισσότερο πικρό λάδι, επειδή είναι άγουρες. Με σκοπό την παραγωγή ενός εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου, οι ελιές πρέπει να έχουν φτάσει στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης τους. Η διαδικασία παραγωγής περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

- Παραλαβή των ελαιόκαρπων και ζύγιση.
- Αποφύλλωση: Ο διαχωρισμός των φύλλων από τον καρπό είναι απαραίτητος γιατί η σύνθλιψη του ελαιόκαρπου με μεγάλης ποσότητας φύλλα προσδίδει πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και το εμπλουτίζει σε χλωροφύλλη η οποία, παρουσία φωτός επηρεάζει αρνητικά στην ποιότητά του. Οι ελιές από την λεκάνη μαζέματος προχωράνε πάνω στην κινητή τροχιά προς το πλυντήριο, κατά το πέρασμά τους υποβάλλονται σε ρεύμα αέρα που αποσύρει τα φύλλα και τα υπολείμματα μικρών κλωναριών και τα απομακρύνει εκτός συσκευής.
- Πλύσιμο των καρπών: Το πλυντήριο ελιάς (κατασκευασμένο εξ' ολοκλήρου από ανοξείδωτο μέταλλο INOX) λειτουργεί με την αρχή της ροής ρεύματος νερού στην αφετηρία της λεκάνης πλυσίματος, το νερό ρέει υπό μορφή κυκλώνα νερού που οι καρποί της ελιάς στρέφονται μαζί και μετά εκτοξεύονται στην τροχιά του νερού που σχηματίζει κύματα για την πλύση. Αυτός ο τύπος είναι εφοδιασμένος με ελικοειδή μεταφορέα που απομακρύνει τις ξένες ύλες όπως σκόνη και χύμα και τα σκληρά συστατικά εκτός πλυντηρίου.
- Σπάσιμο και άλεση, όπου συνθλίβεται ο καρπός με την χρήση μεταλλικών σπαστήρων. Μετά το πλύσιμο χρησιμοποιείται ένας ελικοειδής μεταφορέας ελιάς, εφοδιασμένος με πυραμιδόμορφη λεκάνη για τη μεταφορά της ελιάς στο χειρόμυλο. Ο χειρόμυλος πολτοποιεί την ελιά διατηρώντας την ποιότητα χωρίς θερμοκρασία. Η ισχύς του μεγάλου κινητήρα ρυθμίζεται ανάλογα με την εντολή. Σε αυτήν τη φάση αλλά και στις επόμενες έχει μεγάλη σημασία η θερμοκρασία στην οποία θα βρίσκεται το μίγμα έτσι ώστε να μην καεί το λάδι οπότε ουσιαστικά καταστρέφεται. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται ο ελαιόμυλος.

- Μάλαξη, όπου μαλάσσεται η ελαιοζύμη. Η ελαιοζύμη είναι το προϊόν της άλεσης του ελαιόκαρπου. Επιτελείται σε ειδικούς μαλακτήρες. Απαραίτητη διαδικασία είναι η θέρμανση της ελαιοζύμης με την χρήση αυτόματου θερμοστάτη χωρίς όμως να ξεπεραστεί η οριακή θερμοκρασία των 25°C.
- Φυγοκέντριση, όπου διαχωρίζεται ο πυρήνας (κουκούτσι). Ο πολτός της ελιάς οδηγείται στους φυγοκεντριστές τριών φάσεων όπου εξάγεται ουσιαστικά το λάδι. Προτού οδηγηθεί στον φυγοκεντριστή, η ελαιοζύμη έχει ενυδατωθεί με μεγάλη ποσότητα νερού. Ο λόγος είναι για να διαλύσει το γαλάκτωμα που έχει δημιουργηθεί ανάμεσα στα φυτικά υγρά και το ελαιόλαδο. Λάδι, νερό και στερεά συστατικά (ψίχα) είναι τα τρία υλικά που βγαίνουν από το μηχάνημα. Βασίζεται στην διαφορά ειδικού βάρους που έχουν τα τρία αυτά συστατικά που τους επιτρέπει να διαχωριστούν. Από την ψίχα θα παραχθεί στη συνέχεια το πυρηνέλαιο και το σαπούνι ελιάς.
- Παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη.
- Τελικός διαχωρισμός όπου διαχωρίζεται το λάδι από το νερό και καθαρισμός του ελαιόλαδου. Η διαδικασία πραγματοποιείται στον ελαιοδιαχωριστήρα.

### **5.1.2 Κατηγορίες Ελαιολάδου**<sup>[1], [13]</sup>

Το ελαιόλαδο μπορεί να ταξινομηθεί σε διάφορες κατηγορίες με βάση τις παραμέτρους της ελεύθερης οξύτητας, της απορρόφησης στο υπεριώδες, του αριθμού υπεροξειδίων και άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων, το ελαιόλαδο ταξινομείται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (EVOO): Είναι το παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η οξύτητα εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ δεν υπερβαίνει το 0,8% κατά βάρος. Η σταθερά  $K_{270}$  είναι μικρότερη ή ίση με 0,22, η σταθερά  $K_{232}$  είναι μικρότερη ή ίση με 2,5 και η σταθερά  $\Delta K$  μικρότερη ή ίση με 0,01. Αυτή είναι η υψηλότερη βαθμολογία ποιότητας για ένα ελαιόλαδο. Επομένως η εμπορική του τιμή είναι υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα ελαιόλαδα.
- Κοινό Παρθένο ελαιόλαδο (VOO): Το ελαιόλαδο της κατηγορίας αυτής δεν έχει υποστεί κάποια άλλη επεξεργασία πέραν της πλύσης, μετάγγισης, φυγοκέντρισης και διήθησης. Είναι παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 2%. Η σταθερά  $K_{270}$  είναι μικρότερη ή ίση με 0,25, η σταθερά  $K_{232}$  είναι μικρότερη ή ίση με 2,6 και η σταθερά  $\Delta K$  μικρότερη ή ίση με 0,01.
- Ελαιόλαδο: Είναι έλαιο το οποίο προκύπτει μετά από ανάμιξη εξευγενισμένου και παρθένου ελαιόλαδου και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό

οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,5%. Η σταθερά  $K_{270}$  μικρότερη ή ίση με 0.9 και η σταθερά  $\Delta K$  μικρότερη ή ίση με 0.15.

- Πυρηνέλαιο: Είναι το έλαιο το οποίο αποτελείται από μείγμα ραφιναρισμένου πυρηνελαίου και παρθένου (σε μικρότερο ποσοστό) του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1%, η σταθερά  $K_{270}$  είναι μικρότερη ή ίση με 1.7 και η σταθερά  $\Delta K$  μικρότερη ή ίση με 0.18.
- Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο: Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο λαμβάνεται μετά από ραφινάρισμα παρθένων ελαιόλαδων και του οποίου η οξύτητα, εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ, δεν είναι δυνατό να υπερβαίνει το 0.3%, ενώ ταυτόχρονα δεν έχει υποστεί αλλαγές στην αρχική δομή των τριγλυκεριδίων. Η σταθερά  $K_{270}$  είναι μικρότερη ή ίση με 1.1 και η σταθερά  $\Delta K$  μικρότερη ή ίση με 0.16. Ο εξευγενισμός πραγματοποιείται σε ελαιόλαδα κατώτερης ποιότητας, τα οποία έχουν δυσάρεστη οσμή και γεύση. Χάρη στον εξευγενισμό (ραφινάρισμα), τα ελαιόλαδα χάνουν την ανεπιθύμητη οξύτητα αλλά ταυτόχρονα υποβαθμίζονται και γευστικά και θρεπτικά. Εάν στο ελαιόλαδο, εκτός από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, υπάρχουν και ακαθαρσίες, για τον εξευγενισμό απαιτείται μετάγγιση, πλύσιμο, διύλιση και αφαίρεση με διαλύτες και διαδοχικές εκχυλίσεις της ελαιώδους φάσης με επανάκτηση του διαλύτη.

Η οξύτητα στο ελαιόλαδο οφείλεται στο βαθμό της διάσπασης των τριγλυκεριδίων, κατά την οποία σχηματίζονται ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η οξύτητα είναι ένας άμεσος δείκτης της ποιότητας του ελαίου, και αντικατοπτρίζει στο σύνολο των συνθηκών παραγωγής του, από την άνθιση του καρπού μέχρι και η συσκευασία του. Η χαμηλή ποιότητα των καρπών και η κακής ποιότητας επεξεργασία και αποθήκευση έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας.

Η φασματοφωτομετρική εξέταση του ελαιολάδου στο υπεριώδες, μετρά τις απορροφήσεις στα  $\lambda = 232 \text{ nm}$  και  $270 \text{ nm}$  και συμβολίζονται ως  $K_{232}$  και  $K_{270}$  αντίστοιχα. Υπάρχει και ο δείκτης  $\Delta K = K_{270} - (K_{264} + K_{276})$ , που ορίζεται από μια μαθηματική σχέση υπολογισμού συντελεστών απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας. Η απορρόφηση στα  $232 \text{ nm}$ , οφείλεται σε ενώσεις (υδρο-υπεροξειδία) που παράγονται σε ένα πρωταρχικό στάδιο οξείδωσης αλλά και σε ενώσεις (συζυγή διένια), που παράγονται σε ένα ενδιάμεσο στάδιο οξείδωσης. Η απορρόφηση στα  $270 \text{ nm}$ , οφείλεται σε ενώσεις με καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες), οι οποίες αποτελούν δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης.

### **5.1.3 Ποικιλίες ελιάς**<sup>[14]</sup>

Η ποικιλία της ελιάς μαζί με το κλίμα και το έδαφος μπορούν να καθορίσουν και να διαφοροποιήσουν σε μεγάλο βαθμό την σύσταση και την ποιότητα του ελαιολάδου<sup>[15]</sup>. Οι ποικιλίες που εντοπίζονται στην Ελλάδα είναι περίπου 37. Χωρίζονται σε μικρόκαρπες, μεσόκαρπες και αδρόκαρπες. Οι μικρόκαρπες και μεσόκαρπες ελιές είναι που προορίζονται για ελαιοπαραγωγή, είναι δηλαδή ελαιοποιήσιμες. Οι αδρόκαρπες προορίζονται σχεδόν αποκλειστικά για φαγητό, όπως είναι η γνωστή μας ελιά Καλαμών. Οι πιο σημαντικές ελαιοποιήσιμες ποικιλίες στην Ελλάδα είναι η Κορωνέικη, η Λιανολιά (Κερκύρας), η Λαδολιά, η Τσουνάτη, το Αγουρομάνακο, η Μεγαρείτικη, η Κολοβή, η Αδραμυτιανή, η Ματολιά και η Κοθρέϊκη.

Η Κορωνέικη ποικιλία είναι η πιο διαδεδομένη ποικιλία στην Ελλάδα. Είναι μικρόκαρπη ποικιλία, γεγονός που κάνει δύσκολη την συγκομιδή της από τους παραγωγούς. Η Αδραμυτιανή και η Κολοβή (Βαλανολιά) είναι μεσόκαρπες και απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά στο νησί της Λέσβου. Και οι τρεις ποικιλίες χαρακτηρίζονται από αντοχή στο ψύχος ενώ η Κορωνέικη χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή παραγωγικότητα σε σχέση με τις άλλες δύο ποικιλίες. Το ελαιόλαδο που προκύπτει από τις ποικιλίες αυτές χαρακτηρίζεται ως εκλεκτό.

### **5.1.4 Χημική Σύσταση Ελαιολάδου**<sup>[11],[13]</sup>

Το ελαιόλαδο χαρακτηρίζεται χημικά ως μείγμα εστέρων της γλυκερίνης με τα ανώτερα λιπαρά οξέα. Η βασική διάκριση των συστατικών του ελαιολάδου είναι ανάμεσα στα σαπωνοποιησίμα και ασαπωνοποίητα συστατικά. Στα σαπωνοποιησίμα συστατικά ανήκουν τα τριγλυκερίδια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια. Στα ασαπωνοποίητα συστατικά ανήκουν κυρίως υδρογονάνθρακες, αλειφατικές αλκοόλες, φαινόλες, τοκοφερόλες και χρωστικές. Τα σαπωνοποίησιμα συστατικά του ελαιολάδου αποτελούν το 99% περίπου των συστατικών του. Το ασαπωνοποίητο τμήμα αποτελεί μηδαμινό ποσοστό στο ελαιόλαδο, όμως τα συστατικά που εμπεριέχει έχουν σημαντική βιολογική δράση.

#### **Λιπαρά οξέα**

Τα λιπαρά οξέα στο ελαιόλαδο χωρίζονται σε κορεσμένα και ακόρεστα και βρίσκονται κυρίως υπό μορφή τριγλυκεριδίων. Το σημαντικότερο είναι το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (18:1, ω-9 λιπαρό οξύ) η σύσταση του ελαιολάδου στο οποίο διαφέρει από χώρα σε χώρα και εξαρτάται από την ποικιλία καθώς και τις κλιματολογικές συνθήκες όπου καλλιεργούνται οι ελιές. Το δεύτερο κατά σειρά λιπαρό οξύ του ελαιολάδου είναι το λινελαϊκό (18:2, ω-6) ενώ επίσης περιέχει αλινολενικό (18:3, ω-3) και αραχιδονικό (20:4, ω-6) σε μικρότερες ποσότητες. Μάλιστα, επειδή τα γλυκερίδια αυτά είναι υγρά, σε θερμοκρασία δωματίου, το ελαιόλαδο, στο σύνολο του, παραμένει σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία

δωματίου. Από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, το μεγαλύτερο ποσοστό κατέχει το παλμιτικό (C16:0) και ακολούθως το στεατικό (C18:0), όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.1.1: Χημική σύσταση εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου

Λιπαρά οξέα	Συντακτικός τύπος	Ποσοστά
Αραχιδονικό οξύ	(C20:4)C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	≤1%
Ελαϊκό οξύ	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	55-83%
Λινελαϊκό οξύ	(C18:2) C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	3.5-21%
Παλμιτικό οξύ	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	7.5-20%
Στεατικό οξύ	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	0.5-5%
α-λινολενικό οξύ	(C18:3) C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	≤1%

### Υδρογονάνθρακες

Στο ελαιόλαδο απαντώνται υδρογονάνθρακες οι οποίοι είναι δευτερεύοντα προϊόντα της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων. Σε αυτούς ανήκουν κορεσμένες ενώσεις απλής και διακλαδισμένης αλυσίδας. Το πιο σημαντικό συστατικό αυτής της ομάδας, βάσει της περιεκτικότητάς του, είναι το σκουαλένιο. Είναι ένα τριτερπένιο που περιέχεται κυρίως στο εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο.

### Φαινόλες<sup>[17]</sup>

Όσον αφορά τις φαινόλες οι οποίες προέρχονται από τον καρπό και τα φύλλα της ελιάς, πρόκειται για μια κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών που συναντάται στο ελαιόλαδο και μάλιστα σε σημαντική ποσότητα. Λειτουργούν αντιοξειδωτικά και προστατεύουν το ελαιόλαδο από την οξείδωση, όταν αυτό έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα και το ηλιακό φως. Σημειώνεται λοιπόν ότι ένα ελαιόλαδο με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες έχει υψηλό βαθμό προστασίας και άρα αντοχής στον χρόνο.

Οι κυριότερες από τις φαινόλες που συναντώνται στο ελαιόλαδο είναι η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Η τελευταία μάλιστα παρουσιάζει αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Όσο περισσότερες υδροξυλικές ομάδες φέρει η φαινόλη, αυξάνεται και η αντιοξειδωτική της δράση. Εκτός από τις δυο αυτές φαινολικές ουσίες έχουν ανιχνευθεί, στο ελαιόλαδο και φαινολικά οξέα τα οποία είναι μεταξύ άλλων το καφεϊκό και το πρωτοκατεχικό. Η τυροσόλη βρίσκεται σχεδόν σ' όλα τα ελαιόλαδα. Τόσο η τυροσόλη όσο και η υδροξυτυροσόλη πιστεύεται ότι προέρχονται από την

υδρόλυση της ελευρωπαϊνης ενώ οι άλλες (βενζοϊκό και κιναμικό οξύ) από την υδρόλυση των φλαβονοειδών (ανθοκυάνες, φλαβόνες), οι οποίες βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες ειδικά στον ώριμο καρπό.

Το 2012, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) πρότεινε έναν καινούριο ισχυρισμό υγείας. Σύμφωνα με τον κανονισμό 432/2012 λοιπόν, θεωρείται ότι οι πολυφαινόλες του ελαιολάδου συμβάλλουν στην προστασία των λιπιδίων του αίματος από το οξειδωτικό στρες στα πλαίσια μιας ποικίλης και ισορροπημένης διατροφής. Ωστόσο, για να αναγραφεί ο ισχυρισμός σε ένα ελαιόλαδο πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 250 mg υδροξυτυροσόλης και παραγώγων της (σύμπλοκα ελευρωπαϊνης και τυροσόλης) ανά 1kg ελαιολάδου.<sup>[18]</sup>

### **Χλωροφύλλες**

Η κυριότερη ουσία που περιέχεται στις χρωστικές είναι η χλωροφύλλη. Η ουσία αυτή δίνει το χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα στο ελαιόλαδο αλλά αποτελεί και την κύρια αιτία της οξειδωτικής αλλοίωσης, όταν αυτό έλθει σε επαφή με το φως. Για τον λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικό το ελαιόλαδο να φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος. Η χλωροφύλλη υπάρχει στη μορφή της α και της β χλωροφύλλης. Η χλωροφύλλη b διαφέρει από την α στο ότι έχει αλδεϋδική ομάδα (-CH=O) αντί μεθύλιο (-CH<sub>3</sub>) στο 3ο άτομο άνθρακα. Οι χρωστικές αυτές αποικοδομούνται εύκολα και μετατρέπονται στις αντίστοιχες φαιοφυτίνες. Με την πρόοδο της ωρίμανσης του ελαιόκαρπου μειώνεται η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη.

### **Τοκοφερόλες**

Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται σε όλα τα φυτικά λάδια. Έχουν προσδιοριστεί διάφορα είδη τοκοφερολών και είναι γνωστές σαν α-β-γ-δ-ε και ζ<sup>[19]</sup>. Η α-τοκοφερόλη αποτελεί περίπου το 88,5% των συνολικών τοκοφερολών στο ελαιόλαδο, η β- μαζί με τη γ-τοκοφερόλη αποτελούν το 9,9% ενώ η δ-τοκοφερόλη το 1,6% του συνόλου των τοκοφερολών. Οι τοκοφερόλες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη θέση στην οποία βρίσκονται οι μεθυλικές ομάδες. Η συνολική περιεκτικότητα των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο ποικίλει. Η διακύμανση η οποία παρατηρείται στη συγκέντρωση των διαφόρων τοκοφερολών, στο ελαιόλαδο, εξηγείται από τη βαθμιαία καταστροφή τους. Ελαιόλαδο, το οποίο λαμβάνεται από τον πυρήνα της ελιάς, περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό τοκοφερολών απ' αυτό που προέρχεται από το σαρκώδες μέρος του καρπού. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των τοκοφερολών στο ελαιόλαδο, είναι χρήσιμος και βοηθά στην ανίχνευση νοθείας του με άλλα φυτικά έλαια.

## Καροτενοειδή

Στο ελαιόλαδο συναντώνται και διάφορα καροτενοειδή τα οποία συνεισφέρουν στην κιτρινωπή απόχρωσή του. Η λουτεΐνη ( $C_{40}H_{56}O_2$ ), που ανήκει στις ξανθοφύλλες είναι υδροξυλιωμένο α-καροτένιο, καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό των καροτενοειδών. Ακολουθούν τα καροτένια α-, β- και γ- που είναι τρεις ισομερείς ακόρεστοι υδρογονάνθρακες του τύπου  $C_{40}H_{56}$ . Το β-καροτένιο υπάρχει σε αναλογία 85%, το α-καροτένιο σε 15% και το γ-καροτένιο σε ιχνοποσότητες.

### 5.1.5 Νοθεία στο ελαιόλαδο

Τα τελευταία χρόνια η νοθεία του ελαιολάδου έχει αναδειχθεί σε ένα μείζον ζήτημα. Αυτός είναι και ο λόγος που η ανίχνευση νοθείας του ελαιολάδου έχει απασχολήσει πολλές ομάδες και έχει μελετηθεί με διάφορες τεχνικές παγκοσμίως. Το γεγονός είναι ότι το ελαιόλαδο και ειδικά το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο υπερέχει εν σχέσει με τα υπόλοιπα βρώσιμα έλαια τόσο στην βιολογική του σημασία όσο και στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, γεύση και άρωμα. Αναπόδραστα, το λάδι αυτό καθίσταται ένα λάδι υψηλών απαιτήσεων. Για την παραγωγή του απαιτείται φυσική πίεση της ελιάς και όχι κάποια χημική επεξεργασία των σπόρων όπως συμβαίνει με τα κοινά σπορέλαια. Επομένως ένα τόσο ποιοτικό προϊόν είναι πηγή μεγάλων εσόδων και για τον κάθε παραγωγό αλλά και για ολόκληρες χώρες που βασίζουν την οικονομία τους στην παραγωγή ελαιολάδου, όπως είναι η Ισπανική.

Η προσπάθεια κάποιων επιτήδειων για να μεγιστοποιήσουν το κέρδος τους βασίζεται στη νόθευση του ελαιολάδου με λάδια κατώτερης ποιότητας και θρεπτικής αξίας.<sup>[16]</sup> Η πιο συνηθισμένη νοθεία που γίνεται στο ελαιόλαδο είναι η νόθευση του με πυρηνέλαιο, ένα έλαιο κατώτερης ποιότητας με το οποίο μοιράζονται πολλά κοινά στοιχεία. Άλλες συνηθισμένες περιπτώσεις είναι η νόθευση του ελαιολάδου με σπορέλαια, όπως είναι το ηλιέλαιο, το αραβοσιτέλαιο και το σογιέλαιο. Συχνά πραγματοποιείται νοθεία του ελαιολάδου με κάποια ιχθυέλαια ή και ορυκτέλαια. Γίνεται κατανοητό ότι οι νοθείες αυτές διακινδυνεύουν και την υγεία των καταναλωτών, πέραν της οικονομικής εξαπάτησης.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η νοθεία του ελαιολάδου με τα σπορέλαια: ηλιέλαιο (sunflower oil), σογιέλαιο (soybean oil), αραβοσιτέλαιο (corn oil) και πυρηνέλαιο (rapeseed oil). Το πυρηνέλαιο είναι ένα λάδι που προέρχεται από την επεξεργασία του πυρήνα και της ψίχας της ελιάς, επομένως έχει την ίδια σύσταση όσον αφορά τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα, με εκείνη του έξτρα παρθένου ελαιολάδου. Παρακάτω παρατίθεται η χημική σύσταση ως προς τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα των σπορελαίων που χρησιμοποιήθηκαν, όπως προκύπτει από τον Κώδικα Τροφίμων:



Πίνακας 5.1.1 :Χημική σύσταση ηλιελαίου

<b>Λιπαρά οξέα</b>	<b>Περιεκτικότητα</b>
Ελαϊκό οξύ	14-35%
Λινελαϊκό οξύ	55-75%
Παλμιτικό οξύ	3-10%
Στεατικό οξύ	1-10%
α-λινολενικό οξύ	<0.3%

Πίνακας 5.1.2 :Χημική σύσταση σογιελαίου

<b>Λιπαρά οξέα</b>	<b>Περιεκτικότητα</b>
Ελαϊκό οξύ	18-26%
Λινελαϊκό οξύ	50-57%
Παλμιτικό οξύ	7-14%
Στεατικό οξύ	3-5.5%
α-λινολενικό οξύ	5.5-10%

Πίνακας 5.1.3 :Χημική σύσταση αραβοσιτελαίου

<b>Λιπαρά οξέα</b>	<b>Περιεκτικότητα</b>
Ελαϊκό οξύ	24-42%
Λινελαϊκό οξύ	34-62%
Παλμιτικό οξύ	9-14%
Στεατικό οξύ	0.5-4%
α-λινολενικό οξύ	<2%

## Βιβλιογραφία

1. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων κοινής χρήσης- Μέρος Α΄
2. <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/nutrition-basics/mediterranean-diet>
3. <http://www.fao.org/>
4. Bogani, P., Galli, C., Villa, M., & Visioli, F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil, 190, 181–186.
5. Miles, E. A., Ph, D., Zoubouli, P., Sc, B., Calder, P. C., Ph, D., & Phil, D. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures, 21, 389–394.
6. Gutiérrez-Rosales F., Ríos J.J., Gómez-Rey M. L., (2003). Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil . Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography, 6021–6025.
7. Yang, Y., Ferro, M. D., Cavaco, I., & Liang, Y. (2013). Detection and Identification of Extra Virgin Olive Oil Adulteration by GC-MS Combined with Chemometrics.
8. Bouaziz, M. (2014). Detection of Chemlali Extra-Virgin Olive Oil Adulteration Mixed with with Soybean Oil, Corn Oil, and Sunflower Oil by Using GC and HPLC
9. Philippidis A., Poulakis E., Papadaki A., Velegrakis M., (2016) Comparative Study using Raman and Visible Spectroscopy of Cretan Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Sunflower Oil. Analytical Letters, 1182-1195.
10. Vigli G., Philippidis A., Spyros A., and Dais P. (2003). Classification of Edible Oils by Employing 31 P and 1 H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis . A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils, 5715–5722.
11. Boskou, D. (1996). Olive oil chemistry and technology. ed. D. Boskou, 1-282. Champaign, IL: AOCS Press.
12. Κάρκουλα Ε., «Νέα μέθοδος άμεσου ποσοτικού προσδιορισμού τεσσάρων σεκοϊριδοειδών σε ελαιόλαδο με φασματοσκοπία 1H-NMR», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2013.
13. Ανδρικόπουλος, Ν. Κ. (n.d.). Τροφογνωσία, 264-275.
14. <https://myoliveplant.gr/elainvas/poikilies-elias/>
15. Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Gonc, A., Pereira, A., Oliveira, M. B., & Seabra, R. M. (2005). Food Chemistry Phenolic profiles of Portuguese olive fruits ( *Olea europaea* L .): Influences of cultivar and geographical origin, 89, 561–568.

16. Rohman, A., & Man, Y. B. C. (2010). Fourier transform infrared ( FTIR ) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, 43(3), 886–892.
17. Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant
18. European Community Council Regulation No. 432/2012 of 16 May 2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. *Off. J. Eur. Comm. L.* 2012, 136, 1-40.
19. Anna Gliszczyńska-Świgło, Ewa Sikorska, Igor Khmelinskii, Marek Sikorski. (2007). Tocopherol content in edible plant oils. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 57, (pp.157–161)

## 5.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΕΞΑΙΡΕΤΙΚΑ ΠΑΡΘΕΝΟΥ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ ΜΕ ΣΠΟΡΕΛΑΙΑ

### Δείγματα και πειραματική διαδικασία

Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο είχε προέλευση από τοπικούς παραγωγούς του Ηρακλείου, ενώ τα σπορέλαια αγοράστηκαν από γνωστές αλυσίδες καταστημάτων. Τα σπορέλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ηλιέλαιο (sunflower oil), σογιέλαιο (soybean oil), αραβοσιτέλαιο (corn oil) και πυρηνέλαιο (pomace oil). Πραγματοποιήθηκαν μίξεις του ελαιολάδου με το κάθε σπορέλαιο σε βαθμιδωτές συγκεντρώσεις, από 1% μέχρι 50%.

Τα έλαια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μίξεις υπήρξαν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος εντός του εργαστηρίου. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία ενώ ο καθαρισμός τους πραγματοποιήθηκε με καθαρό ισοοκτάνιο.

Όσον αφορά τις μετρήσεις απορρόφησης που πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο με την επωνυμία Perkin-Elmer Lambda 950, αυτές χωρίζονται στις περιοχές του υπεριώδους (UV), ορατού (Vis) και εγγύς υπέρυθρου (NIR) όπως φαίνεται παρακάτω:

α. Περιοχή UV με μήκη κύματος 220-280nm και step 2nm, όπου το δείγμα έχει αραιωθεί σε διαλύτη ισοοκτάνιο (1% v/v) και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 2mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον διαλύτη.

β. Περιοχή UV με μήκη κύματος 260-400nm και step 2nm, όπου το δείγμα έχει αραιωθεί σε διαλύτη ισοοκτάνιο (1% v/v) και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον διαλύτη.

γ. Περιοχή ορατού (Vis) με μήκη κύματος 400-800nm και step 2nm, όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραίωση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 2mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

δ. Περιοχή Near-IR (NIR) με μήκη κύματος 800-1600nm και step 2nm, όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραίωση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

ε. Περιοχή Near-IR (NIR) με μήκη κύματος 1800-2200nm και step 2nm, όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραίωση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

### 5.2.1 Αποτελέσματα

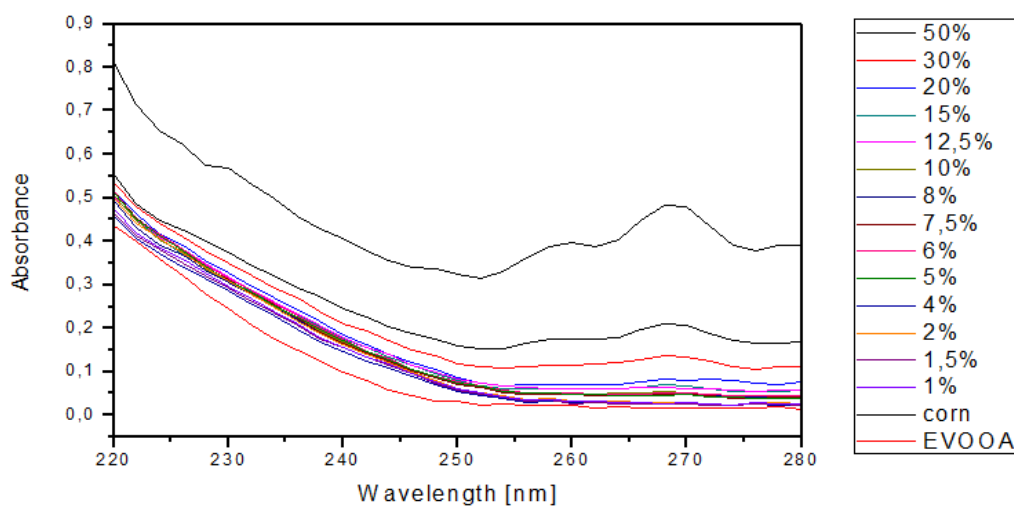
Στο κομμάτι αυτό θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα για τις 4 διαφορετικές μίξεις με σπορέλαια στις 5 διαφορετικές περιοχές προς ανάλυση.

Υπεριώδης περιοχή: 220-280 nm και 260-400 nm.

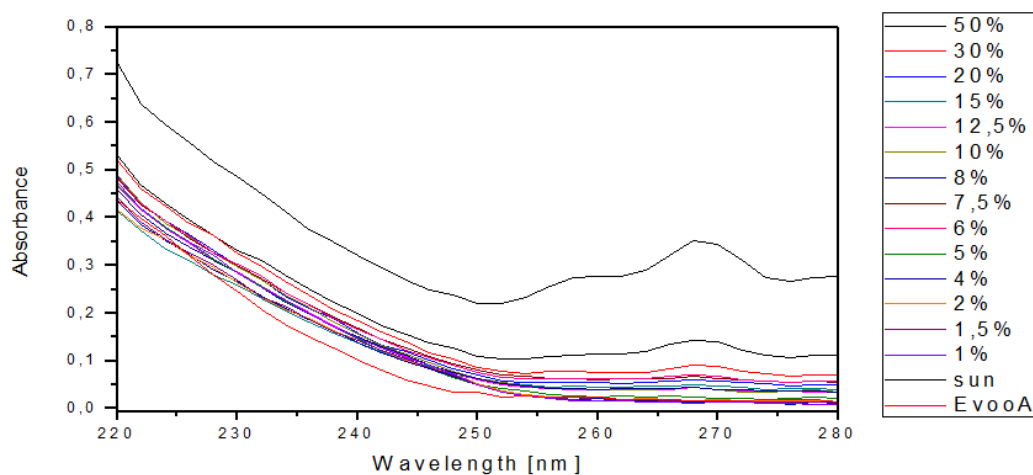
Οι κύριες ομάδες που απορροφούν σε αυτή την περιοχή στο ελαιόλαδο είναι:

- Στα 232 nm απορροφούν τα συζυγιακά διένια<sup>[1]</sup>
- Στα 270 nm απορροφούν δευτερογενή προϊόντα<sup>[1]</sup> οξείδωσης(κετόνες, α- και β- ακόρεστες αλδεΐδες) καθώς και τα συζυγή τριένια
- Στα 280 nm απορροφούν οι φαινόλες<sup>[2]</sup>
- Στα 310-320 nm εμφανίζουν κορυφή τα φλαβονοειδή<sup>[2]</sup>
- Στα 320 nm απορροφούν τα φαινολικά οξέα<sup>[2]</sup>

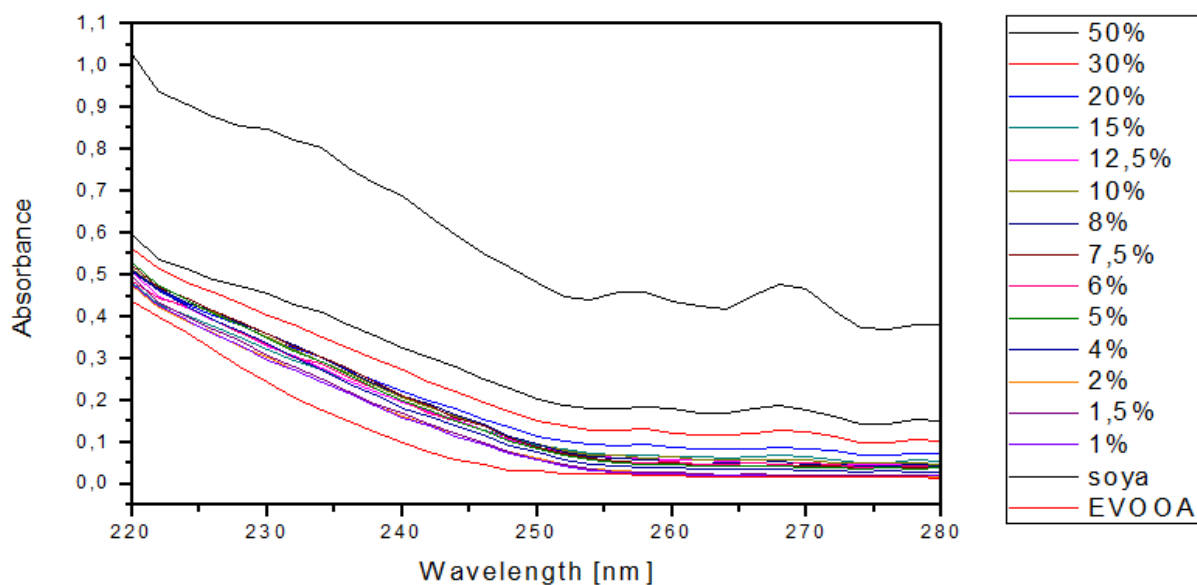
**220-280 nm:**



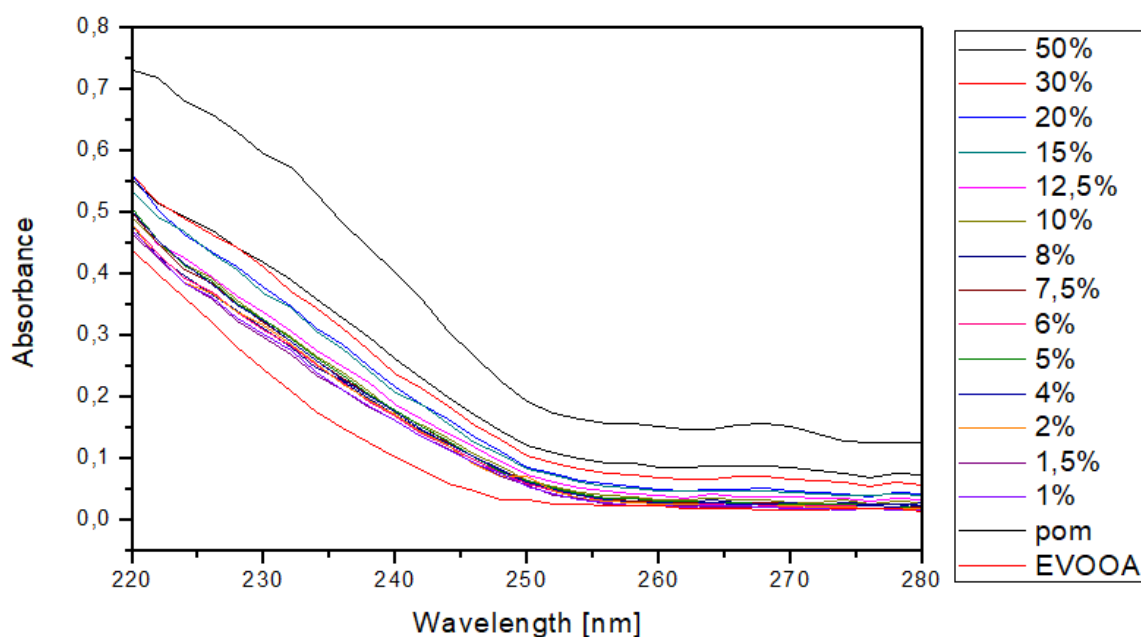
Εικόνα 5.2.1: Φάσματα μίξεων Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στην περιοχή 220-280 nm



Εικόνα 5.2.2: Φάσματα μίξεων Ηλιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 220-280 nm



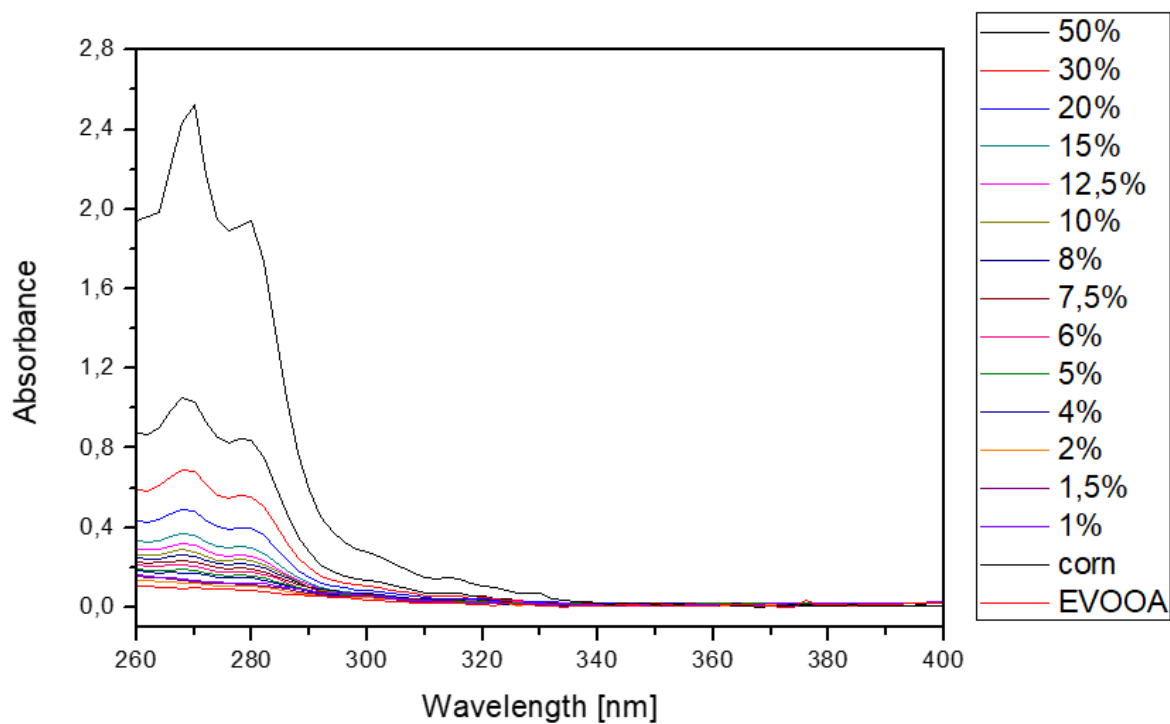
Εικόνα 5.2.3: Φάσματα μίξεων Σογιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 220-280 nm



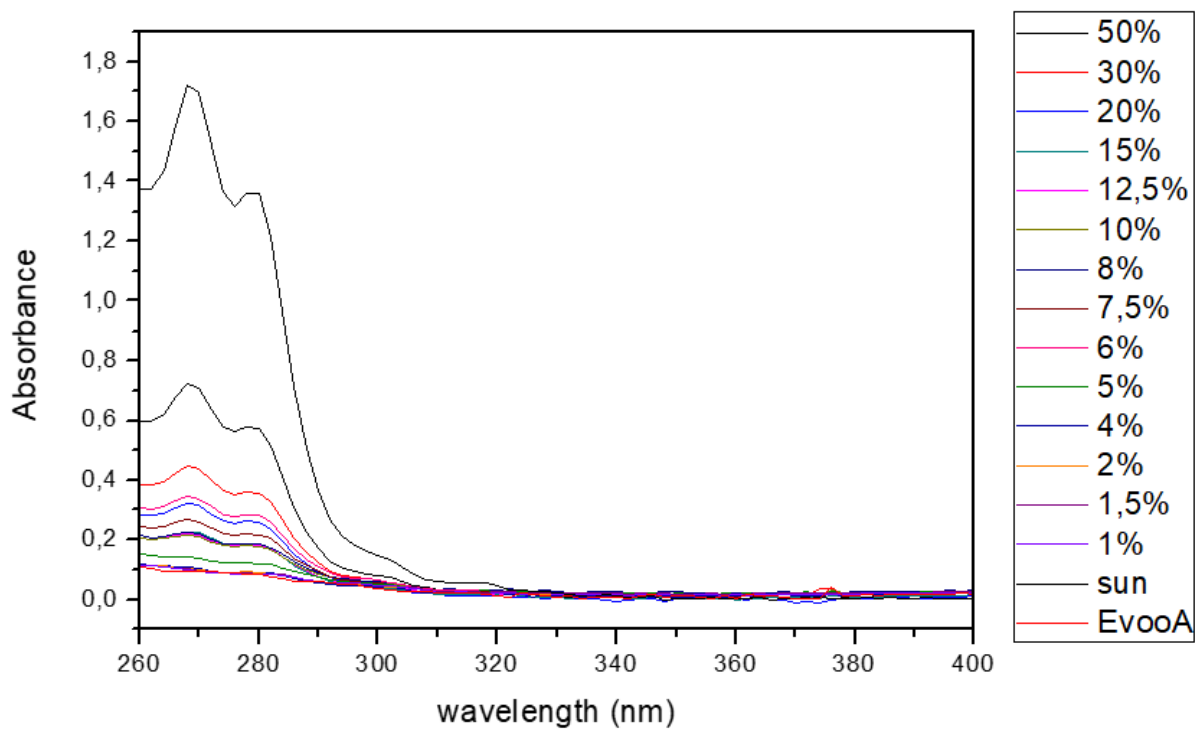
Εικόνα 5.2.4: Φάσματα μίξεων Πυρηνέλαιο- EVOOA στην περιοχή 220-280 nm

Τα σπορέλαια αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο και σογιέλαιο διαφοροποιούνται αισθητά από το ελαιόλαδο ειδικά στην περιοχή των 270 nm όπου εμφανίζουν κορυφή που δεν φέρει το ελαιόλαδο. Το πυρηνέλαιο, επειδή μοιάζει αρκετά στην σύστασή του με το ελαιόλαδο εμφανίζει σε μικρότερο βαθμό αυτήν την κορυφή, όμως και πάλι διαφοροποιείται αισθητά. Και τα 4 σπορέλαια εμφανίζονται σε αρκετά υψηλότερη ένταση από το ελαιόλαδο.

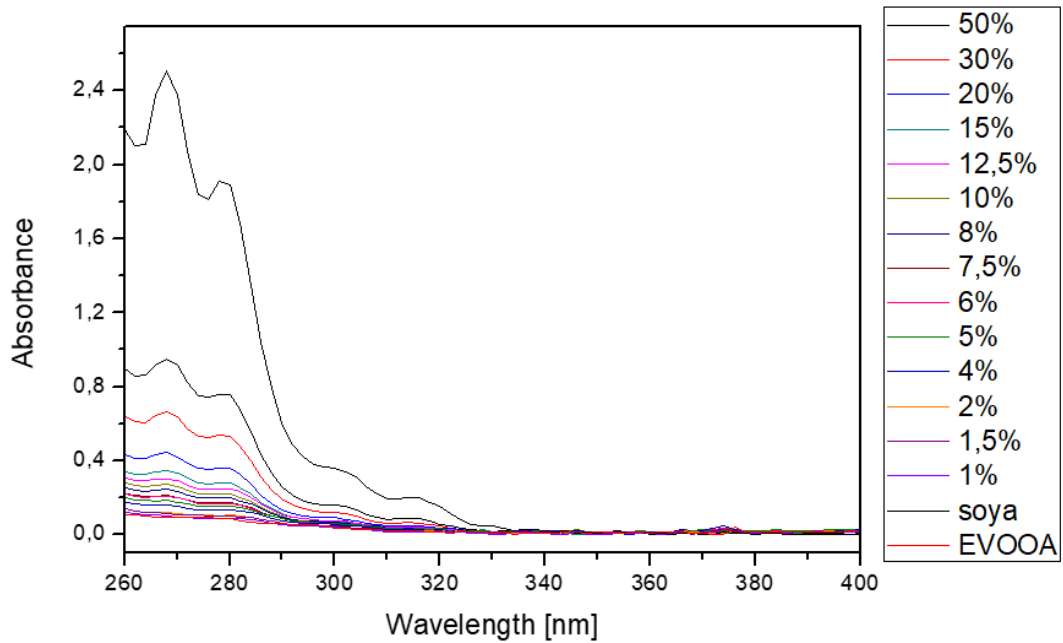
## 260- 400 nm:



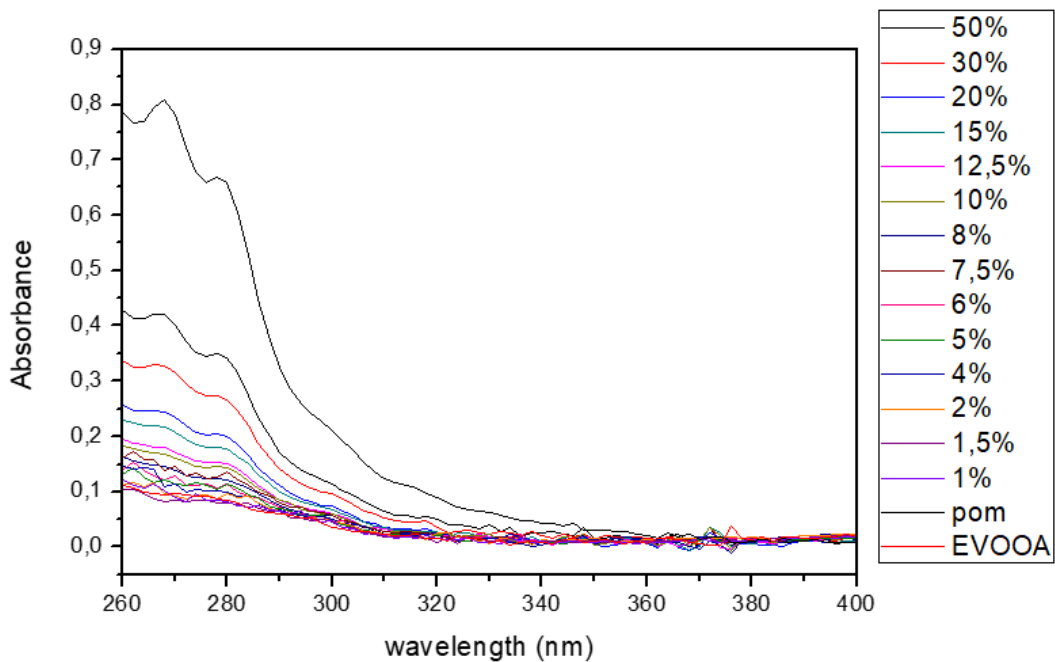
Εικόνα 5.2.5: Φάσματα μίξεων Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στην περιοχή 260-400 nm



Εικόνα 5.2.6: Φάσματα μίξεων Ηλιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 260-400 nm



Εικόνα 5.2.7: Φάσματα μίξεων Σογιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 260-400 nm



Εικόνα 5.2.8: Φάσματα μίξεων Πυρηνέλαιο- EVOOA στην περιοχή 260-400 nm

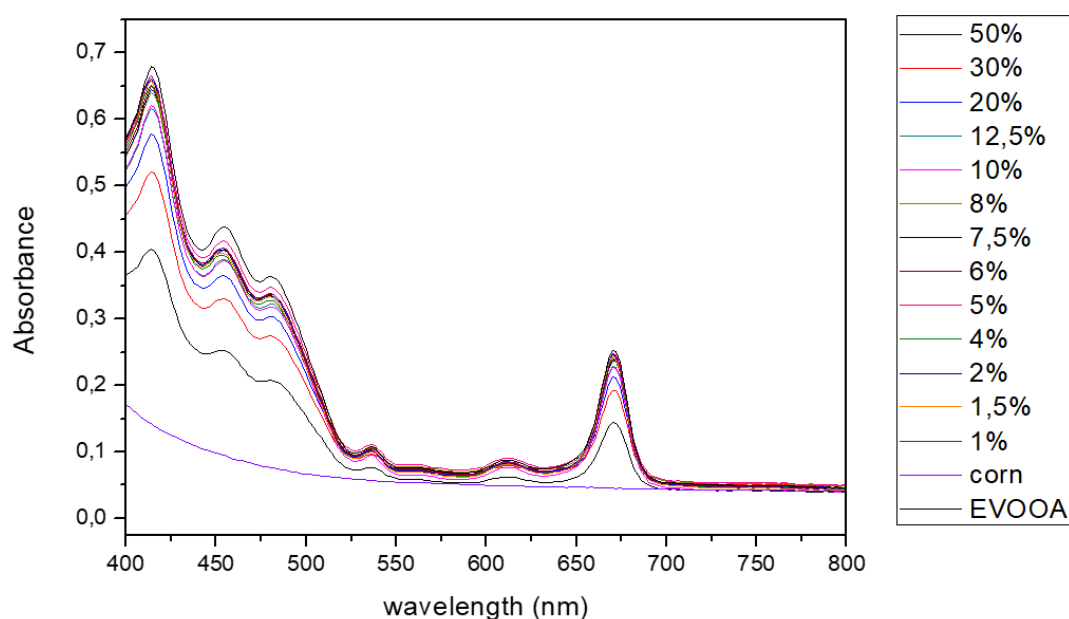
Στην φασματική περιοχή αυτή τα σπορέλαια διαφοροποιούνται έντονα από το ελαιόλαδο αφού εμφανίζουν κορυφές με μεγάλη ένταση στην περιοχή των 260-280 nm. Στην περιοχή αυτή απορροφά και το ελαιόλαδο αλλά οι κορυφές του έχουν πολύ μικρότερη ένταση. Και στην περιοχή των 310-320 nm που εμφανίζουν κορυφές τα φαινολικά παράγωγα στο ελαιόλαδο, η ένταση των αντίστοιχων κορυφών των σπορελαίων είναι πολύ μεγαλύτερη.



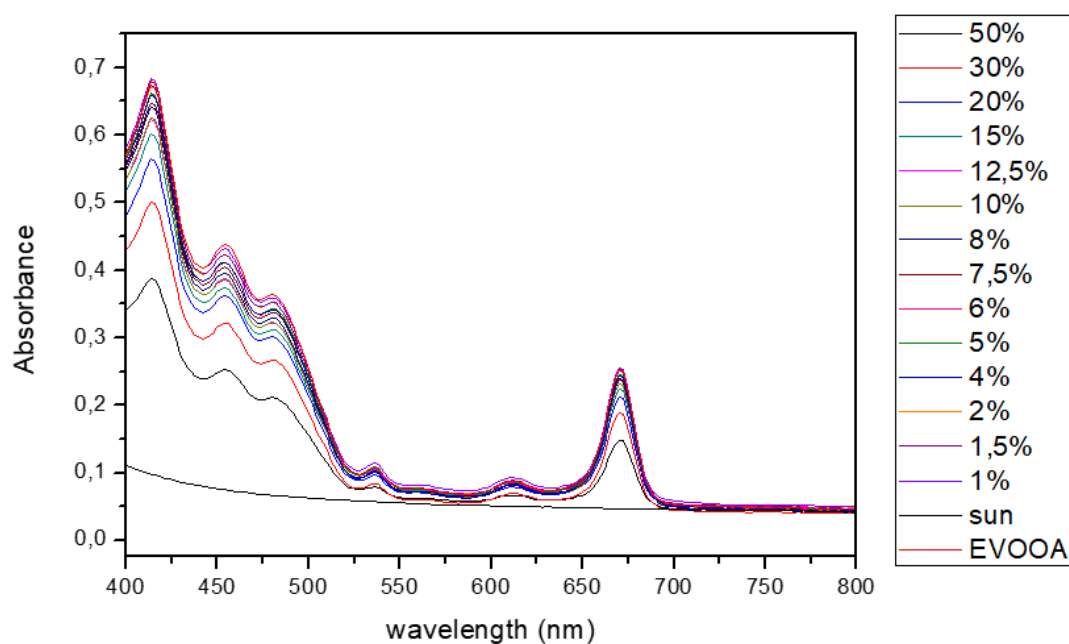
## Ορατή Περιοχή (Vis) 400-800 nm

Οι κύριες ομάδες του ελαιολάδου που απορροφούν σε αυτή την περιοχή είναι:

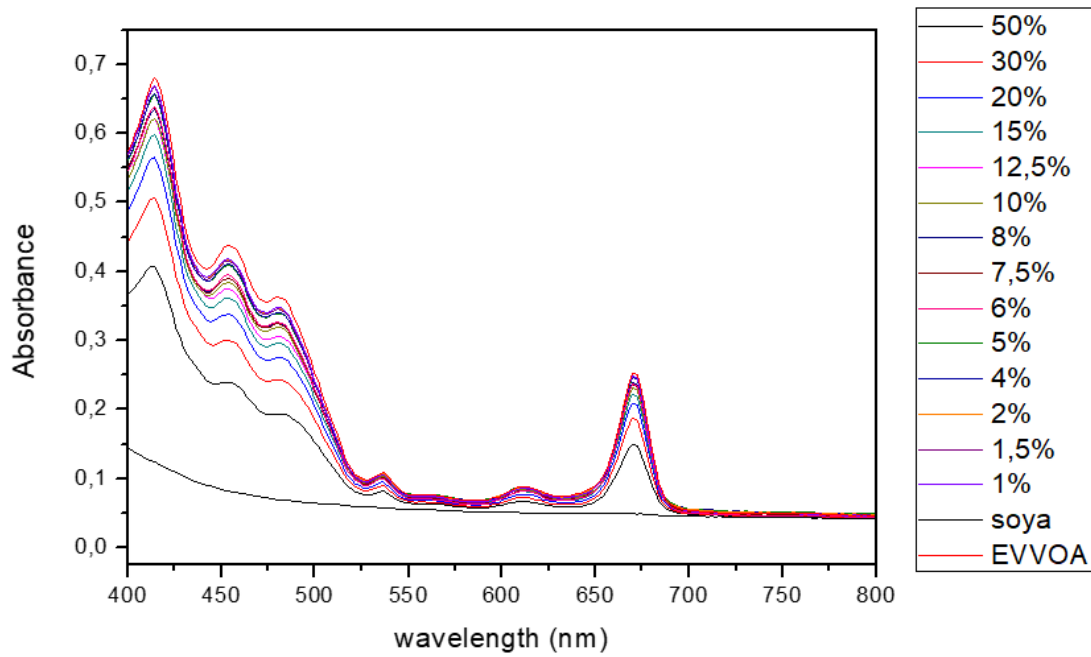
- Στα 413-430 nm, 455-458 nm και 480-486 nm εμφανίζουν κορυφή τα καροτενοειδή<sup>[3], [4]</sup>.
- Στα 535-537 nm, 611-613 nm και στα 667-672 nm (φαιοφυτίνη α) απορροφούν οι χλωροφύλλες<sup>[3], [4]</sup>.



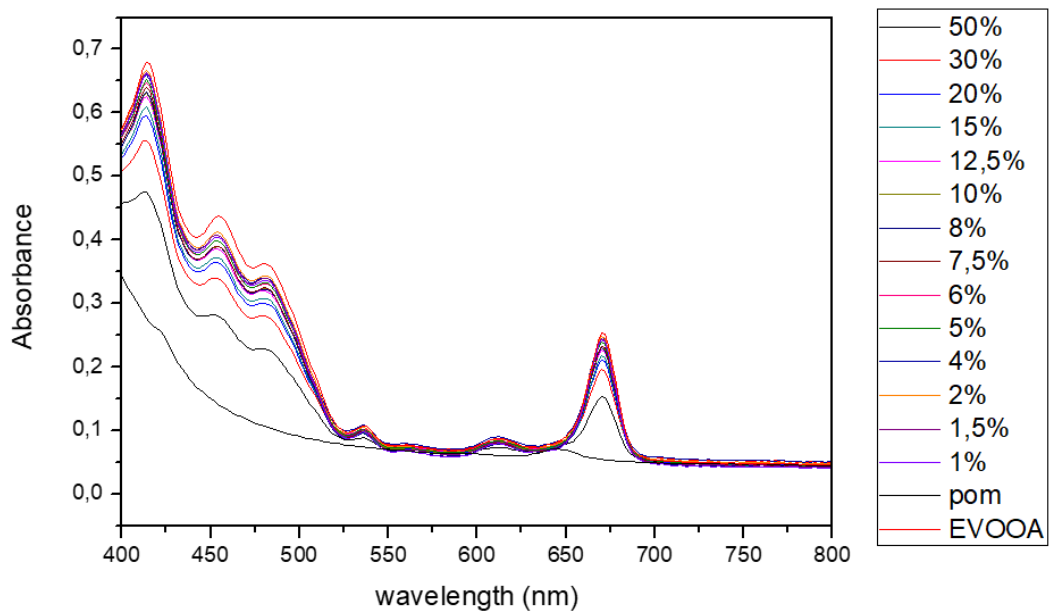
Εικόνα 5.2.9: Φάσματα μίξεων Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στην περιοχή 400-800 nm



Εικόνα 5.2.10: Φάσματα μίξεων Ηλιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 400-800 nm



Εικόνα 5.2.11: Φάσματα μίξεων Σογιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 400-800 nm



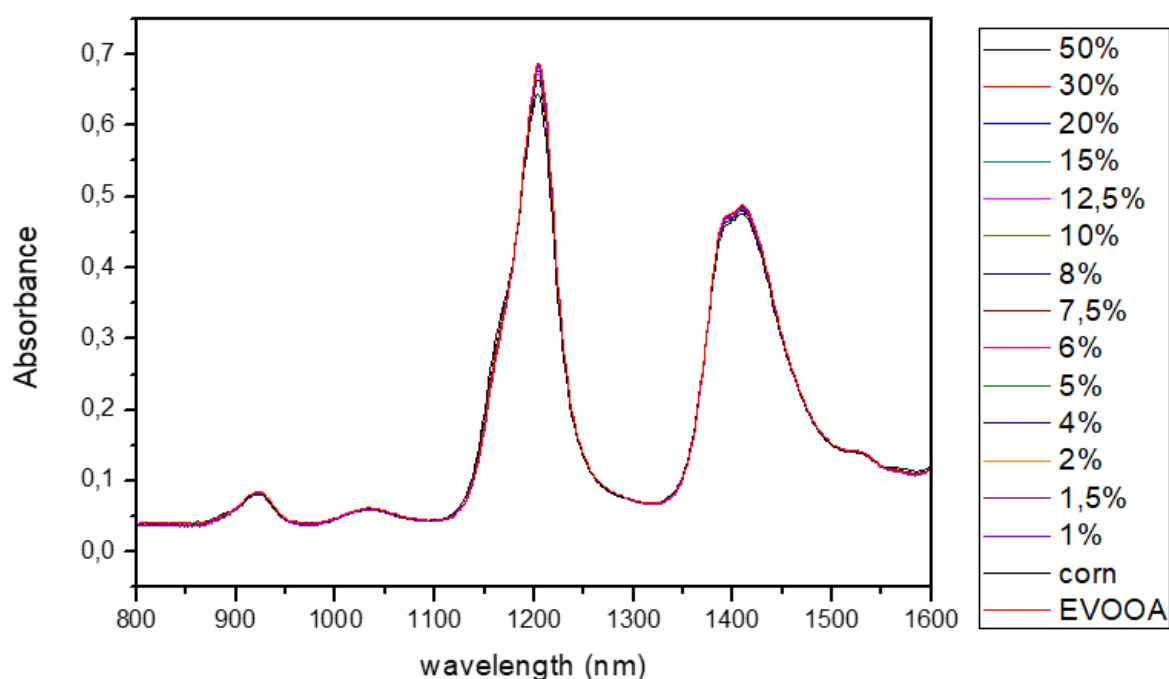
Εικόνα 5.2.12: Φάσματα μίξεων Πυρηνέλαιο- EVOOA στην περιοχή 400-800 nm

Στην περιοχή του ορατού εντοπίζονται οι μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα σπορέλαια και στο ελαιόλαδο. Τα σπορέλαια δεν εμφανίζουν καμία από τις κορυφές των καροτενοειδών και των χλωροφυλλών που εμφανίζει το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο. Το μοναδικό εκ των σπορελαίων που προσεγγίζει στο φάσμα το προφίλ κορυφών που εμφανίζει το ελαιόλαδο είναι το πυρηνέλαιο που η σύστασή του μοιάζει περισσότερο την σύσταση του ελαιολάδου.

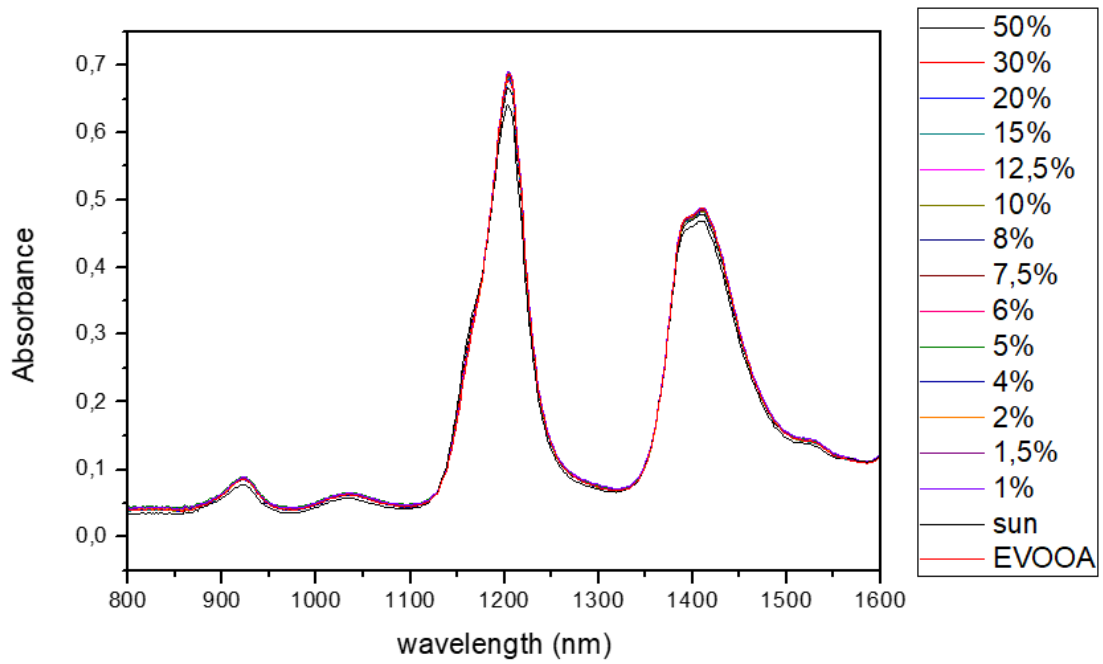
### Εγγύς Υπέρυθρη Περιοχή (NIR): 800-1600 nm

Στην περιοχή αυτή παρουσιάζονται πολλαπλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές. Οι κορυφές αυτές είναι υπέρτονοι δονήσεων έκτασης του δεσμού C-H (1<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup>) καθώς και συνδυασμοί θεμελιωδών δονήσεων C-H<sup>[4]</sup>. Πιο συγκεκριμένα:

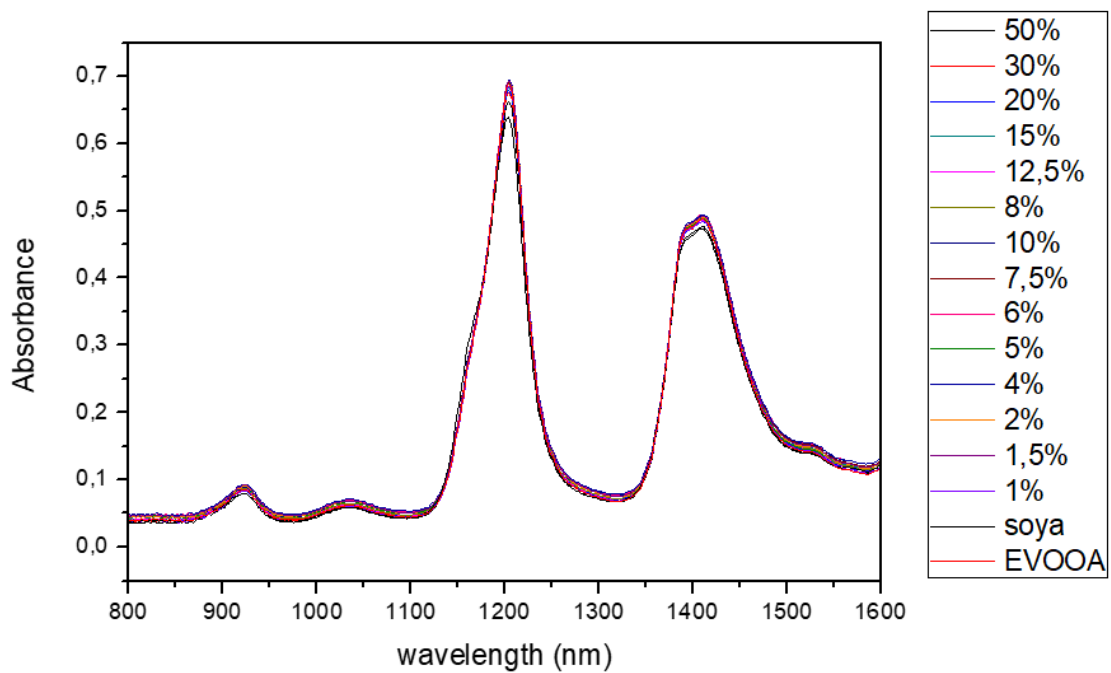
- Στα 930 nm εμφανίζεται η τρίτη υπέρτονος έκτασης δεσμού C-H του  $-CH_2$ <sup>[5]</sup>
- Στα 1.090-1.180 nm εμφανίζεται η δεύτερη υπέρτονος δόνησης έκτασης δεσμού C-H του  $-CH_2$
- Στα 1.100-1.200 nm εμφανίζεται η δεύτερη υπέρτονος δόνησης έκτασης δεσμού C-H του  $-CH_3$
- Στα 1.150-1.260 nm εμφανίζεται η πρώτη υπέρτονος δόνησης έκτασης δεσμού C-H του  $-CH=CH-$
- Στα 1.350-1.430 nm εμφανίζεται συνδυασμός δονήσεων δεσμού C-H των  $-CH_2$  και  $-CH_3$



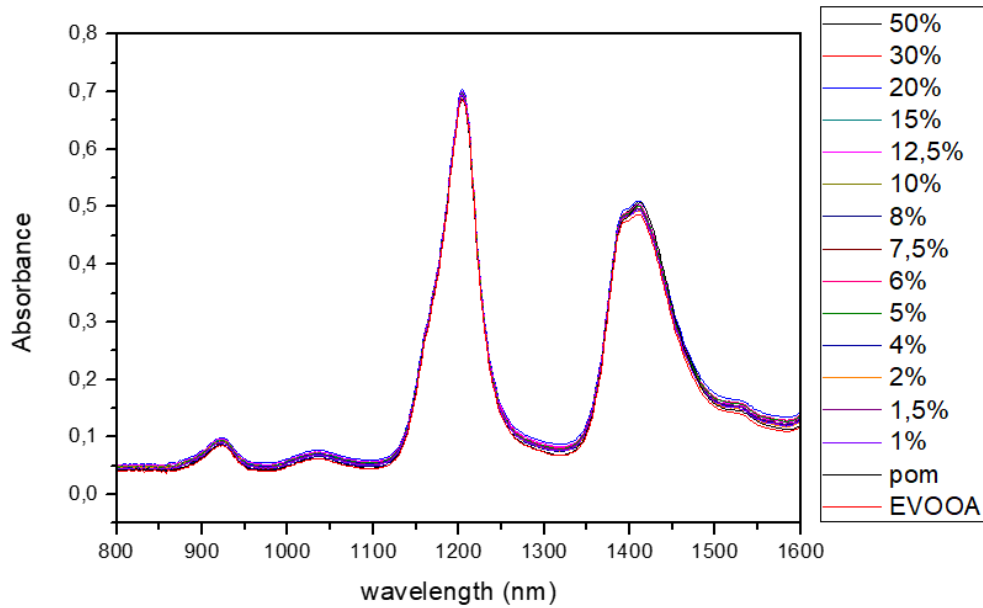
Εικόνα 5.2.13: Φάσματα μίξεων Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στην περιοχή 800-1600 nm



Εικόνα 5.2.14: Φάσματα μίξεων Ηλιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 800-1600 nm



Εικόνα 5.2.15: Φάσματα μίξεων Σογιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 800-1600 nm



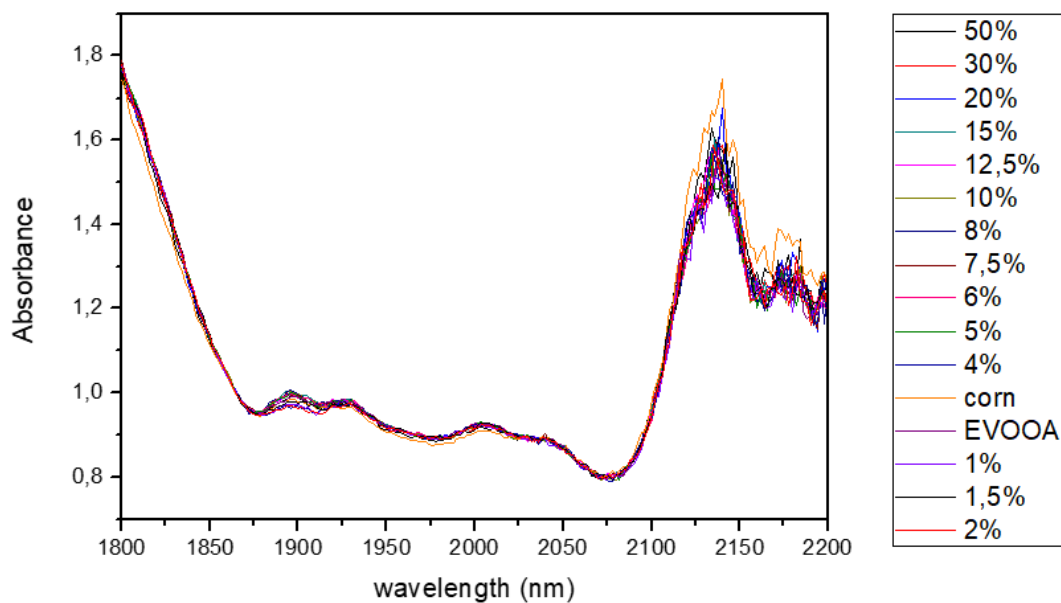
Εικόνα 5.2.16: Φάσματα μίξεων Πυρηνέλαιο- EVOOA στην περιοχή 800-1600 nm

Από τα φάσματα της περιοχής αυτής δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα, αφού τα σπορέλαια δεν διαφοροποιούνται από το ελαιόλαδο.

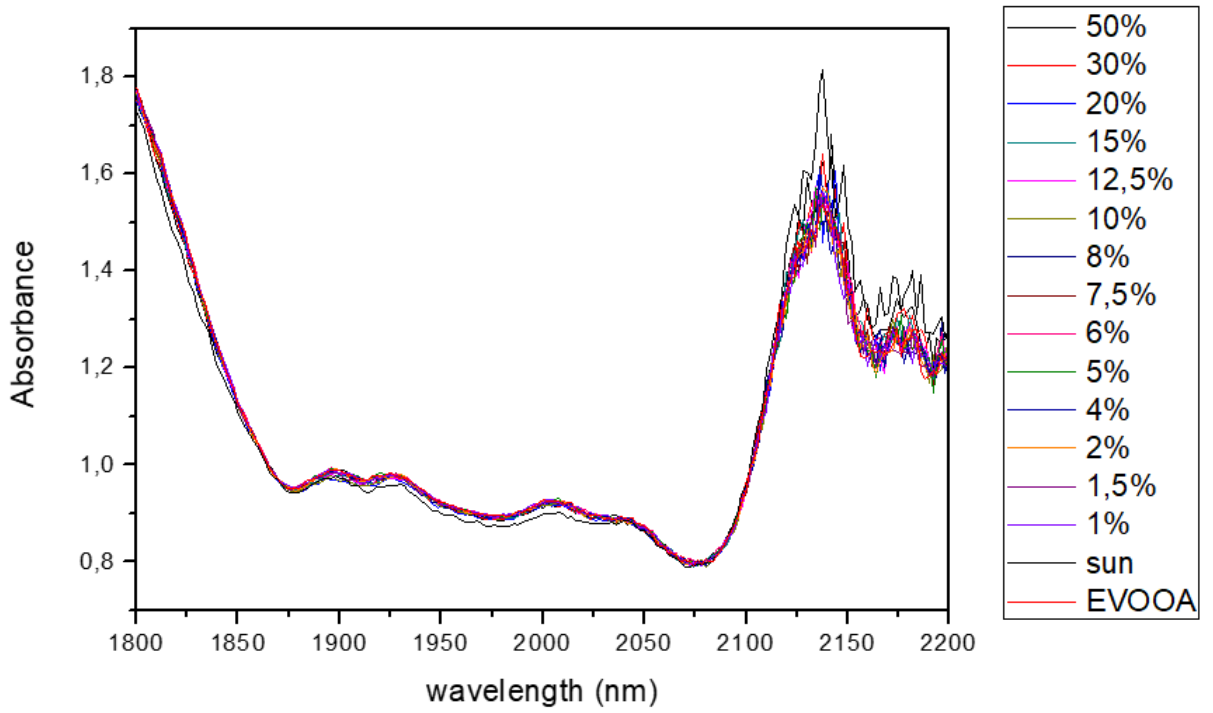
Εγγύς Υπέρυθρο (NIR): 1800-2200 nm

Και σε αυτήν την περιοχή εμφανίζονται ίδιου είδους κορυφές όπως και στην περιοχή 800-1600 nm<sup>[4]</sup>. Συγκεκριμένα:

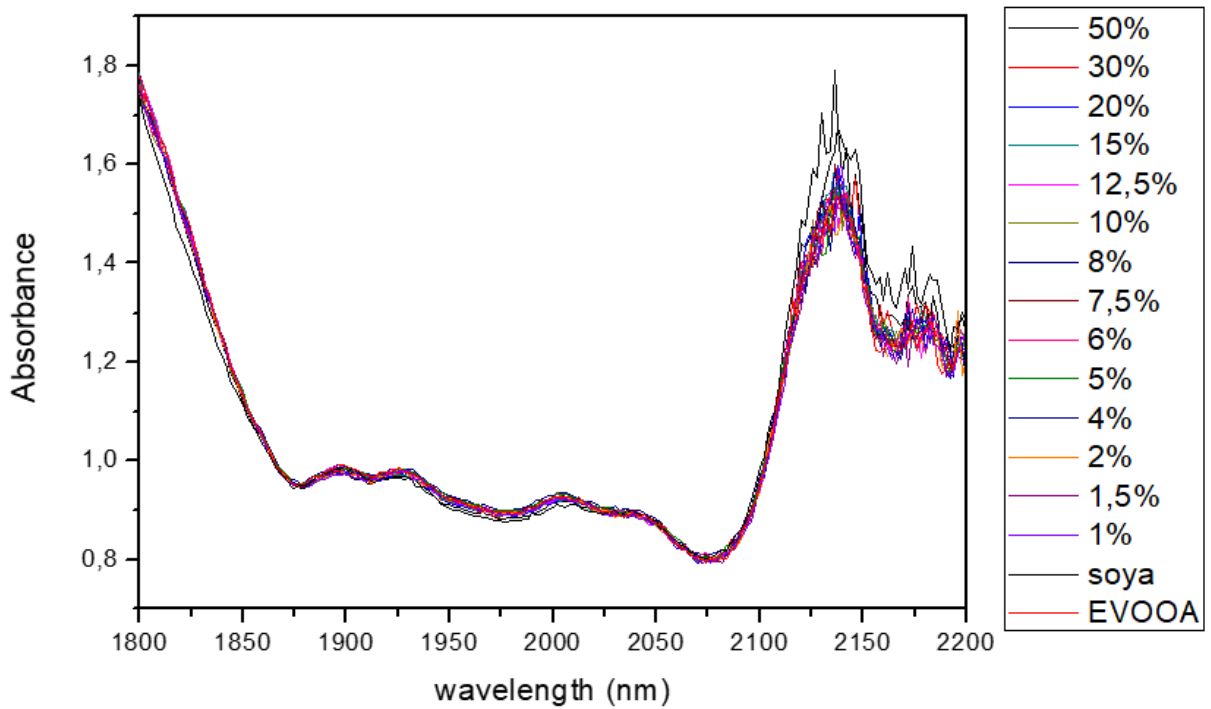
- Στα 1850-1950 nm ανατίθεται ο εστερικός δεσμός των τριγλυκεριδίων <sup>[6]</sup>
- Στα 2.100-2.200 nm ανατίθεται ο συνδυασμός δονήσεων C-H στο  $-CH=CH-$  <sup>[4]</sup>



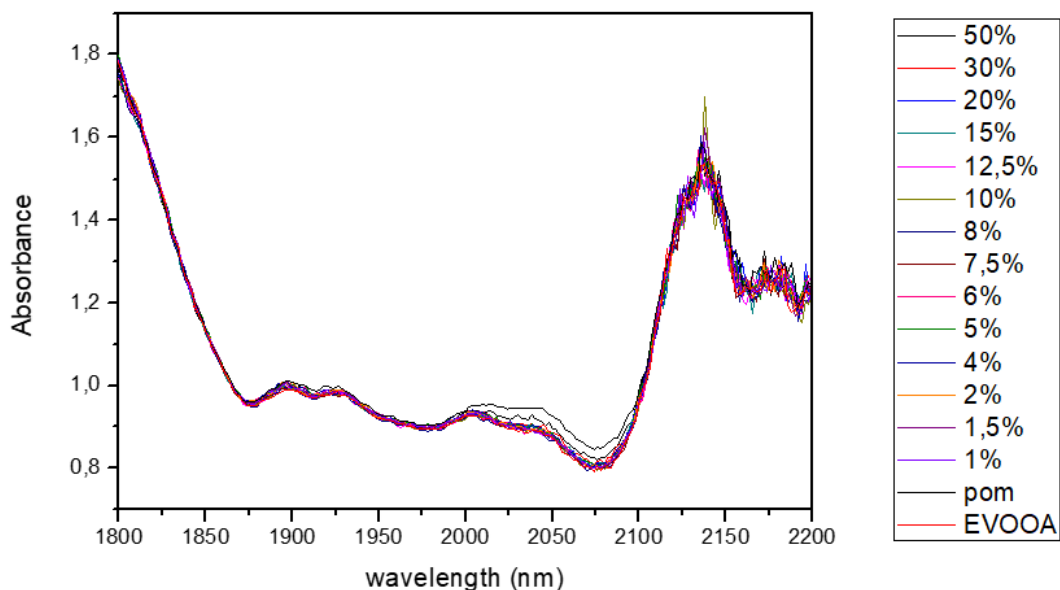
Εικόνα 5.2.17: Φάσματα μίξεων Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στην περιοχή 1800-2200 nm



Εικόνα 5.2.18: Φάσματα μίξεων Ηλιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 1800-2200 nm



Εικόνα 5.2.19: Φάσματα μίξεων Σογιέλαιο- EVOOA στην περιοχή 1800-2200 nm



Εικόνα 5.2.20: Φάσματα μίξεων Πυρηνέλαιο- EVOOA στην περιοχή 1800-2200 nm

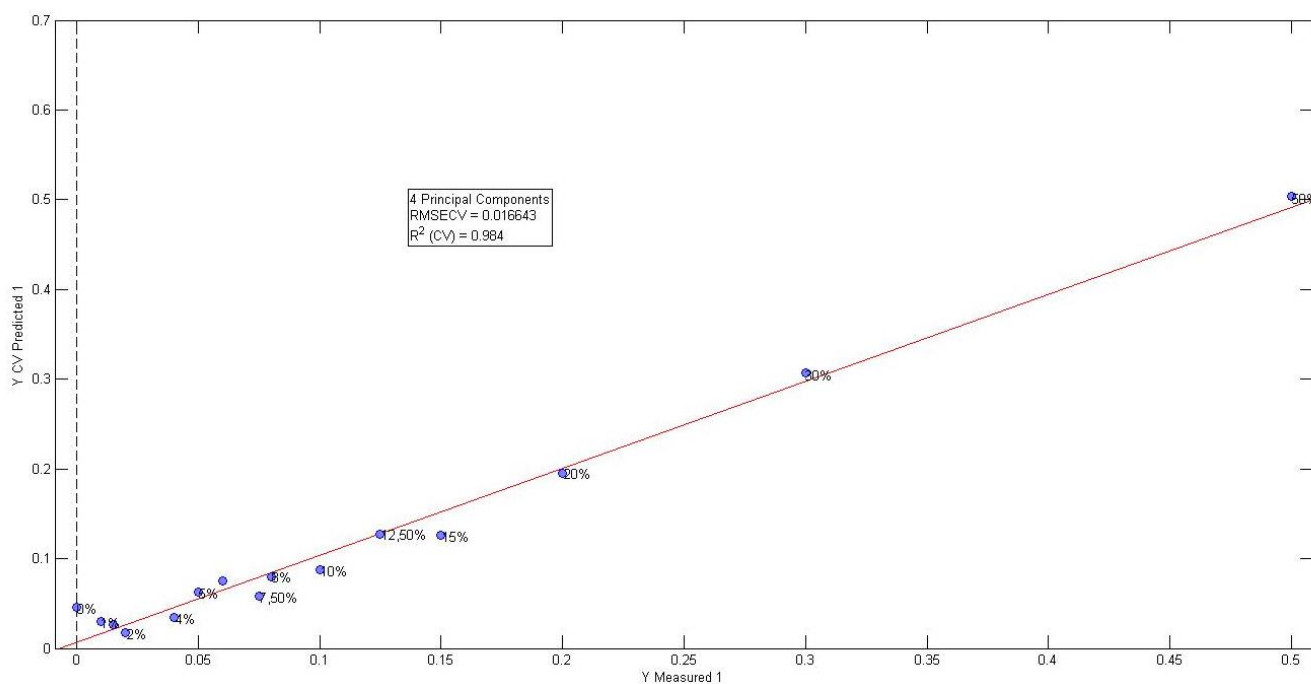
Τα φάσματα αυτής της περιοχής δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στα σπορέλαια και το ελαιόλαδο, ενώ χαρακτηρίζονται από θόρυβο στην περιοχή των 2150 nm και άνω.

### **5.2.2 Στατιστική Ανάλυση**

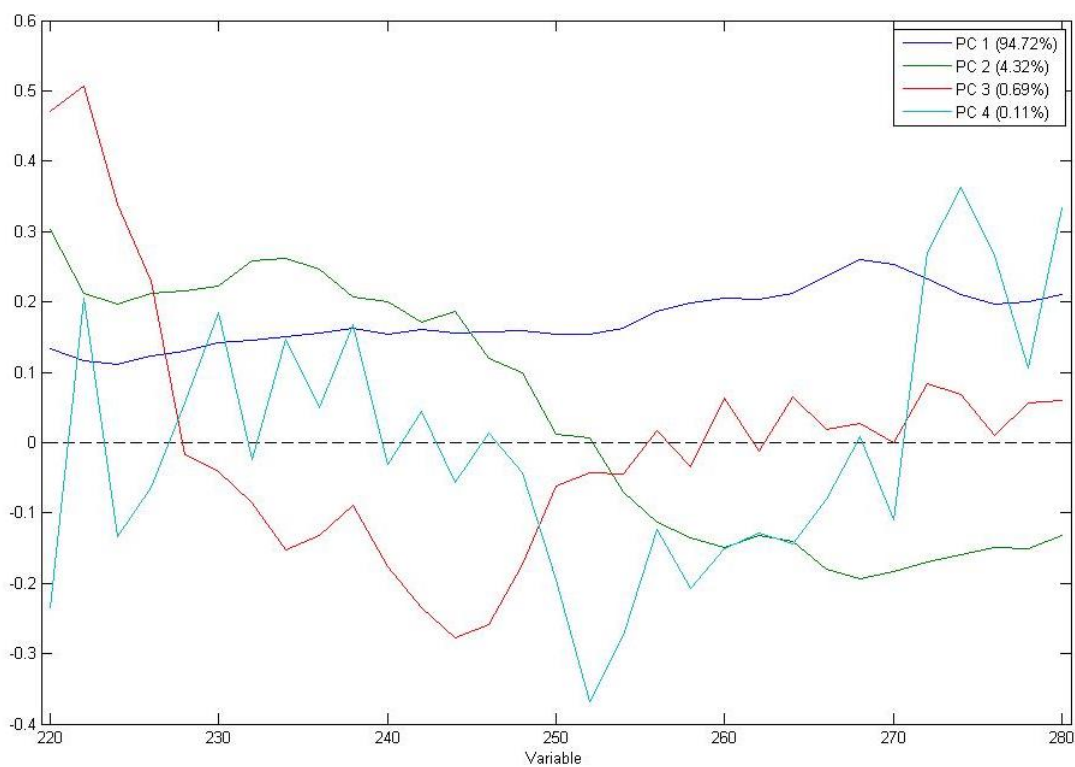
Σε αυτό το τμήμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε κάθε μια από τις 5 περιοχές για τα 4 διαφορετικά σπορέλαια. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης που αφορά τις σειρές νοθείας με ηλιέλαιο, σογιέλαιο, αραβοσιτέλαιο και πυρηνέλαιο για την υπεριώδη (220-280 nm και 260-400nm), την ορατή (400-800nm) και την εγγύς υπέρυθρη (800-1600nm και 1800-2200nm) περιοχή. Η μέθοδος στατιστικής ανάλυσης που επιλέχθηκε είναι η PCR (Principal Components Regression). Τα δεδομένα αυτά έχουν ήδη αναλυθεί και με την μέθοδο PLS Regression (Partial Least Squares Regression) στο πλαίσιο πτυχιακής εργασίας που εκπονήθηκε στο εργαστήριο.

## UV1: 220-280 nm

### Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA



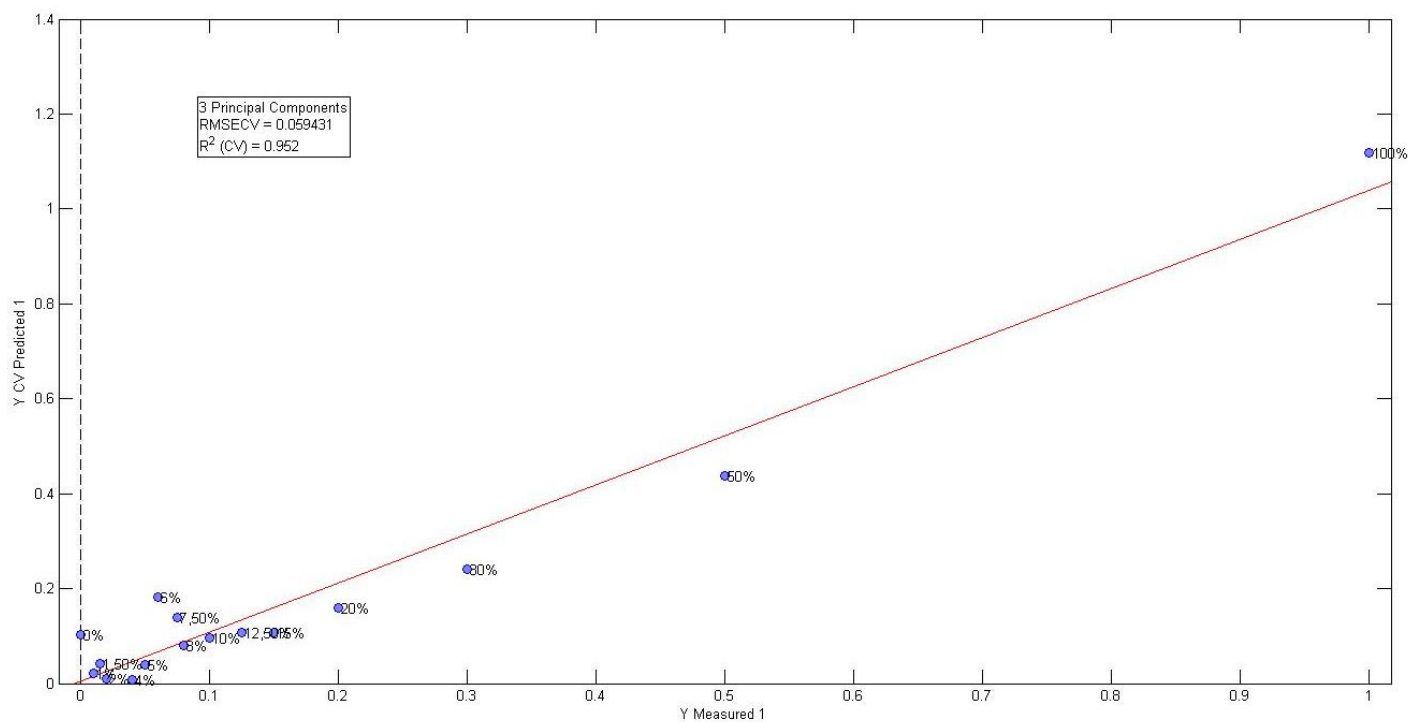
Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% αραβοσιτέλαιο



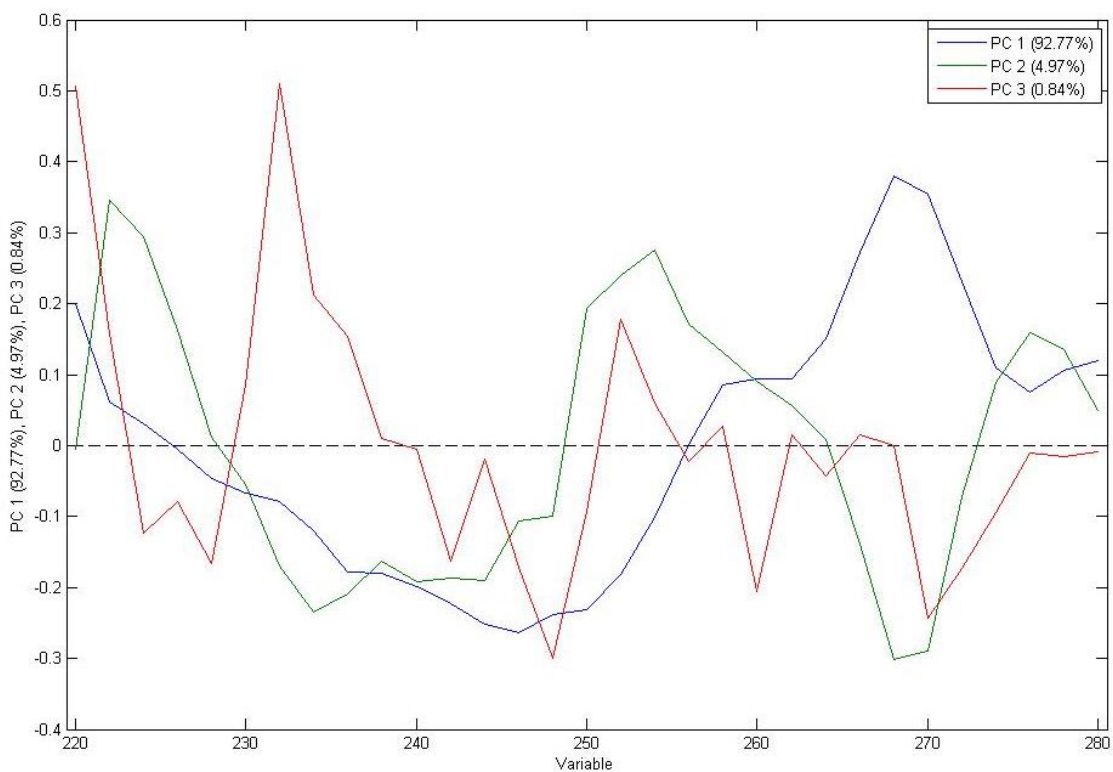
Εικόνα 5.2.21: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA στα 220-280 nm



# Ηλιέλαιο- ΕVOOA

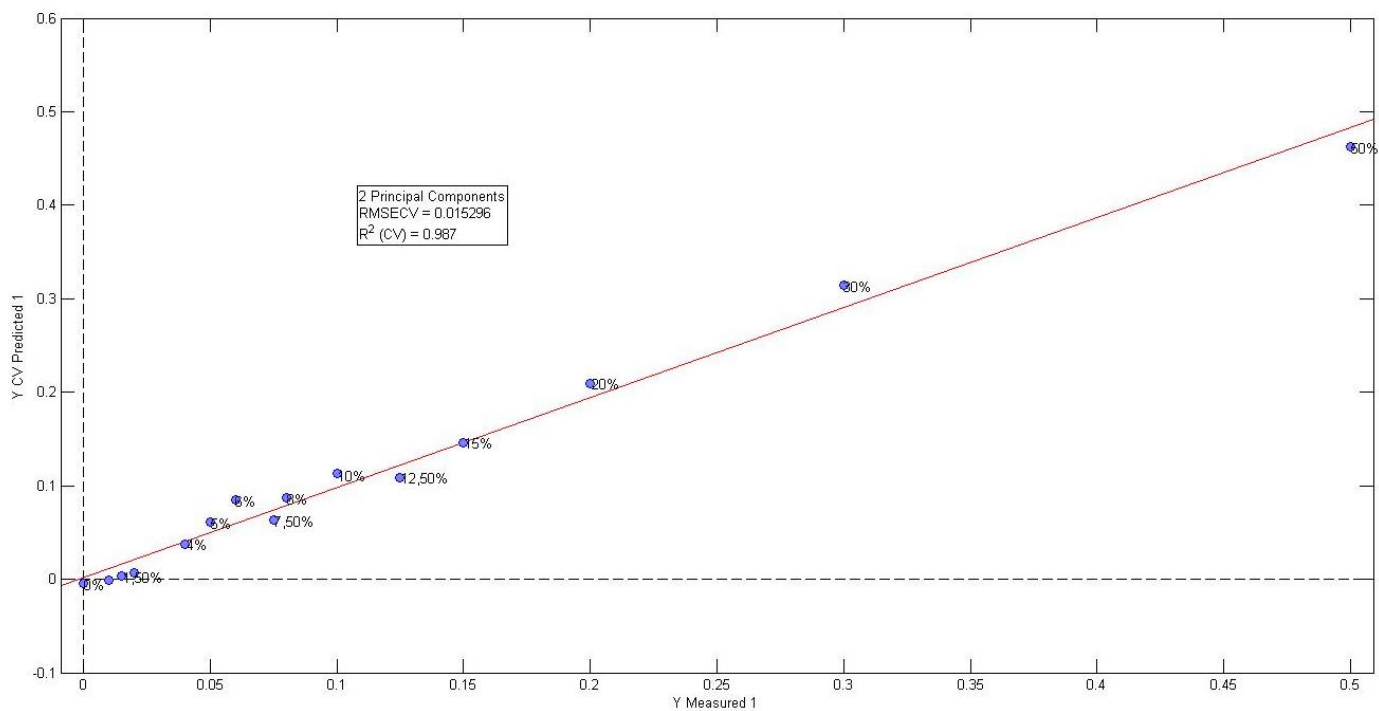


## Προεπεξεργασία: SNV, Mean Center, -100% ηλιέλαιο

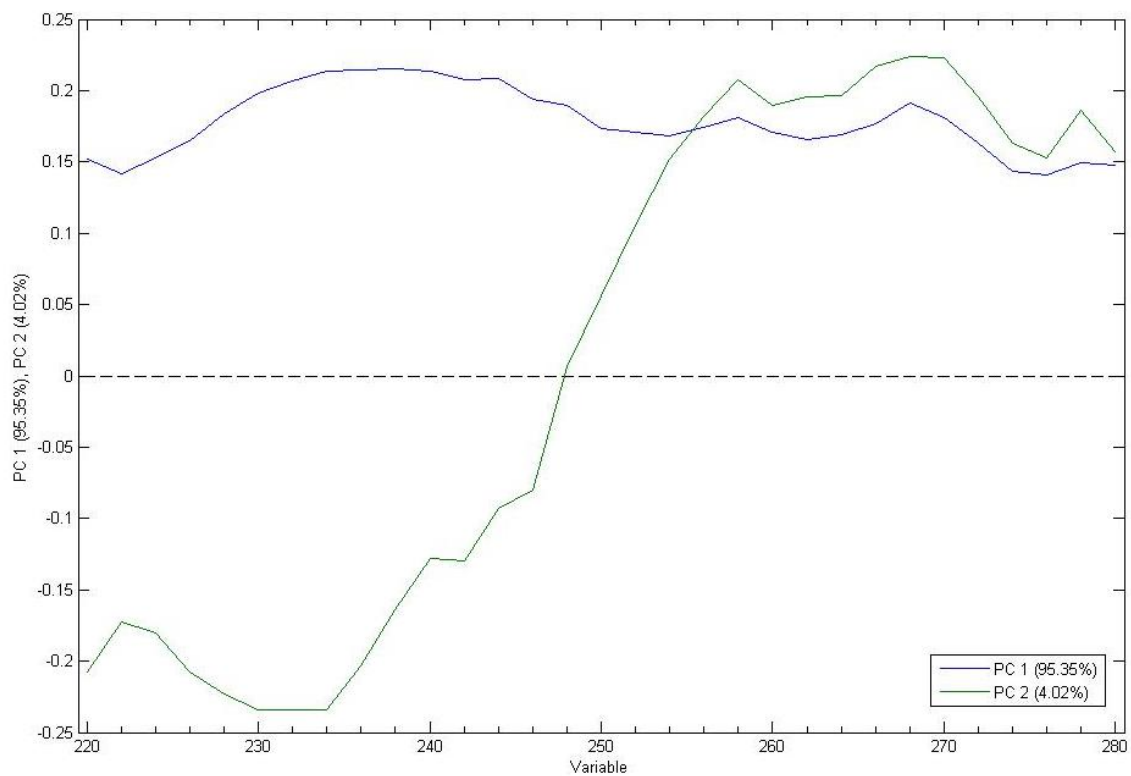


Εικόνα 5.2.22: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Ηλιέλαιο- ΕVOOA στα 220-280 nm

## Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

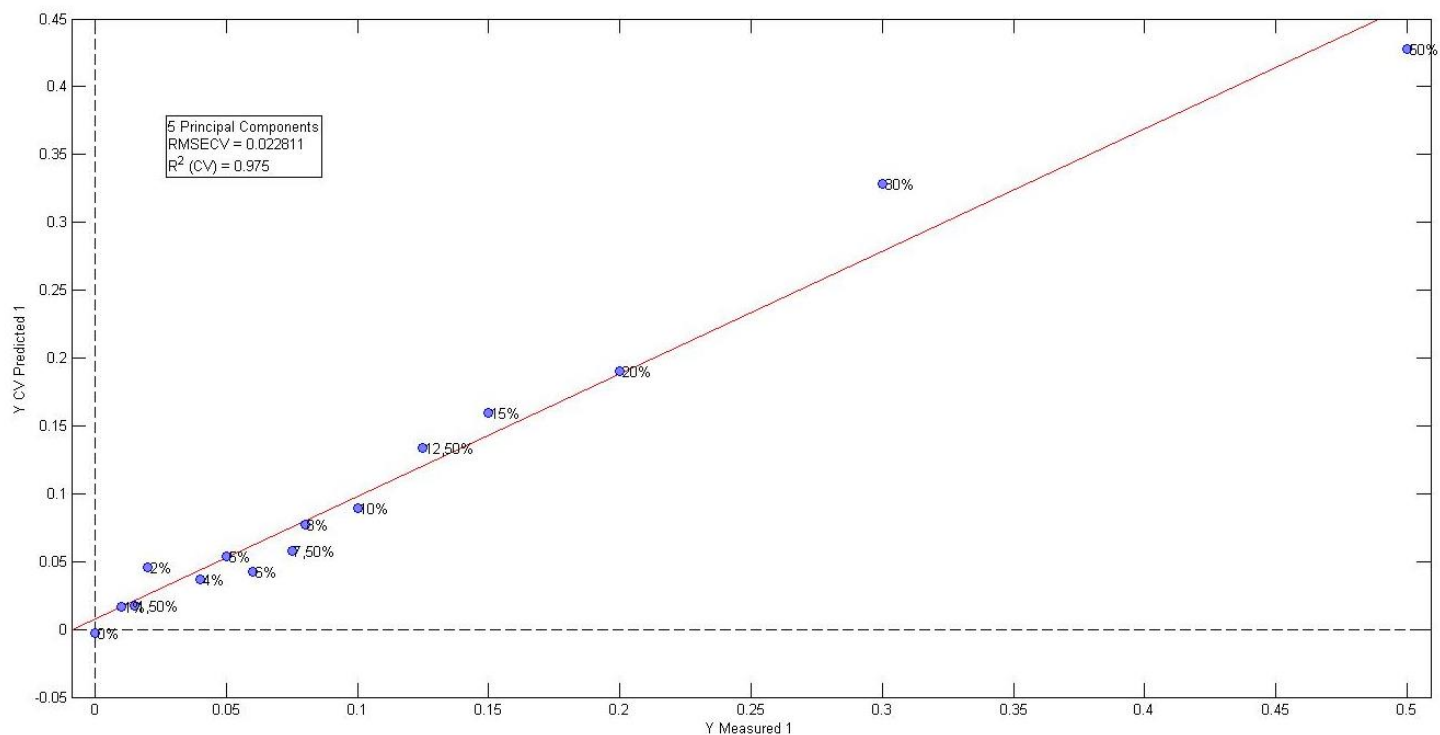


Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% σογιέλαιο

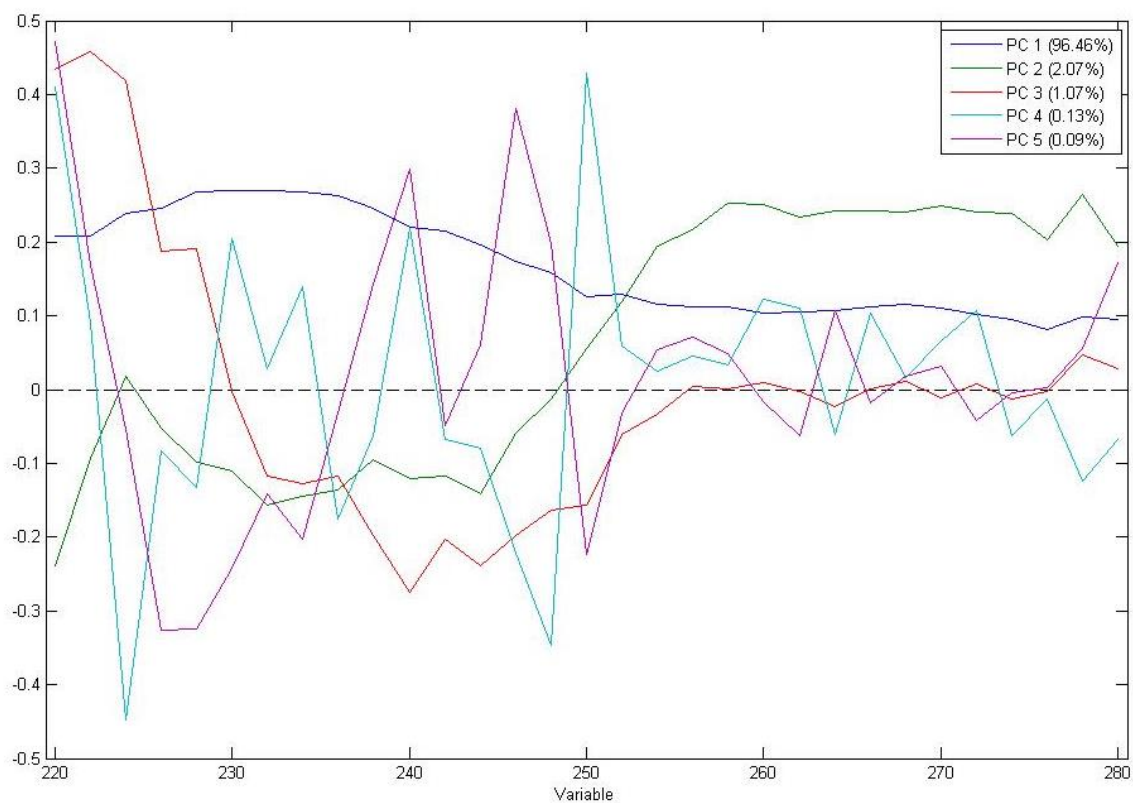


Εικόνα 5.2.23: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 220-280 nm

## Πυρηνέλαιο- ΕVOOA



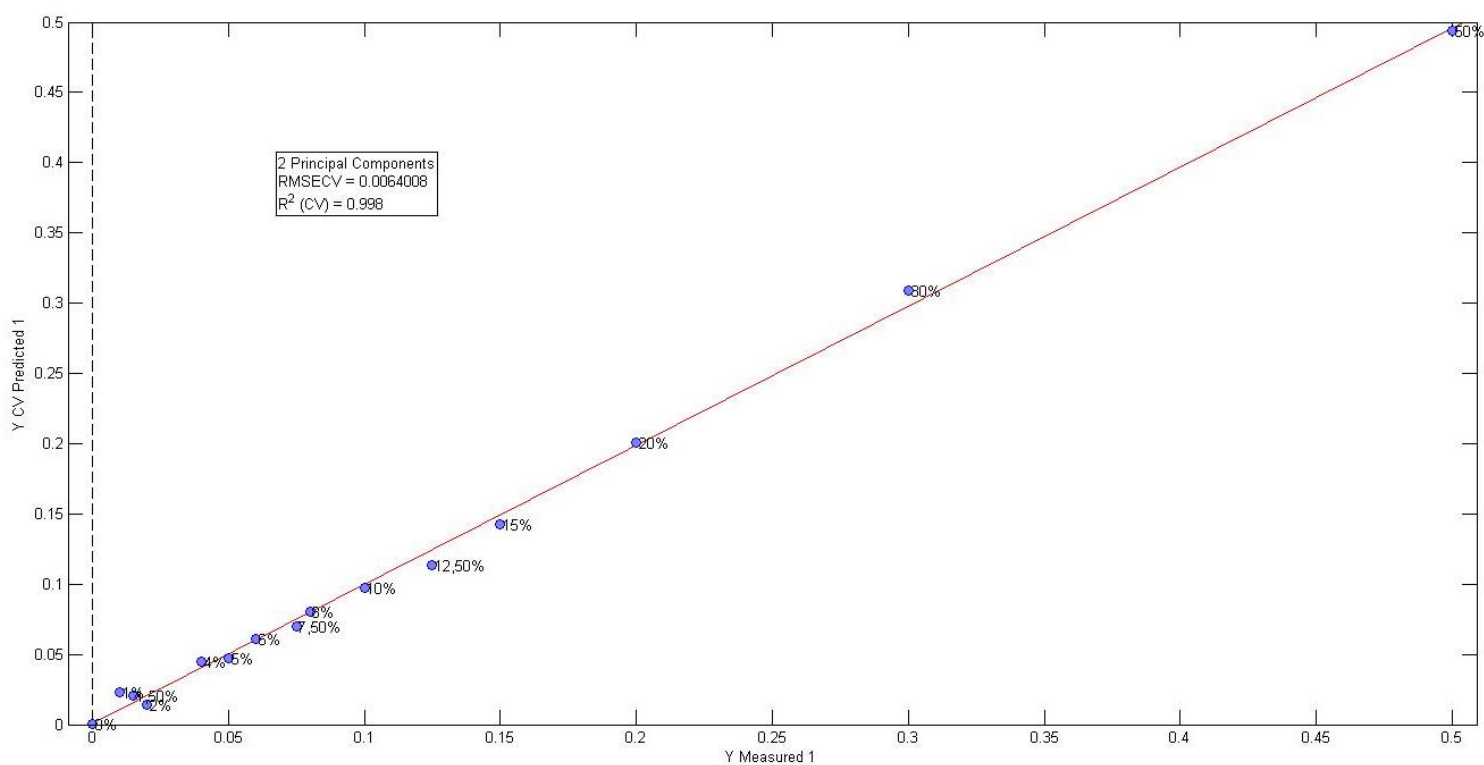
## Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% πυρηνέλαιο



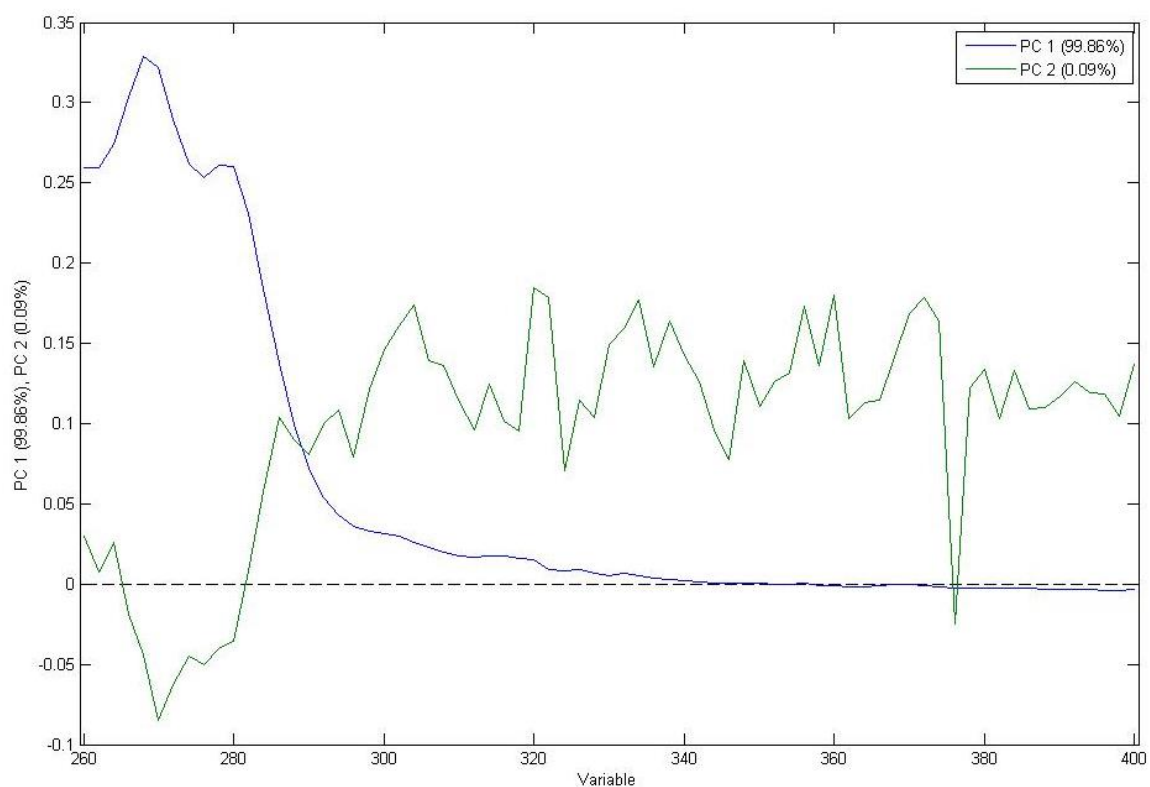
Εικόνα 5.2.24: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πυρηνέλαιο- ΕVOOA στα 220-280 nm

## UV2: 260-400 nm

### Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA

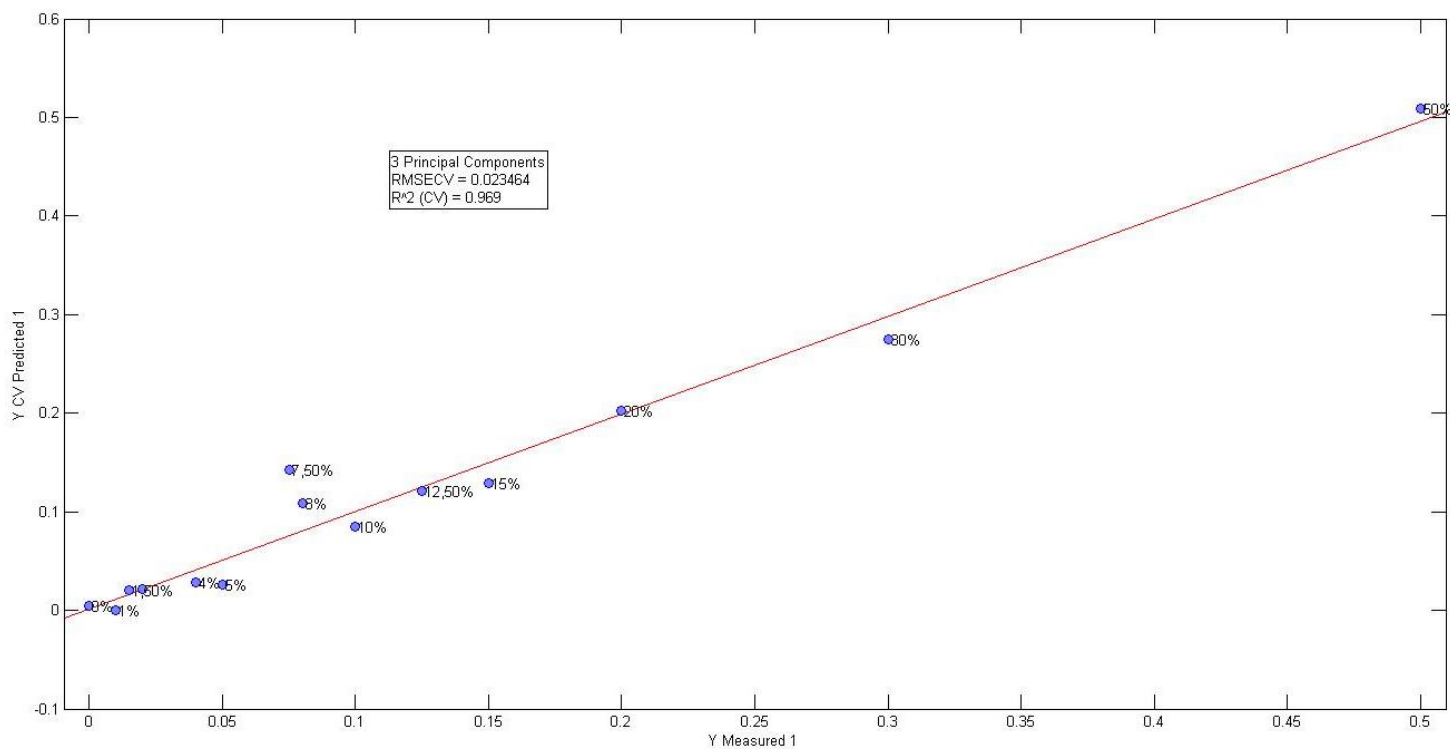


Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% αραβοσιτέλαιο

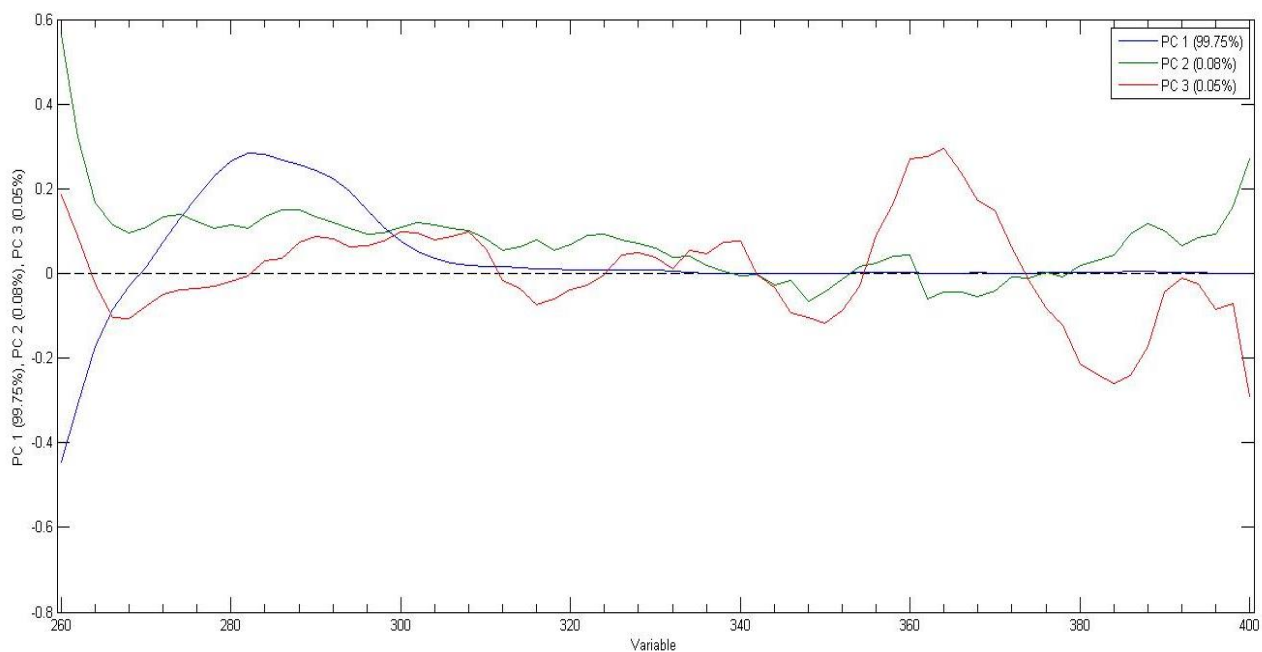


Εικόνα 5.2.25: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA στα 260-410 nm

## Ηλιέλαιο- ΕVOOA

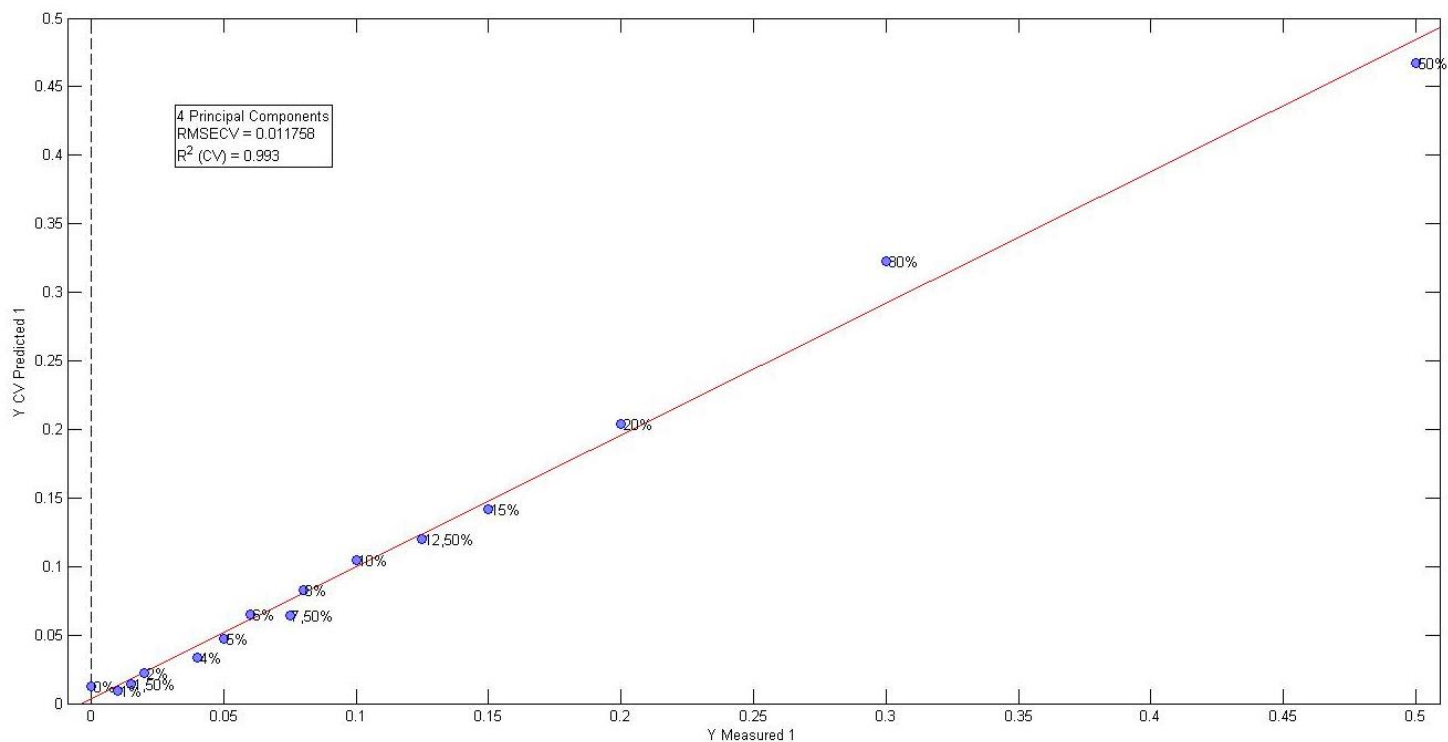


Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -6%, -100% ηλιέλαιο

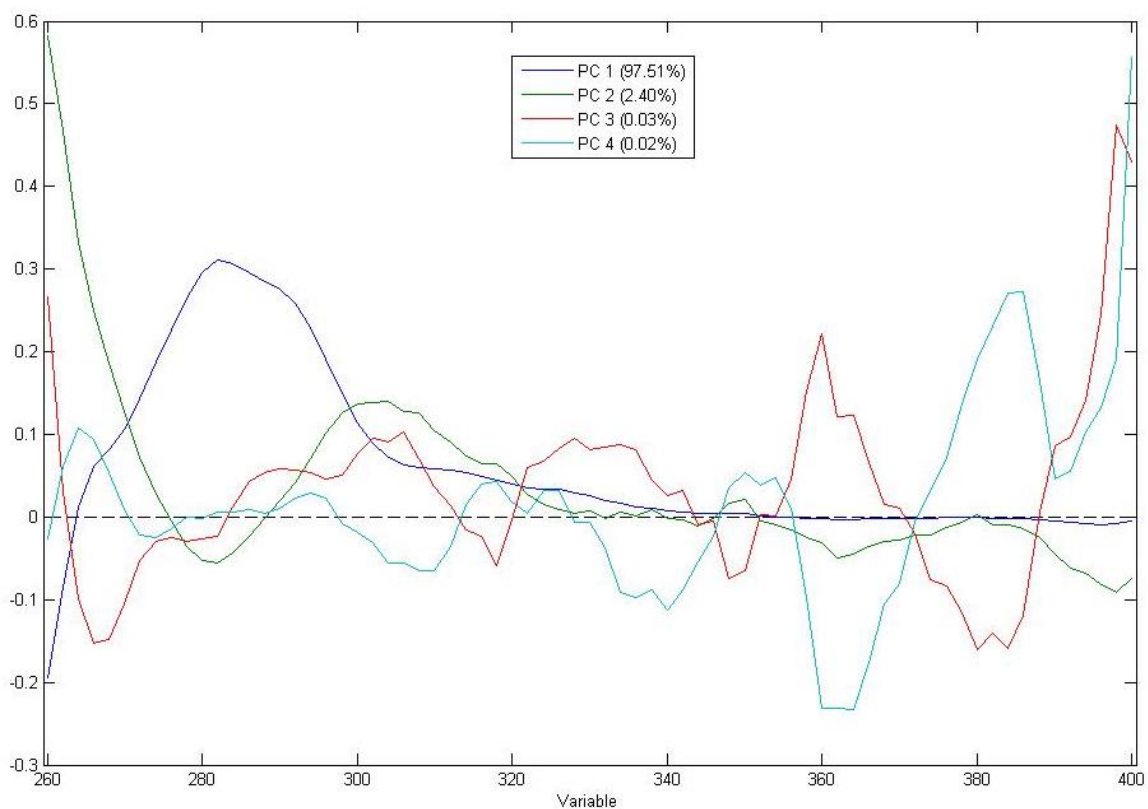


Εικόνα 5.2.26: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Ηλιέλαιο- ΕVOOA στα 260-410 nm

## Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

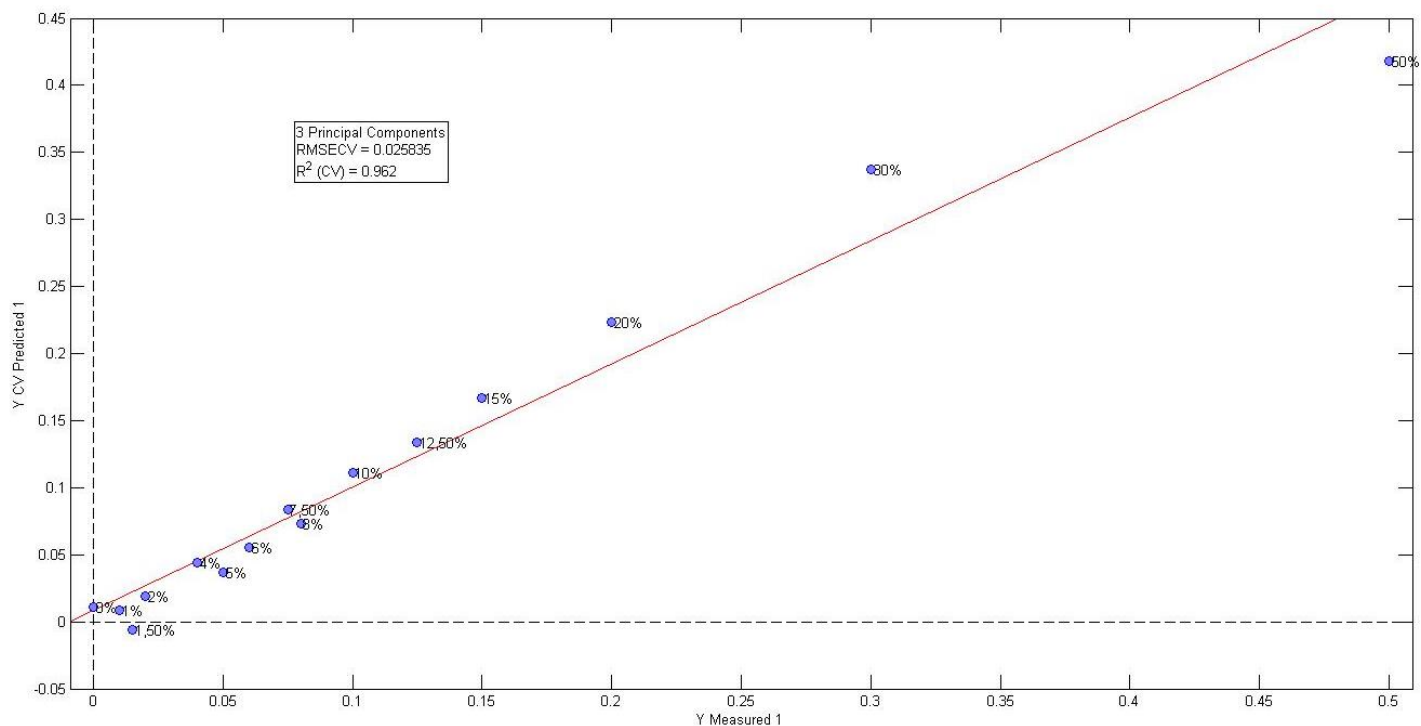


### Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, -100% σογιέλαιο

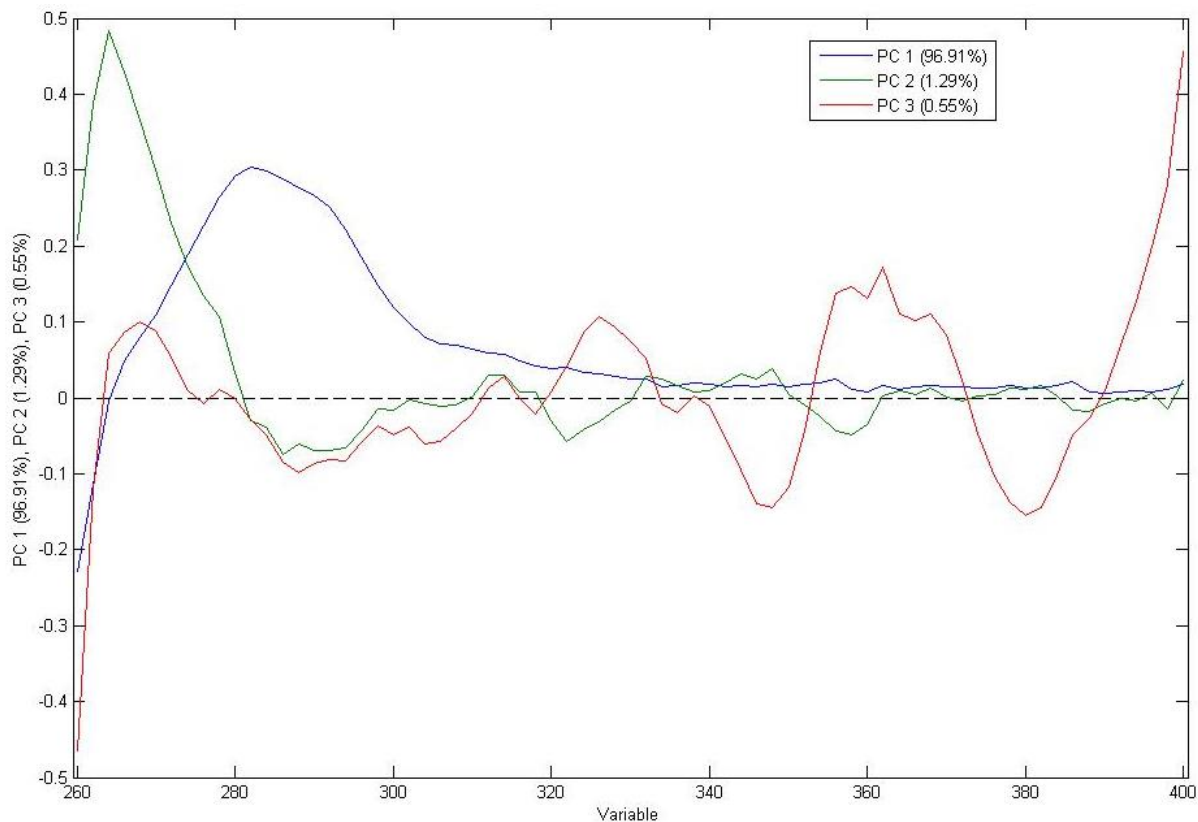


Εικόνα 5.2.27: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 260-410 nm

## Πυρηνέλαιο- ΕVOOA



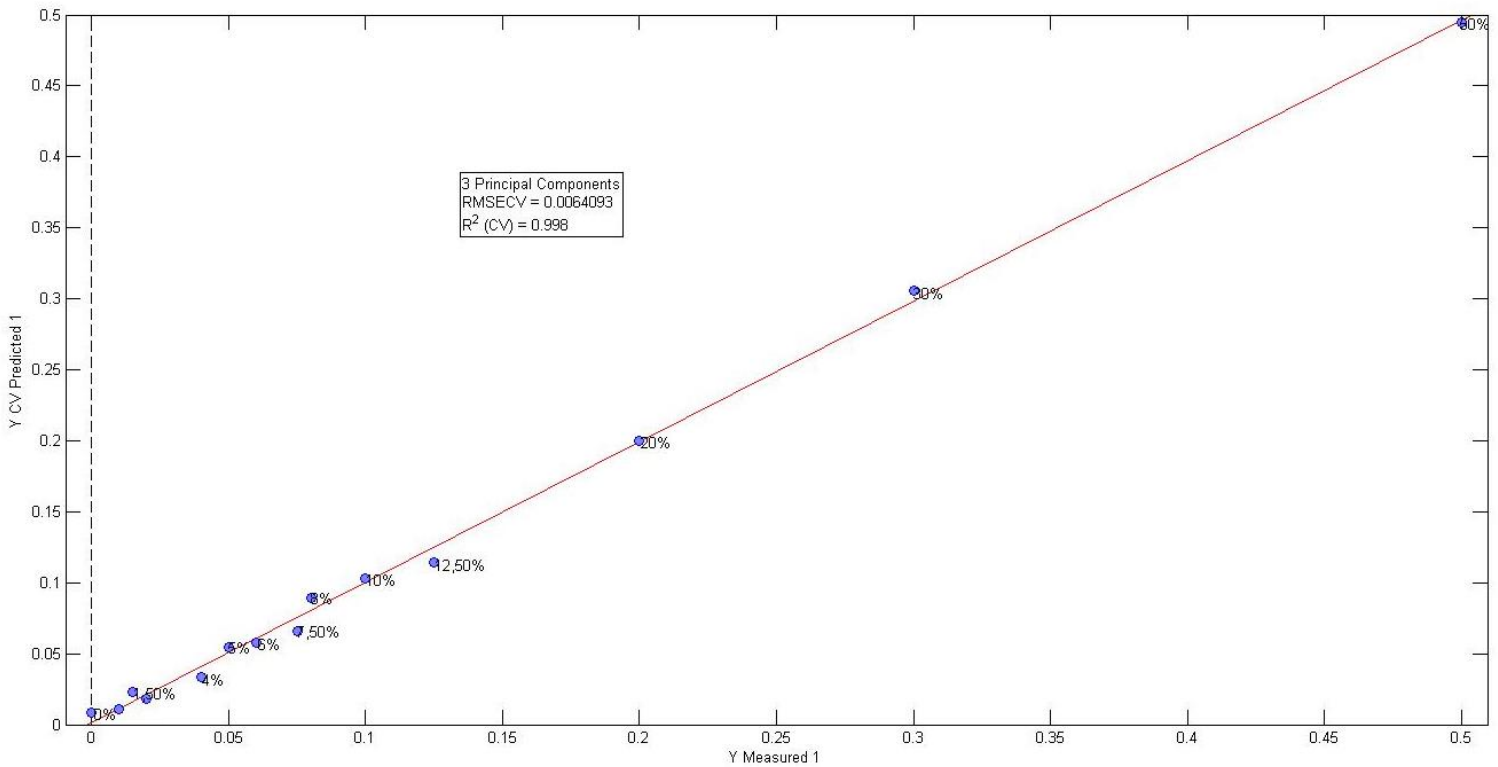
### Προπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -100% πυρηνέλαιο



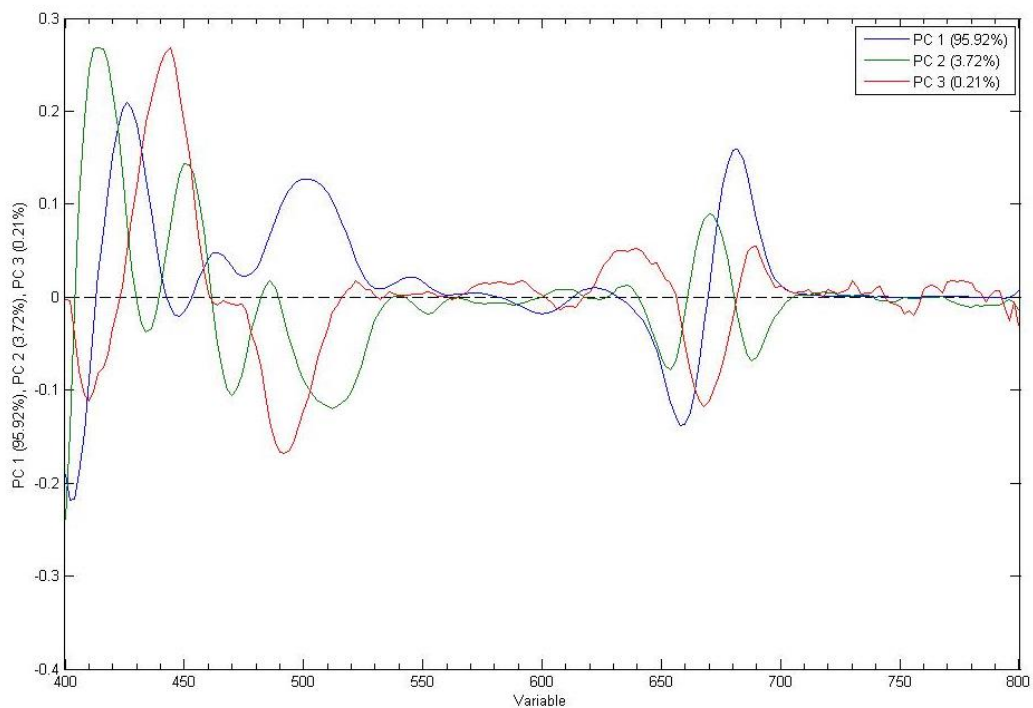
Εικόνα 5.2.28: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πυρηνέλαιο- ΕVOOA στα 260-410 nm

VIS: 400-800 nm

Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA



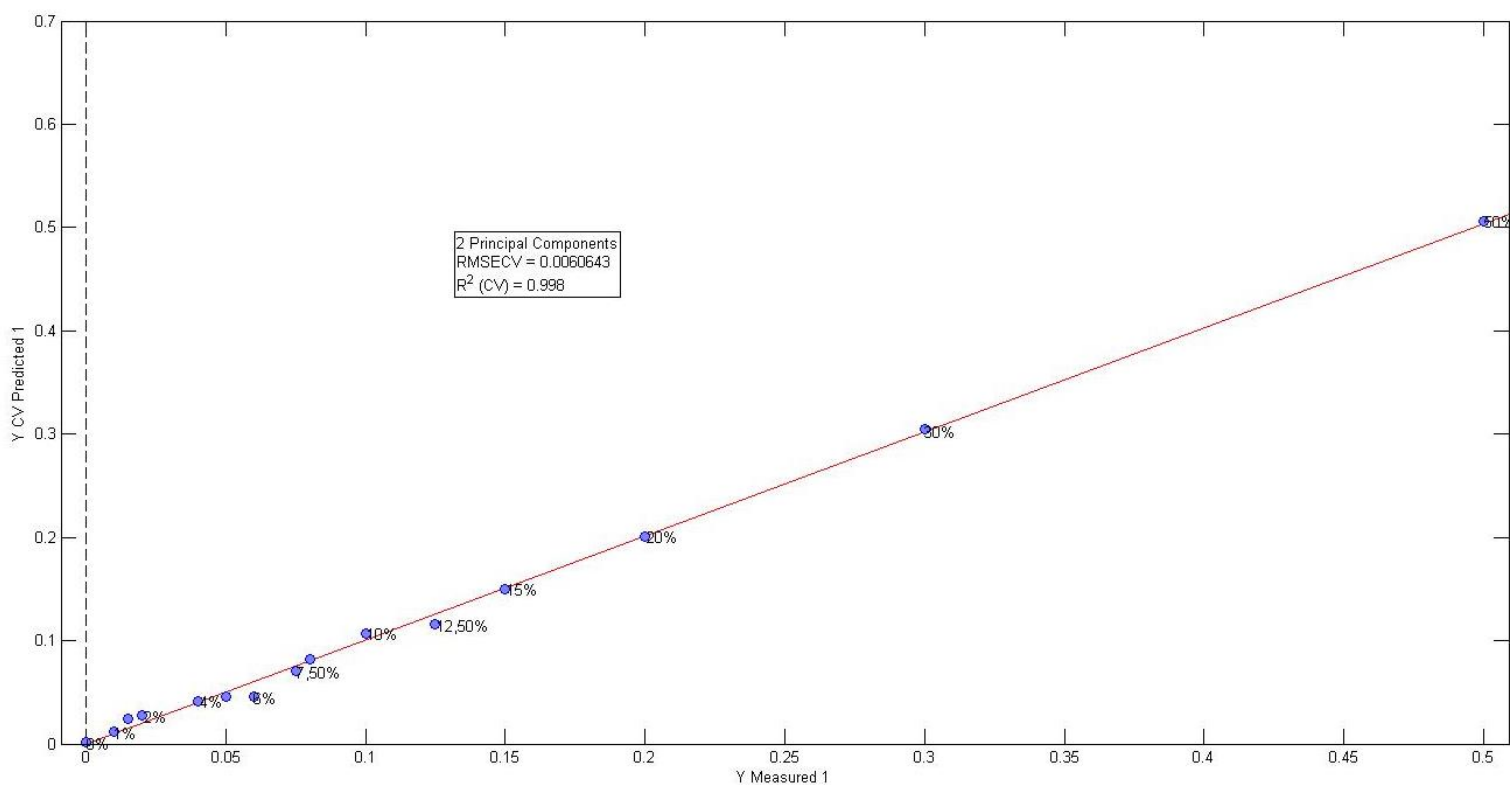
Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -100% αραβοσιτέλαιο



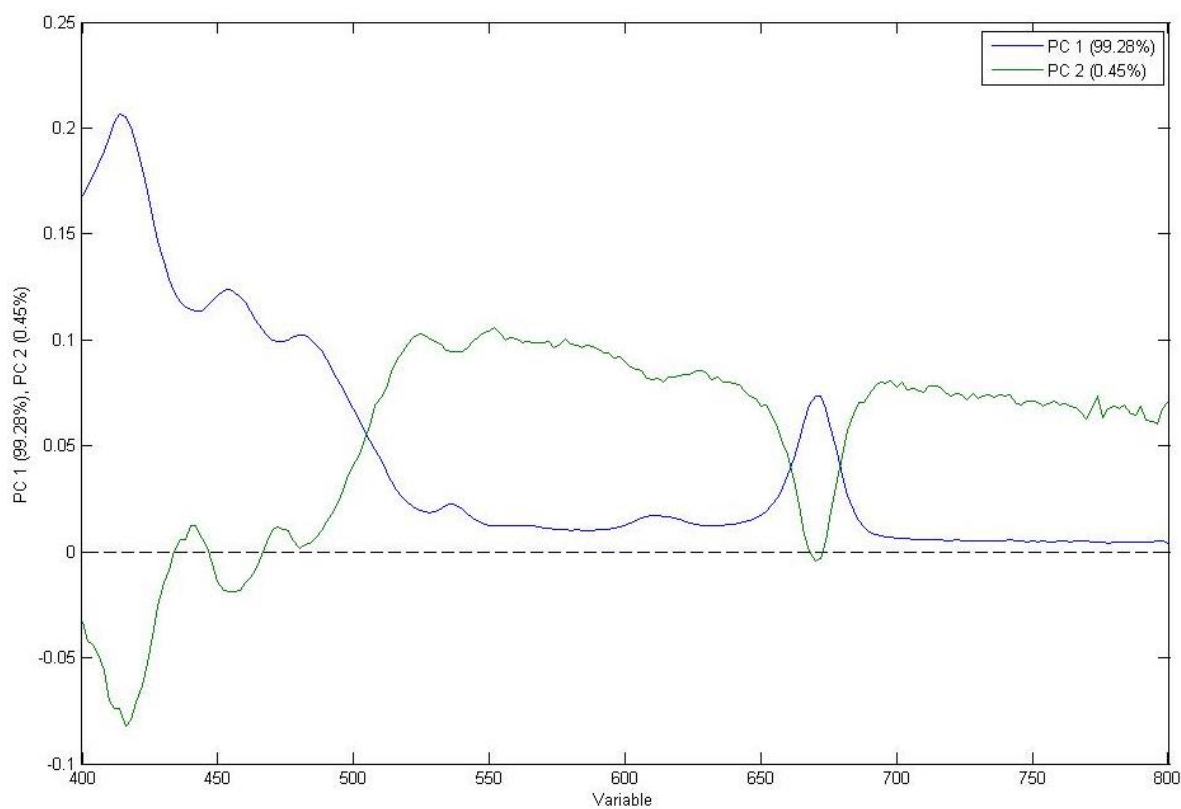
Εικόνα 5.2.29: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA στα 400-800 nm



## Ηλιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

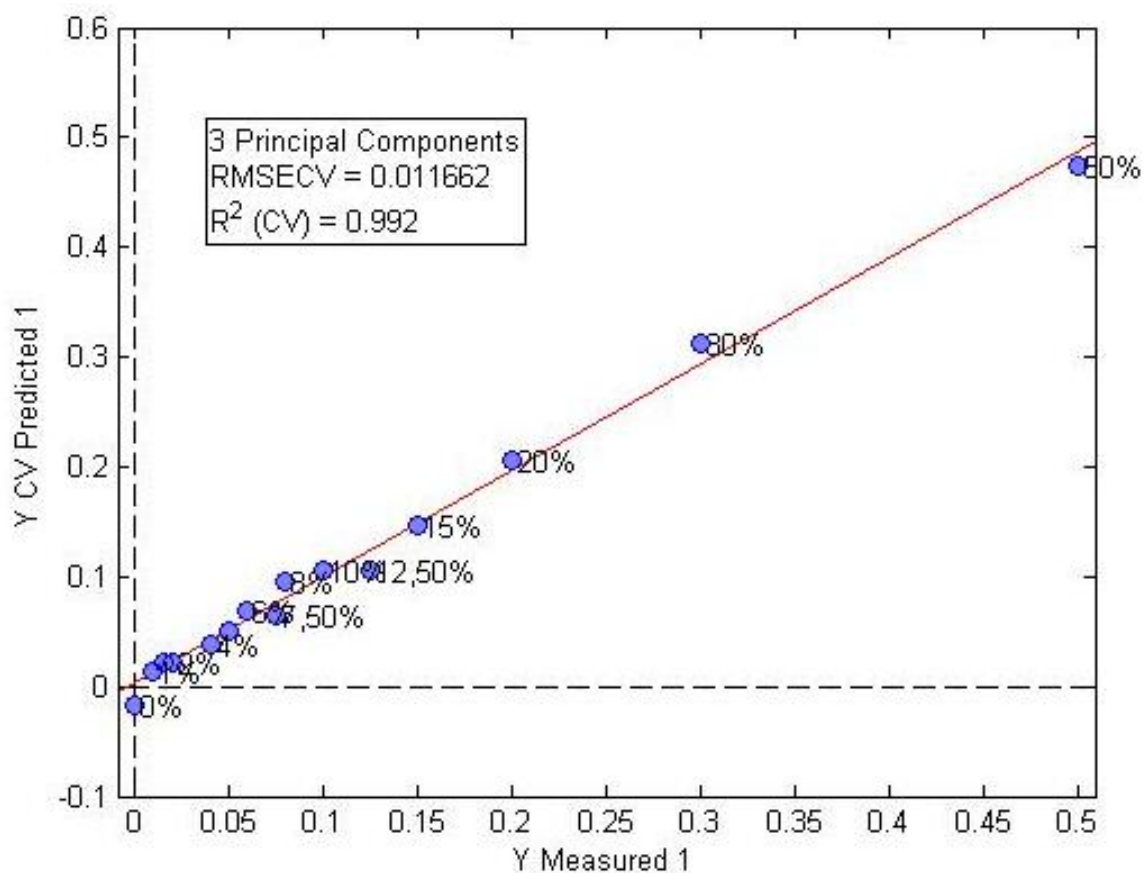


### Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% ηλιέλαιο

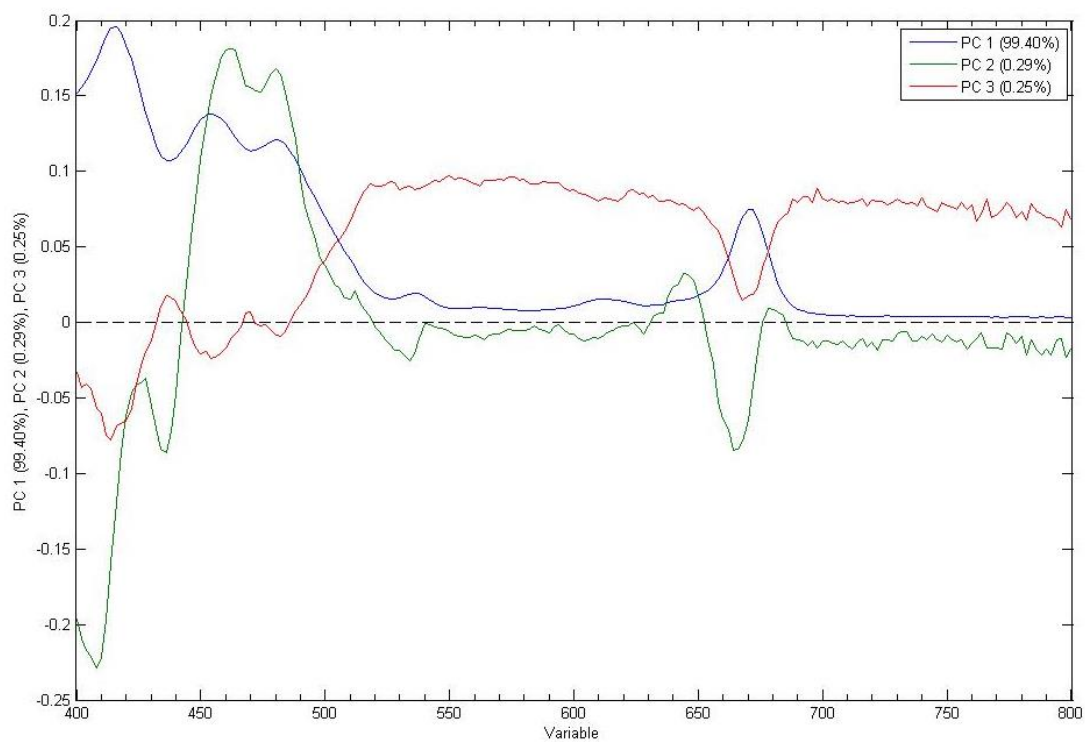


Εικόνα 5.2.30: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Ηλιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 400-800 nm

## Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

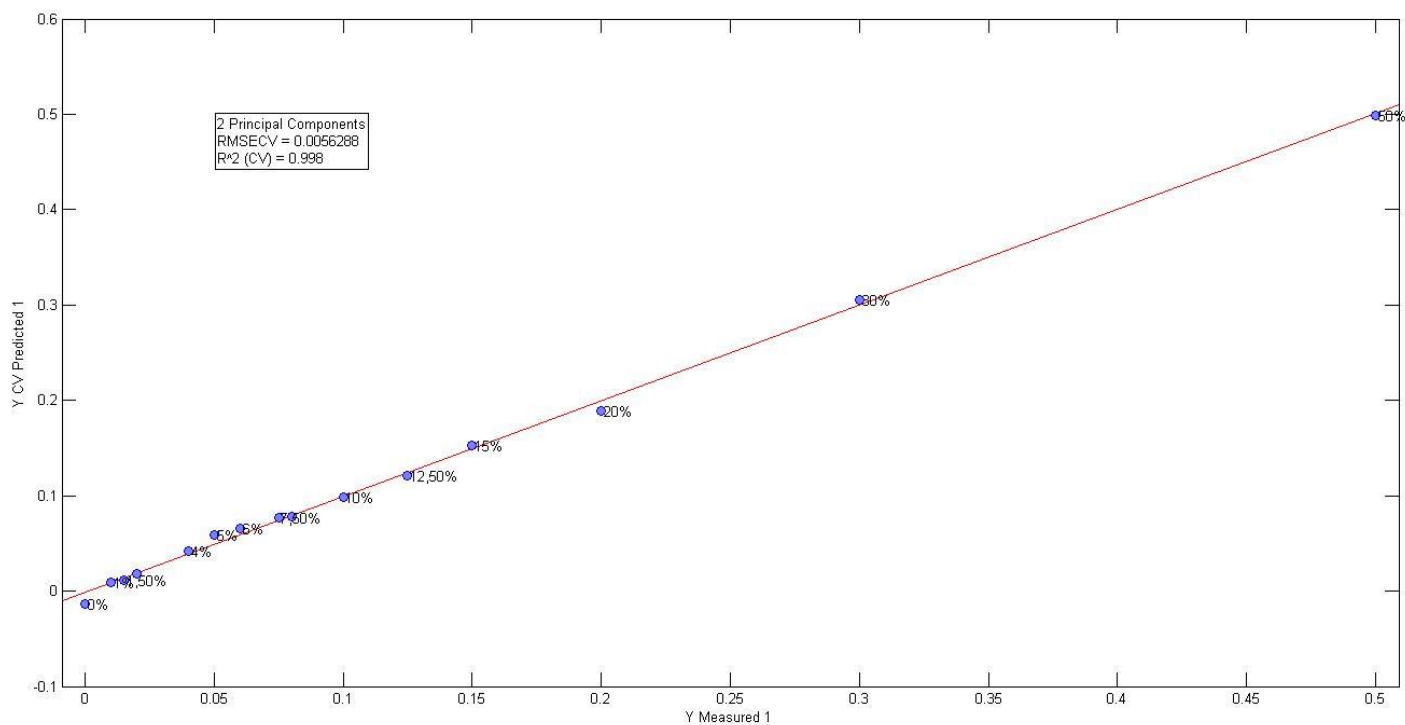


Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% σογιέλαιο

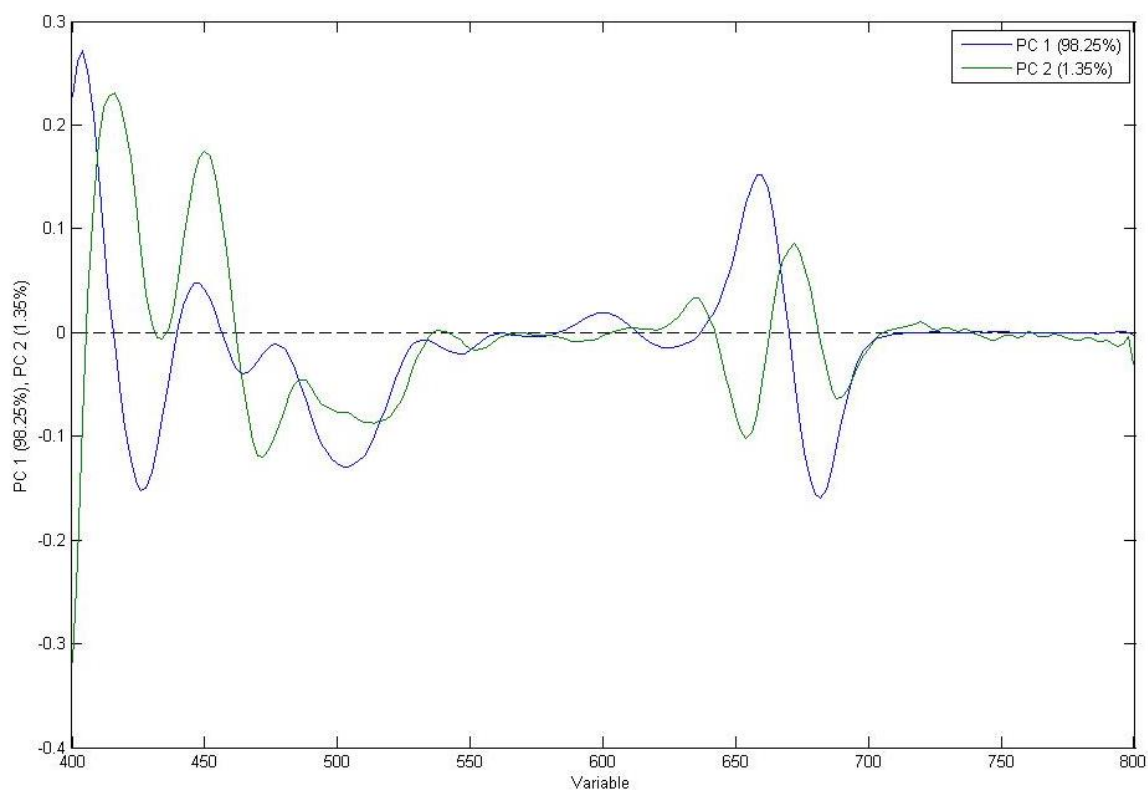


Εικόνα 5.2.31: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 400-800 nm

## Πυρηνέλαιο- ΕVOOA



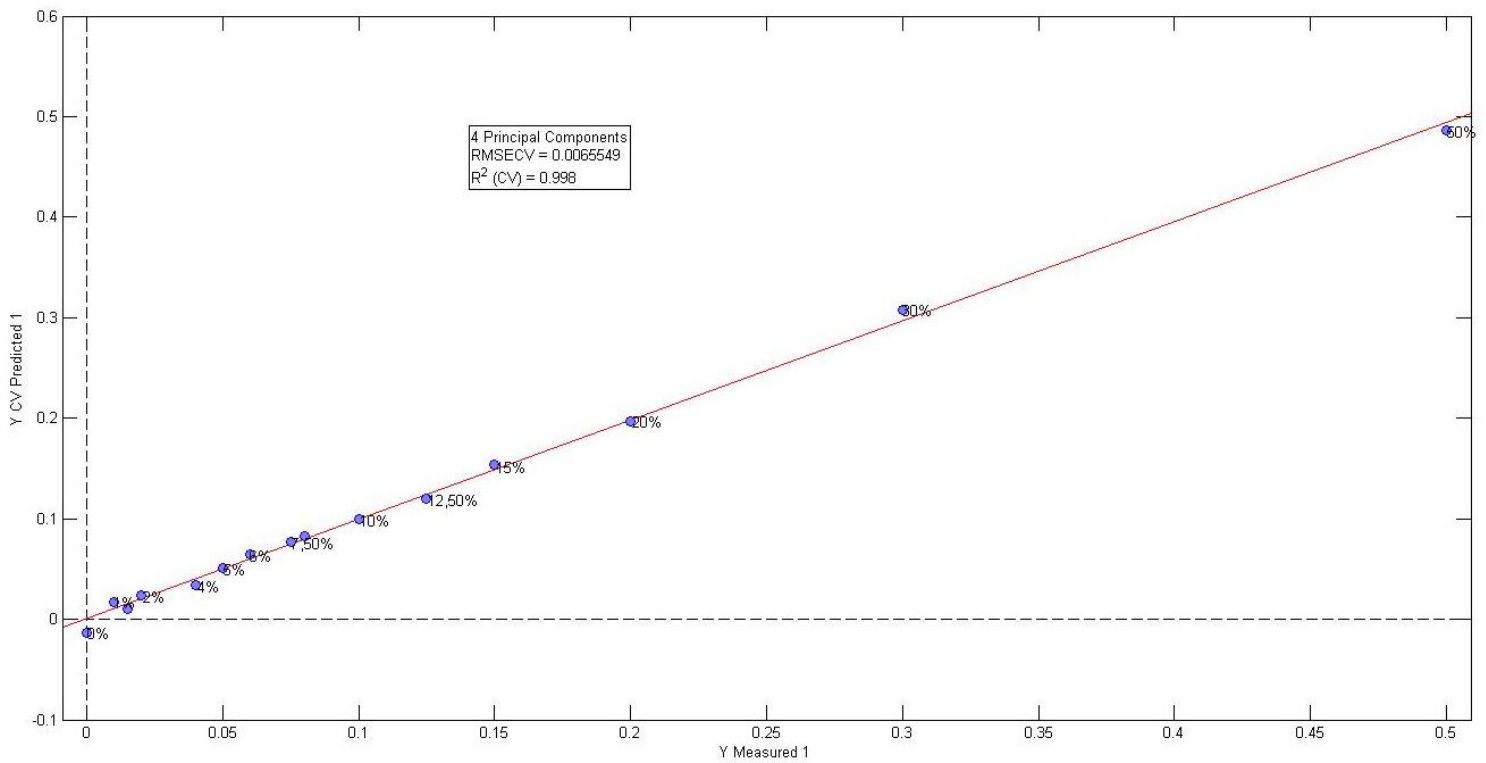
Προπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -100% πυρηνέλαιο



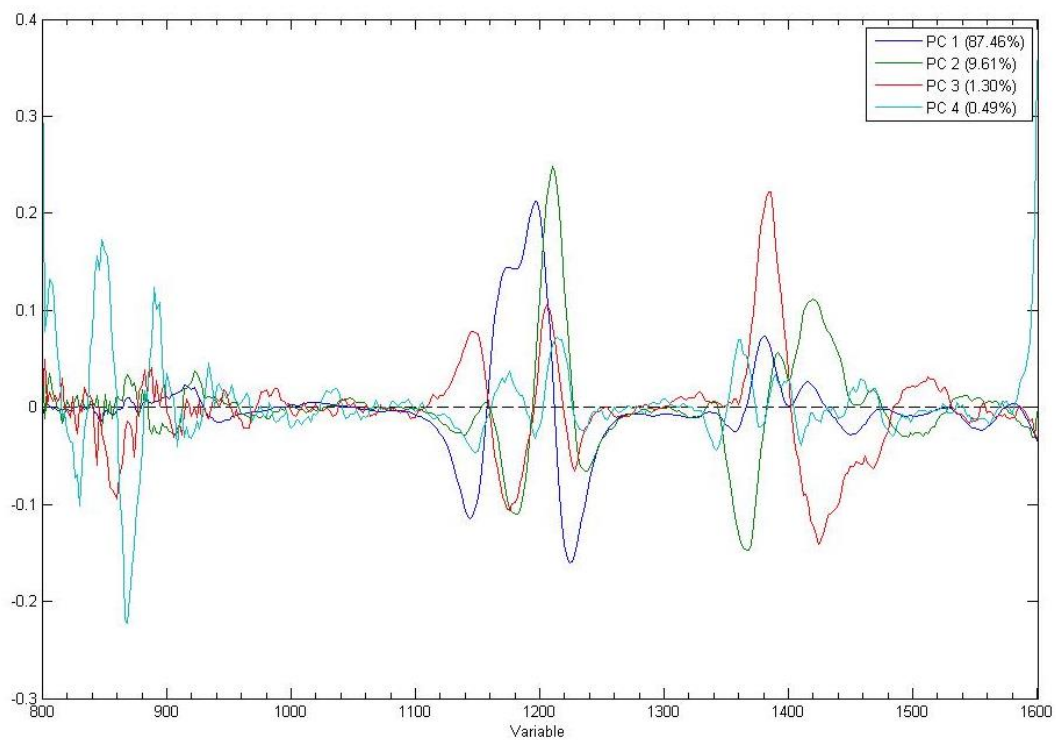
Εικόνα 5.2.32: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πυρηνέλαιο- ΕVOOA στα 400-800 nm

## NIR1: 800-1600 nm

### Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA

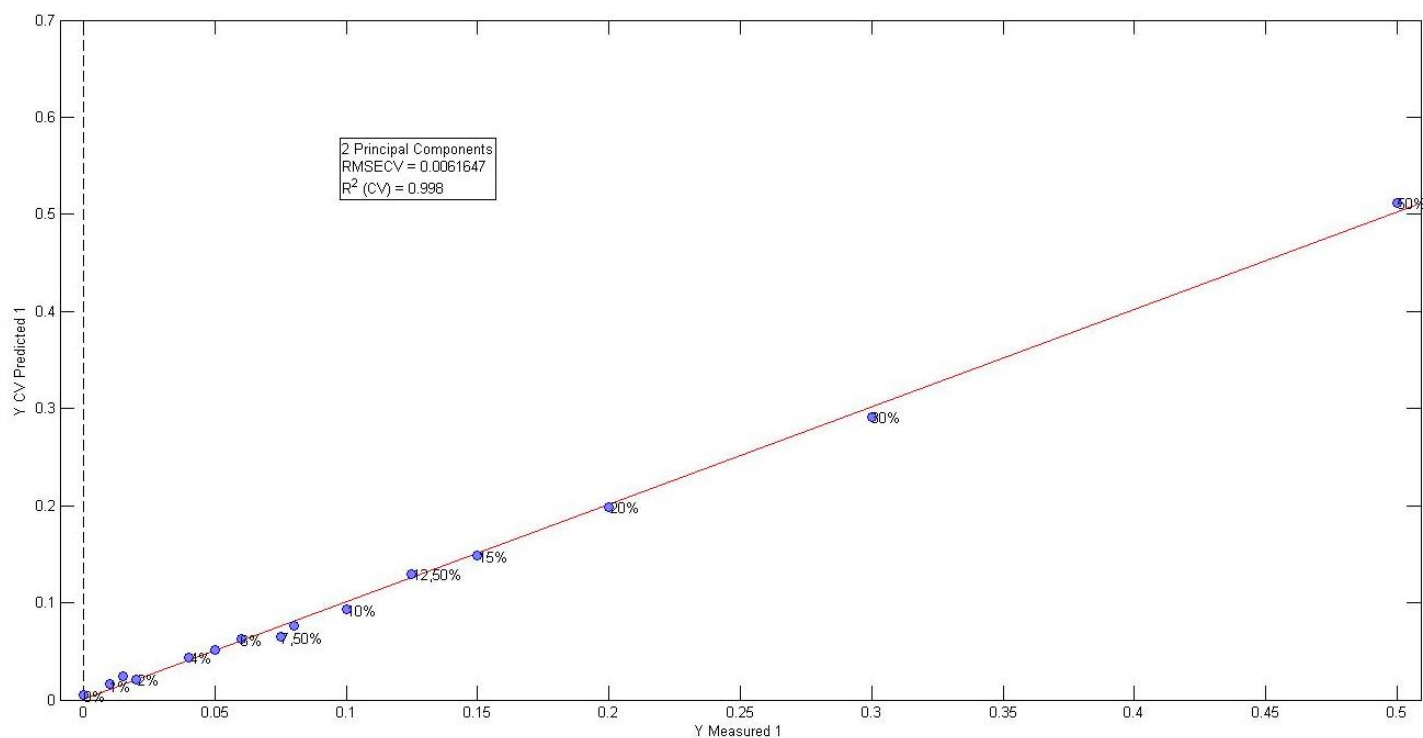


Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -100% αραβοσιτέλαιο

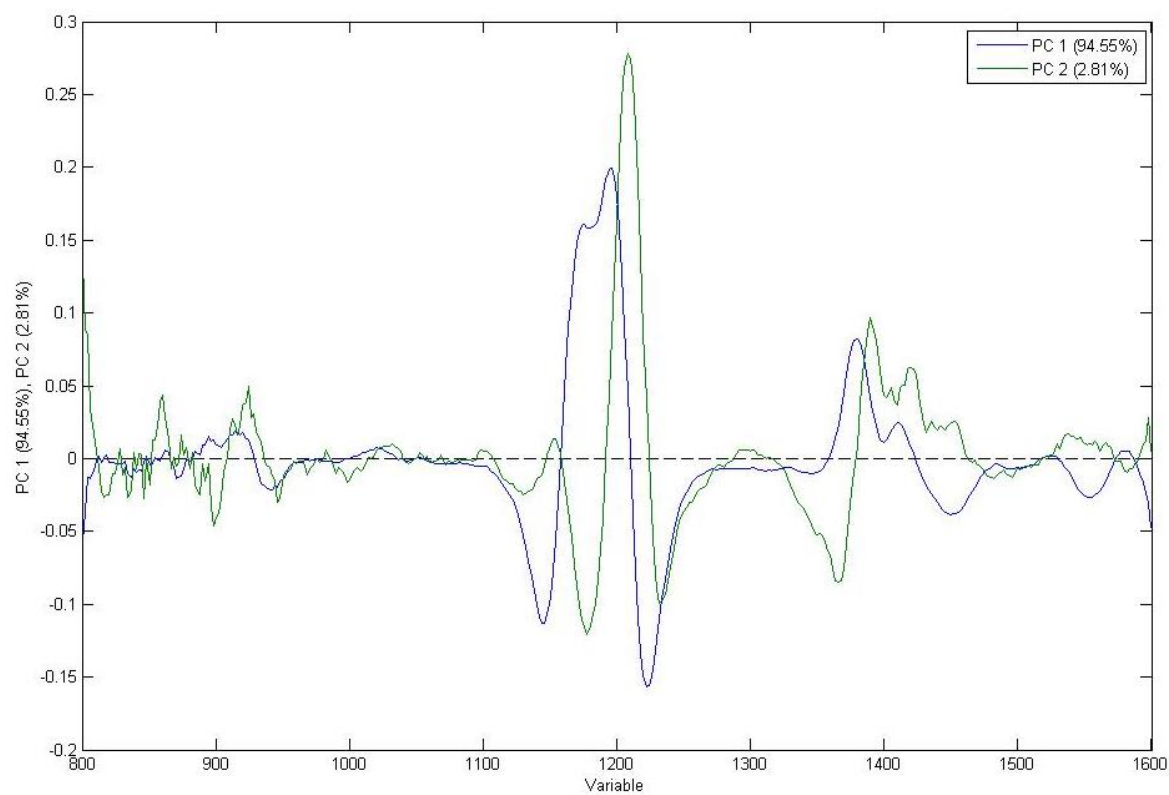


Εικόνα 5.2.33: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Αραβοσιτέλαιο- ΕVOOA στα 800-1600 nm

## Ηλιέλαιο- ΕVOOA

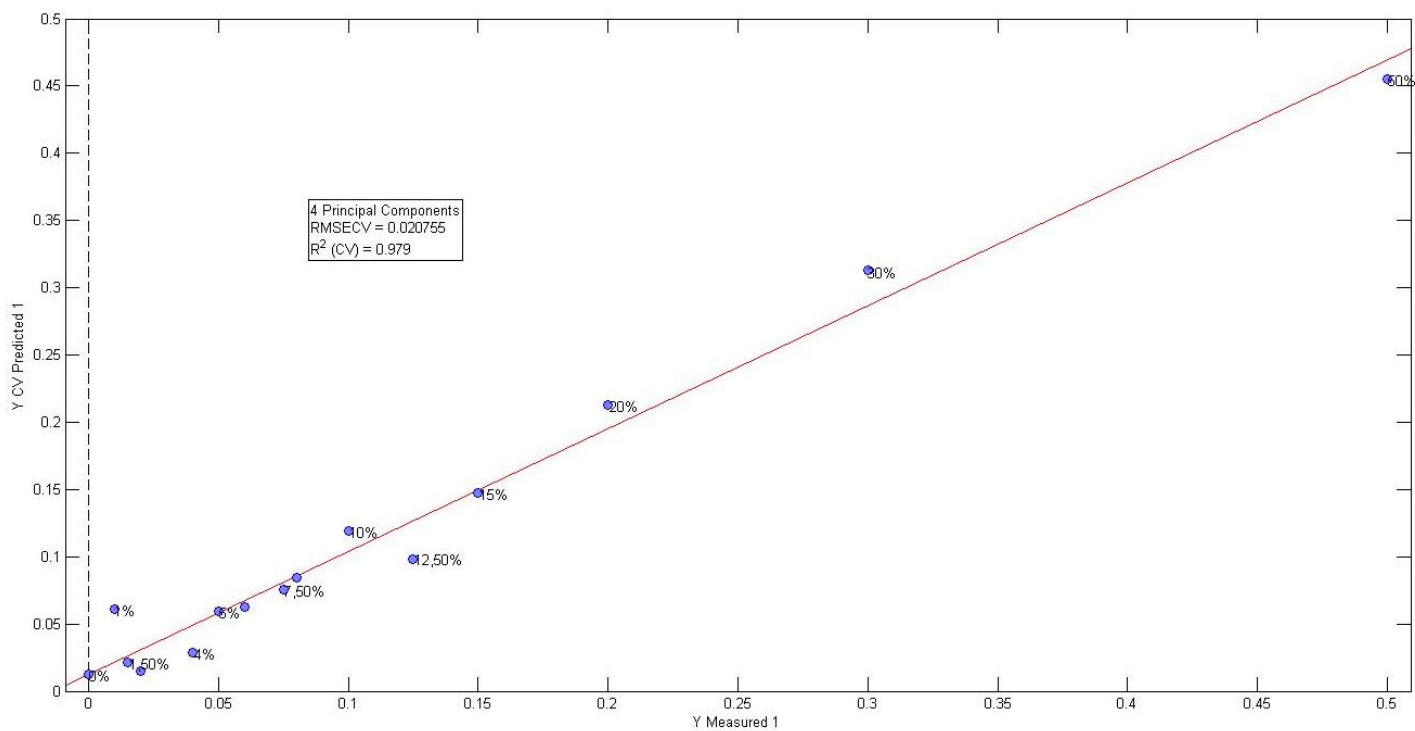


Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative , Mean Center, -100% ηλιέλαιο

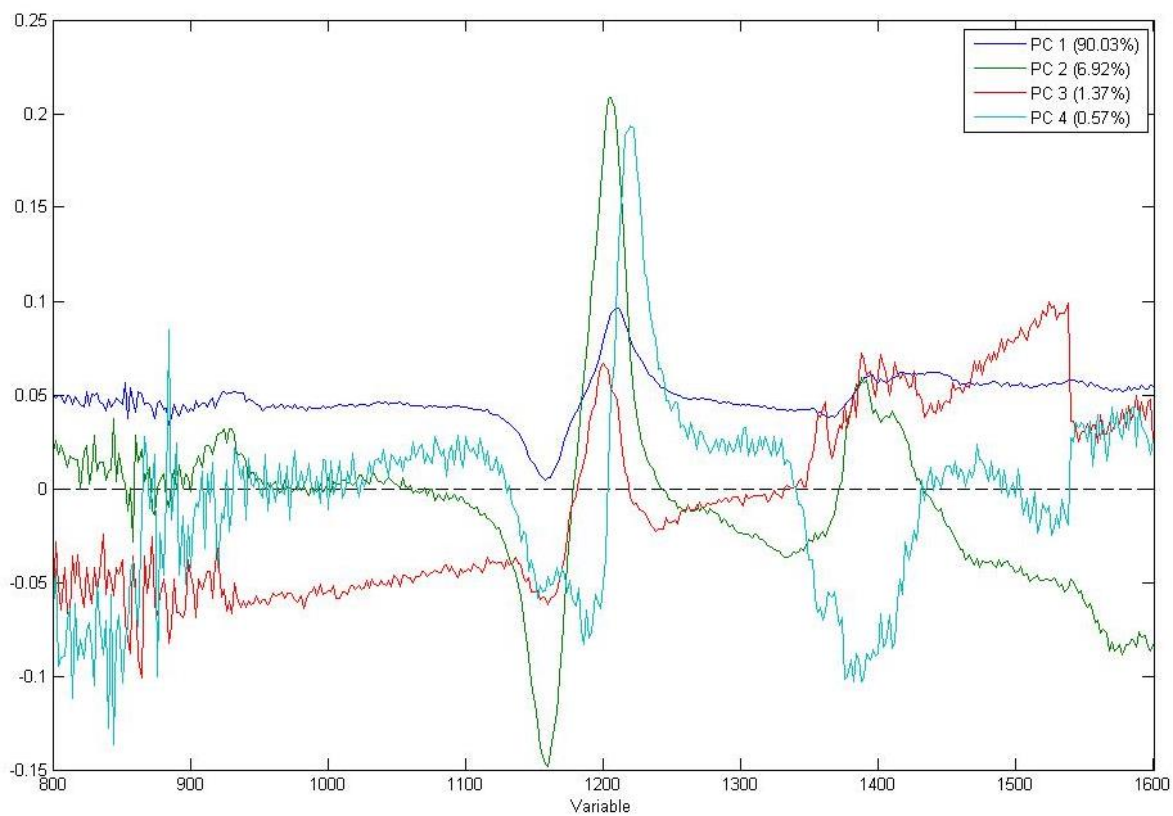


Εικόνα 5.2.34: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Ηλιέλαιο- ΕVOOA στα 800-1600 nm

## Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

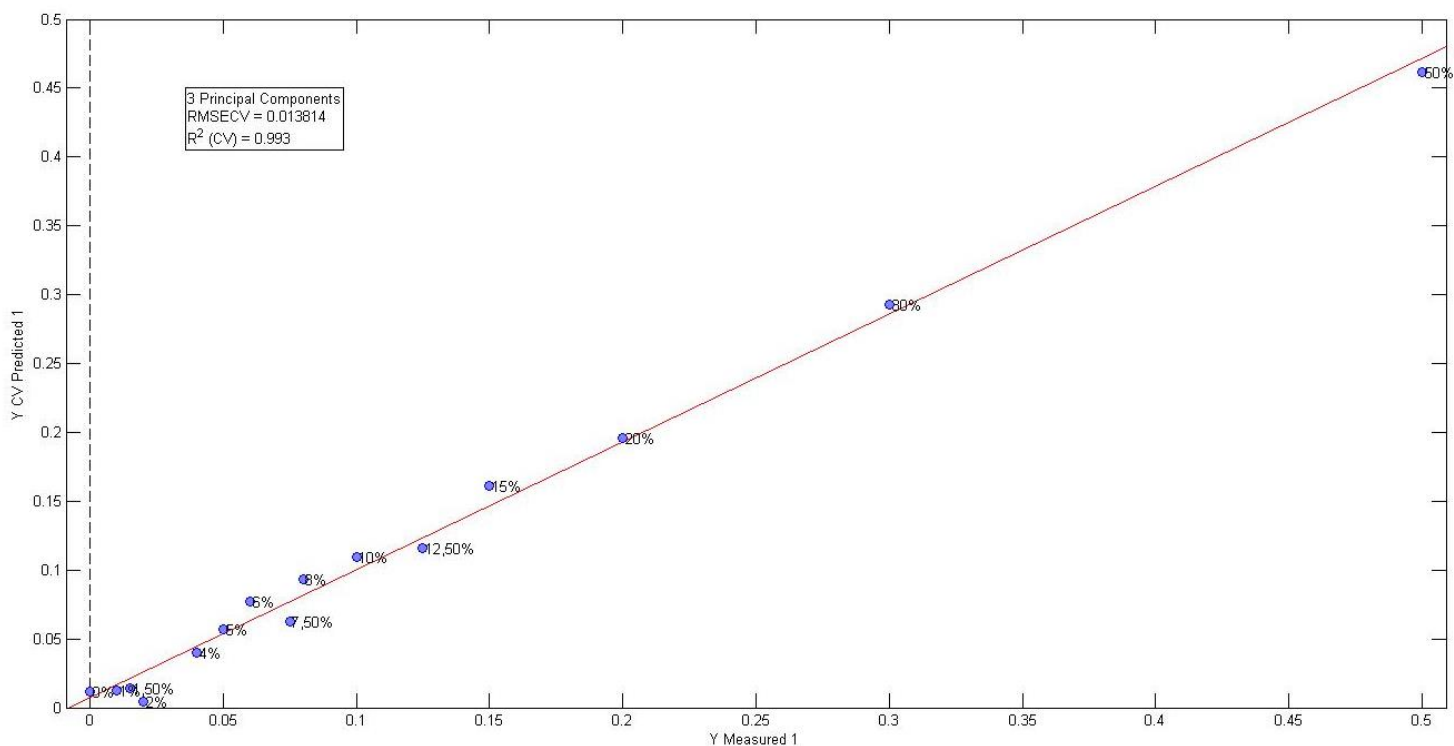


Προεπεξεργασία: Mean Center, -100% σογιέλαιο

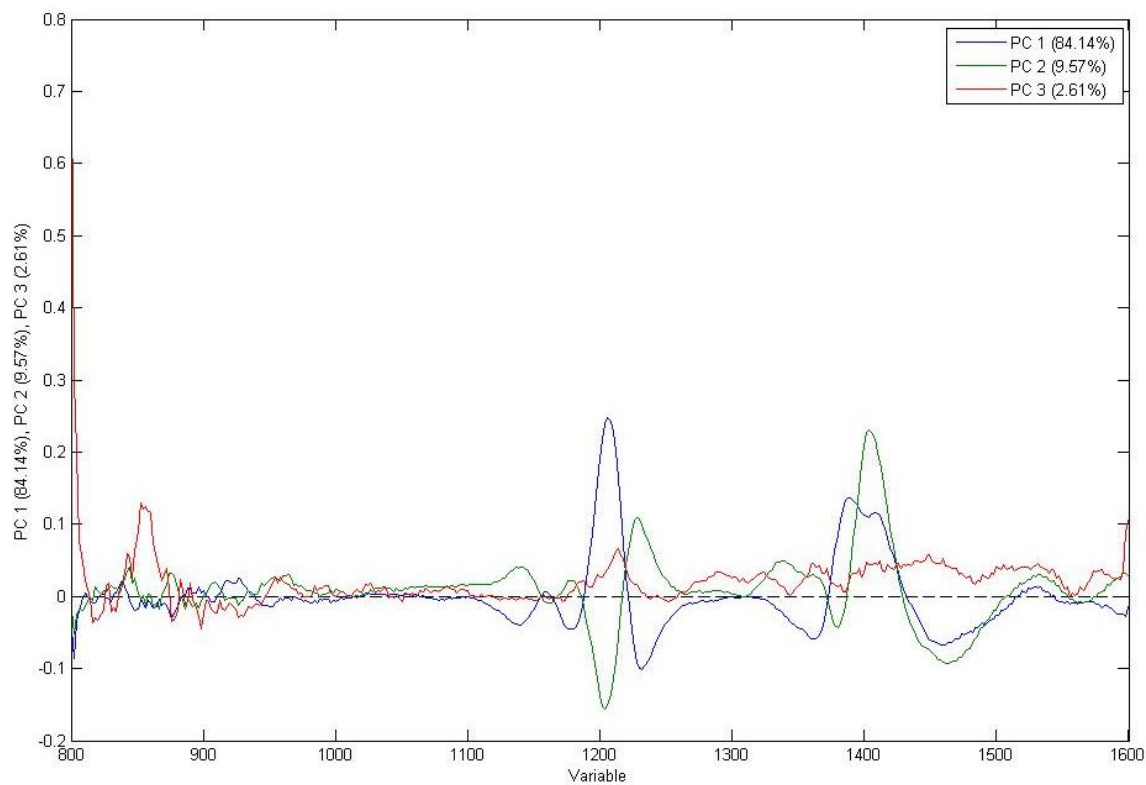


Εικόνα 5.2.35: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Σογιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 800-1600 nm

## Πυρηνέλαιο- ΕVOOA



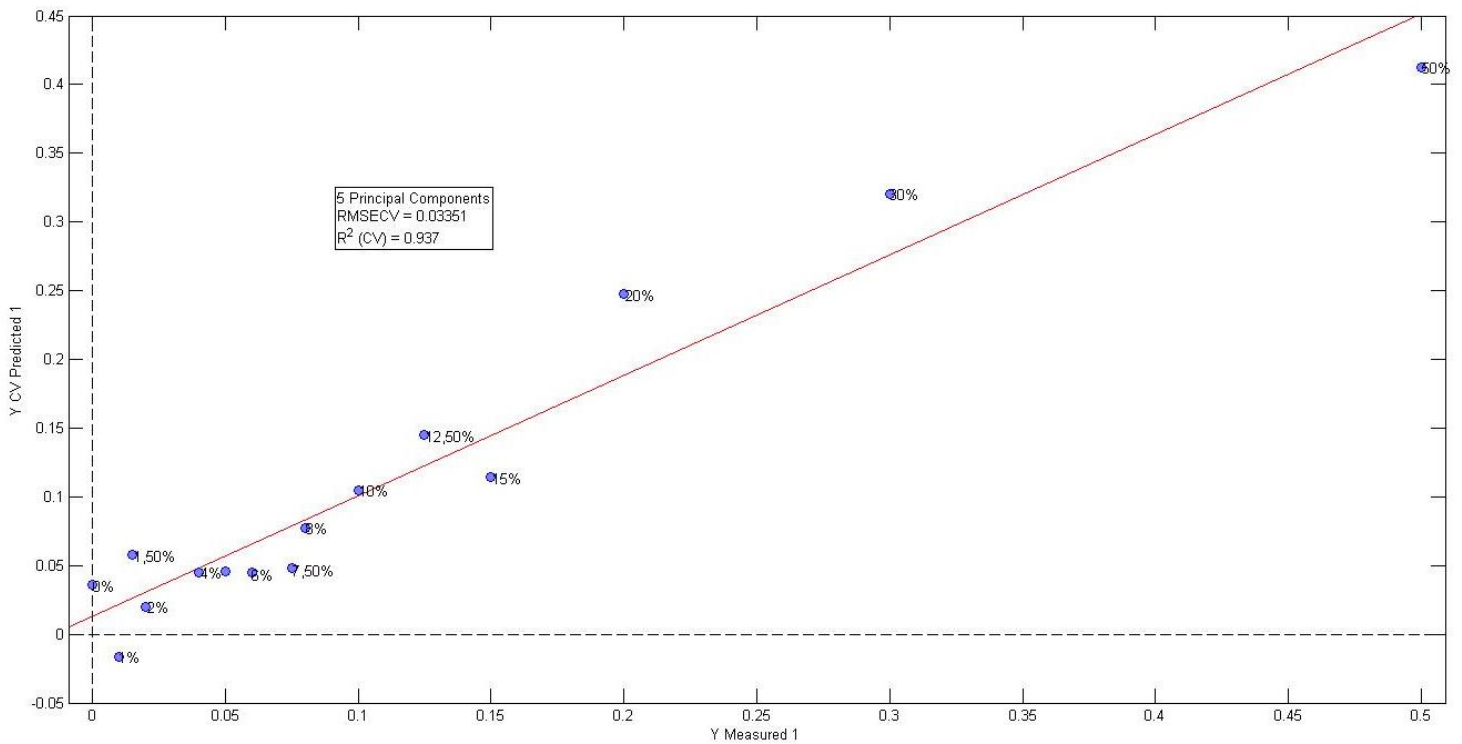
Προεπεξεργασία: 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center, -100% πυρηνέλαιο



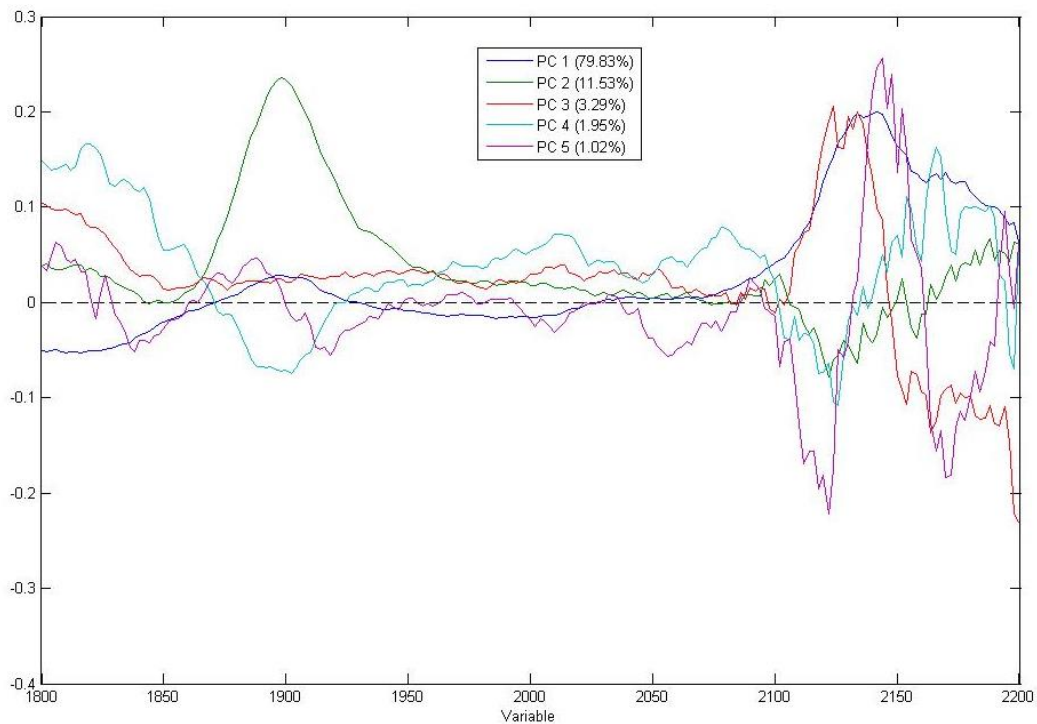
Εικόνα 5.2.36: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πυρηνέλαιο- ΕVOOA στα 800-1600 nm

## NIR2: 1800-2200 nm

### Αραβοσιτέλαιο- EVOOA



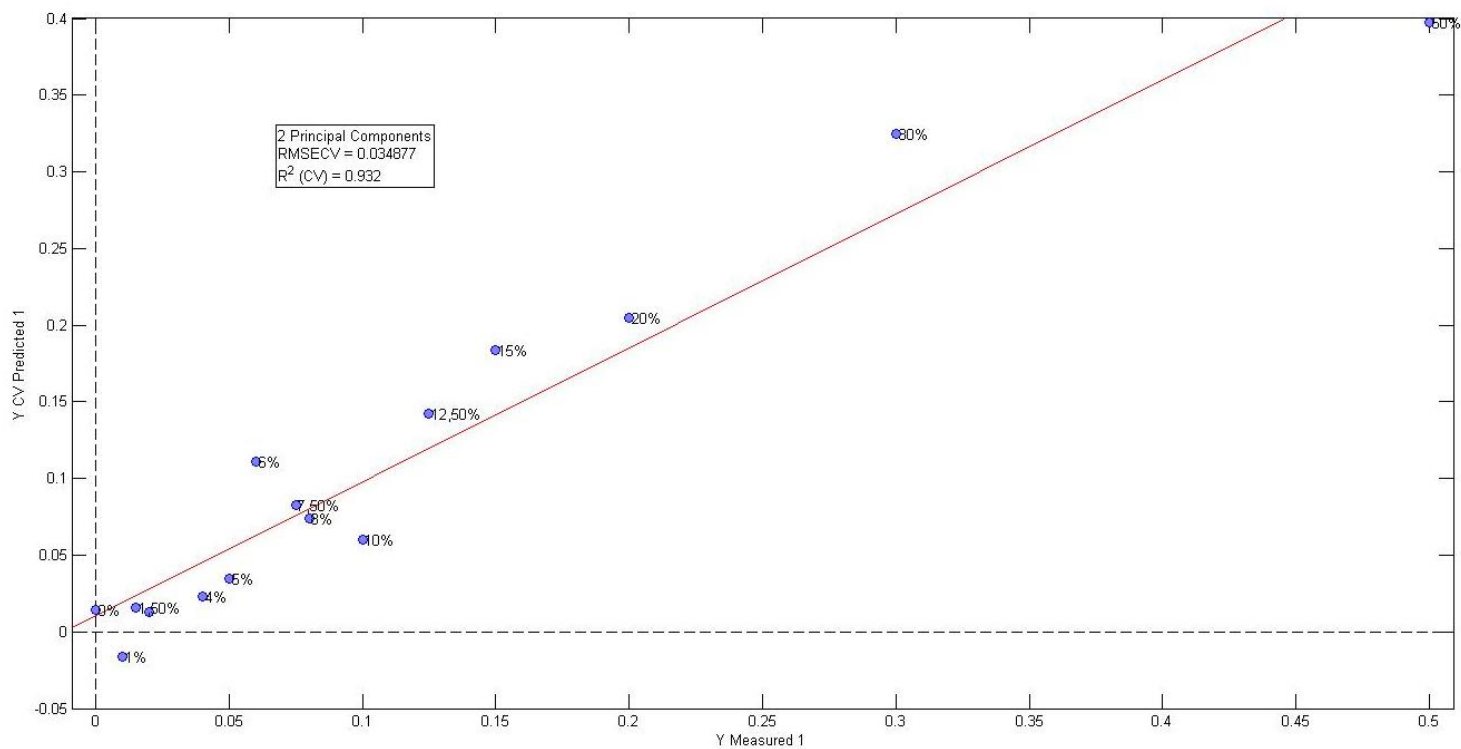
### Προεπεξεργασία: Smoothing, Mean Center, -100% αραβοσιτέλαιο



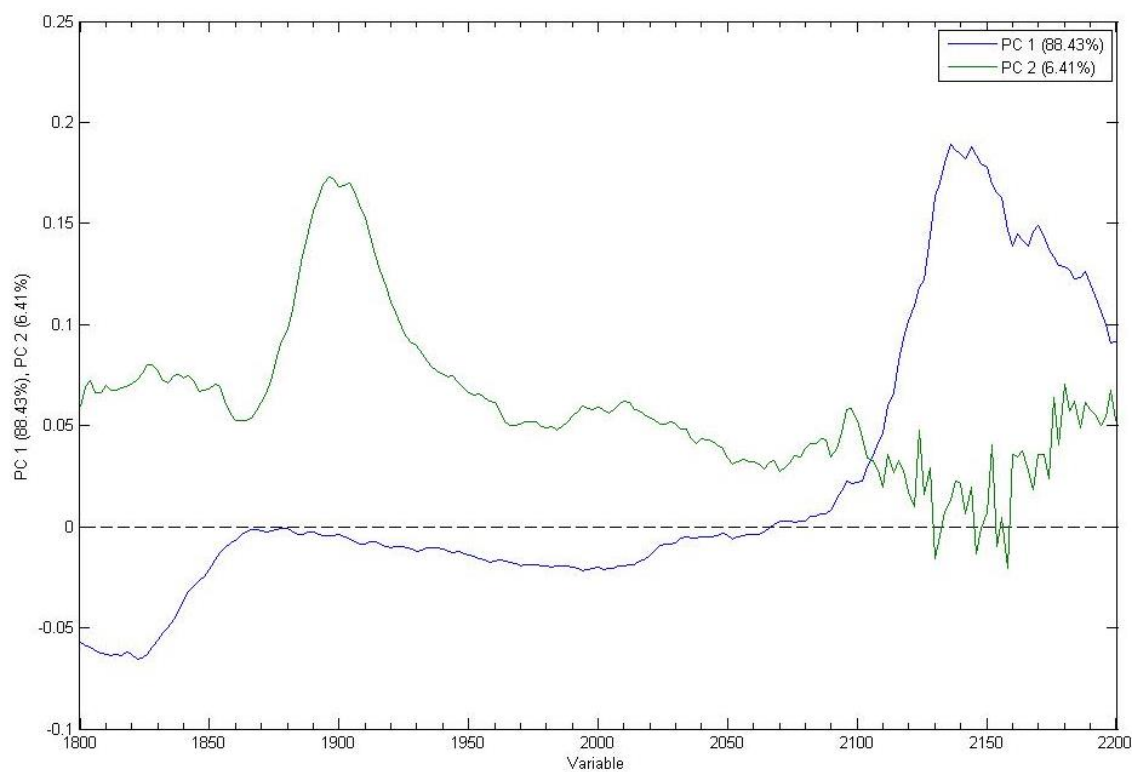
Εικόνα 5.2.37: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Αραβοσιτέλαιο- EVOOA στα 1800-2200 nm



## Ηλιέλαιο- ΕΝΟΟΑ

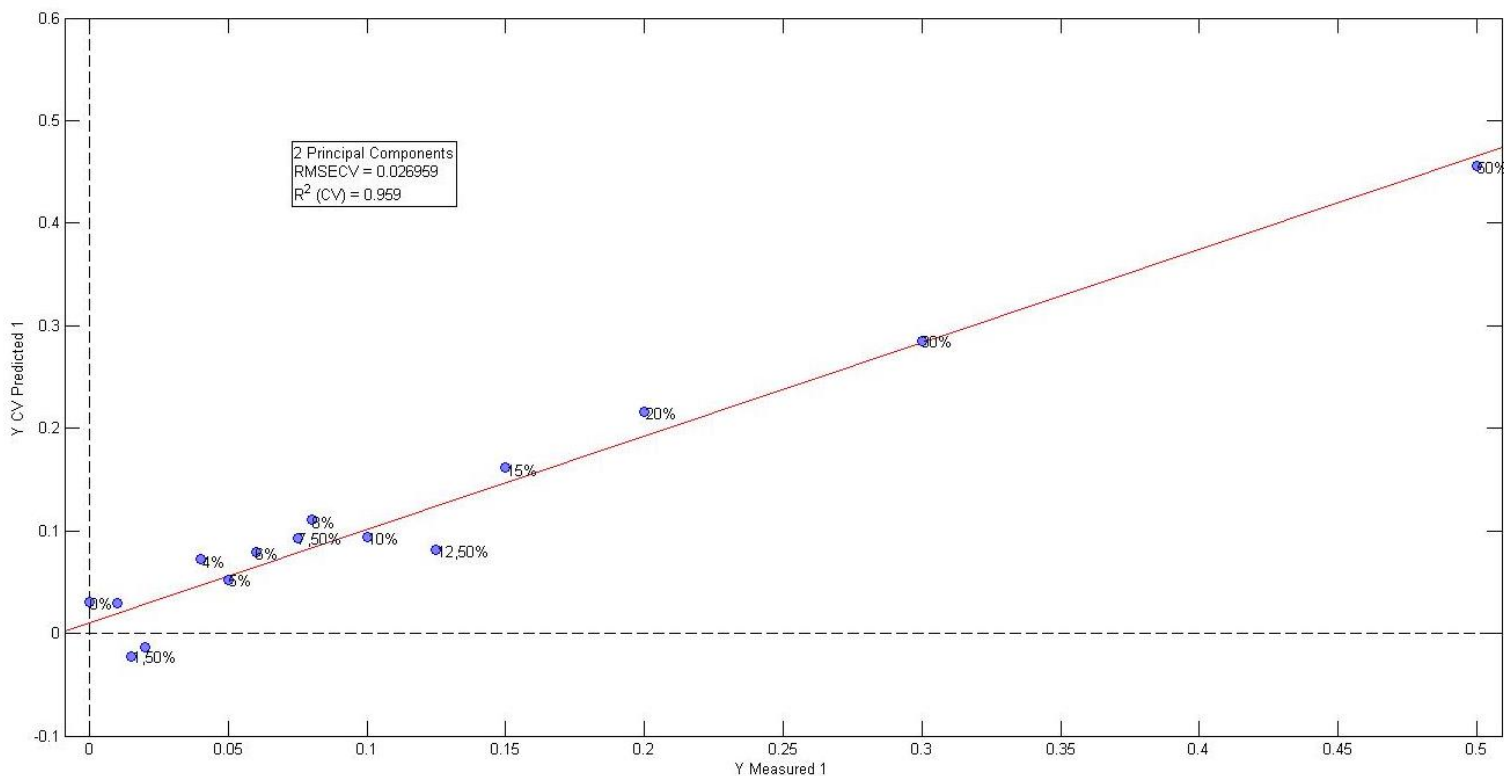


Προπεξεργασία: Smoothing, Mean Center, -100% ηλιέλαιο

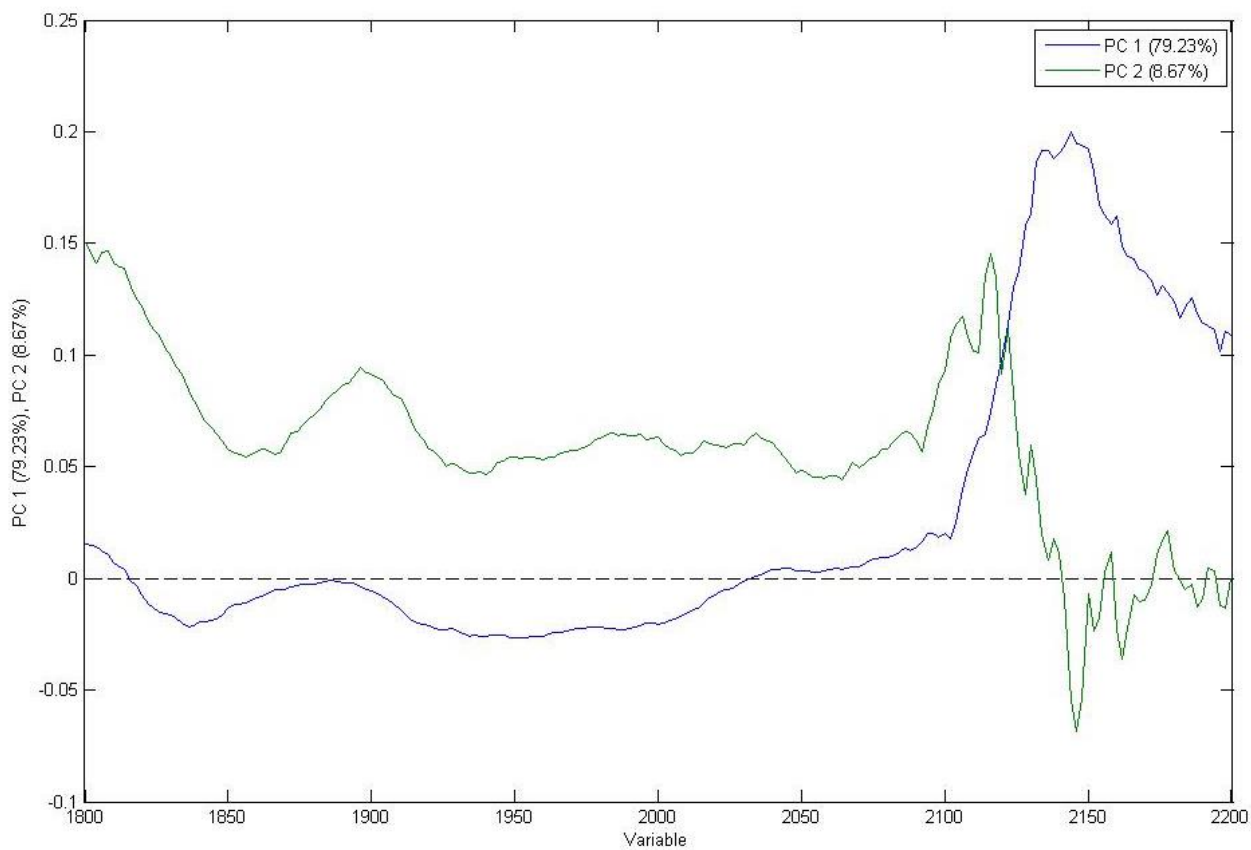


Εικόνα 5.2.38: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Ηλιέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 1800-2200 nm

## Σογιέλαιο- ΕVOOA

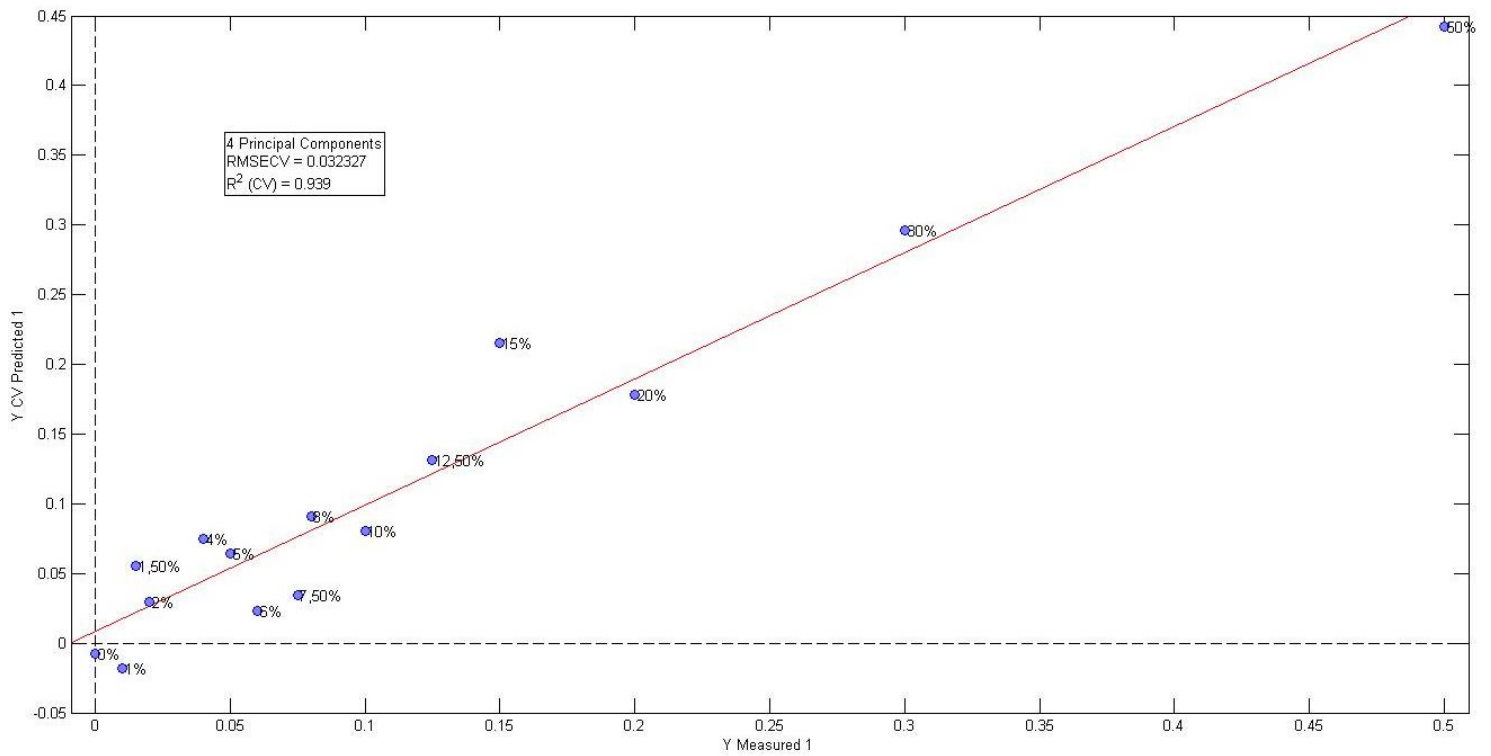


Προεπεξεργασία: Smoothing, Mean Center, -100% σογιέλαιο

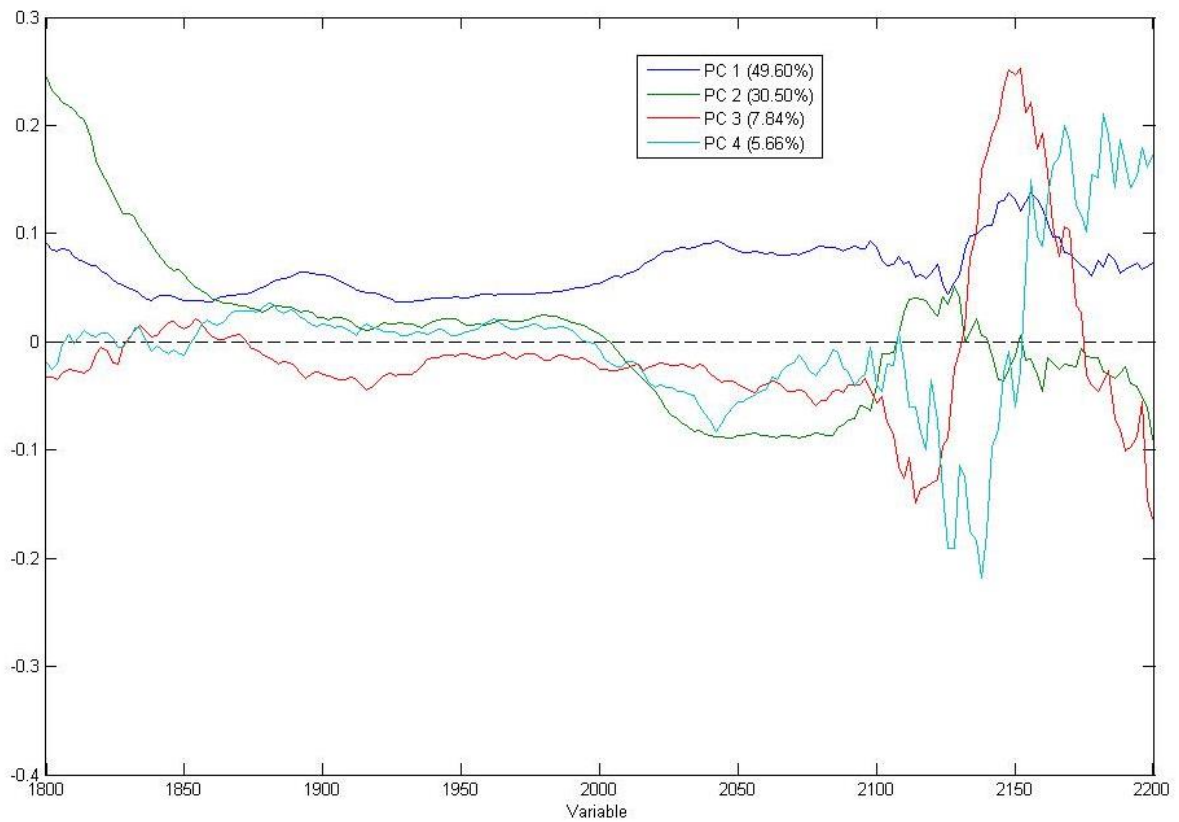


Εικόνα 5.2.39: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Σογιέλαιο- ΕVOOA στα 1800-2200 nm

## πυρηνέλαιο- ΕΝΟΟΑ



Προεπεξεργασία: Smoothing, Mean Center, -100% πυρηνέλαιο



Εικόνα 5.2.40: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πυρηνέλαιο- ΕΝΟΟΑ στα 1800-2200 nm

Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας απορρόφησης είναι αρκετά ενθαρρυντικά, προσφέροντας διάκριση νοθείας σε μικρά ποσοστά με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Τα ποσοστά αυτά αγγίζουν τα πραγματικά ποσοστά νοθείας στην αγορά.

Στην περιοχή του υπεριώδους **220-280 nm**, ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,952 και 0,987 ενώ ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 0,015 και 0,059. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένη απορρόφηση των σπορελαίων καθ' όλη την έκταση του φάσματος και ειδικότερα στα 270 nm. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι μπάντες απορρόφησης κοντά στα 270 nm και 230 nm είναι αυτές που συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποκλίσεις από το μηδέν στα loading plots είναι ανεξάρτητες του προσήμου, δείχνουν απλά τον βαθμό συνεισφοράς.

Στην περιοχή **260-400 nm** ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,962 και 0,998 ενώ ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 0,006 και 0,026. Τα Loading Plots δείχνουν ότι η περιοχή από 260 έως 280 nm είναι εκείνη που ευθύνεται κυρίως για τον διαχωρισμό. Στην περιοχή 260-400, τα EVOOs δεν παρουσιάζουν έντονες κορυφές. Αντιθέτως τα σπορέλαια, στα μήκη κύματος από 260-280 nm εμφανίζουν έντονη απορρόφηση στις αντίστοιχες κορυφές των EVOOs και είναι λογικό η διαφοροποίησή τους να βασίζεται στις περιοχές αυτές.

Στην περιοχή **400-800 nm (ορατό)** ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,992 και 0,998 ενώ ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 0,006 και 0,012. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές από 410-490nm, 530-540nm, 610-615nm και 665-675nm είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό. Στην περιοχή του ορατού, η παρουσία της χλωροφύλλης και των καροτενοειδών συνεισφέρει σημαντικά στον διαχωρισμό των δειγμάτων, καθώς η ύπαρξή τους στα σπορέλαια είναι μηδαμινή. Το πυρηνέλαιο διαφοροποιείται, καθώς προέρχεται από τον ελαιόκαρπο επομένως εμφανίζει μικρής έντασης κορυφές στην περιοχή του ορατού, πολύ χαμηλότερης έντασης όμως εν συγκρίσει με την ένταση των κορυφών των εξαιρετικά παρθένων ελαιολάδων.

Στην περιοχή του **NIR(800-1600nm)** ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,979 και 0,998 ενώ ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 0,021 και 0,006. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές από 1100-1250 nm και 1350-1450 nm συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό. Οι κορυφές αυτές είναι κοινές τόσο για το ελαιόλαδο όσο και για τα σπορέλαια, ωστόσο διαφοροποιούνται στην ένταση, για αυτό και η συνεισφορά τους στον διαχωρισμό των ελαίων είναι σημαντική.

Τέλος, στην περιοχή του **NIR(1800-2200nm)** ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,932 και 0,959 ενώ ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 0,027 και 0,035. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές στα 2100-2200 nm είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό. Σε μικρότερο βαθμό φαίνεται να συνεισφέρει μια κορυφή στα 1900 nm περίπου, η

οποία ανατίθεται στον εστερικό δεσμό των τριγλυκεριδίων<sup>[5]</sup>. Σε αυτήν την περιοχή επίσης, οι κορυφές είναι κοινές για όλα τα λάδια, και διαφοροποιούνται στην ένταση των κορυφών, όπου όλα τα σπορέλαια εμφανίζουν εντονότερες κορυφές σε σχέση με τα ΕVOOs.

Τα καλύτερα αποτελέσματα βάσει των δεικτών  $R^2$  και RMSECV εμφανίζονται στις περιοχές του ορατού(400-800 nm) και του NIR(800-1600 nm). Στην περιοχή του ορατού εμφανίζονται τα καρτενοειδή και η χλωροφύλλη, ουσίες που ούτως ή άλλως ξεχωρίζουν το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο αφού είναι ενδεικτικές της φρεσκάδας του. Στην περιοχή 800-1600 nm εμφανίζονται οι δεσμοί από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, κορυφές κοινές για όλα τα έλαια οι οποίες όμως διαφοροποιούνται στην ένταση.

Ωστόσο και στις υπόλοιπες περιοχές η διάκριση είναι αρκετά ικανοποιητική. Τα λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε η περιοχή 1800-2200 nm. Χρήζει αναφοράς το γεγονός ότι ενώ μετρήθηκαν, το καθαρό σπορέλαιο κάθε σειράς δεν συμπεριλήφθηκε σε καμία από τις μελέτες. Το καθαρό σπορέλαιο θα αντιστοιχούσε σε νόθευση της τάξης του 100%, τιμή μη ρεαλιστική με τα δεδομένα της αγοράς. Επίσης, η πολύ ακραία του τιμή θα «τέντωνε» την ευθεία, βελτιώνοντας την τιμή του δείκτη  $R^2$ , χωρίς να βελτιώνεται στην ουσία η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου.

### 5.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΝΟΘΕΙΑΣ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΑΚΕΣ ΜΙΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΙΞΕΙΣ ΠΕΡΙΟΧΩΝ

#### Δείγματα

Στο πλαίσιο του προγράμματος «Δρόμοι της ελιάς» μελετήθηκαν 54 δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου που είχαν υποστεί μια τεχνητή νόθευση.

Στα 27 από αυτά η νόθευση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε βαθμιδωτά ποσοστά ελαιόλαδου από ελιά διαφορετικής ποικιλίας, όπου και οι 2 ποικιλίες της κάθε μίξης ήταν από την Λέσβο. Οι μίξεις που μελετήθηκαν αποτελούνται από μίξη Κορωνέικης και Αδραμυτιανής ποικιλίας (1N-10N), Κολοβής και Αδραμυτιανής ποικιλίας (11N-18N) και Κορωνέικης και Κολοβής ποικιλίας (28N-36N). Το ποσοστό νόθευσης ήταν από 10% έως 90%, με βήμα 10%.

Στα άλλα μισά, η νόθευση πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε βαθμιδωτά ποσοστά ελαιόλαδου ίδιας ποικιλίας από διαφορετικές περιοχές, όπου η ποικιλία ήταν σταθερά Κορωνέικη. Οι μίξεις που μελετήθηκαν αποτελούνται από μίξη Λέσβου-Κρήτης (19N-27N), μίξη Πελοποννήσου- Κρήτης (37N-45N) και μίξη Πελοποννήσου-Λέσβου (46N-54N). Το ποσοστό νόθευσης ήταν από 10% έως 90%, με βήμα 10%.

KOR_ADR_90_10_LES OO	1N	KOL_ADR_90_10_LES OO	11N	LES_CRE_90_10_KOR/OO	19N
KOR_ADR_80_20_LES OO	2N	KOL_ADR_80_20_LES OO	12N	LES_CRE_80_20_KOR/OO	20N
KOR_ADR_70_30_LES OO	3N	KOL_ADR_70_30_LES OO	13N	LES_CRE_70_30_KOR/OO	21N
KOR_ADR_60_40_LES OO	4N	KOL_ADR_60_40_LES OO	14N	LES_CRE_60_40_KOR/OO	22N
ADR_KOR_50_50_LES OO	5N	KOL_ADR_50_50_LES OO	6N	LES_CRE_50_50_KOR/OO	23N
ADR_KOR_60_40_LES OO	7N	ADR_KOL_60_40_LES OO	15N	CRE_LES_60_40_KOR/OO	24N
ADR_KOR_70_30_LES OO	8N	ADR_KOL_70_300_LES OO	16N	CRE_LES_70_30_KOR/OO	25N
ADR_KOR_80_20_LES OO	9N	ADR_KOL_80_20_LES OO	17N	CRE_LES_80_20_KOR/OO	26N
ADR_KOR_90_10_LES OO	10N	ADR_KOL_90_10_LES OO	18N	CRE_LES_90_10_KOR/OO	27N
KOR_KOL/90_10 LESVOS/OO	28N	PEL_CRE_90_10_KOR/OO	37N	PEL_LES_90_10_KOR/OO	46N
KOR_KOL/80_20 LESVOS/OO	29N	PEL_CRE_80_20_KOR/OO	38N	PEL_LES_80_20_KOR/OO	47N
KOR_KOL/70_30 LESVOS/OO	30N	PEL_CRE_70_30_KOR/OO	39N	PEL_LES_70_30_KOR/OO	48N
KOR_KOL/60_40 LESVOS/OO	31N	PEL_CRE_60_40_KOR/OO	40N	PEL_LES_60_40_KOR/OO	49N
KOR_KOL/50_50 LESVOS/OO	32N	PEL_CRE_50_50_KOR/OO	41N	LES_PEL_50_50_KOR/OO	50N
KOL_KOR/60_40 LESVOS/OO	33N	CRE_PEL_60_40_KOR/OO	42N	LES_PEL_60_40_KOR/OO	51N
KOL_KOR/70_30 LESVOS/OO	34N	CRE_PEL_70_30_KOR/OO	43N	LES_PEL_70_30_KOR/OO	52N
KOL_KOR/80_20 LESVOS/OO	35N	CRE_PEL_80_20_KOR/OO	44N	LES_PEL_80_20_KOR/OO	53N
KOL_KOR/90_10 LESVOS/OO	36N	CRE_PEL_90_10_KOR/OO	45N	LES_PEL_90_10_KOR/OO	54N

Πίνακας 5.3.1: Πίνακας νοθευμένων δειγμάτων με κωδικούς

## Φασματοσκοπία Απορρόφησης

Τα δείγματα μετρήθηκαν με την φασματοσκοπία απορρόφησης σε 5 περιοχές. Οι περιοχές του υπέρυθρου μετρήθηκαν στο μηχάνημα Perkin-Elmer Lambda 950 ενώ οι περιοχές του υπεριώδους και του ορατού μετρήθηκαν στο μηχάνημα Shimadzu UV-1900. Συγκεκριμένα:

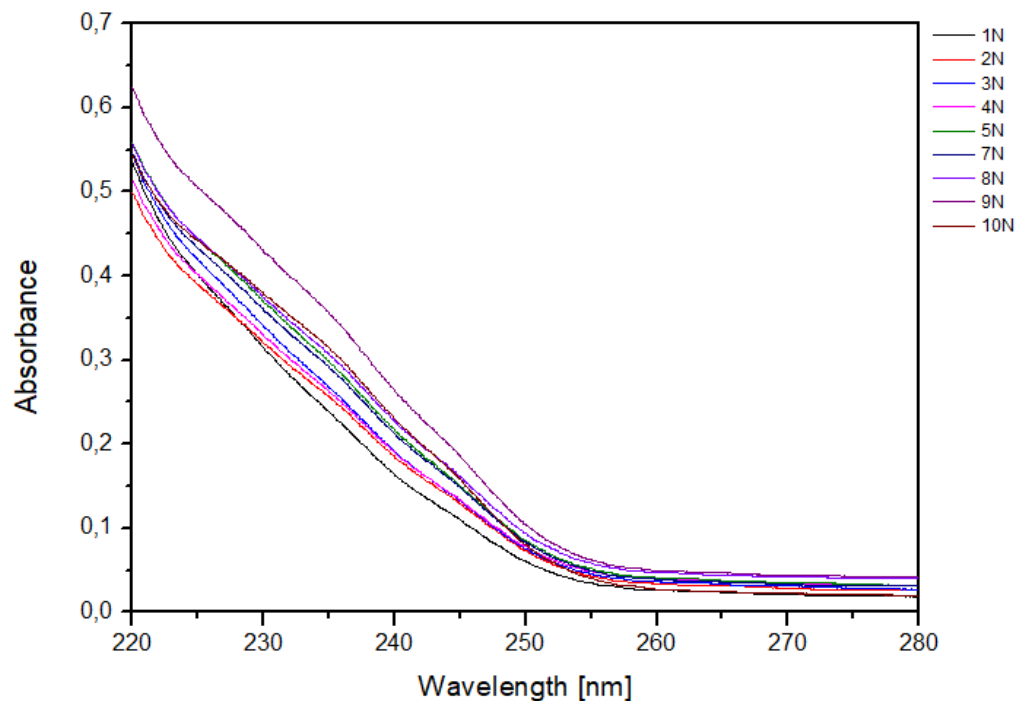
- Περιοχή UV με μήκη κύματος 220-280 nm και βήμα 0,05 nm , όπου το δείγμα έχει αραιωθεί σε διαλύτη ισοοκτάνιο (1% v/v) και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 2 mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον διαλύτη.
- Περιοχή UV με μήκη κύματος 260-410 nm και βήμα 0,1 nm , όπου το δείγμα έχει αραιωθεί σε διαλύτη ισοοκτάνιο (1% v/v) και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10 mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον διαλύτη.
- Περιοχή ορατού (Vis) με μήκη κύματος 400-800 nm και βήμα 0,2 nm , όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραιώση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 2 mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.
- Περιοχή Near-IR (NIR) με μήκη κύματος 800-1600 nm και βήμα 2 nm , όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραιώση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10 mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.
- Περιοχή Near-IR (NIR) με μήκη κύματος 1800-2200 nm και βήμα 2 nm, όπου το δείγμα δεν έχει υποστεί αραιώση και έχει τοποθετηθεί σε κυψελίδα χαλαζία πάχους 10 mm. Ο μηδενισμός υποβάθρου γίνεται με τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Υπενθυμίζεται ότι η αναλυτική παρουσίαση και ανάθεση των κορυφών των φασμάτων του ελαιολάδου, για τις 5 αυτές φασματικές περιοχές έχει πραγματοποιηθεί στην προηγούμενη ενότητα και δεν θα επαναληφθεί και σε αυτήν την ενότητα.

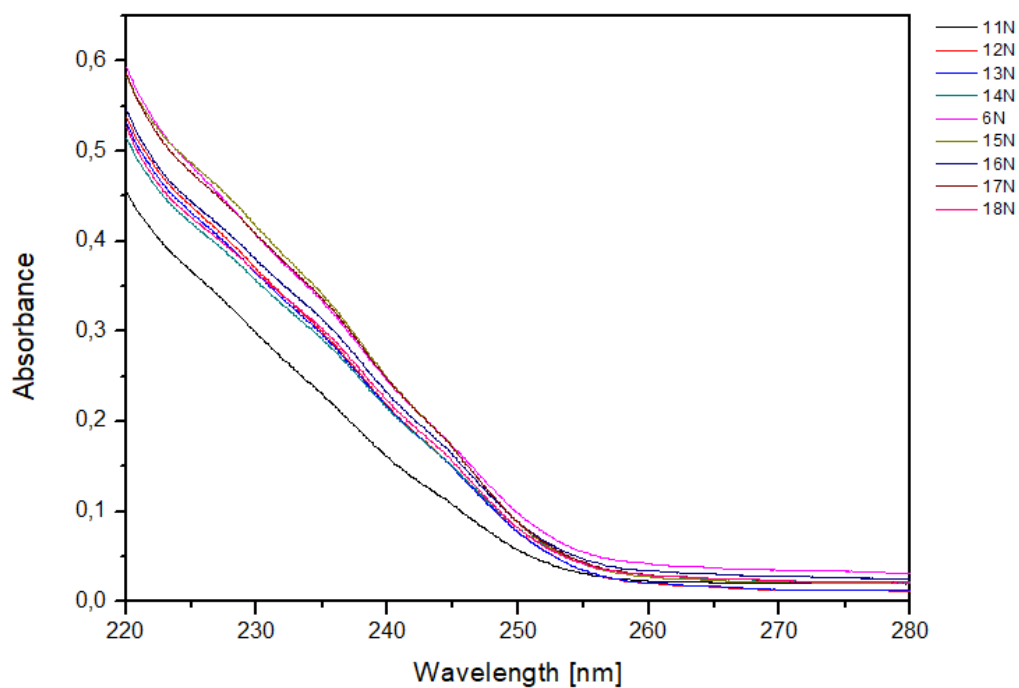
### 5.3.1 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Απορρόφησης

Περιοχή 220-280 nm:

Ποικιλιακές μίξεις

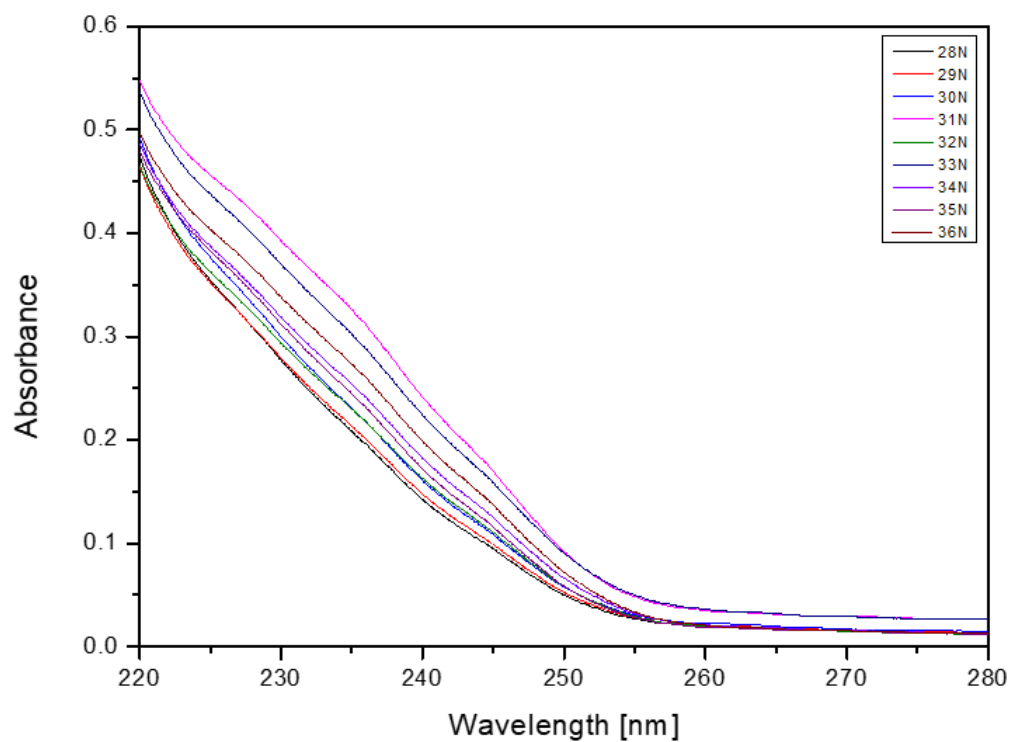


Εικόνα 5.3.1: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 220-280 nm



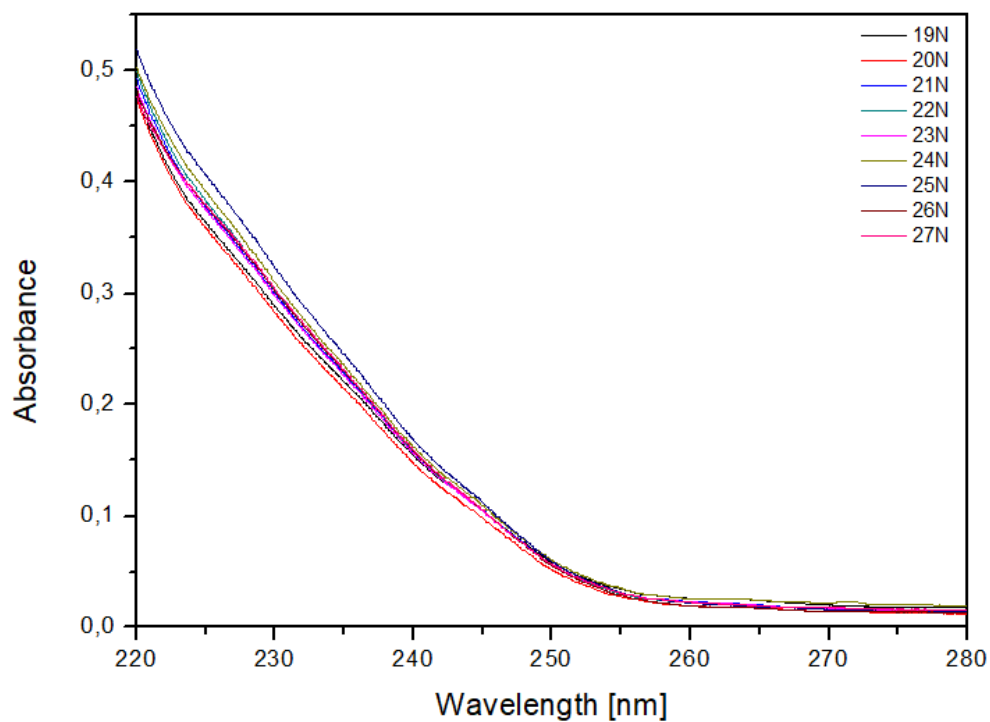
Εικόνα 5.3.2: Φάσματα μίξεων Κολοθή- Αδραμυτιανή στα 220-280 nm



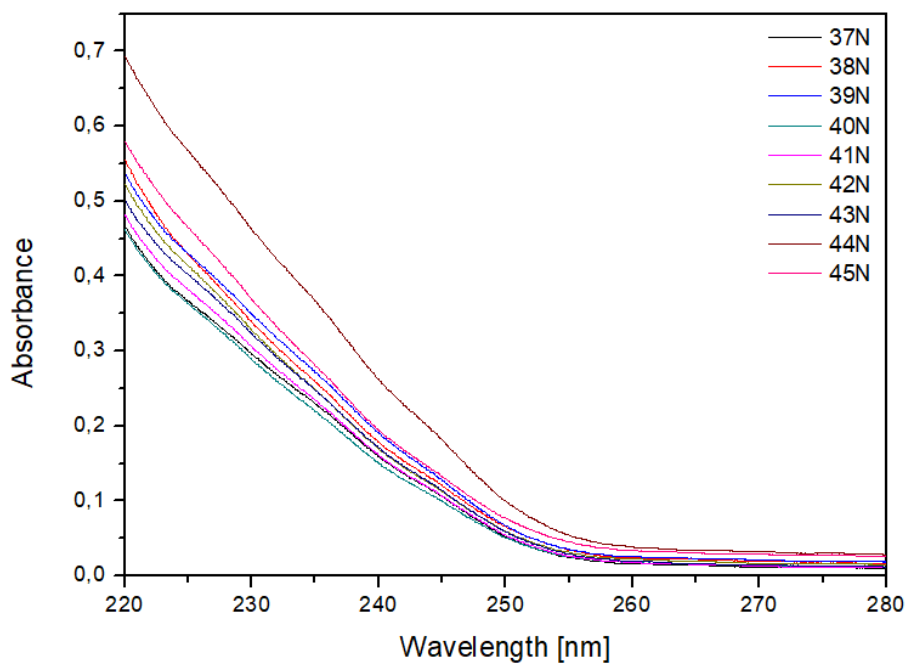


Εικόνα 5.3.3: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Κολοβή στα 220-280 nm

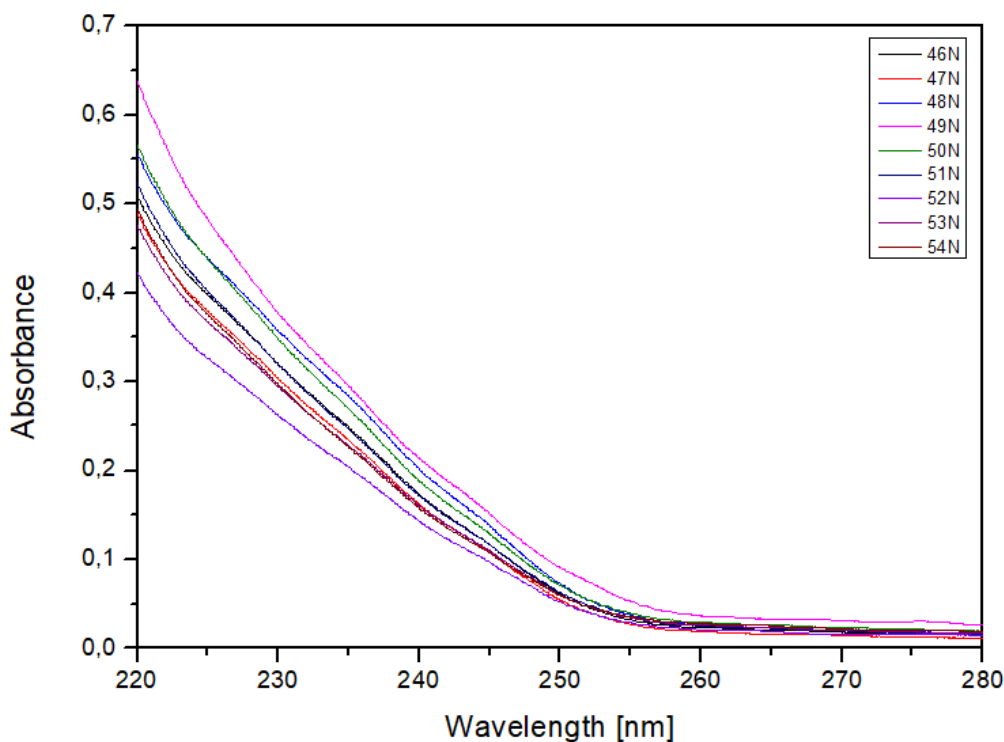
### Μίξεις περιοχών



Εικόνα 5.3.4: Φάσματα μίξεων Λέσβος – Κρήτη στα 220-280 nm



Εικόνα 5.3.5: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Κρήτη στα 220-280 nm

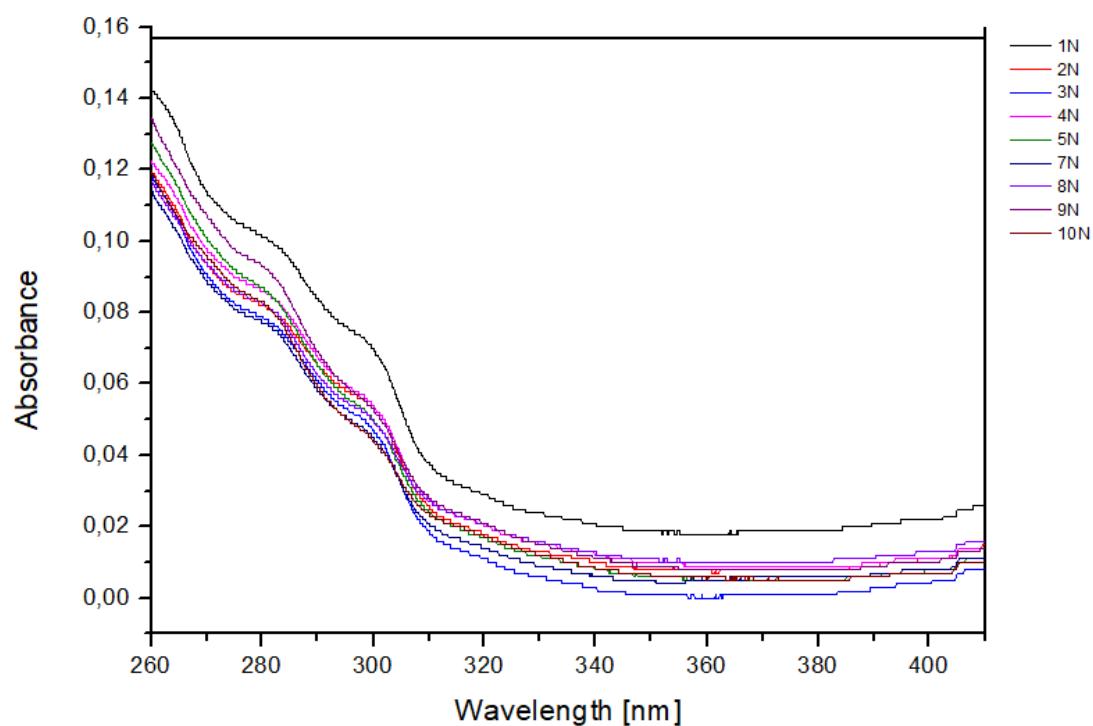


Εικόνα 5.3.6: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος στα 220-280 nm

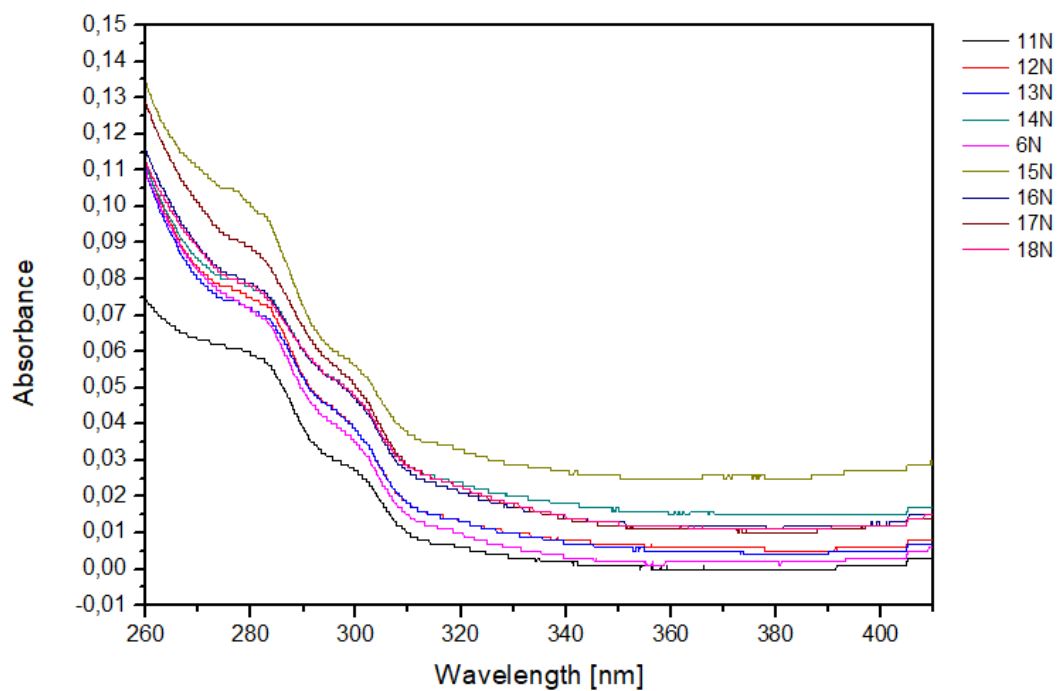
Από την σύγκριση των φασμάτων σε αυτήν την περιοχή δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Οι ποικιλιακές μίξεις εμφανίζονται να διαφοροποιούνται περισσότερο μεταξύ τους σε σχέση με τις μίξεις περιοχών, αν και η διαφοροποίηση είναι μικρή. Η μπάντα που εμφανίζεται ανατίθεται στα συζυγιακά διένια.

Περιοχή 260-410 nm:

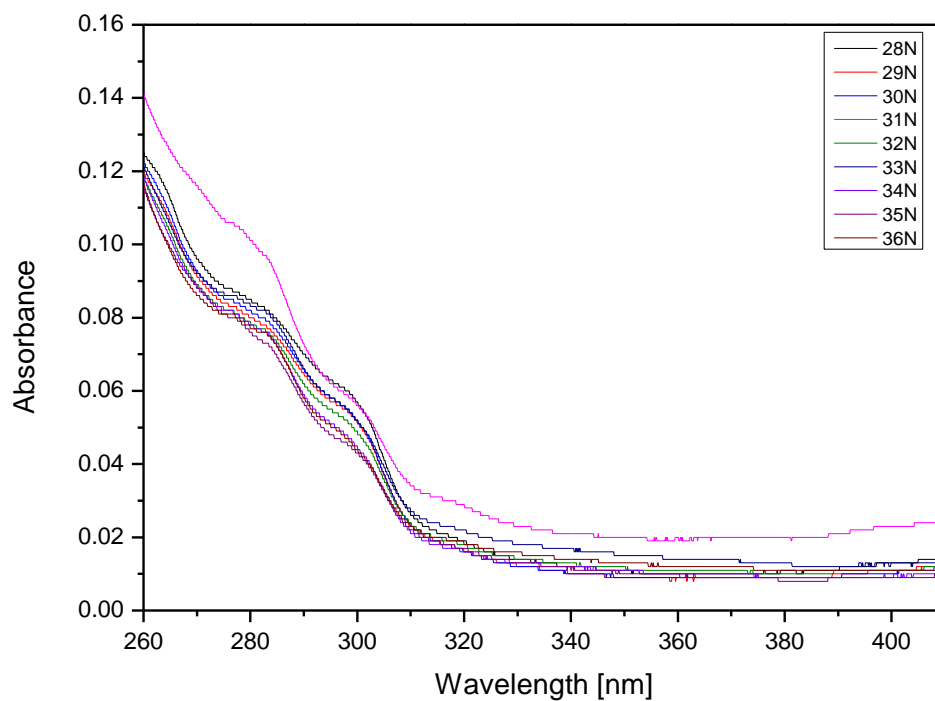
Ποικιλιακές μίξεις



Εικόνα 5.3.7: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 260-410 nm

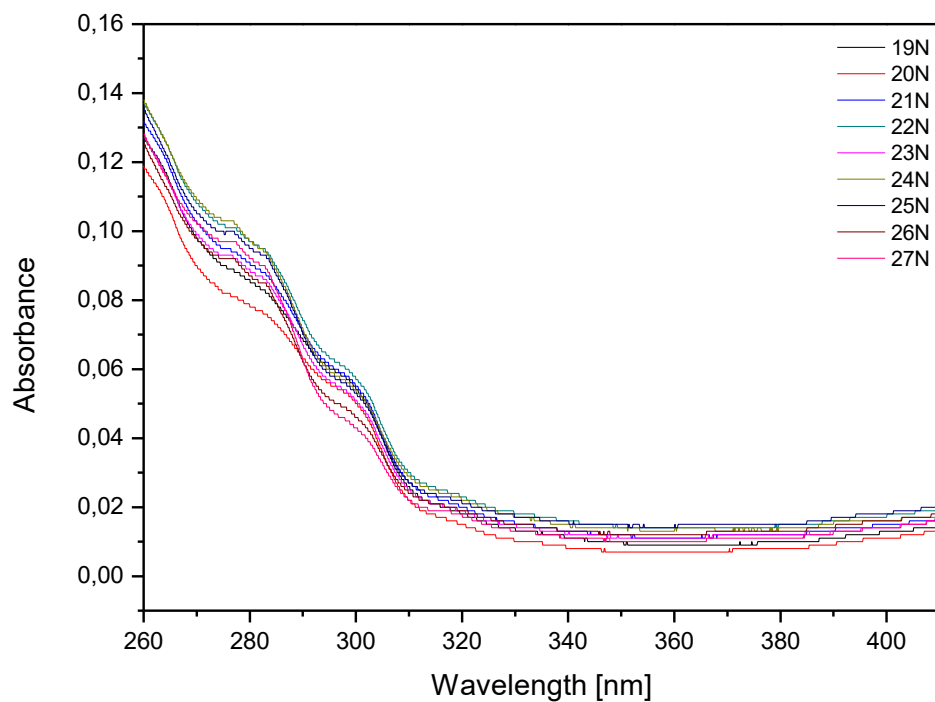


Εικόνα 5.3.8: Φάσματα μίξεων Κολοθή- Αδραμυτιανή στα 260-410 nm

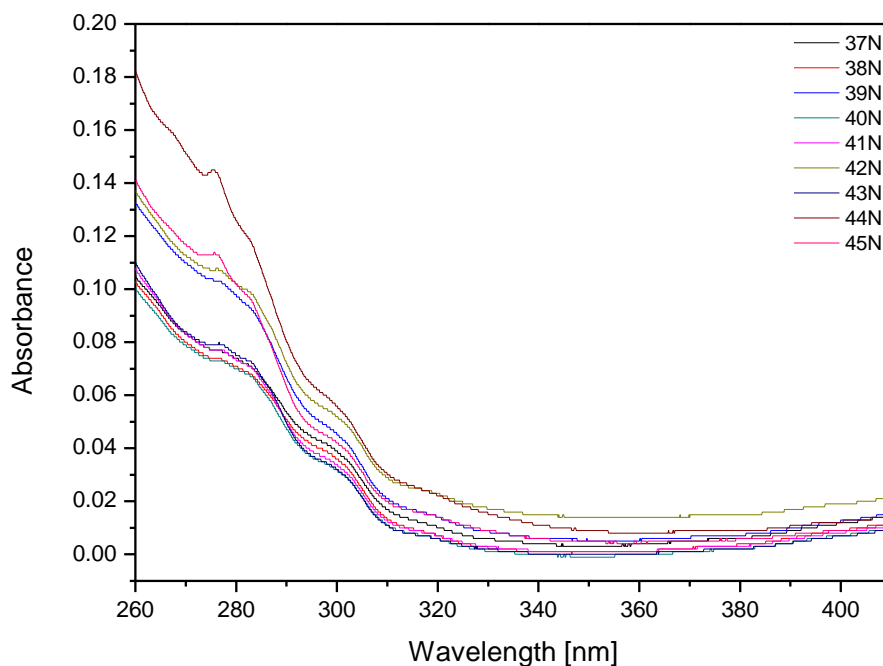


Εικόνα 5.3.9: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Κολοβή στα 260-410 nm

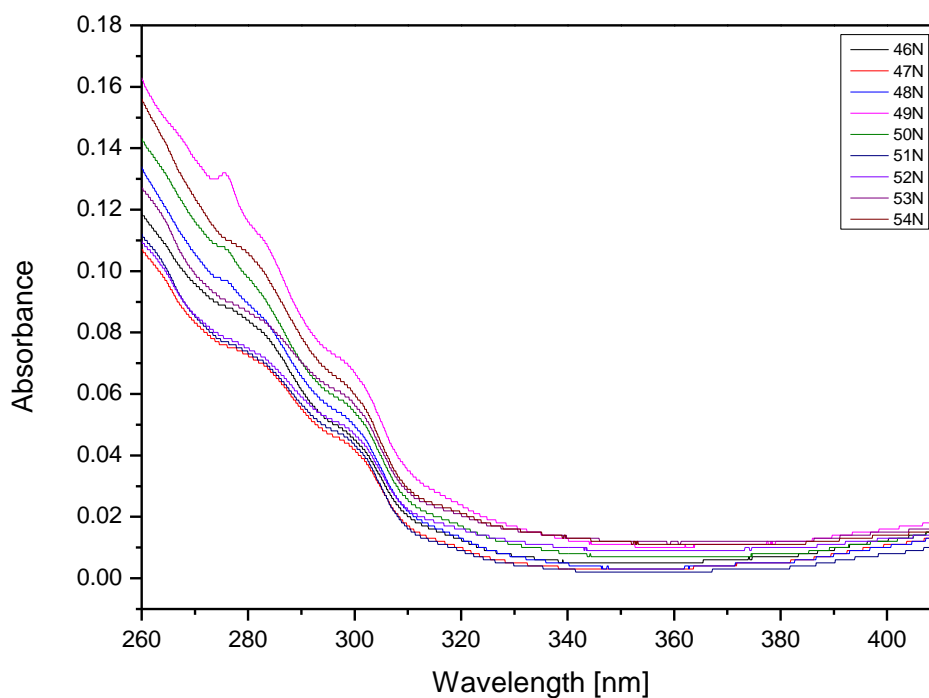
### Μίξεις περιοχών



Εικόνα 5.3.10: Φάσματα μίξεων Λέσβος – Κρήτη στα 260-410 nm



Εικόνα 5.3.11: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος-Κρήτη στα 260-410 nm

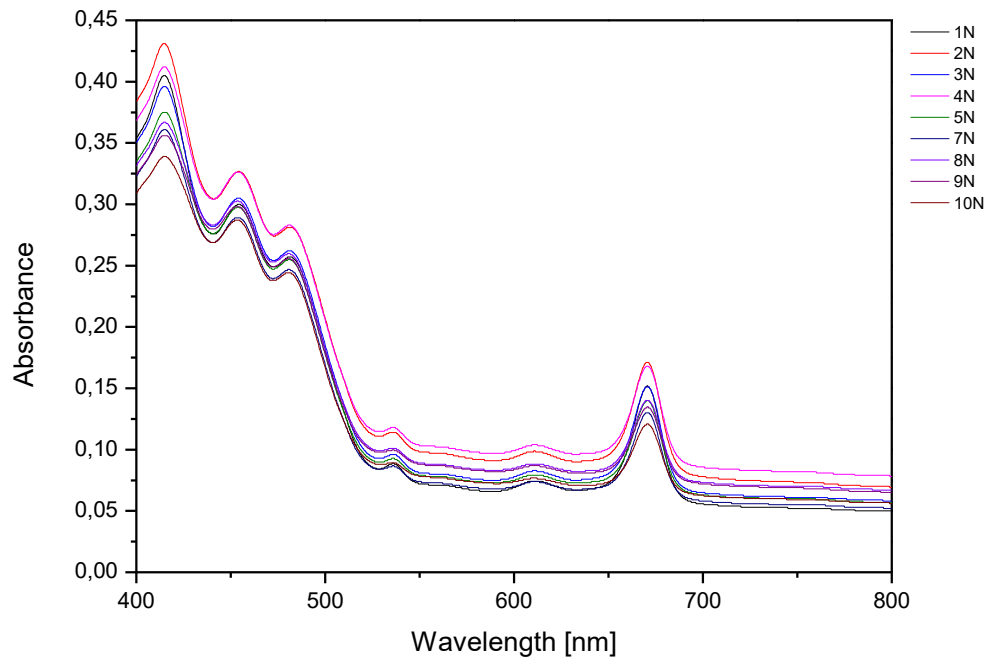


Εικόνα 5.3.12: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος στα 260-410 nm

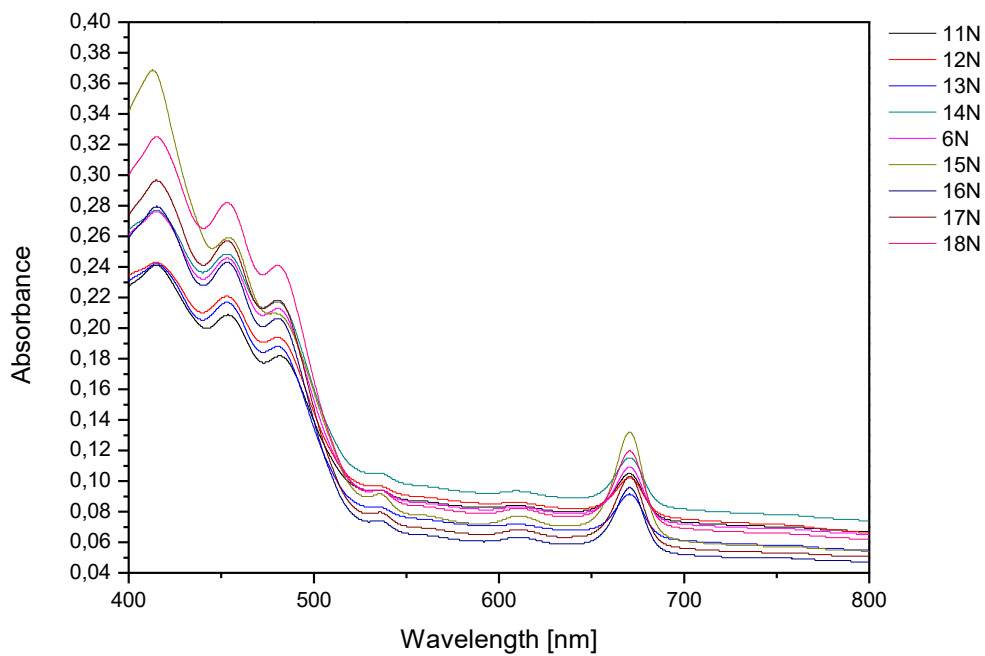
Από την σύγκριση των φασμάτων, τόσο για τις ποικιλιακές μίξεις όσο και για τις γεωγραφικές, δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή των 280-310 nm ανατίθενται στις φαινόλες και τα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου, δηλαδή στα φαινολικά οξέα και στα φλαβονοειδή.

Περιοχή 400- 800 nm:

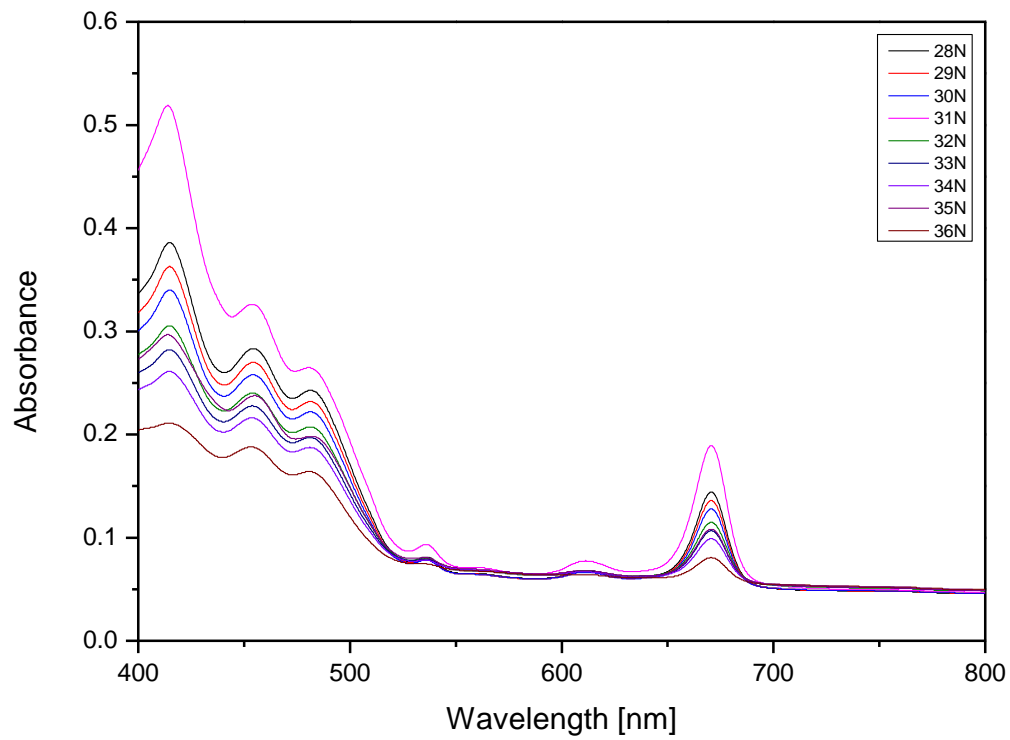
Ποικιλιακές μίξεις



Εικόνα 5.3.13: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Αδραμιτιανή στα 400-800 nm

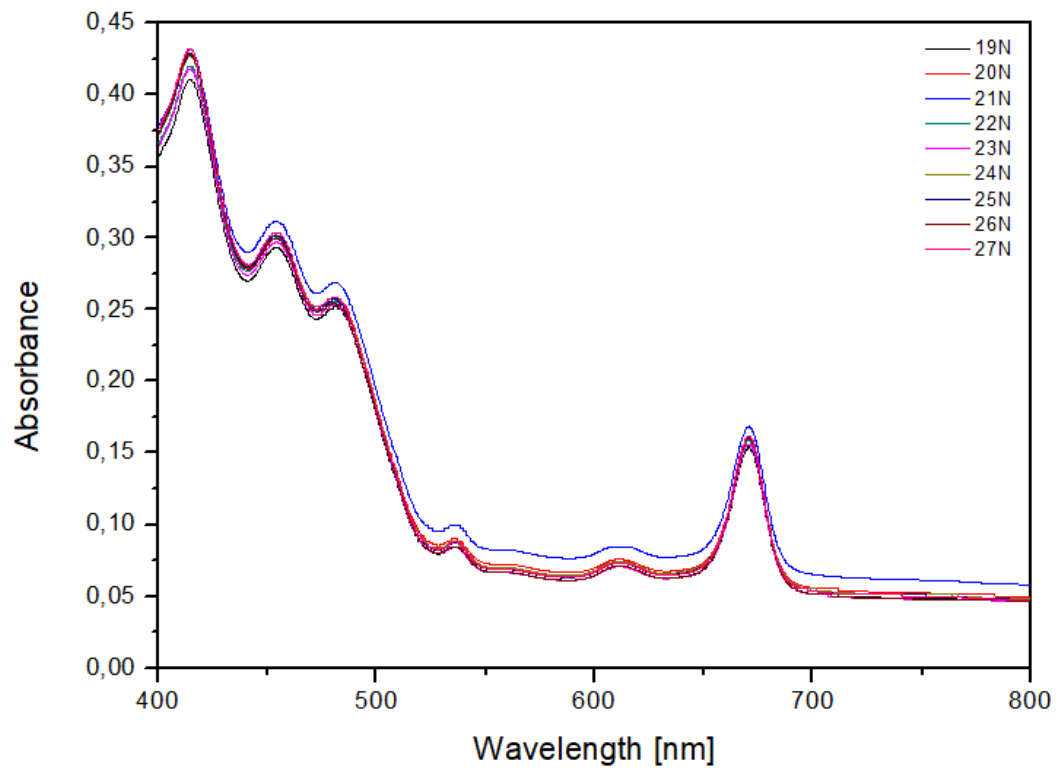


Εικόνα 5.3.14: Φάσματα μίξεων Κολοθή- Αδραμιτιανή στα 400-800 nm

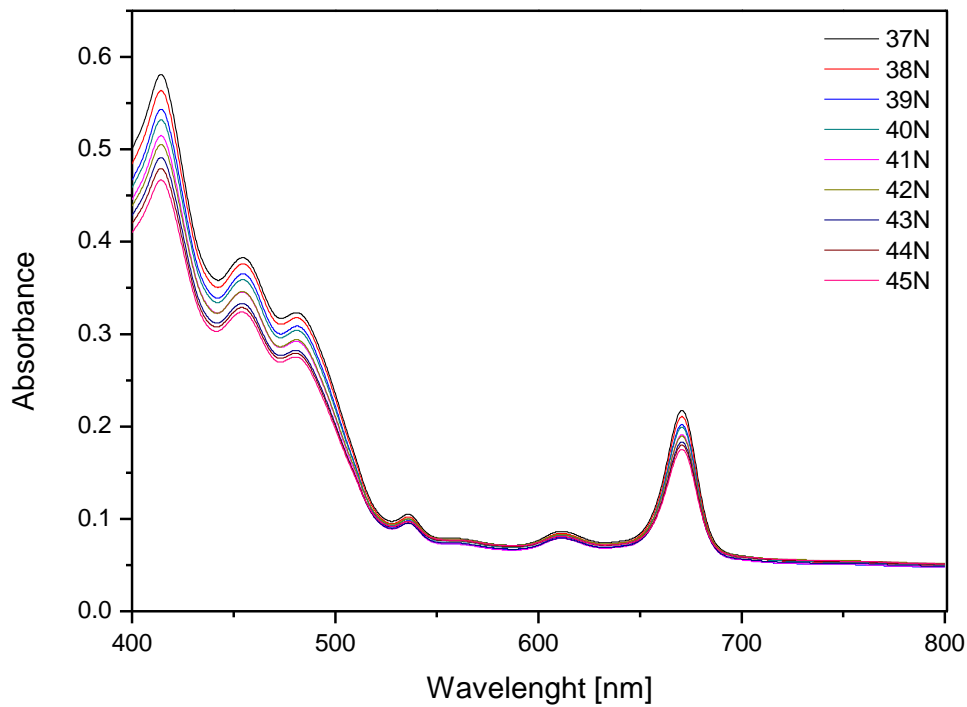


Εικόνα 5.3.15: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Κολοθή στα 400-800 nm

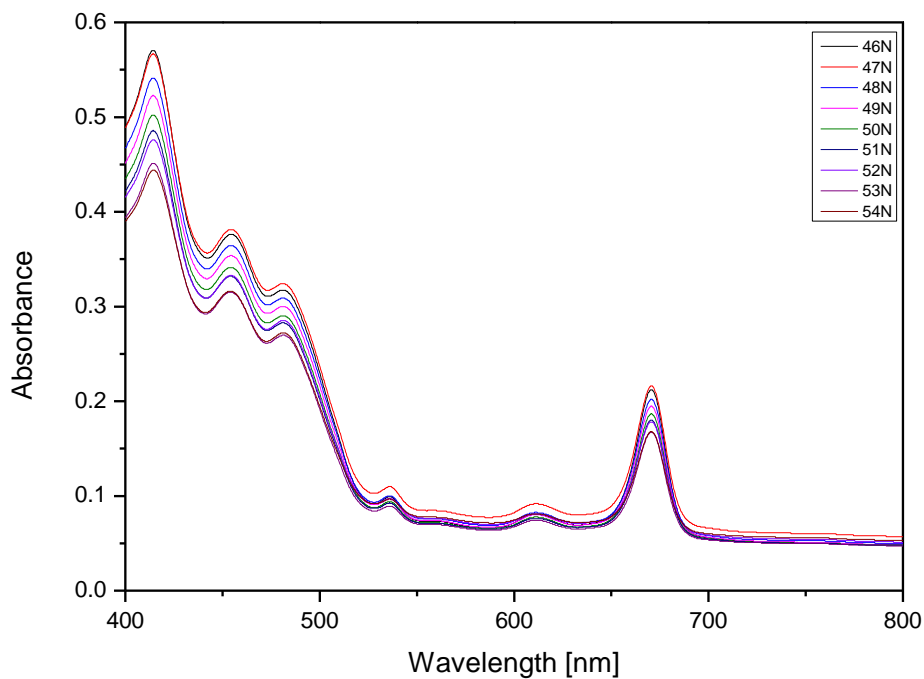
### Μίξεις Περιοχών



Εικόνα 5.3.16: Φάσματα μίξεων Λέσβος- Κρήτη στα 400-800 nm



Εικόνα 5.3.17: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Κρήτη στα 400-800 nm



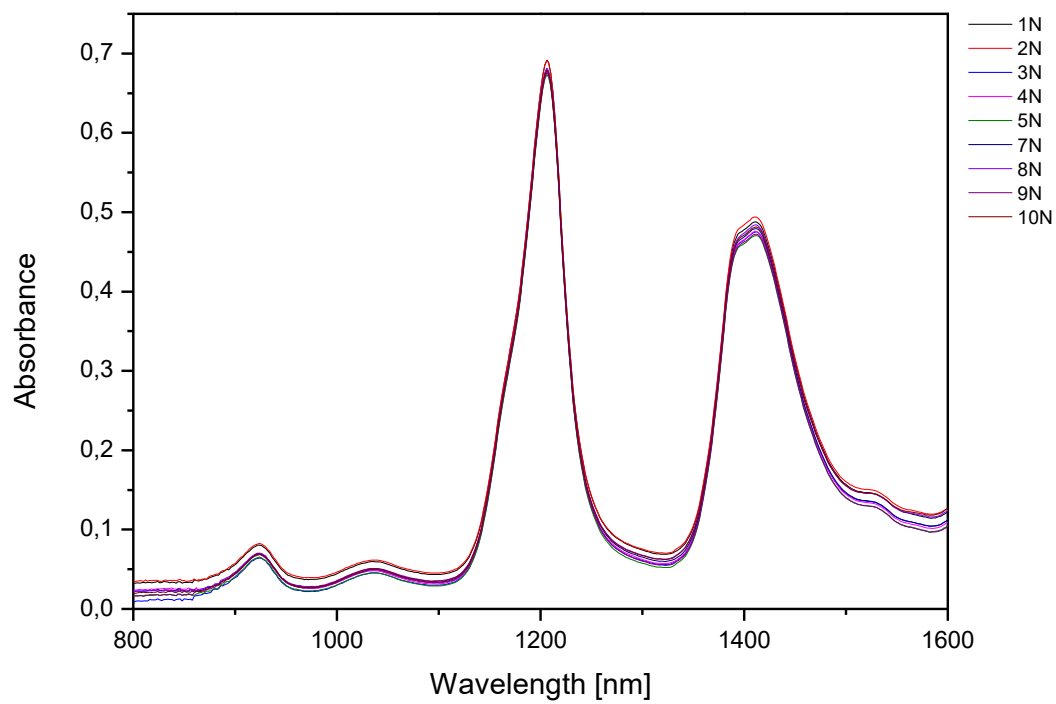
Εικόνα 5.3.18: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος στα 400-800 nm

Από την σύγκριση των παραπάνω φασμάτων προκύπτει ότι οι γεωγραφικές μίξεις διαφοροποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι οι ποικιλιακές μίξεις. Συγκεκριμένα στις κορυφές που ανατίθενται στα καροτενοειδή η διάκριση ανάλογα το ποσοστό μίξης είναι ξεκάθαρη. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 410-485 nm ανατίθενται στα καροτενοειδή ενώ οι κορυφές στα 535 nm και στα 610-670 nm ανατίθενται στις χλωροφύλλες.

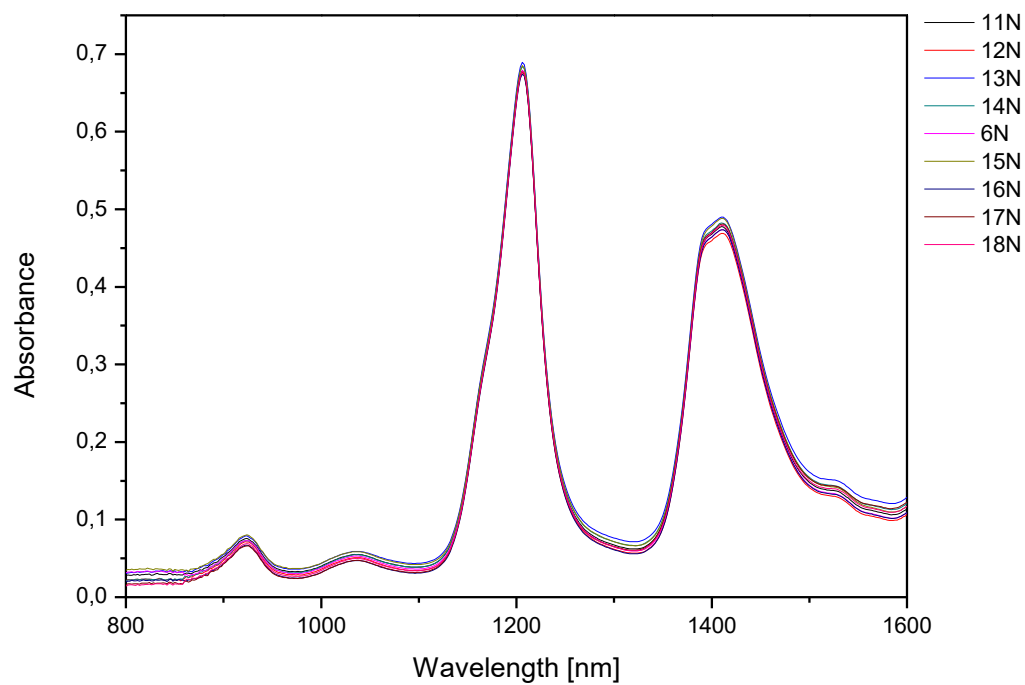


Περιοχή 800-1600 nm:

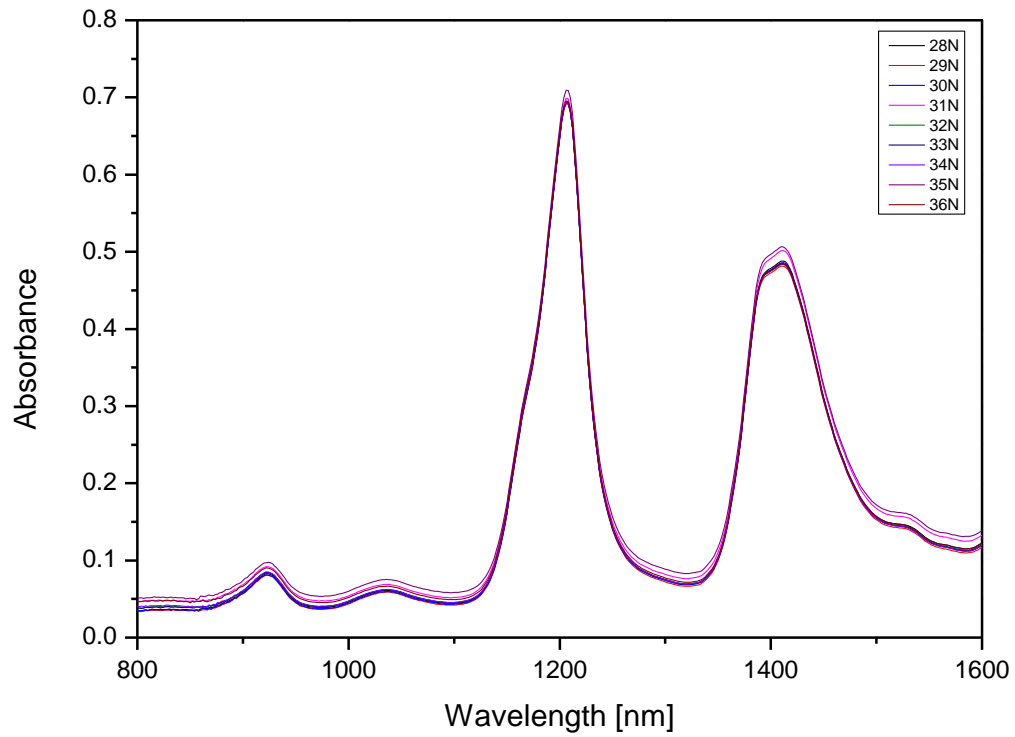
Ποικιλιακές μίξεις



Εικόνα 5.3.19: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Αδραμιτιανή στα 800-1600 nm

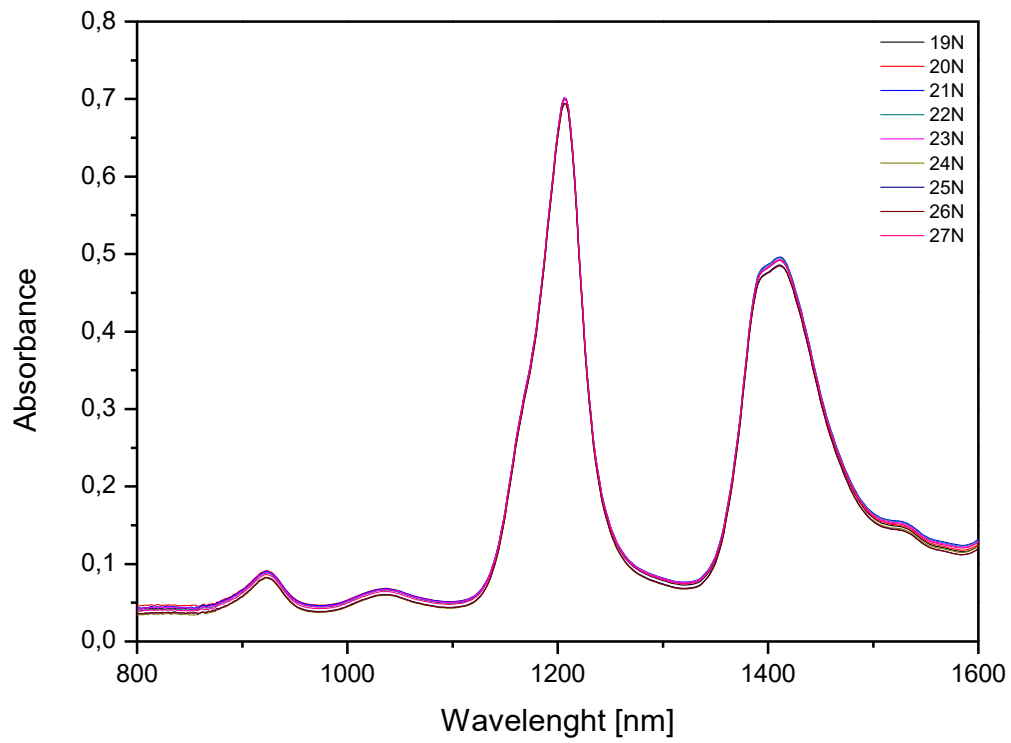


Εικόνα 5.3.20: Φάσματα μίξεων Κολοθή- Αδραμιτιανή στα 800-1600 nm

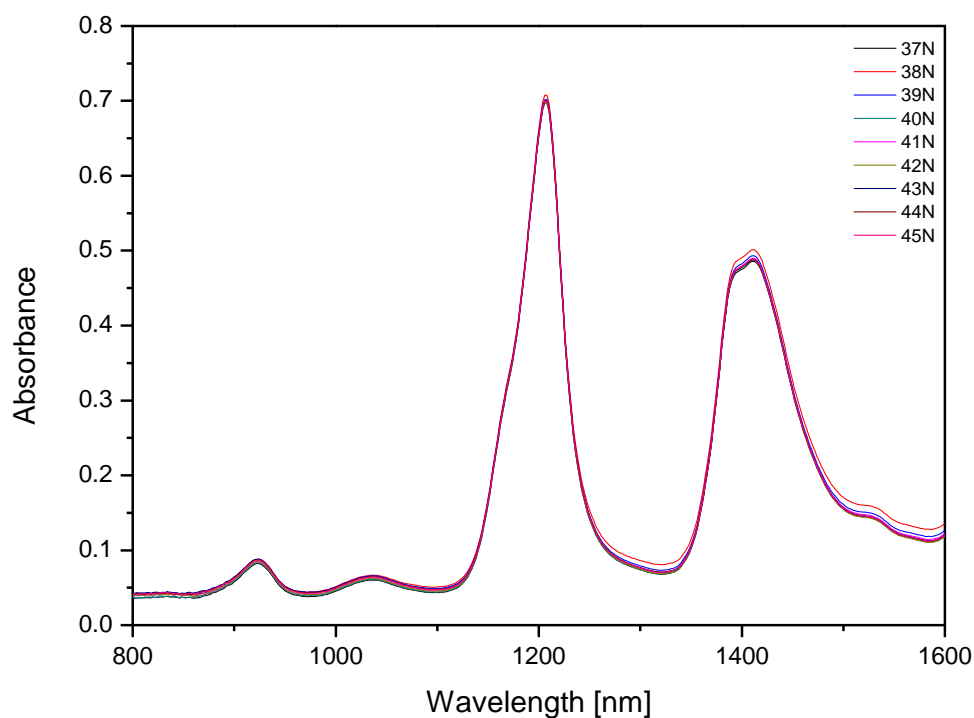


Εικόνα 5.3.21: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Κολοβή στα 800-1600 nm

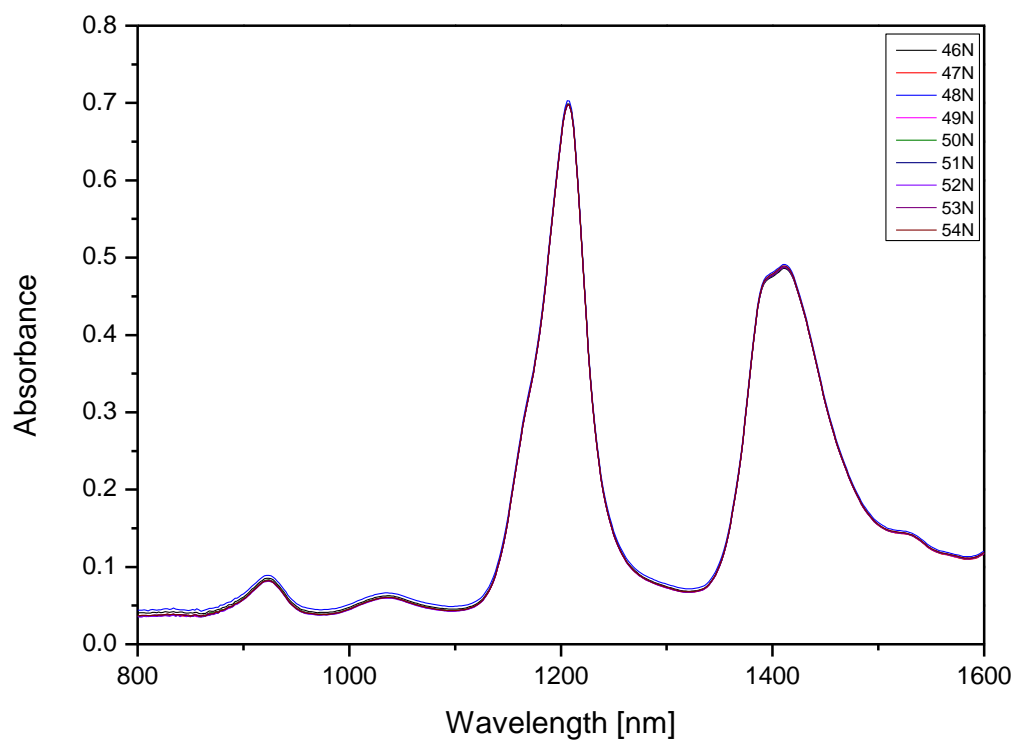
### Μίξεις Περιοχών



Εικόνα 5.3.22: Φάσματα μίξεων Λέσθος- Κρήτη στα 800-1600 nm



Εικόνα 5.3.23: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Κρήτη στα 800-1600 nm

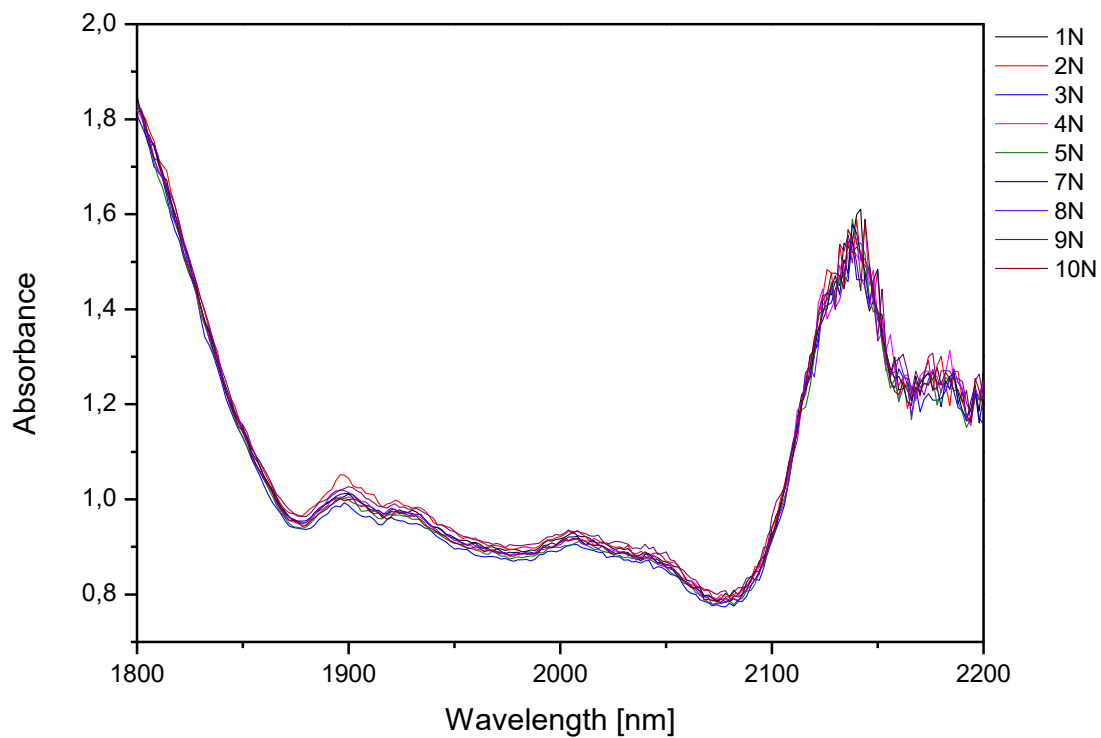


Εικόνα 5.3.24: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος στα 800-1600 nm

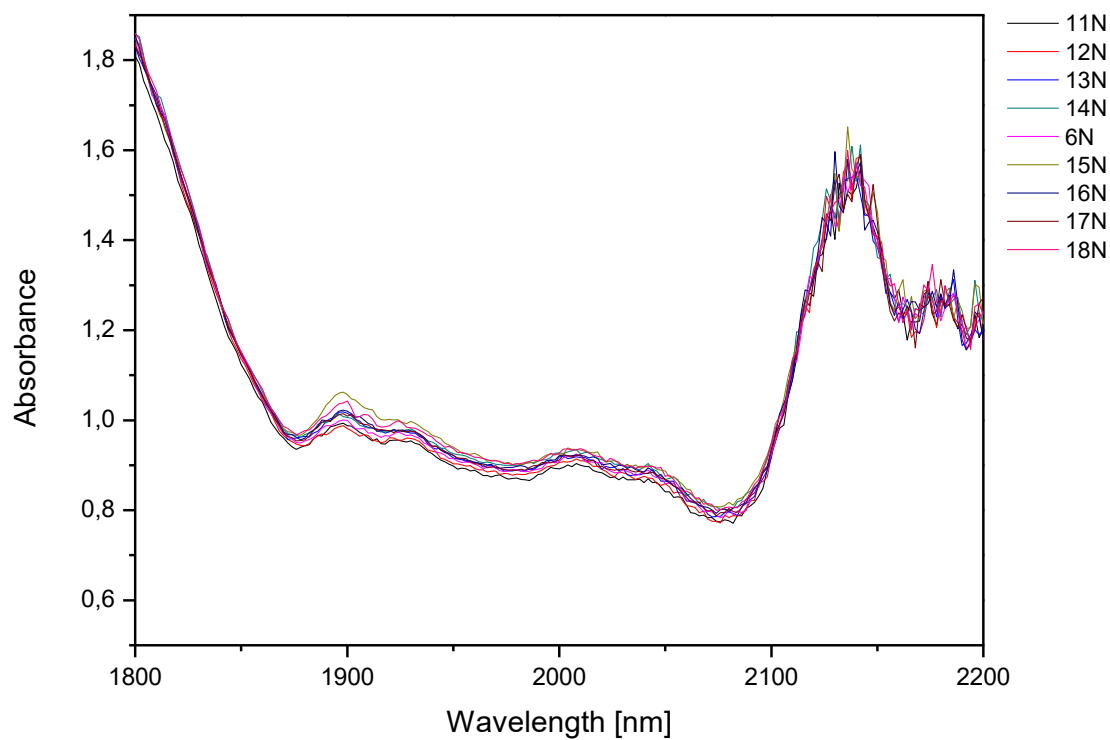
Από την σύγκριση των φασμάτων δεν μπορεί να προκύψει κανένα συμπέρασμα. Το προφίλ των κορυφών είναι ίδιο και η ένταση των κορυφών πολύ κοντινή. Παρατηρείται ελάχιστα καλύτερη διαφοροποίηση των ποικιλιακών μίξεων εν σχέσει με τις μίξεις περιοχών. Οι κορυφές που εμφανίζονται στις δονήσεις των δεσμών C-H των ακόρεστων λιπαρών οξέων και στις υπέρτονους αυτών.

Περιοχή 1800-2200 nm:

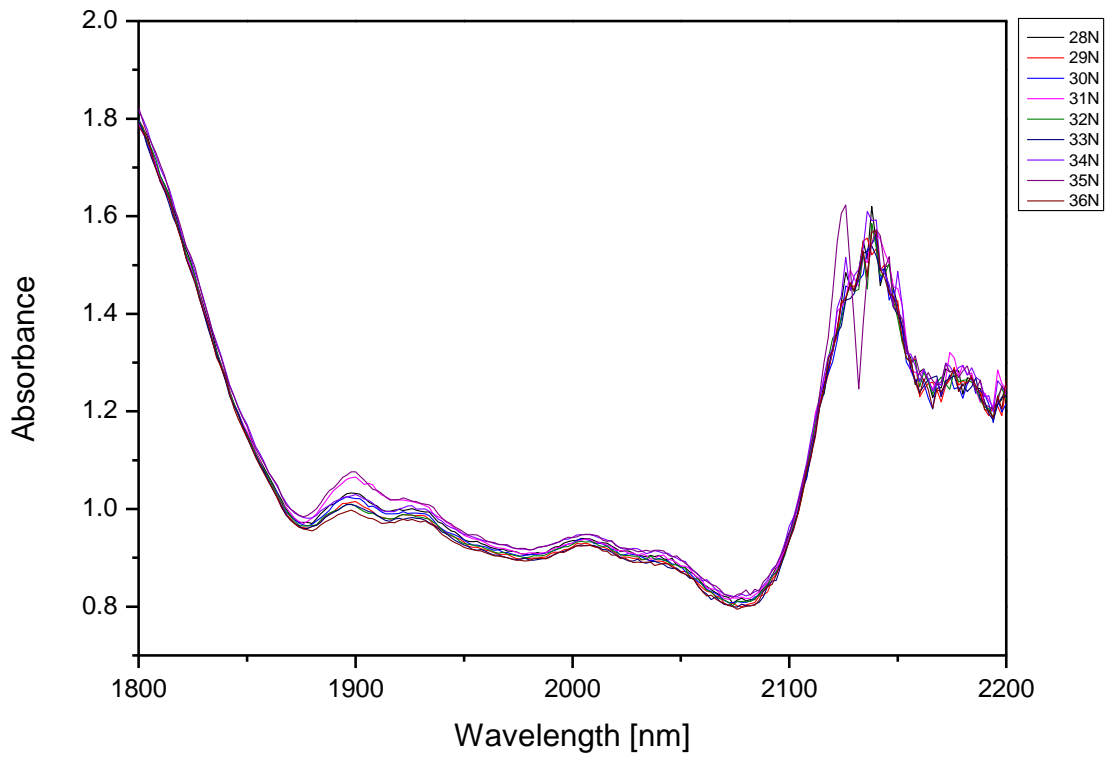
Ποικιλιακές μίξεις



Εικόνα 5.3.25: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Αδραμιτιανή στα 1800-2200 nm

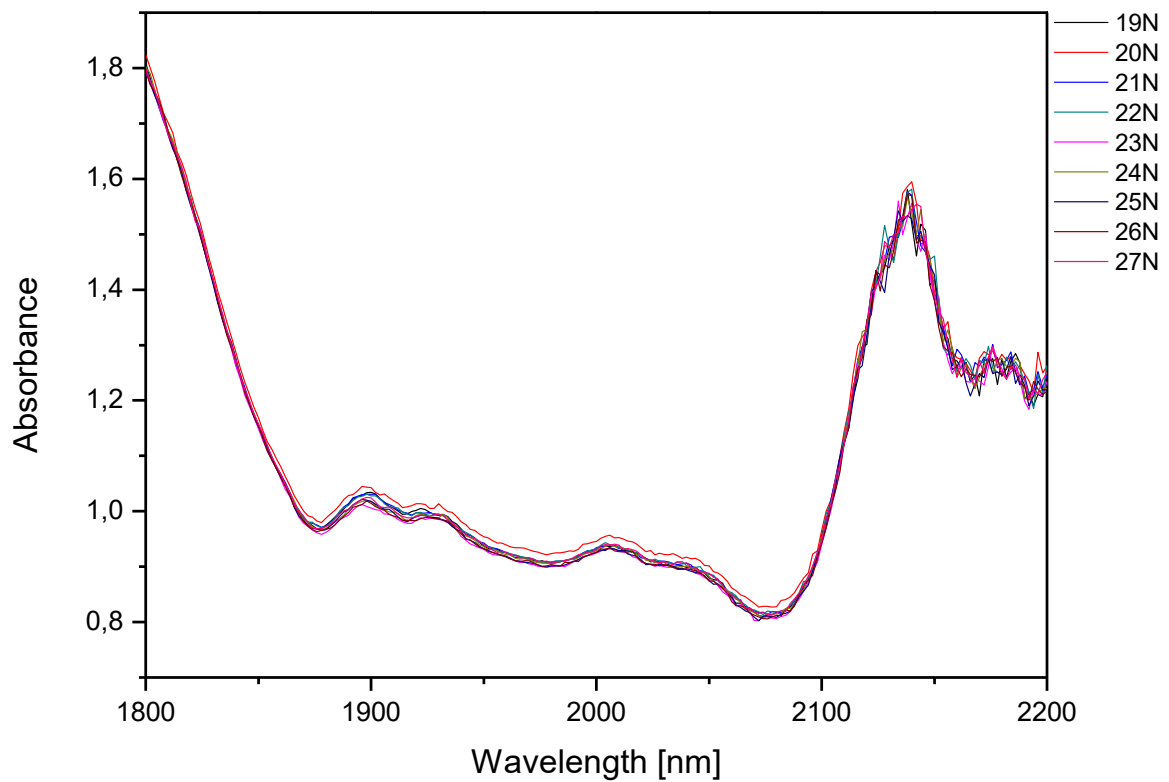


Εικόνα 5.3.26: Φάσματα μίξεων Κολοθή- Αδραμιτιανή στα 1800-2200 nm

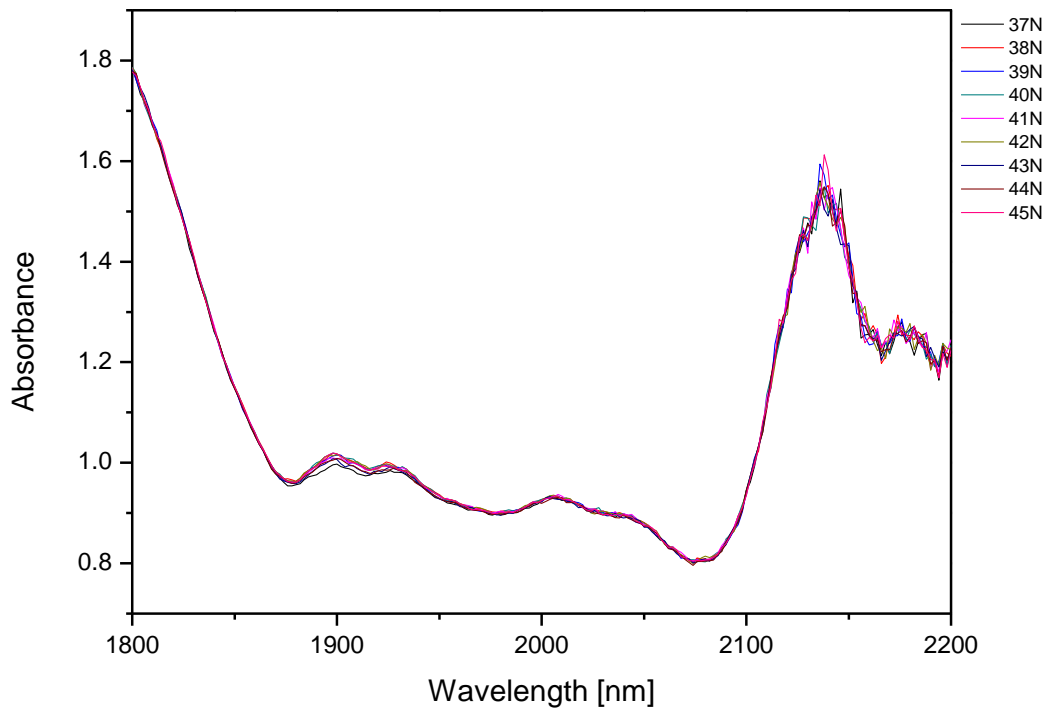


Εικόνα 5.3.27: Φάσματα μίξεων Κορωνέικη- Κολοβή στα 1800-2200 nm

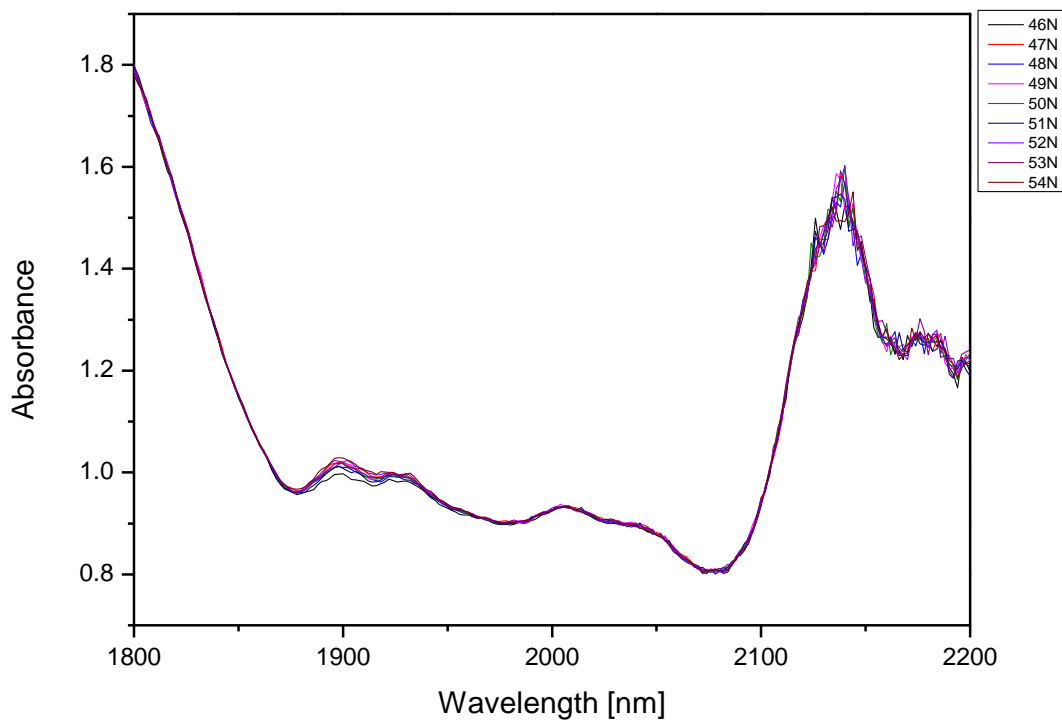
### Μίξεις Περιοχών



Εικόνα 5.3.28: Φάσματα μίξεων Λέσβος- Κρήτη στα 1800-2200 nm



Εικόνα 5.3.29: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Κρήτη στα 1800-2200 nm



Εικόνα 5.3.30: Φάσματα μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος στα 1800-2200 nm

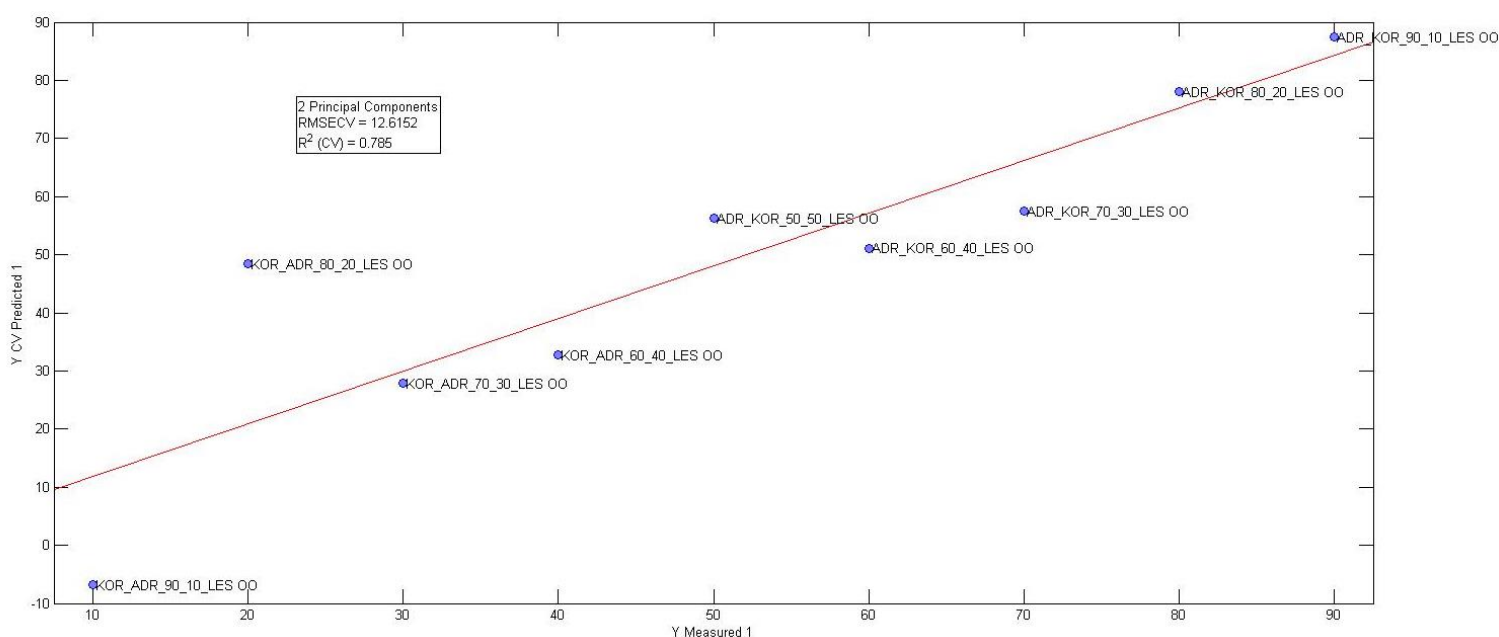
Από την σύγκριση των φασμάτων δεν προκύπτει κάποιο συμπέρασμα ούτε ως προς την διάκριση των ποικιλιακών μίξεων αλλά ούτε και ως προς την διάκριση των γεωγραφικών μίξεων. Τα φάσματα στην περιοχή των 2100 nm και άνω χαρακτηρίζονται από θόρυβο.

### 5.3.2 Στατιστική Ανάλυση

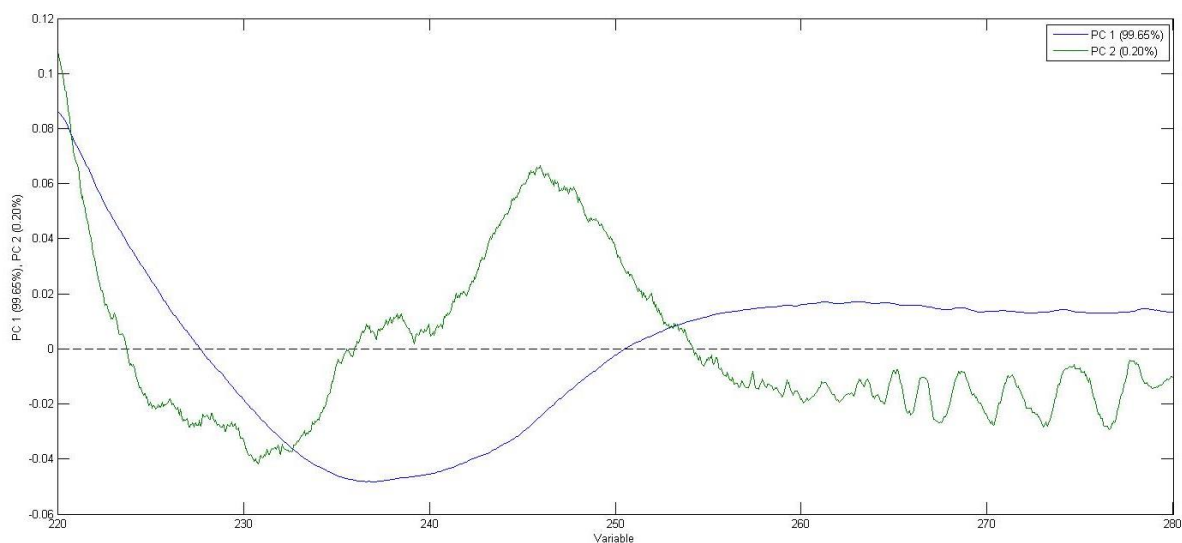
Για την στατιστική ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκε η μέθοδος PCR. Τα δείγματα αυτά έχουν μελετηθεί και με την μέθοδο PLS στο πλαίσιο εκπόνησης πτυχιακής εργασίας στο εργαστήριο.

#### 220-280 nm

#### Κορωνέικη- Αδραμυτιανή



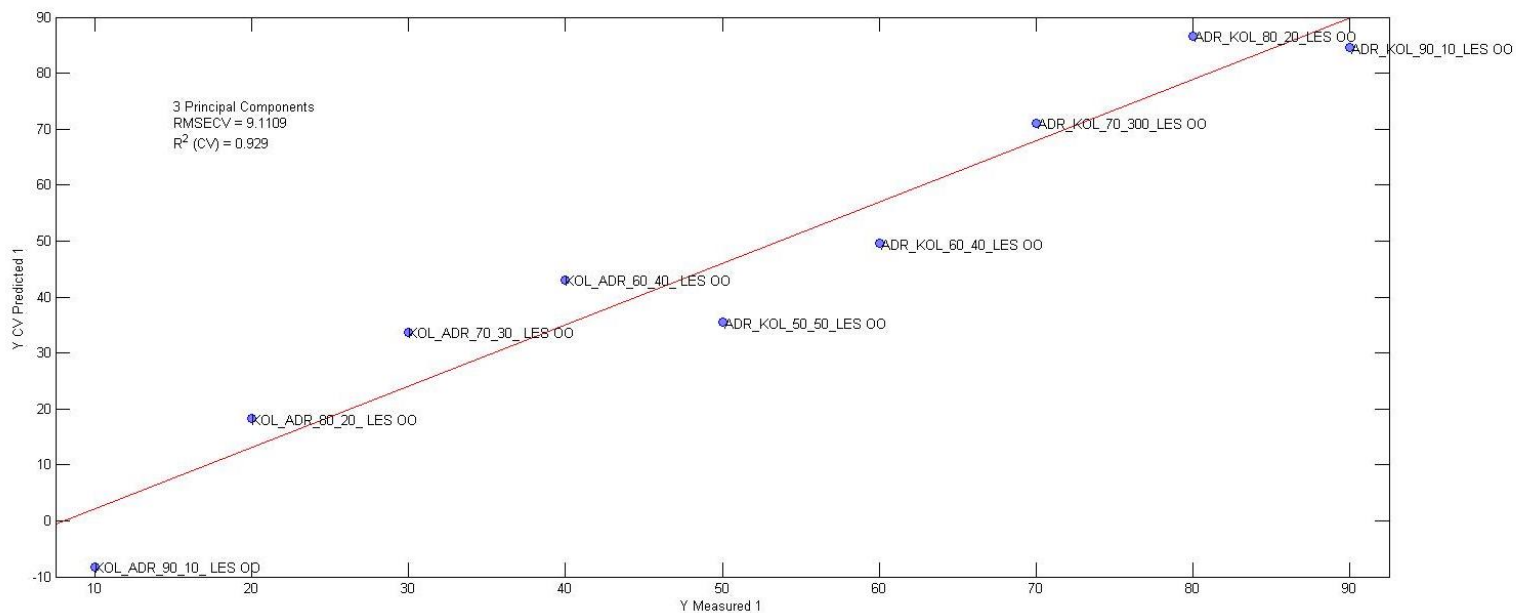
Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



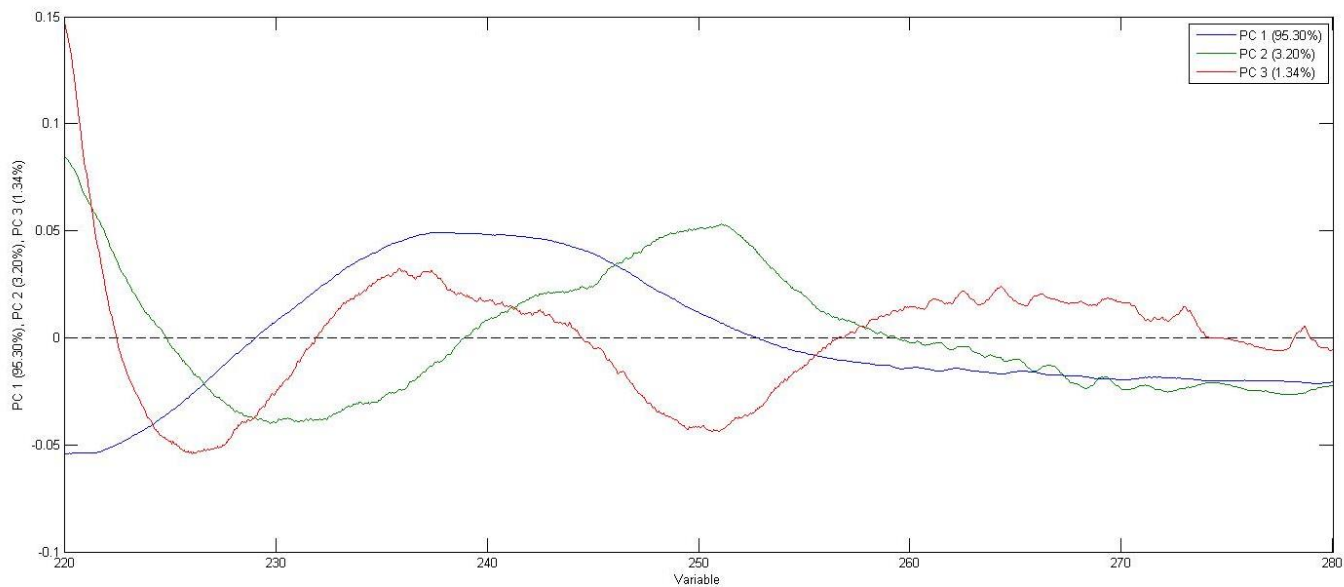
Εικόνα 5.3.31: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 220-280 nm

## 220-280 nm

### Κολοβή- Αδραμυτιανή



Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center

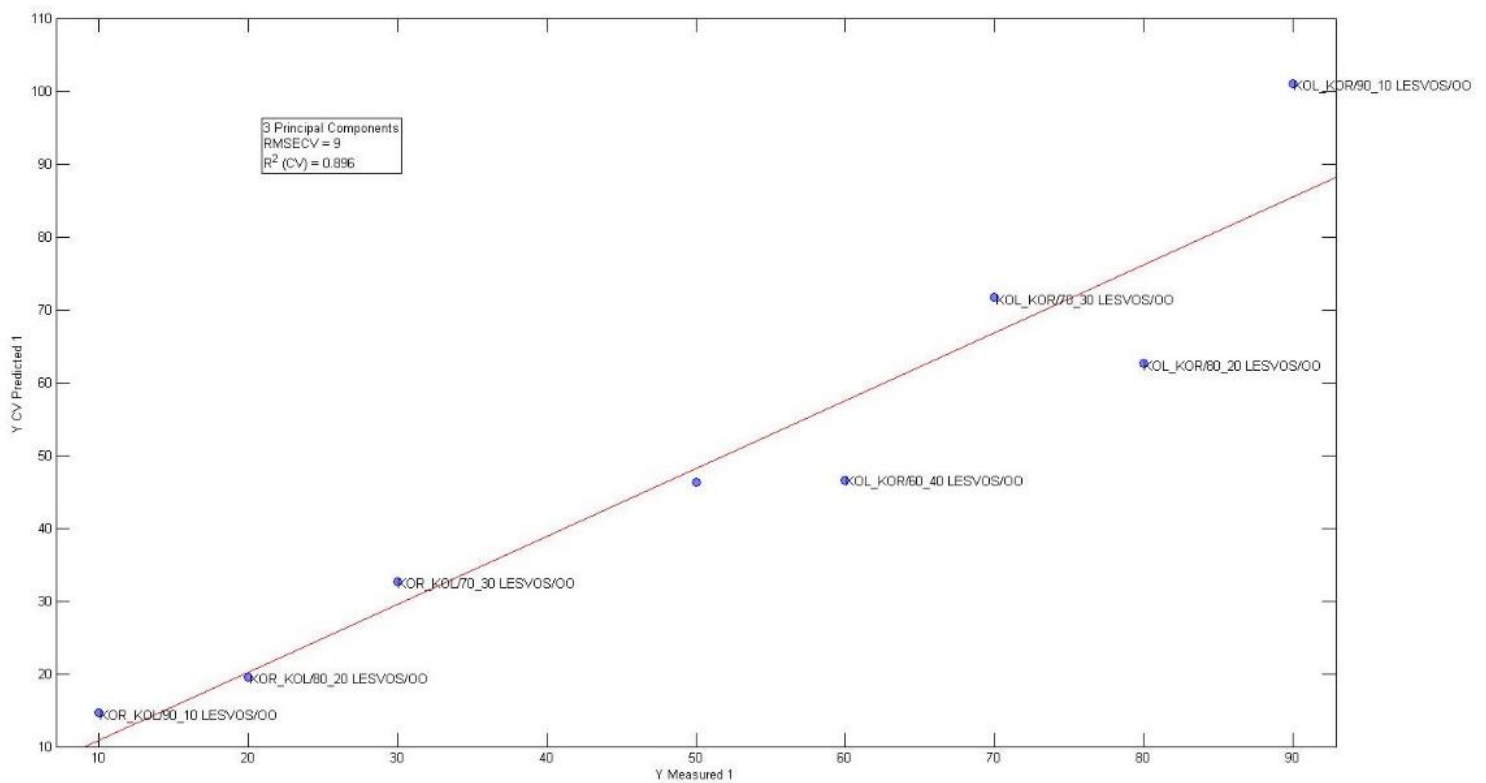


Εικόνα 5.3.32: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κολοβή- Αδραμυτιανή στα 220-280 nm

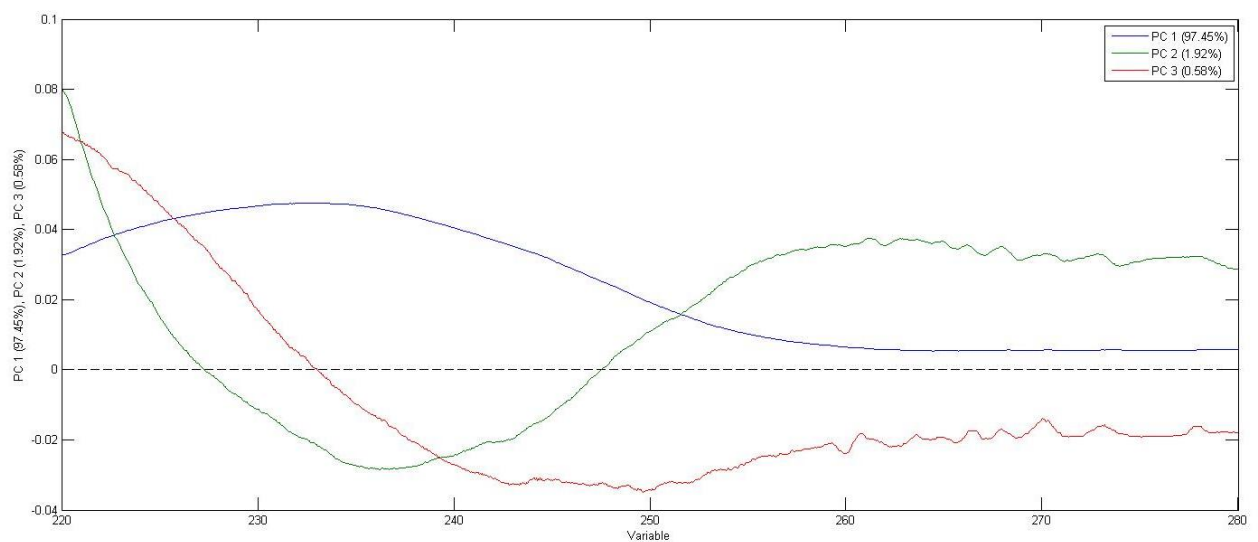


## 220-280 nm

### Κορωνέικη- Κολοβή



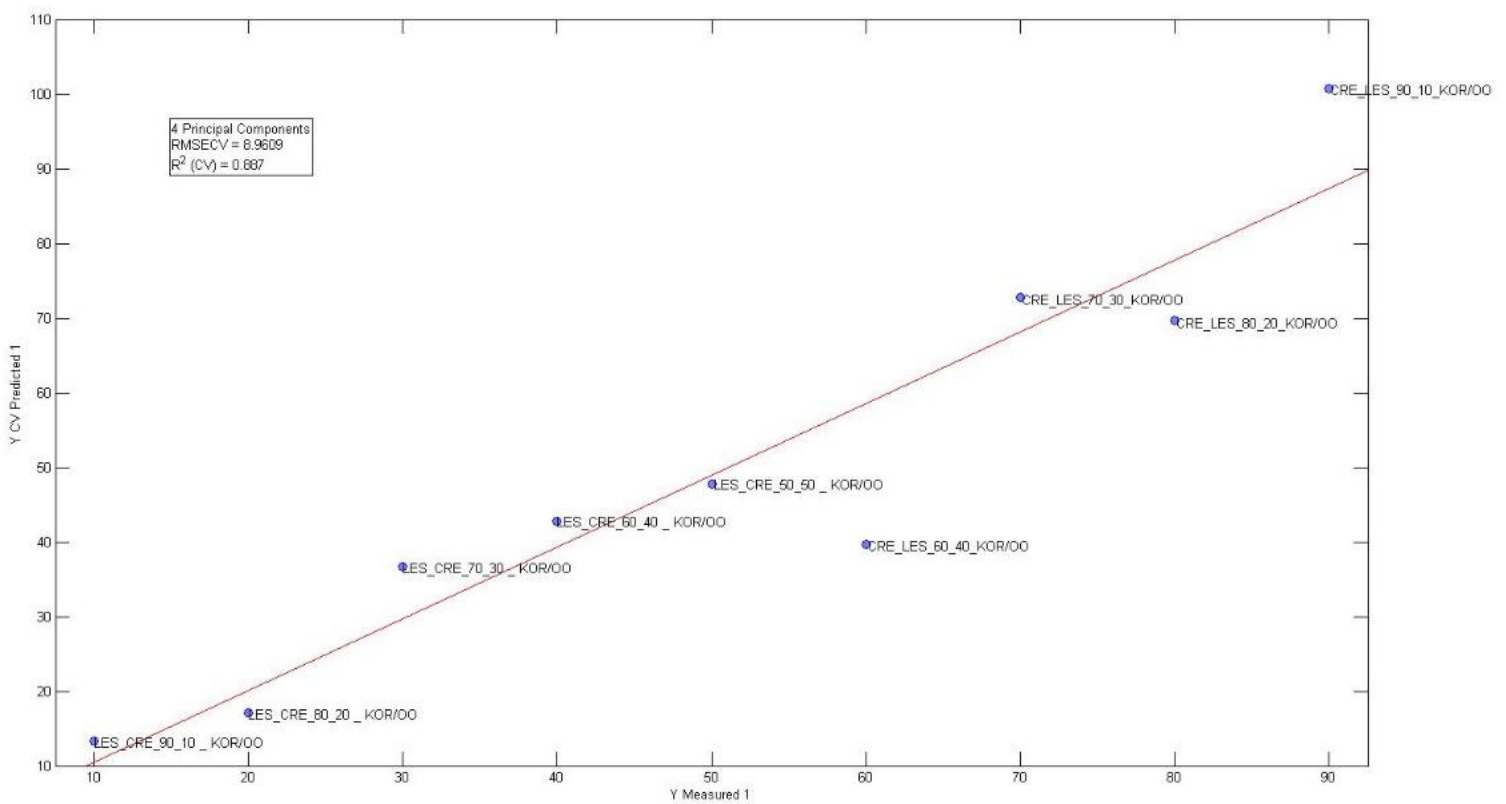
Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center, -31N



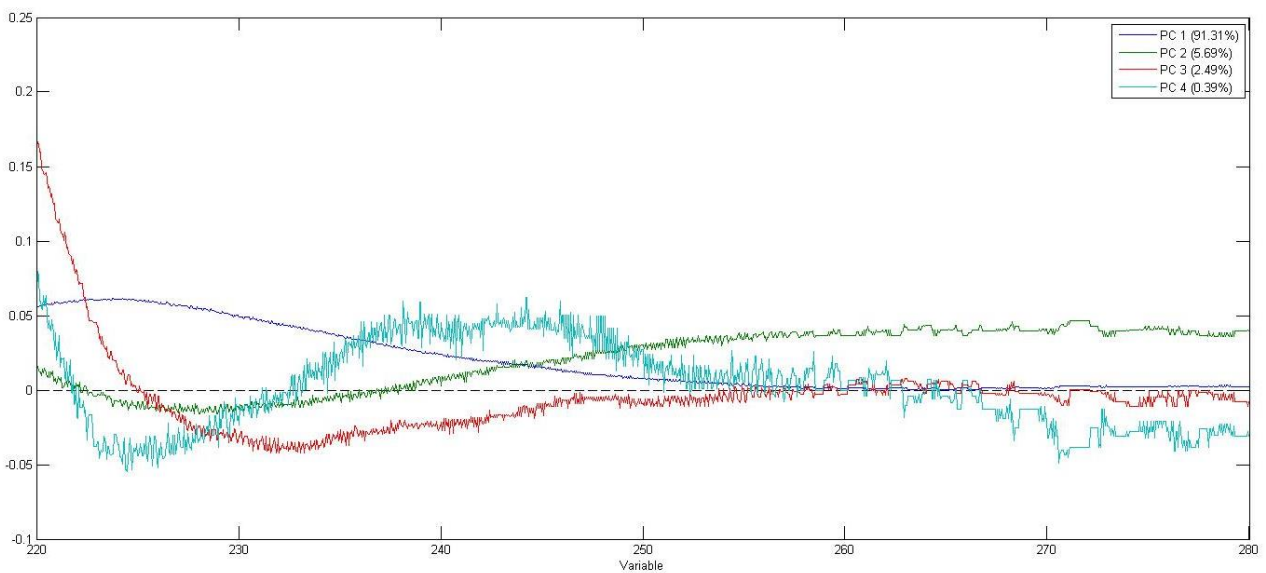
Εικόνα 5.3.33: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Κολοβή στα 220-280 nm

## 220-280 nm

### Λέσβος- Κρήτη



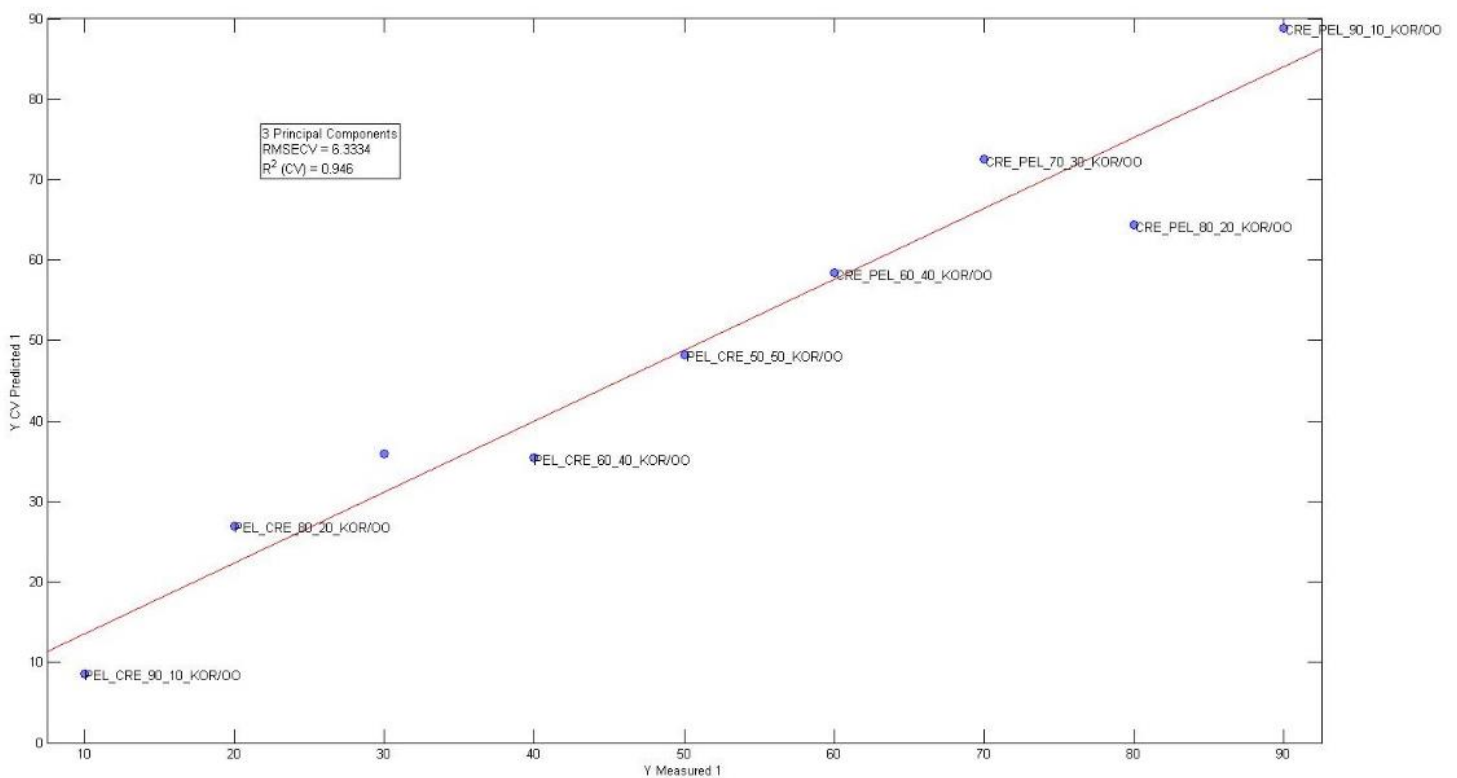
### Προεξεργασία με Mean Center



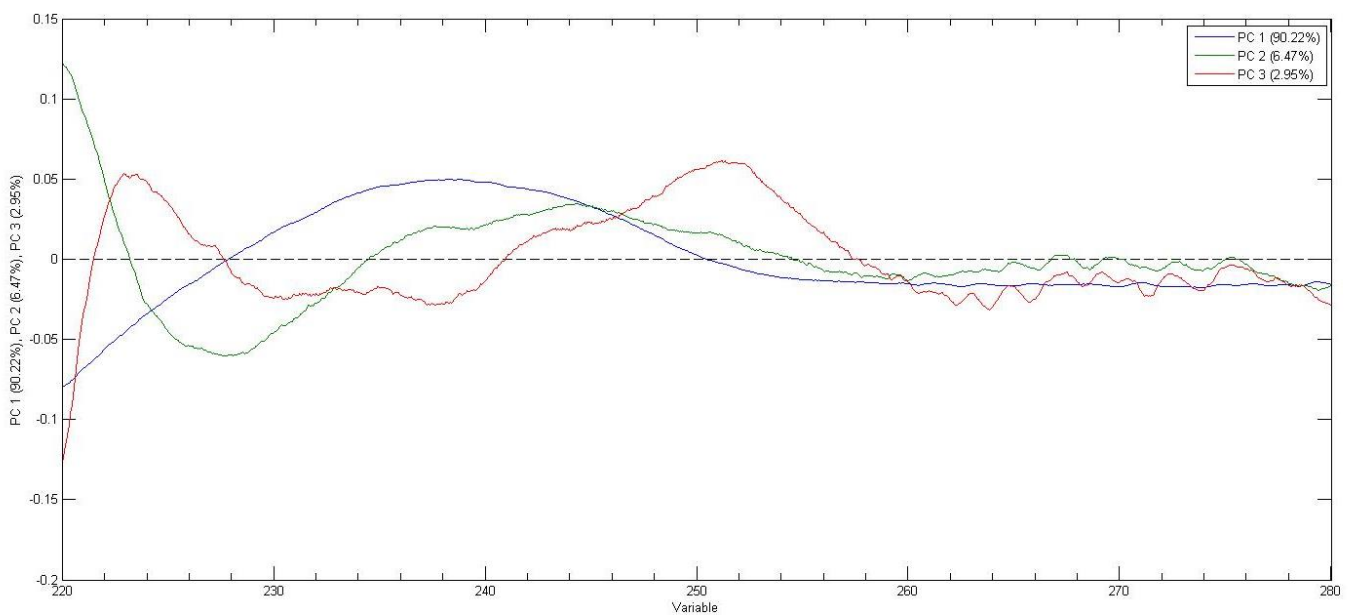
Εικόνα 5.3.34: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Λέσβος- Κρήτη στα 220-280 nm

## 220-280 nm

### Πελοπόννησος- Κρήτη



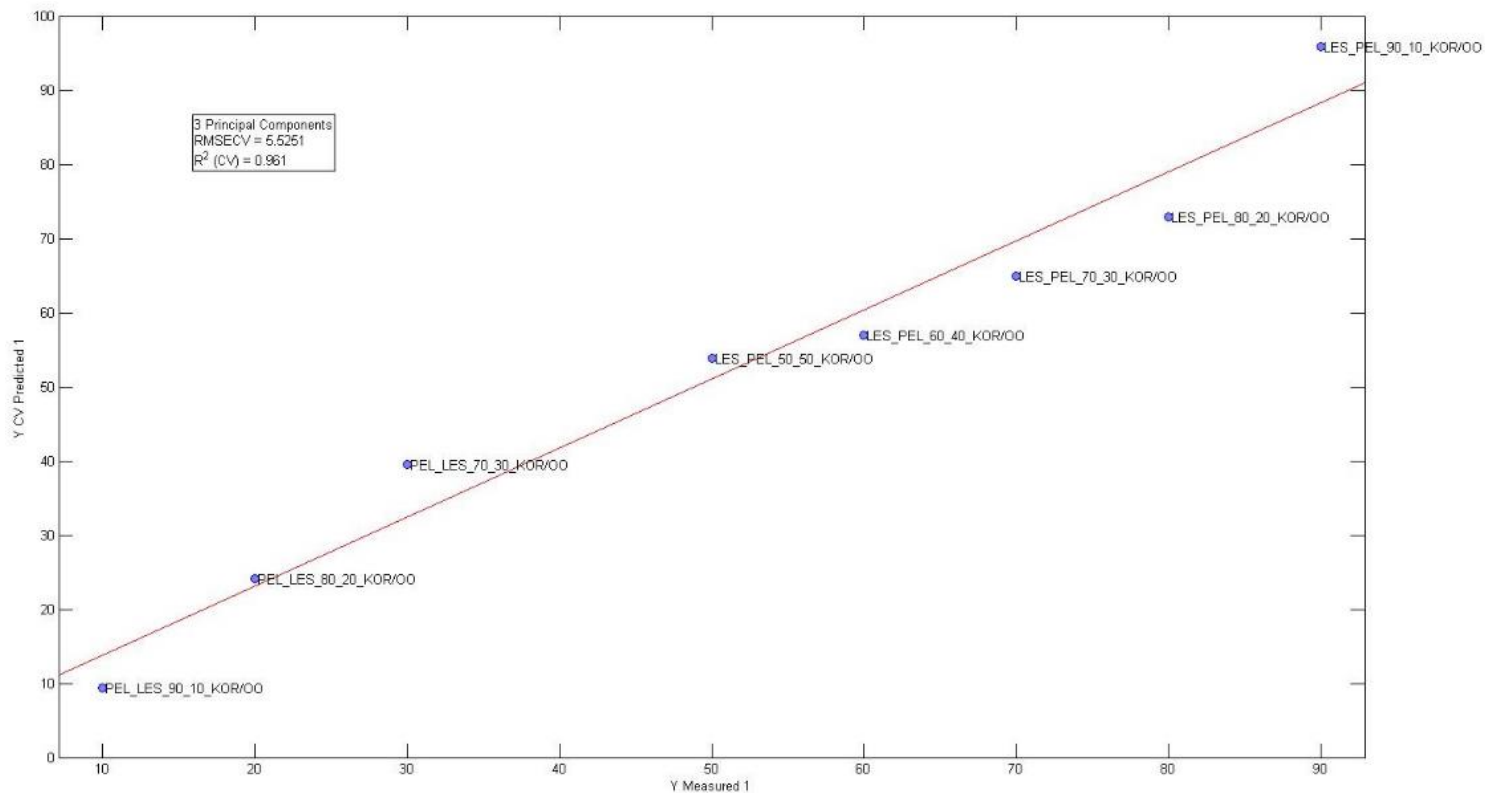
Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



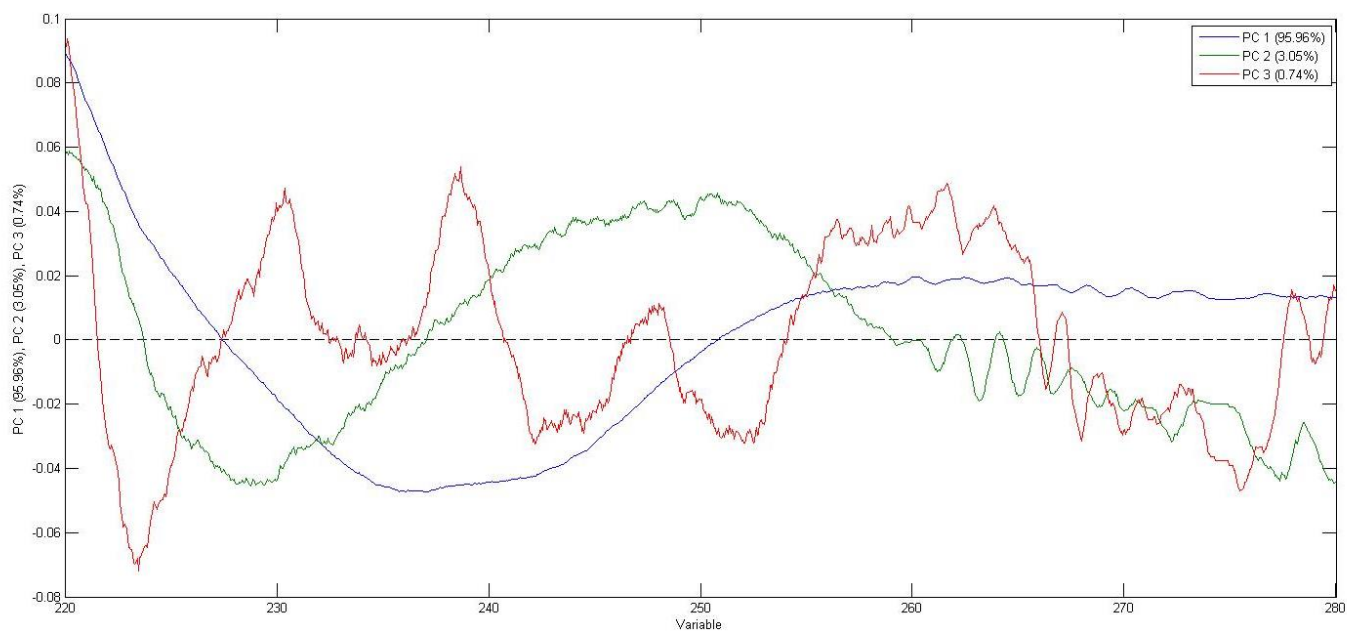
Εικόνα 5.3.35: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος- Κρήτη στα 220-280 nm

## 220-280 nm

### Πελοπόννησος- Λέσβος



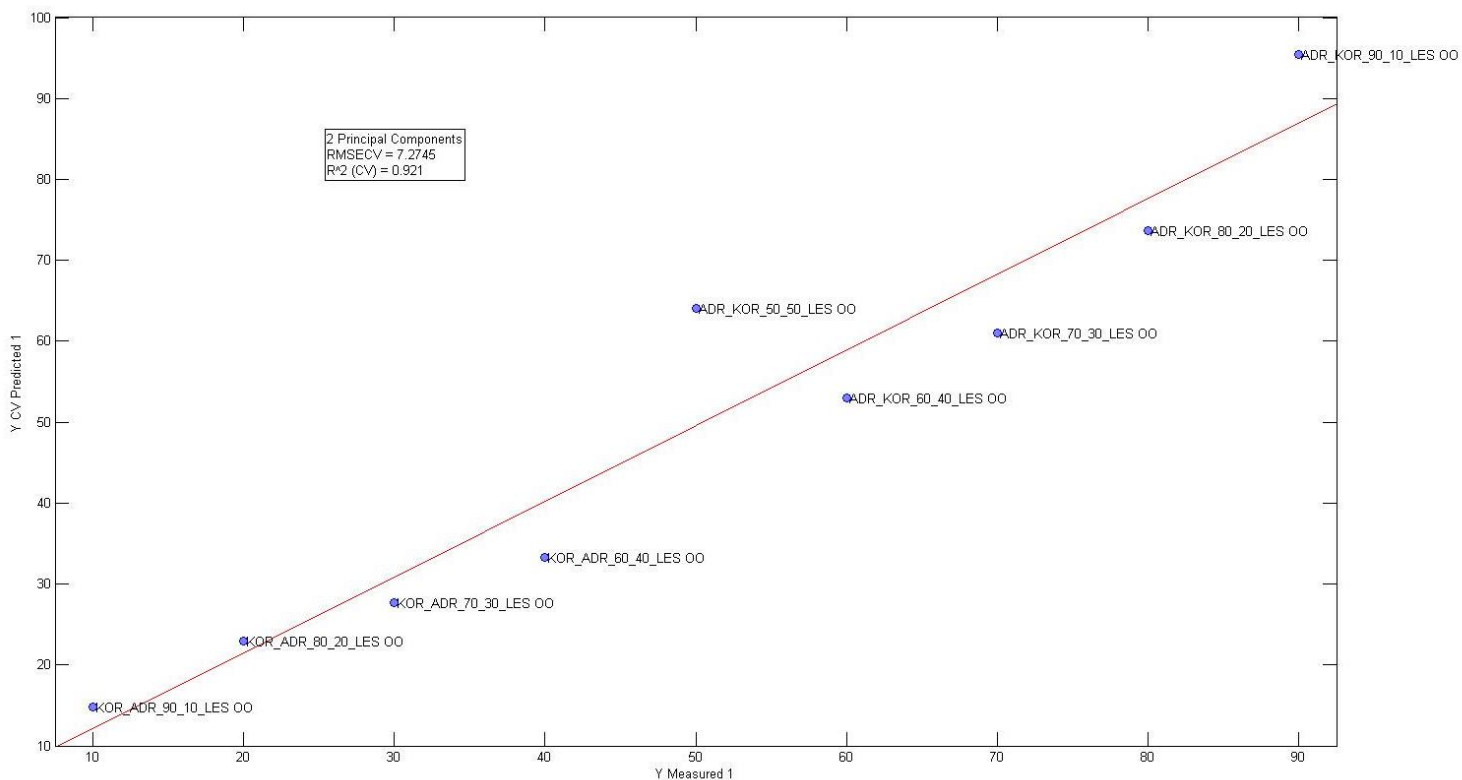
Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center, -49N



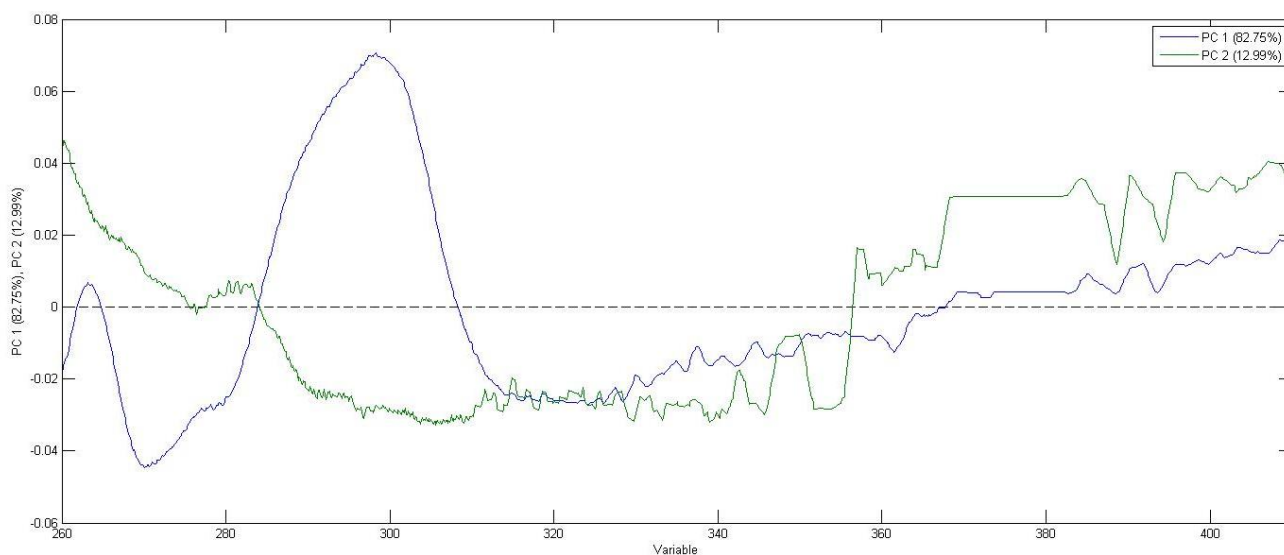
Εικόνα 5.3.36: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος- Λέσβος στα 220-280 nm

## 260-410 nm

### Κορωνέικη- Αδραμυτιανή



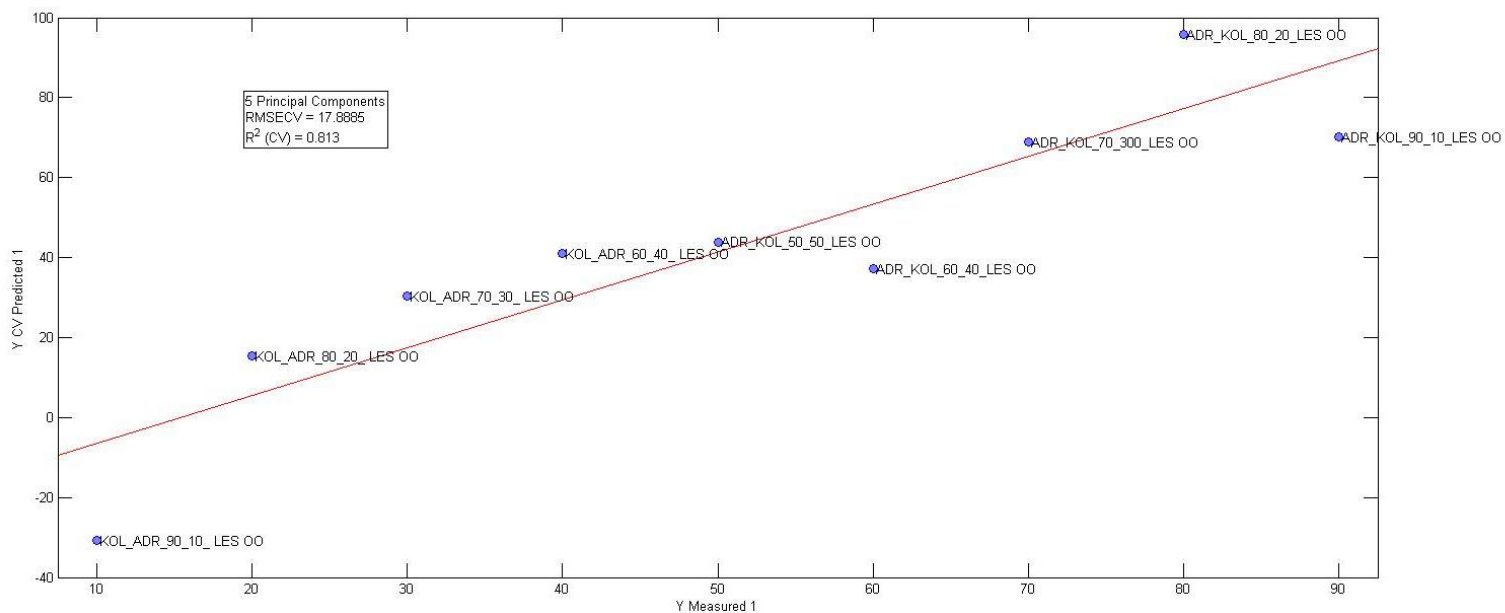
### Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



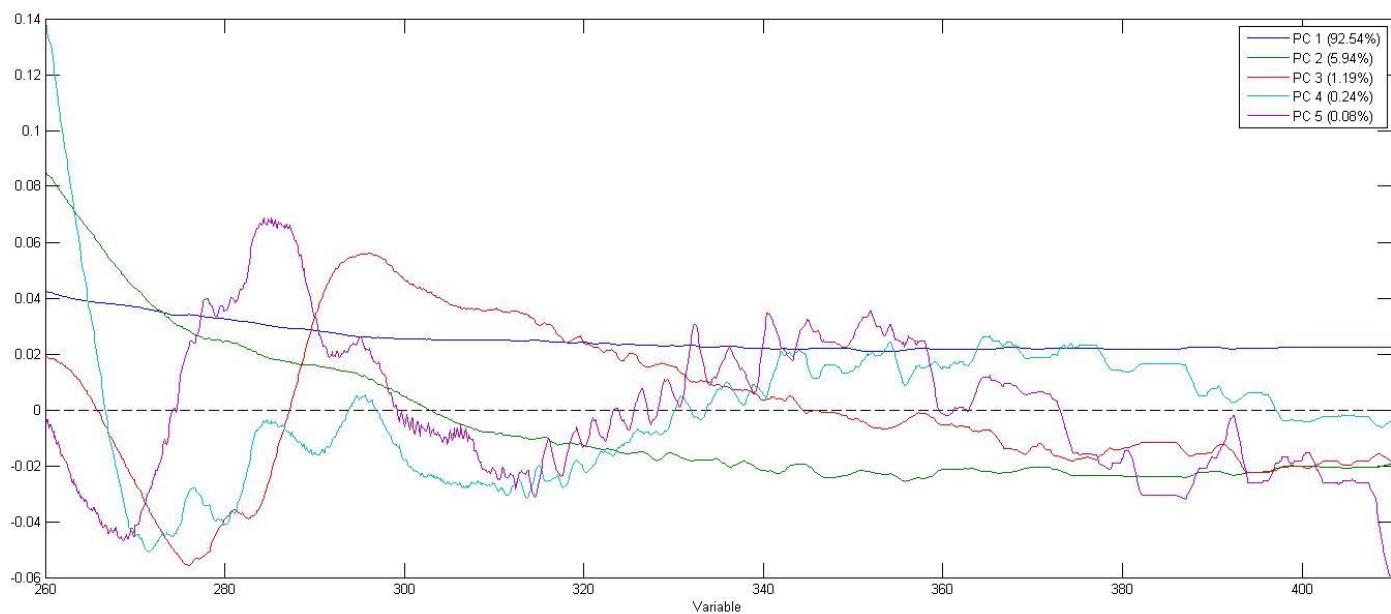
Εικόνα 5.3.37: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 260-410 nm

## 260-410 nm

### Κολοβή- Αδραμυτιανή



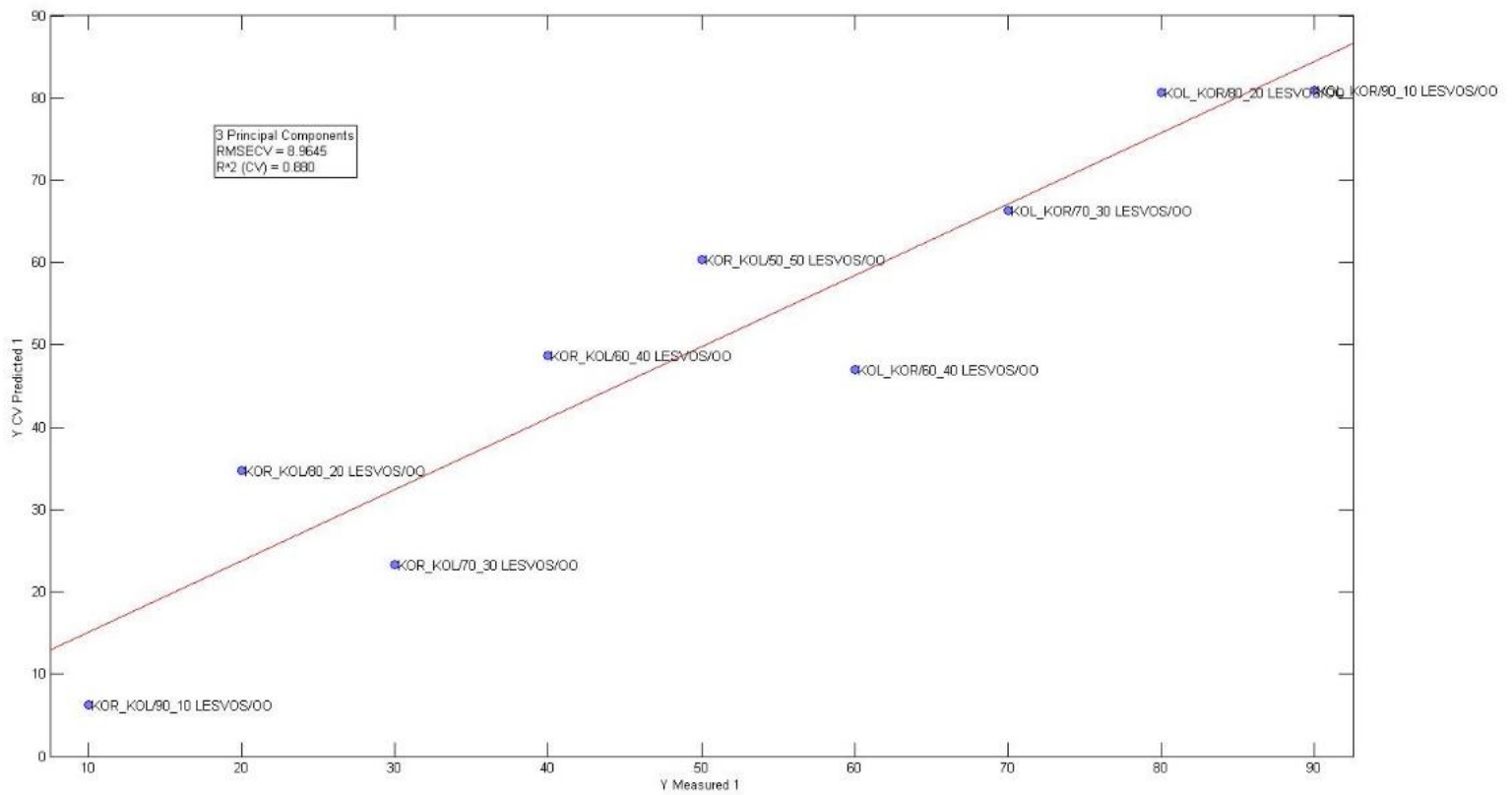
Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



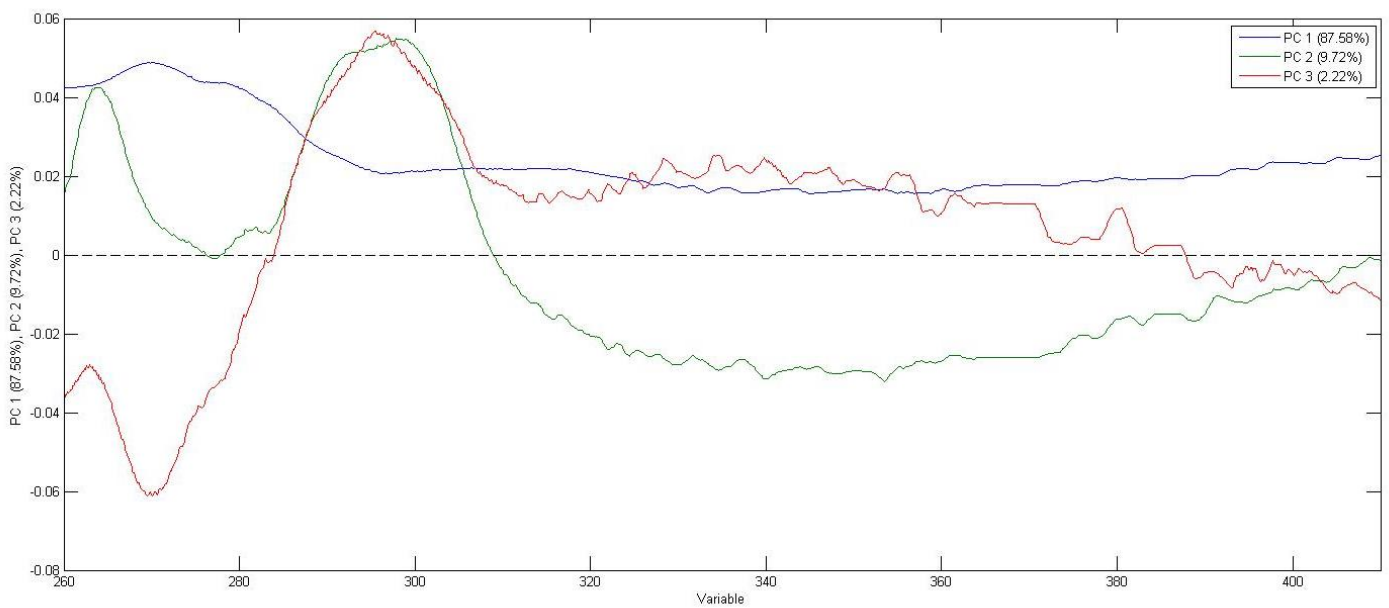
Εικόνα 5.3.38: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κολοβή- Αδραμυτιανή στα 260-410 nm

## 260-410 nm

### Κορωνέικη- Κολοβή



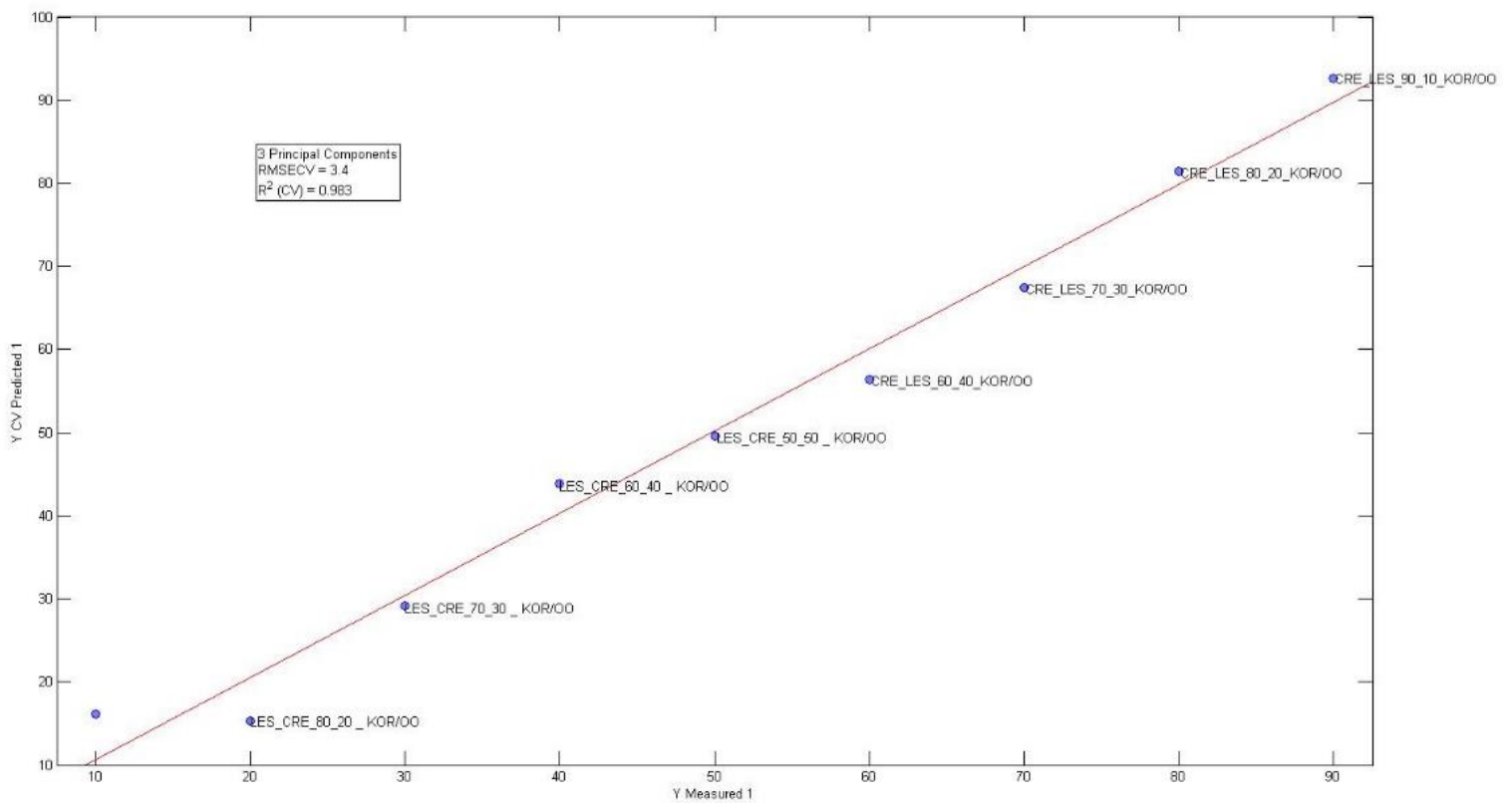
### Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



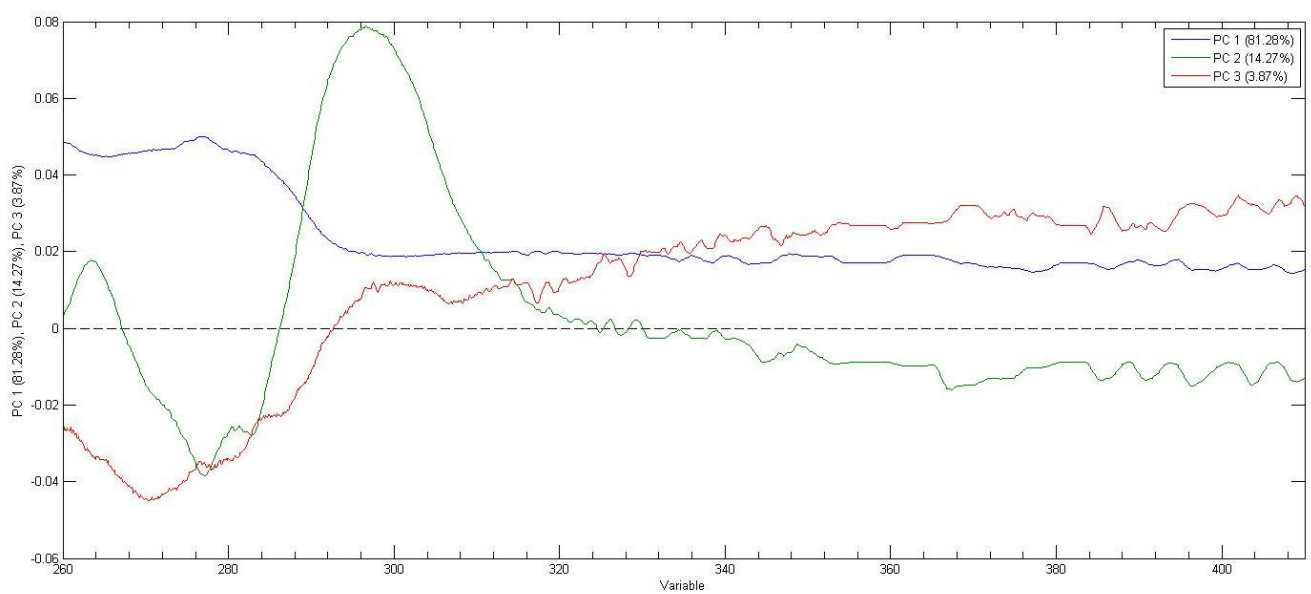
Εικόνα 5.3.39: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη-Κολοβή στα 260-410 nm

## 260-410 nm

### Λέσβος- Κρήτη



Προεξεργασία με Smoothing, Mean Center

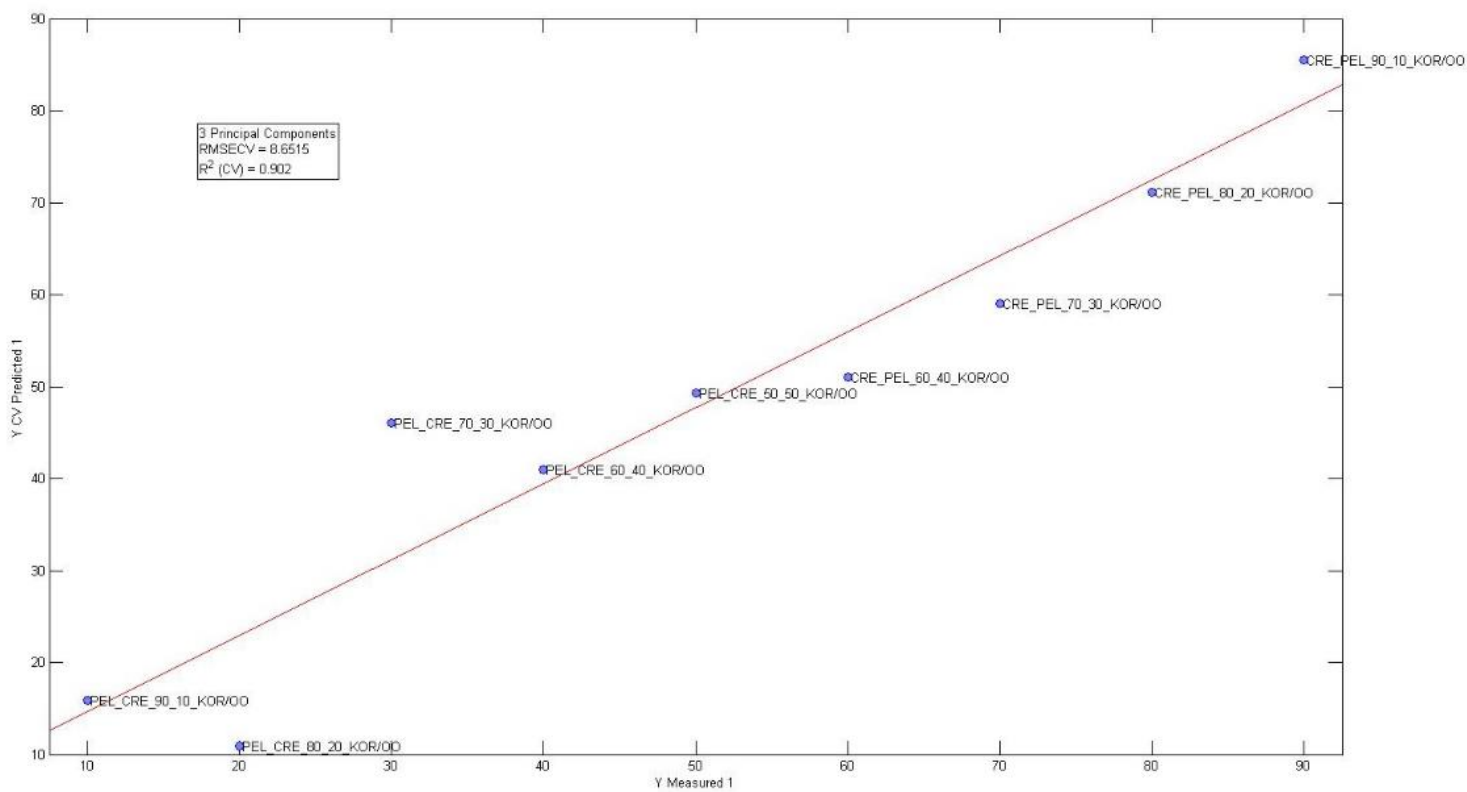


Εικόνα 5.3.40: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Λέσβος- Κρήτη στα 260-410 nm

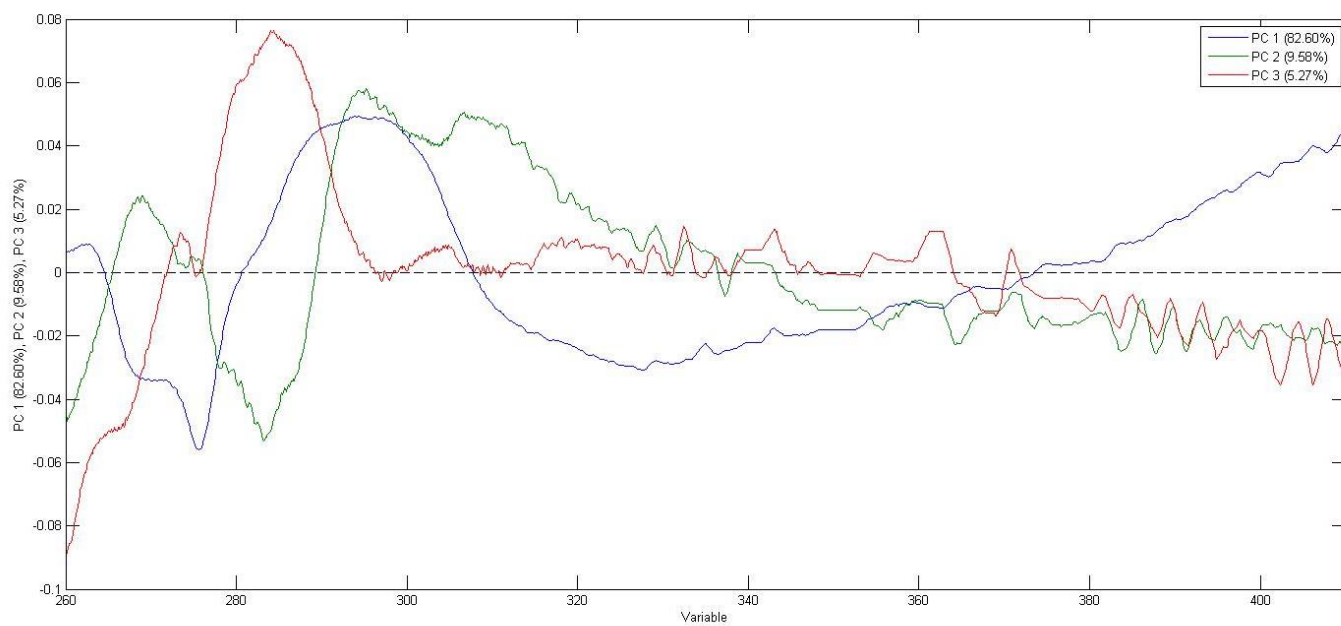


## 260-410 nm

### Πελοπόννησος- Κρήτη



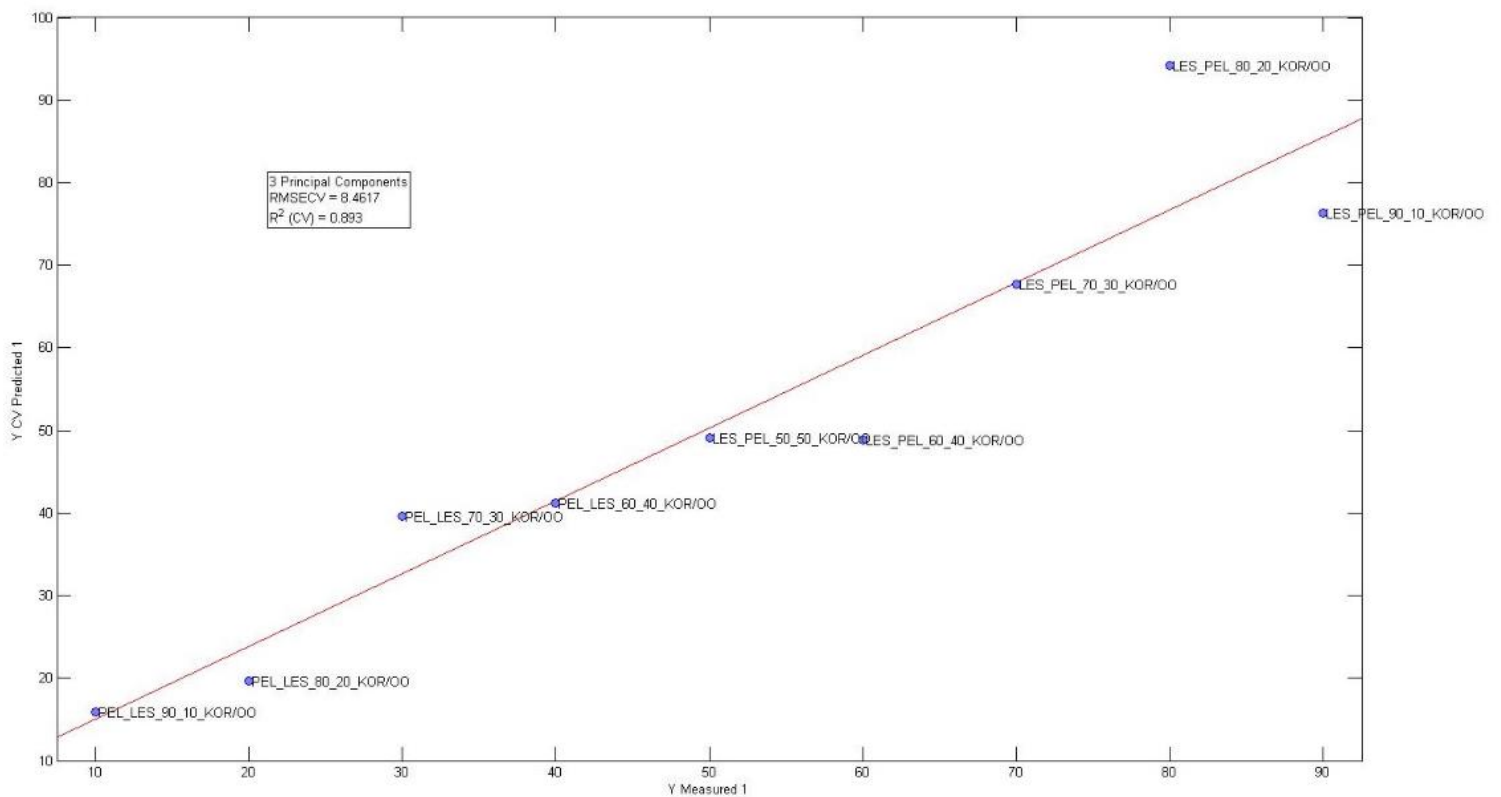
Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



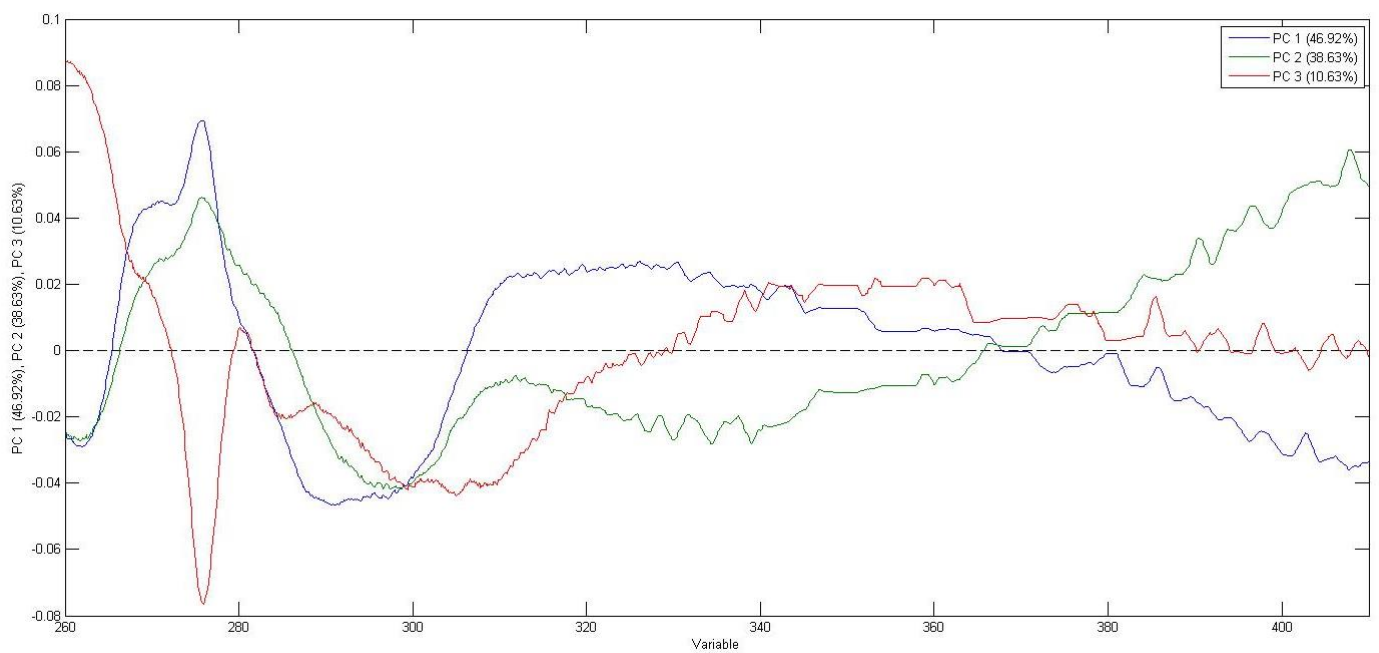
Εικόνα 5.3.41: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος- Κρήτη στα 260-410 nm

## 260-410 nm

### Πελοπόννησος- Λέσβος



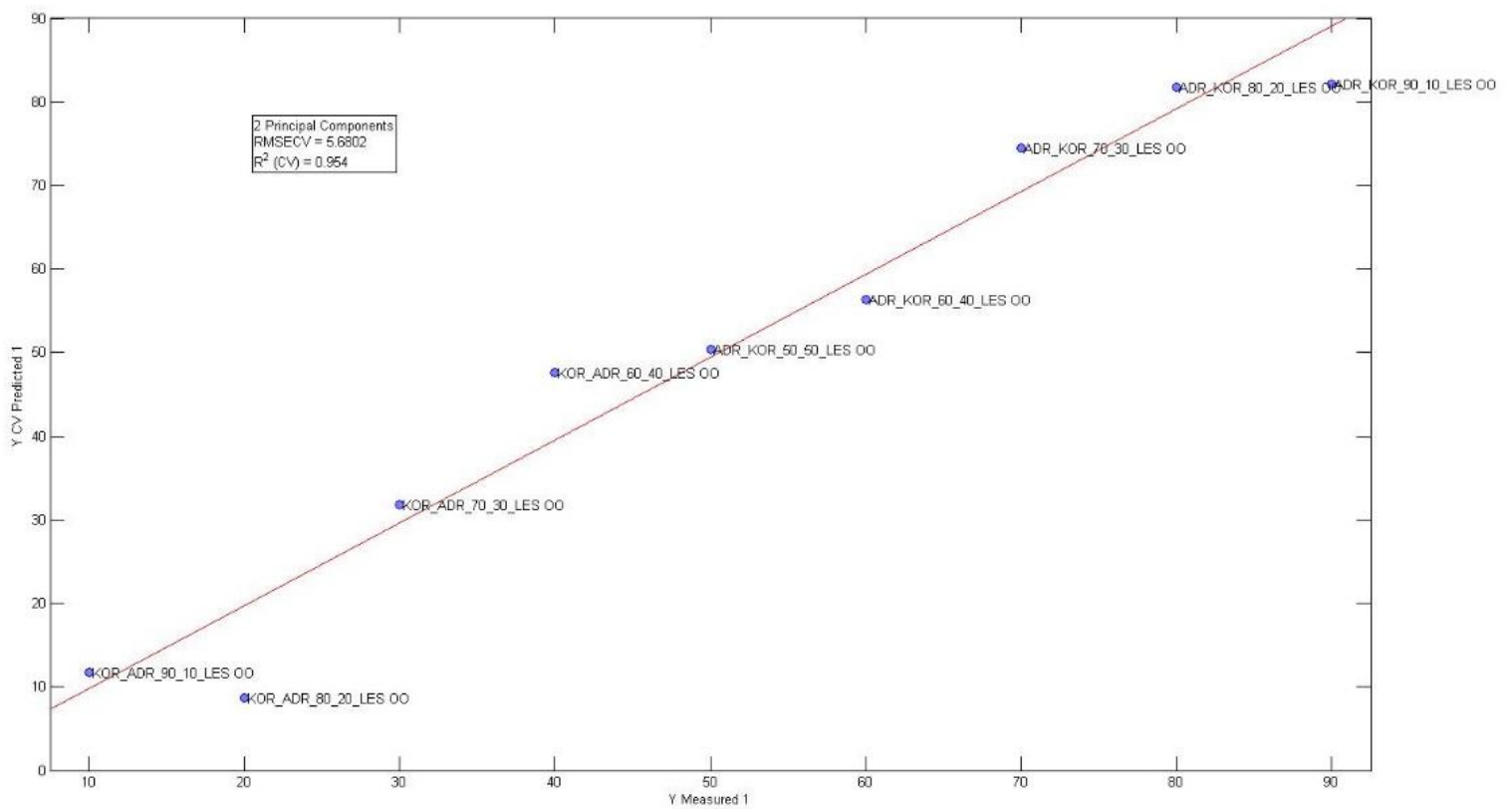
### Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



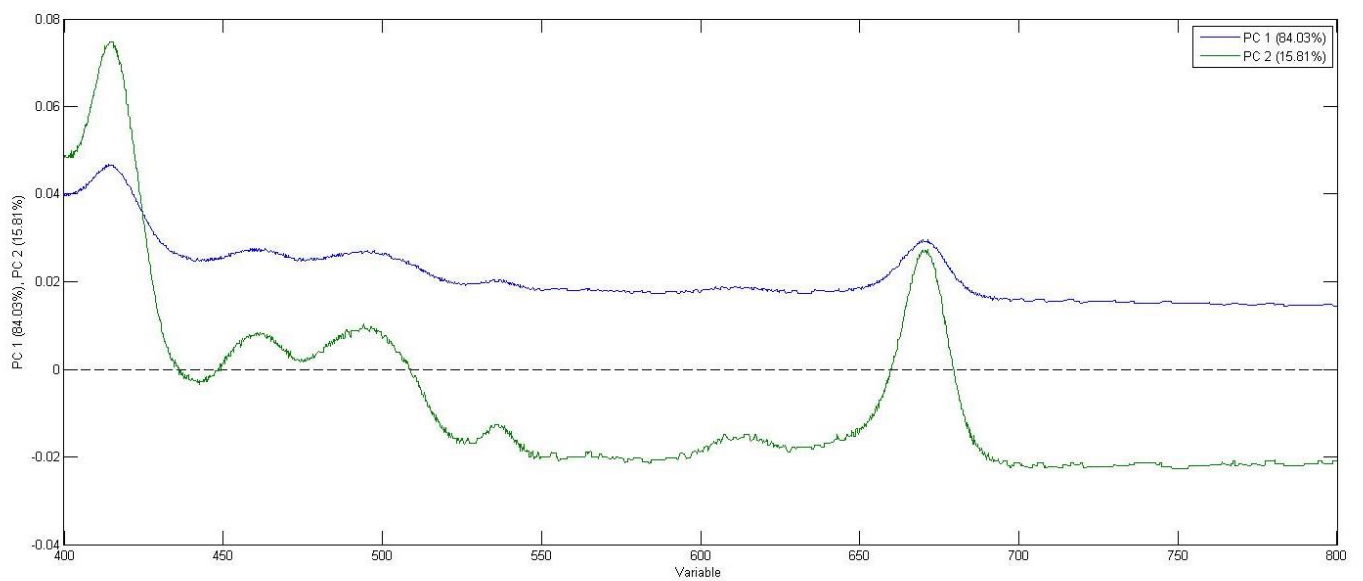
Εικόνα 5.3.42: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος- Λέσβος στα 260-410 nm

## 400- 800 nm

### Κορωνέικη- Αδραμυτιανή



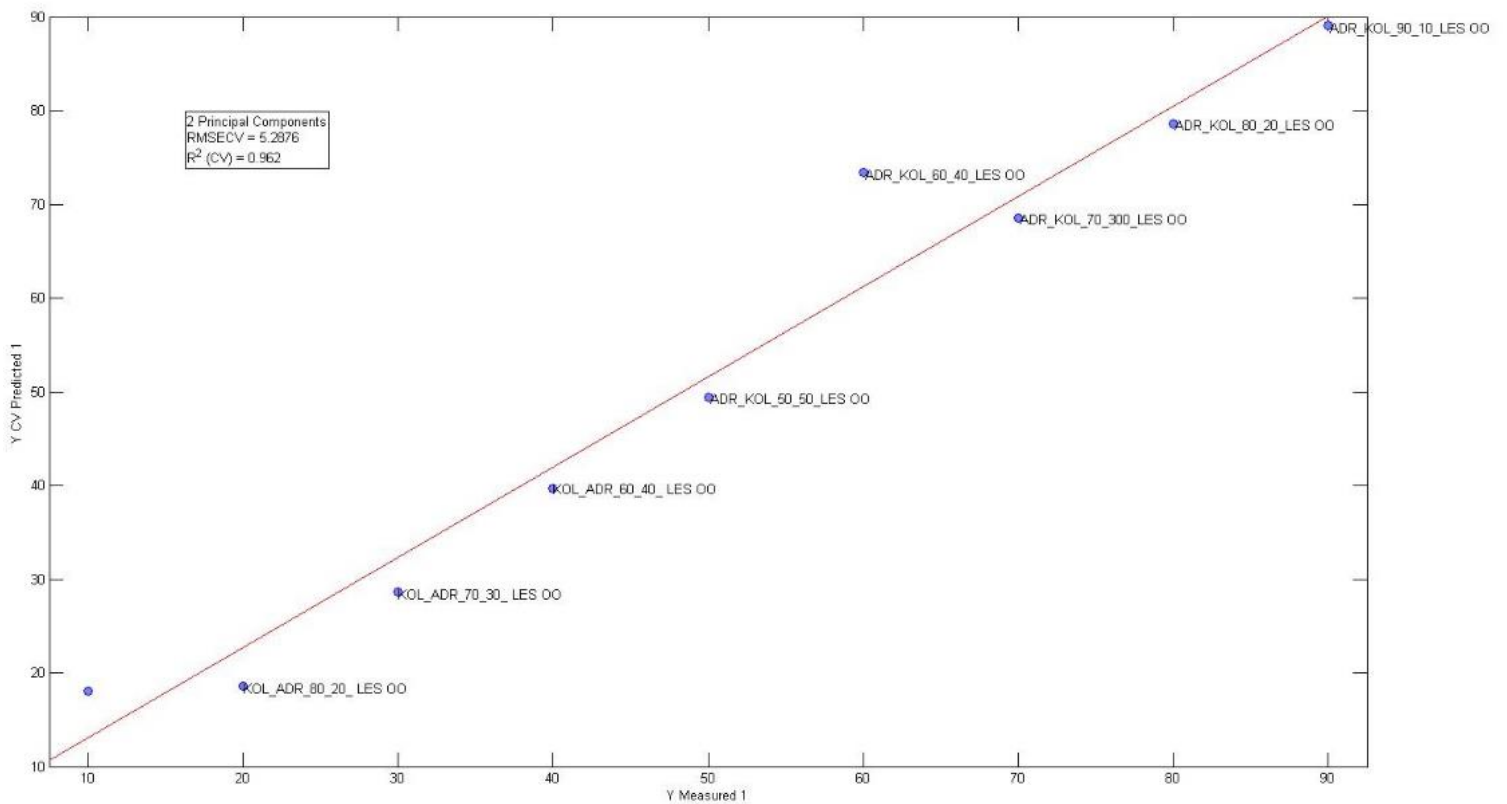
### Προεπεξεργασία με Mean Center



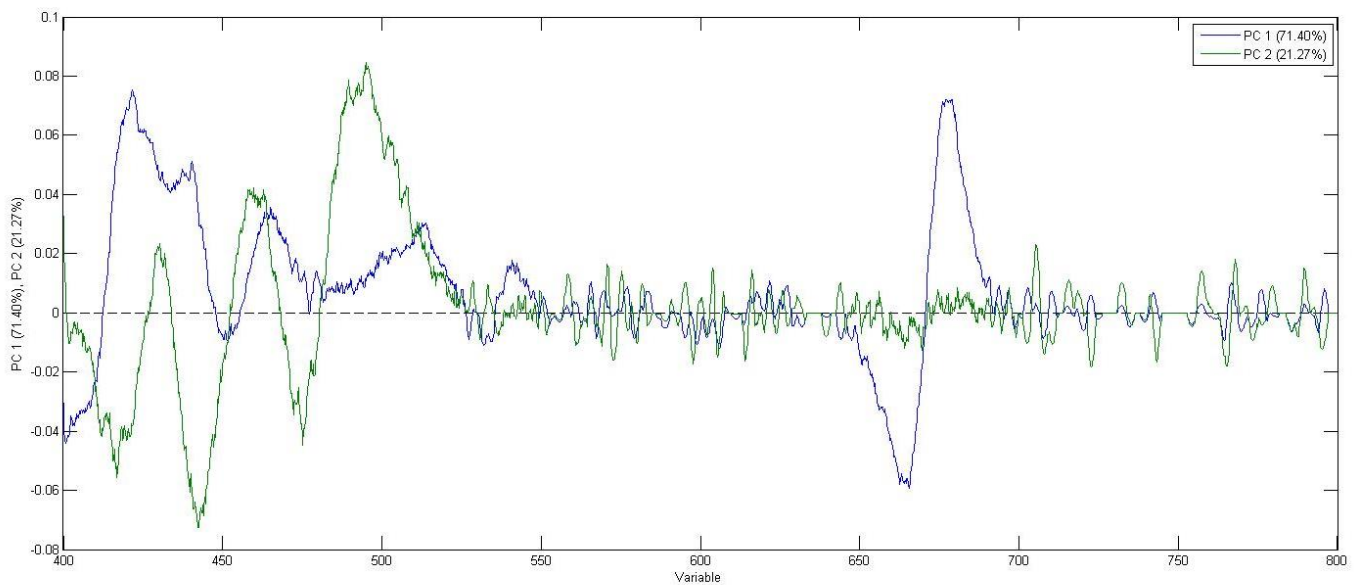
Εικόνα 5.3.43: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 400-800 nm

## 400- 800 nm

### Κολοβή- Αδραμυτιανή



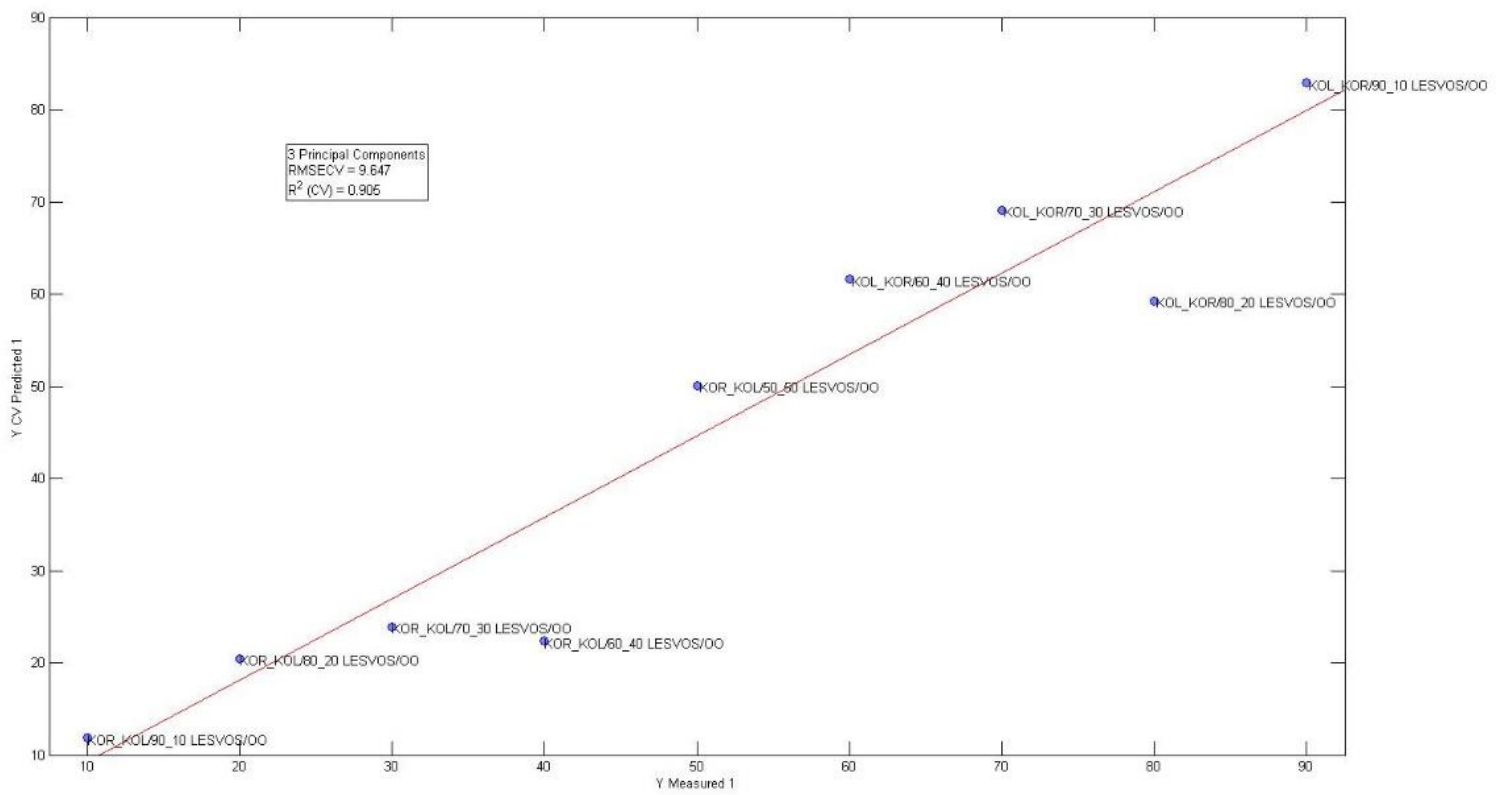
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



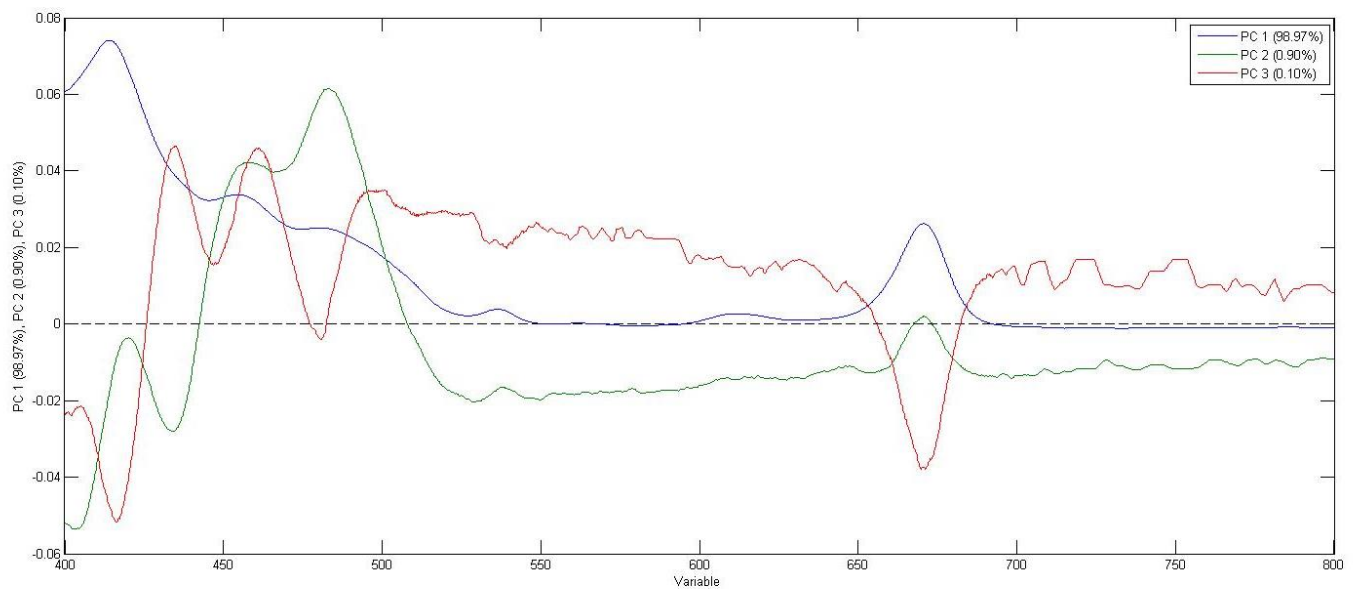
Εικόνα 5.3.44: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κολοβή- Αδραμυτιανή στα 400-800 nm

## 400- 800 nm

### Κορωνέικη- Κολοβή



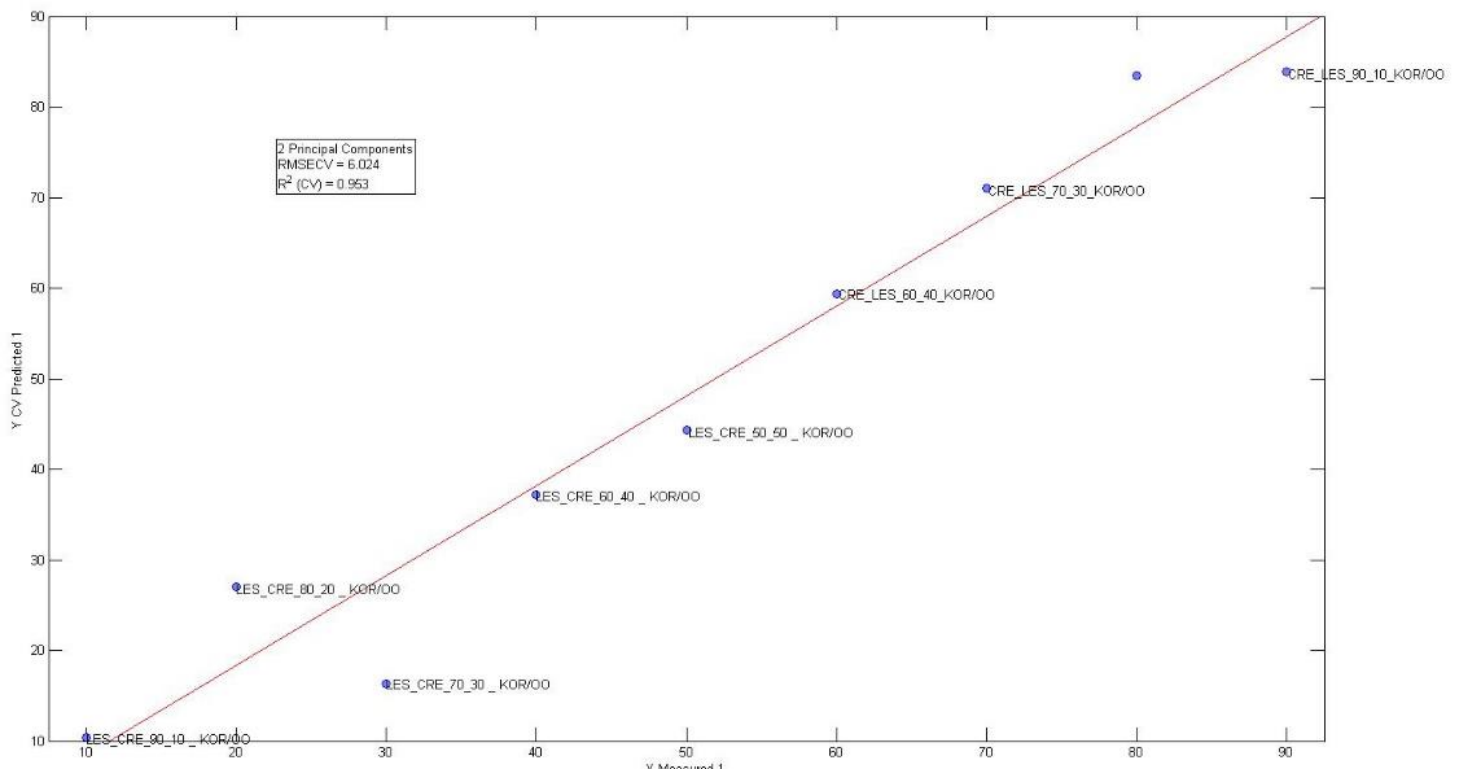
Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



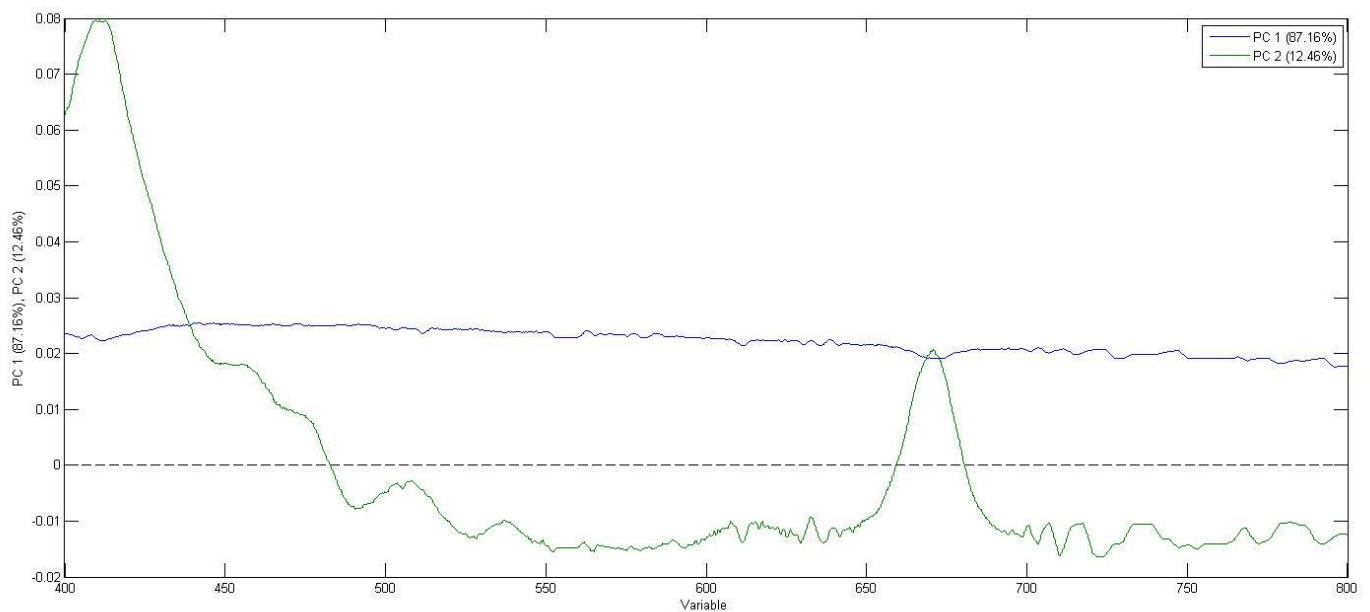
Εικόνα 5.3.45: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Κολοβή στα 400-800 nm

## 400- 800 nm

### Λέσβος- Κρήτη



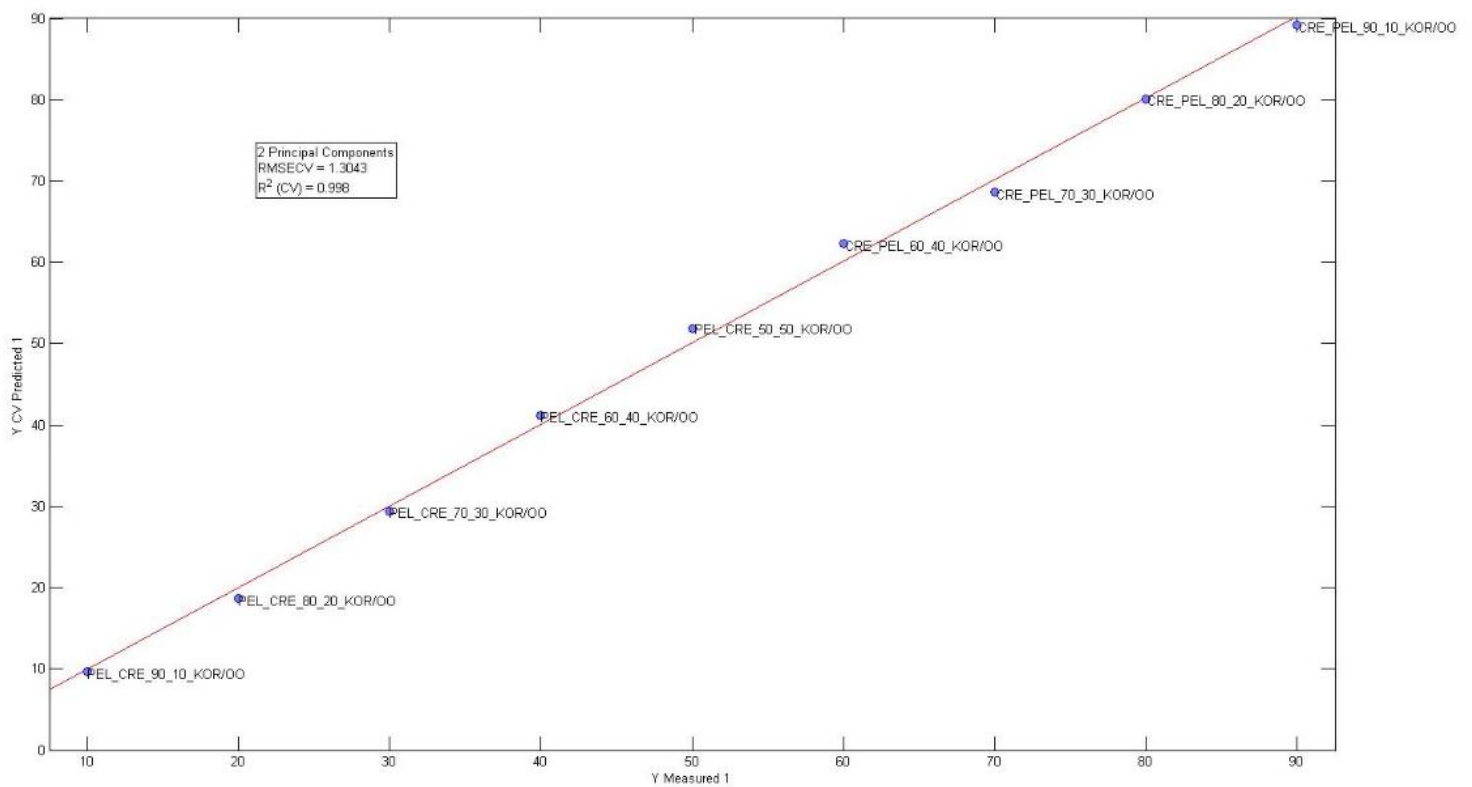
Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



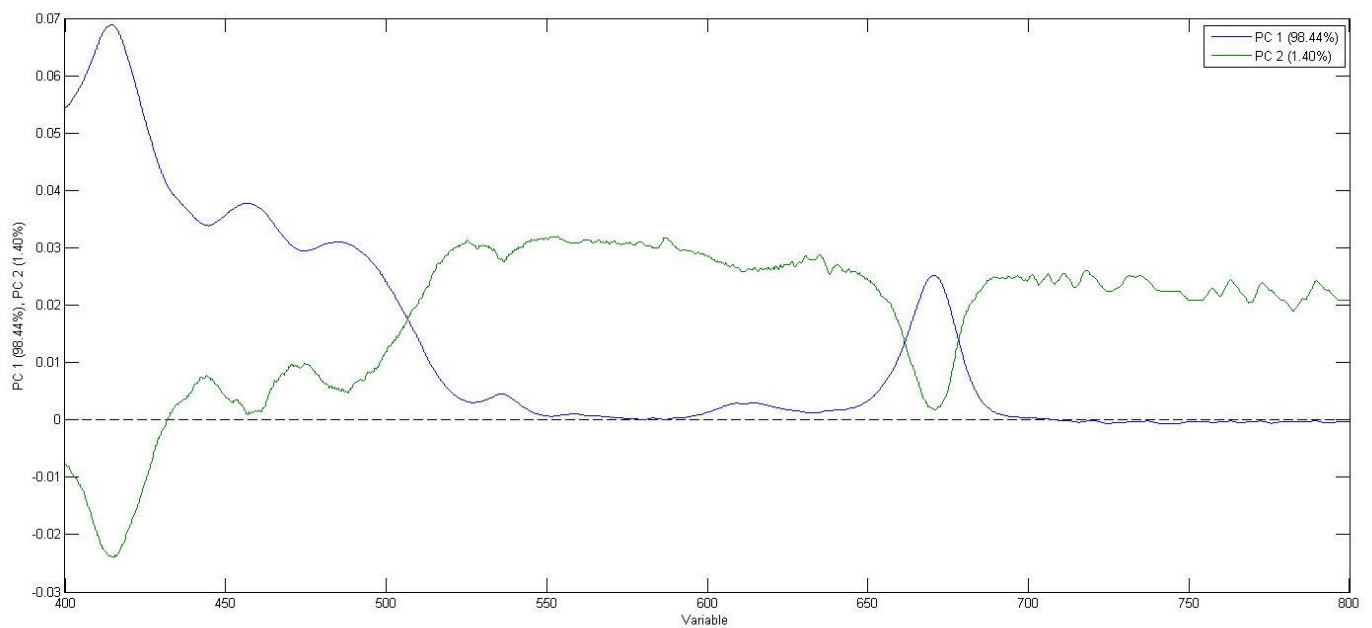
Εικόνα 5.3.46: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Λέσβος-Κρήτη στα 400-800 nm

## 400- 800 nm

### Πελοπόννησος- Κρήτη



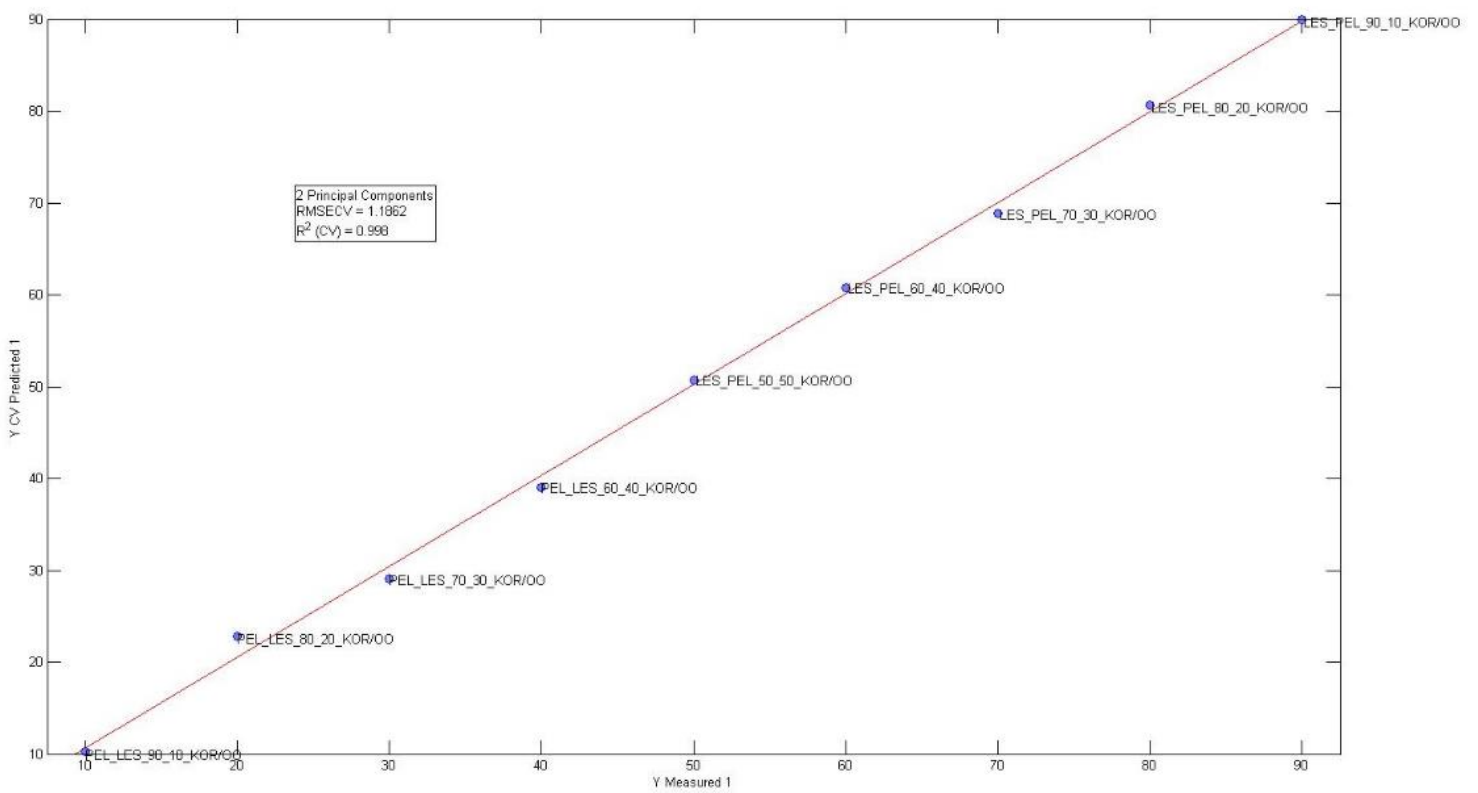
Προεπεξεργασία με Smoothing, Mean Center



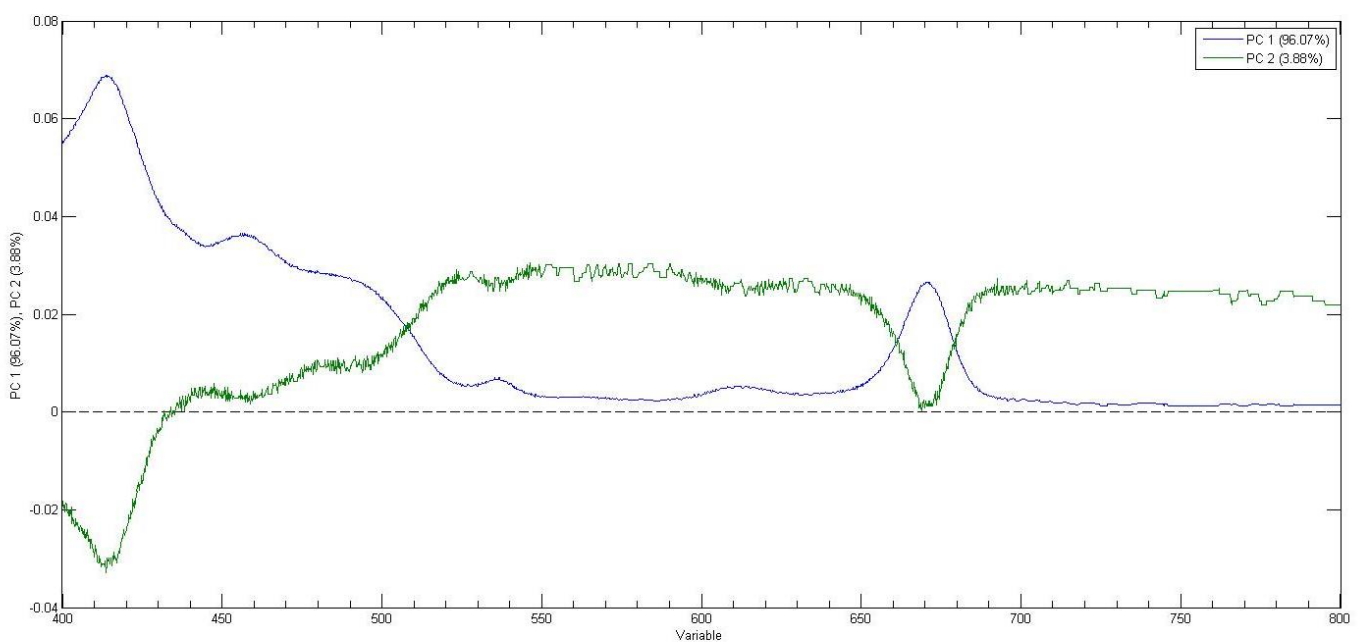
Εικόνα 5.3.47: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Κρήτη στα 400-800 nm

## 400- 800 nm

### Πελοπόννησος- Λέσβος



Προεπεξεργασία με Mean Center

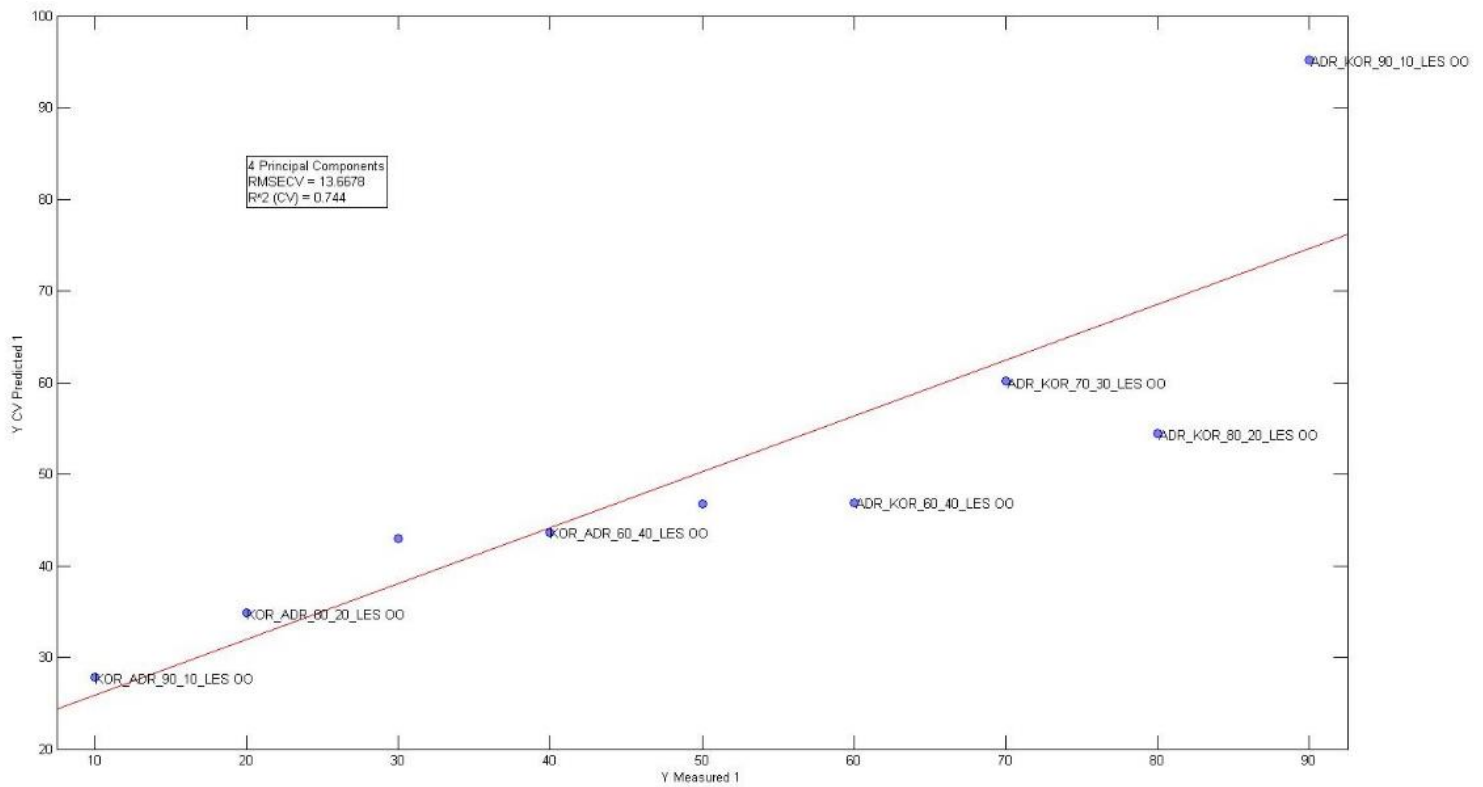


Εικόνα 5.3.48: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Λέσβος στα 400-800 nm

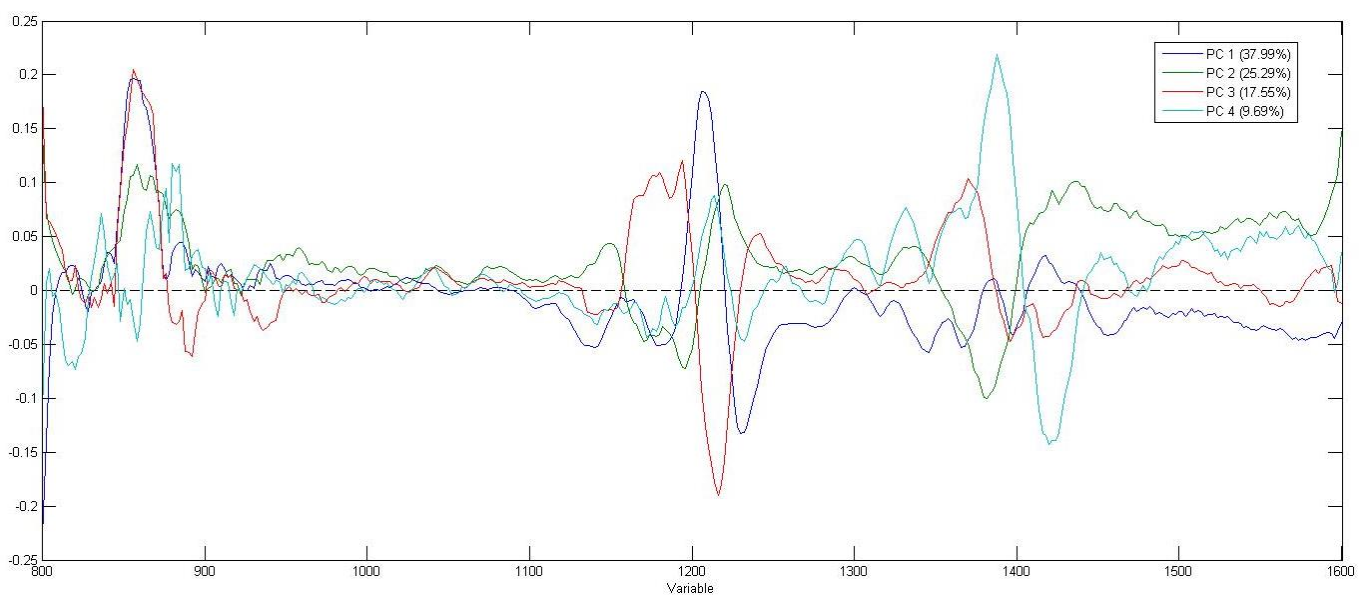


## 800- 1600 nm

### Κορωνέικη- Αδραμυτιανή



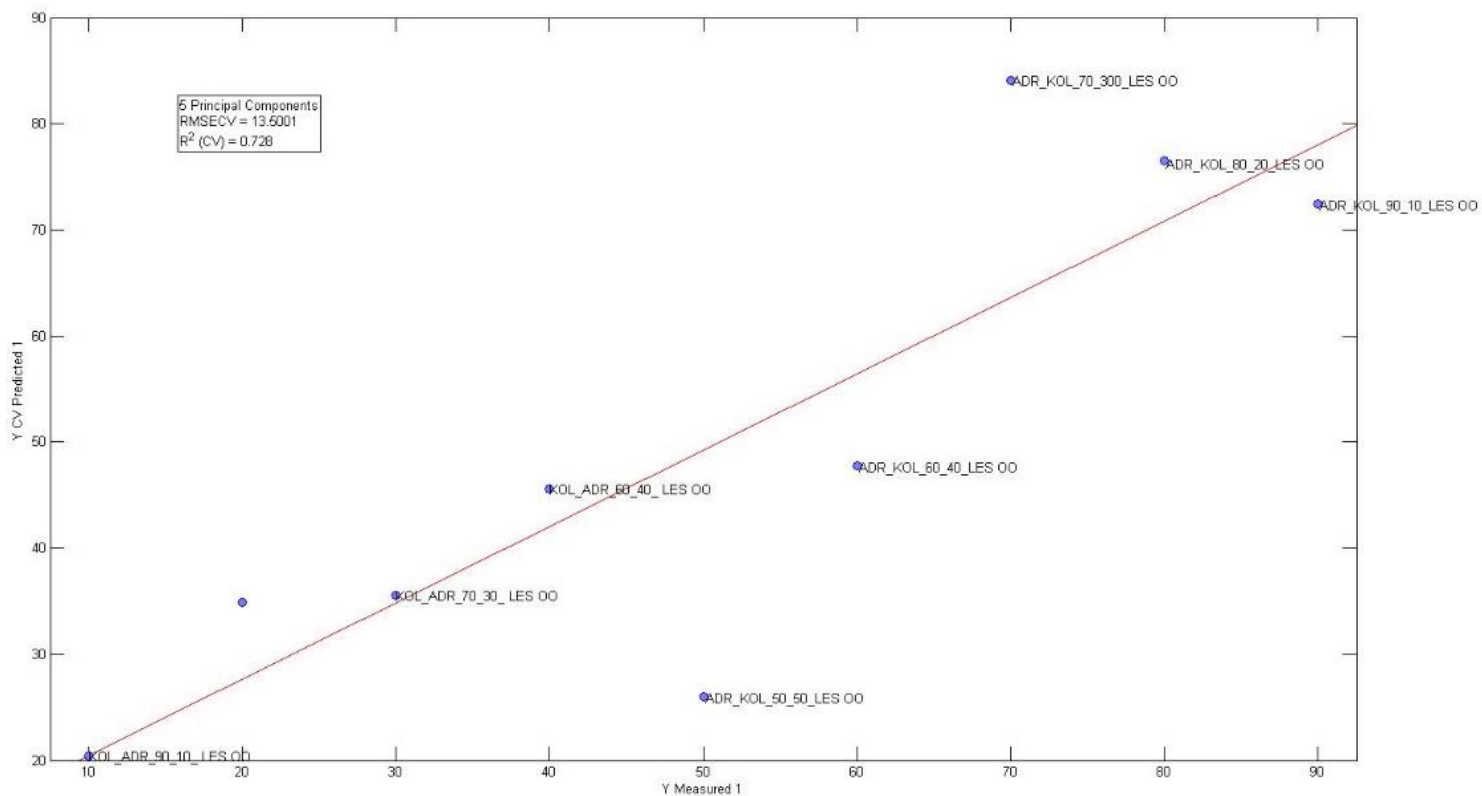
### Προεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



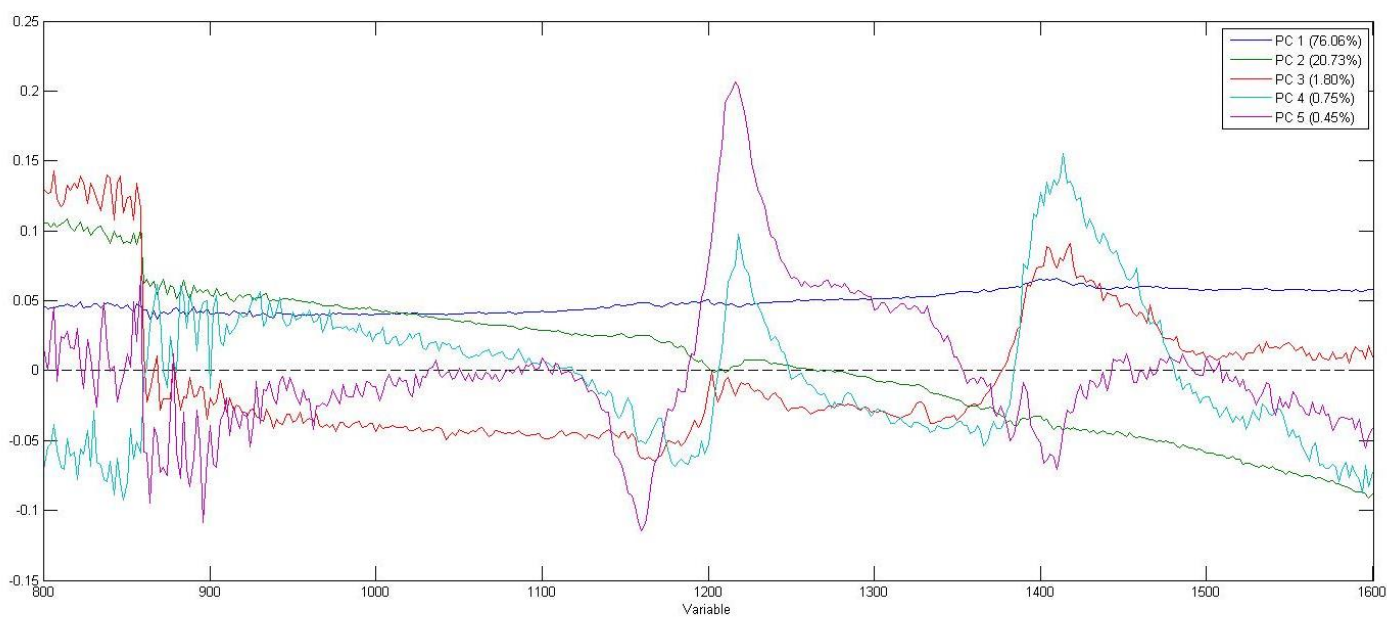
Εικόνα 5.3.49: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Αδραμυτιανή στα 800-1600 nm

## 800- 1600 nm

### Κολοβή- Αδραμυτιανή



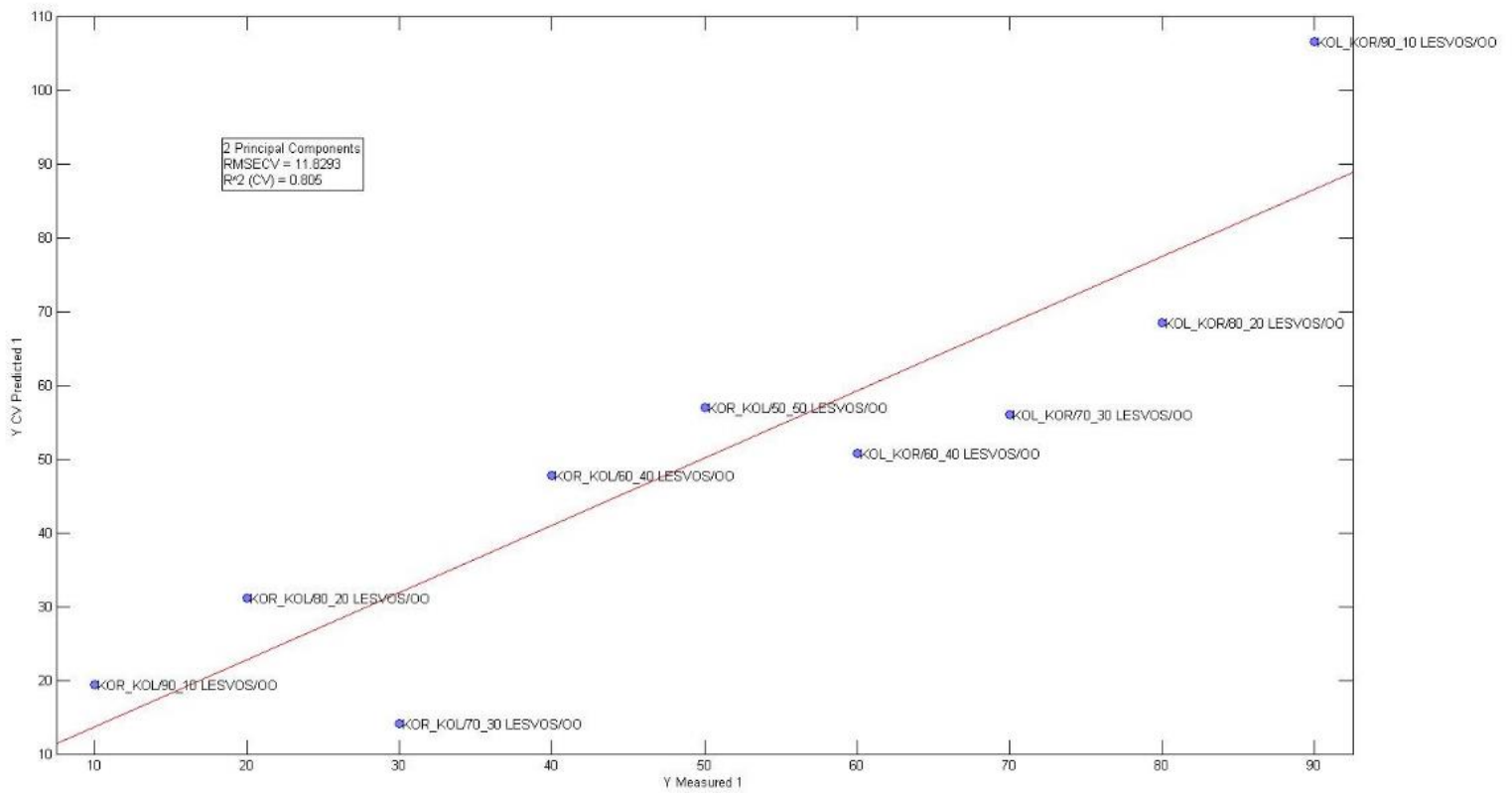
### Προεπεξεργασία με Mean Center



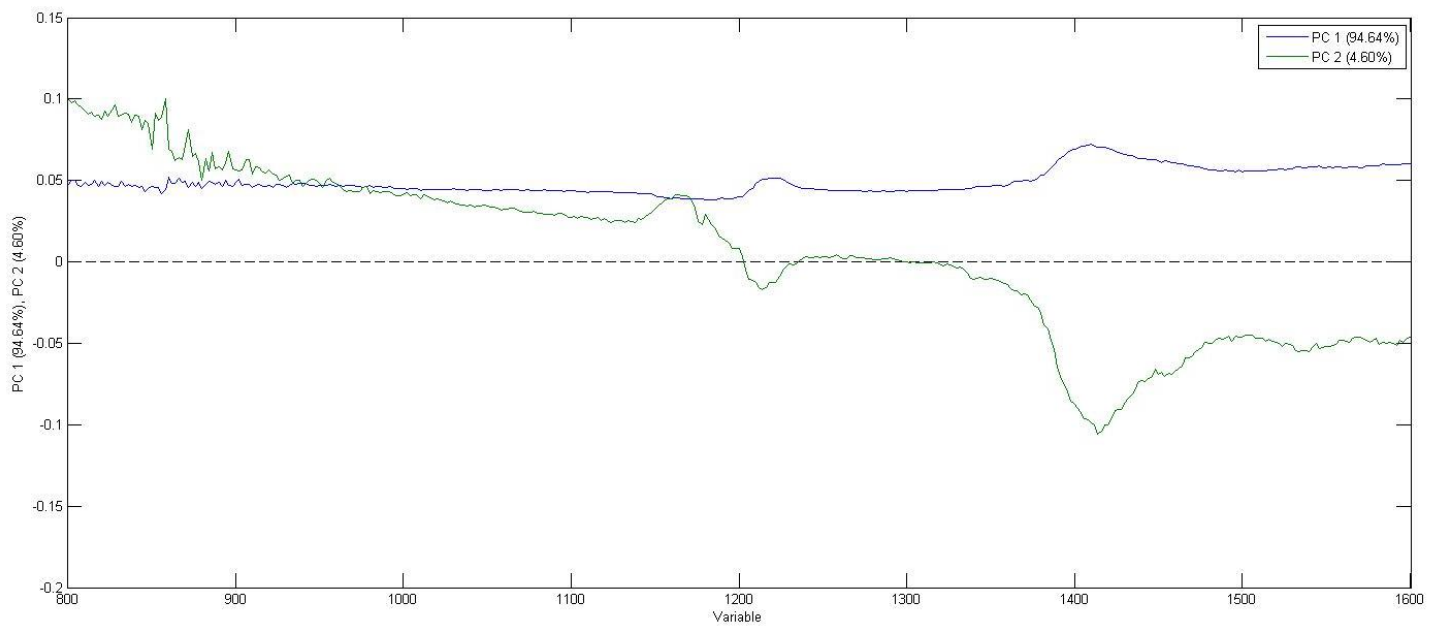
Εικόνα 5.3.50: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κολοβή- Αδραμυτιανή στα 800-1600 nm

## 800- 1600 nm

### Κορωνέικη- Κολοβή



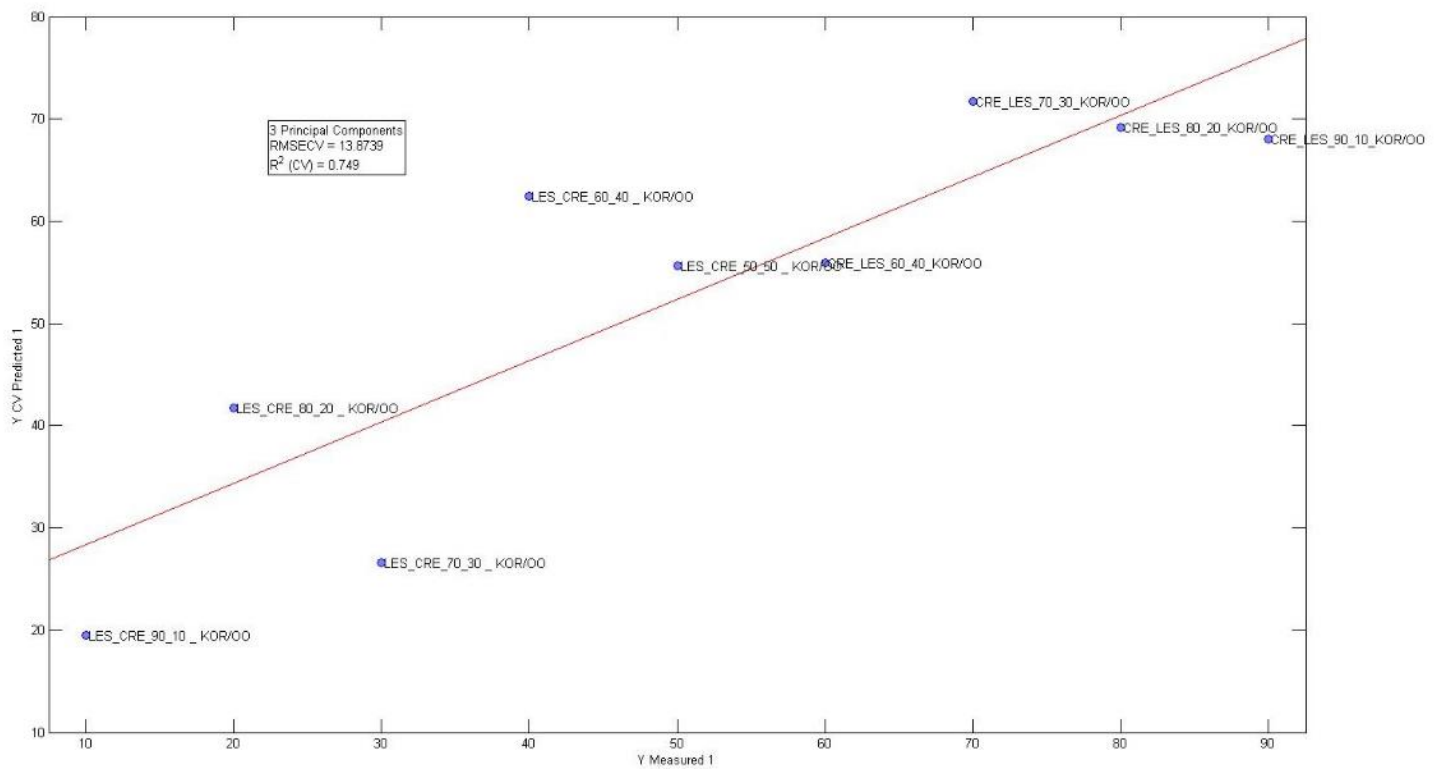
Προεπεξεργασία με Mean Center



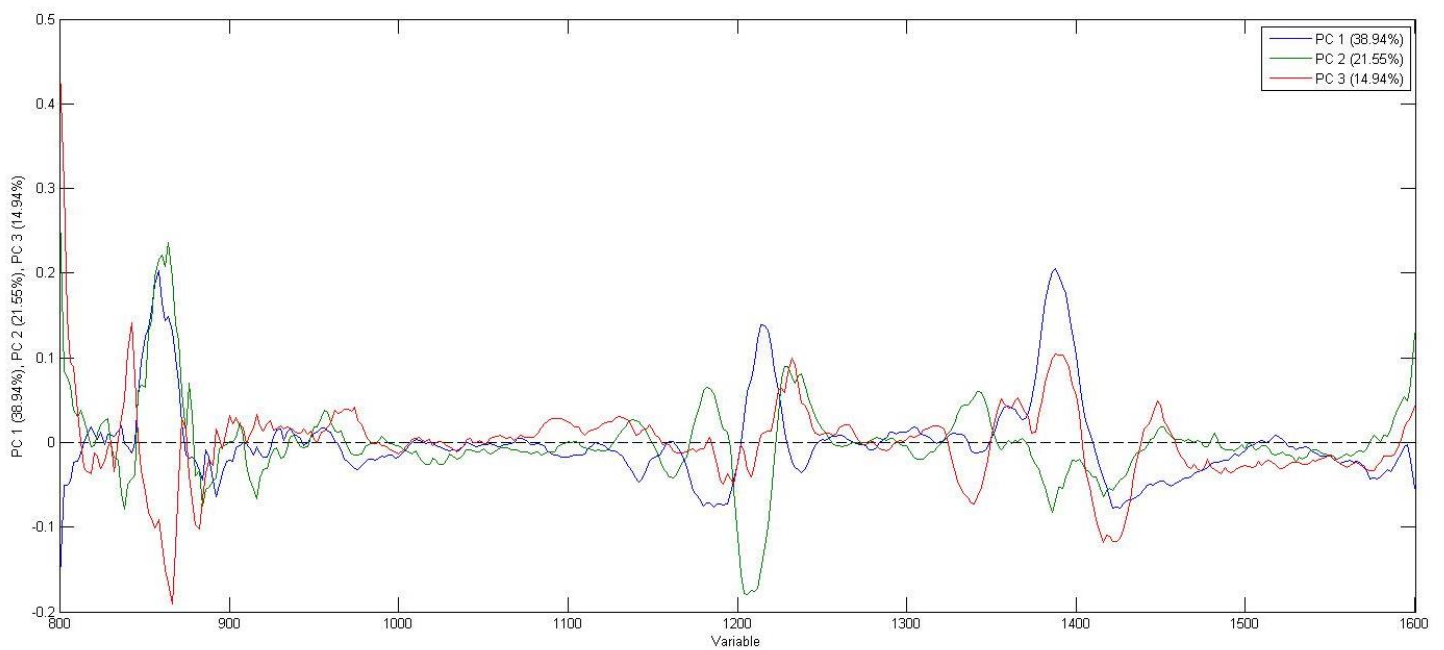
Εικόνα 5.3.51: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Κολοβή στα 800-1600 nm

## 800- 1600 nm

### Λέσβος- Κρήτη



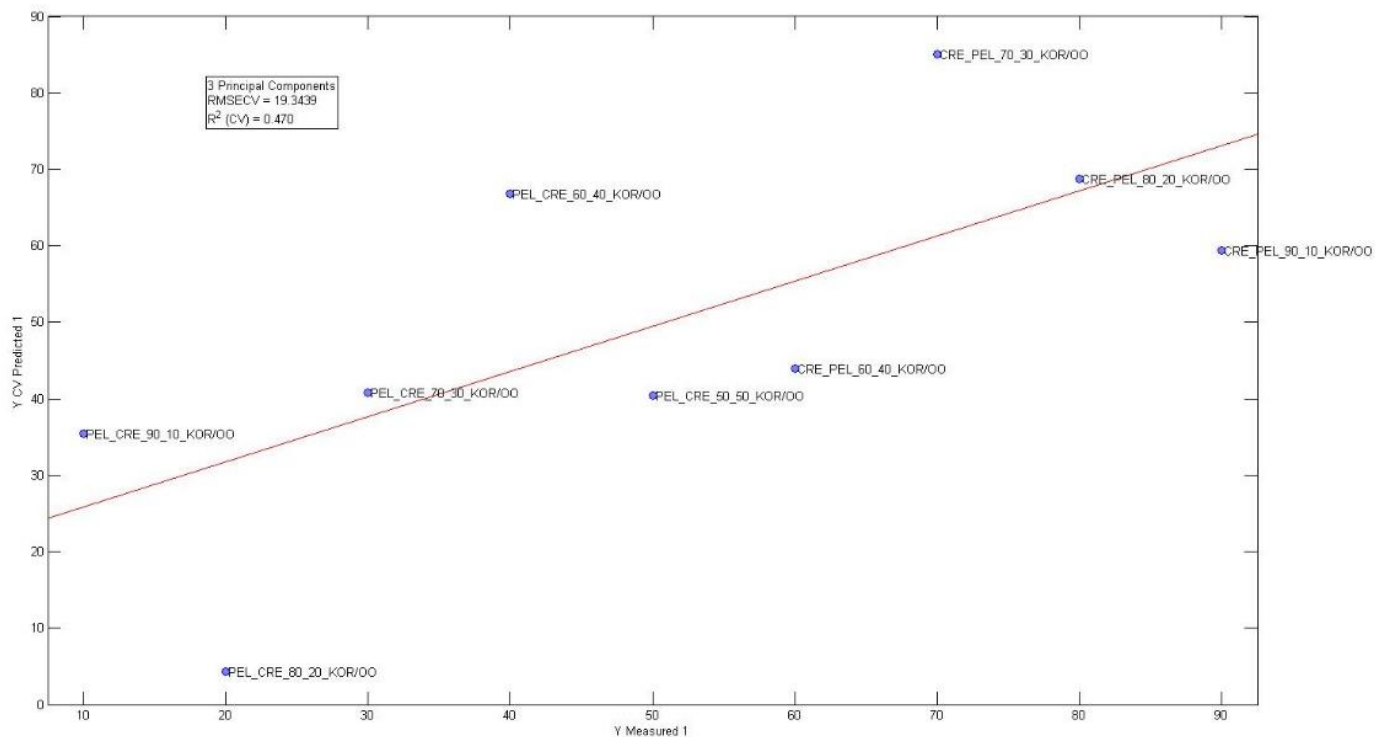
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, SNV, Mean Center



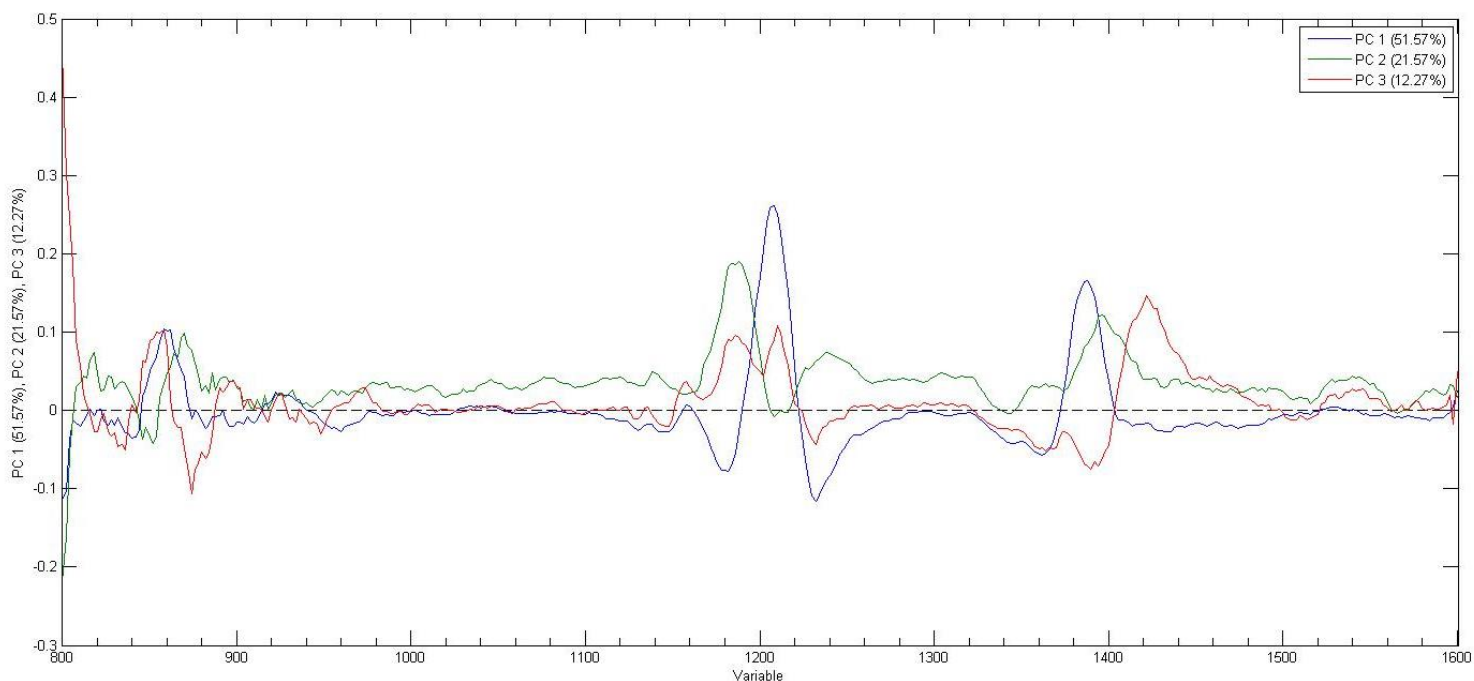
Εικόνα 5.3.52: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Λέσβος-Κρήτη στα 800-1600 nm

## 800- 1600 nm

### Πελοπόννησος- Κρήτη



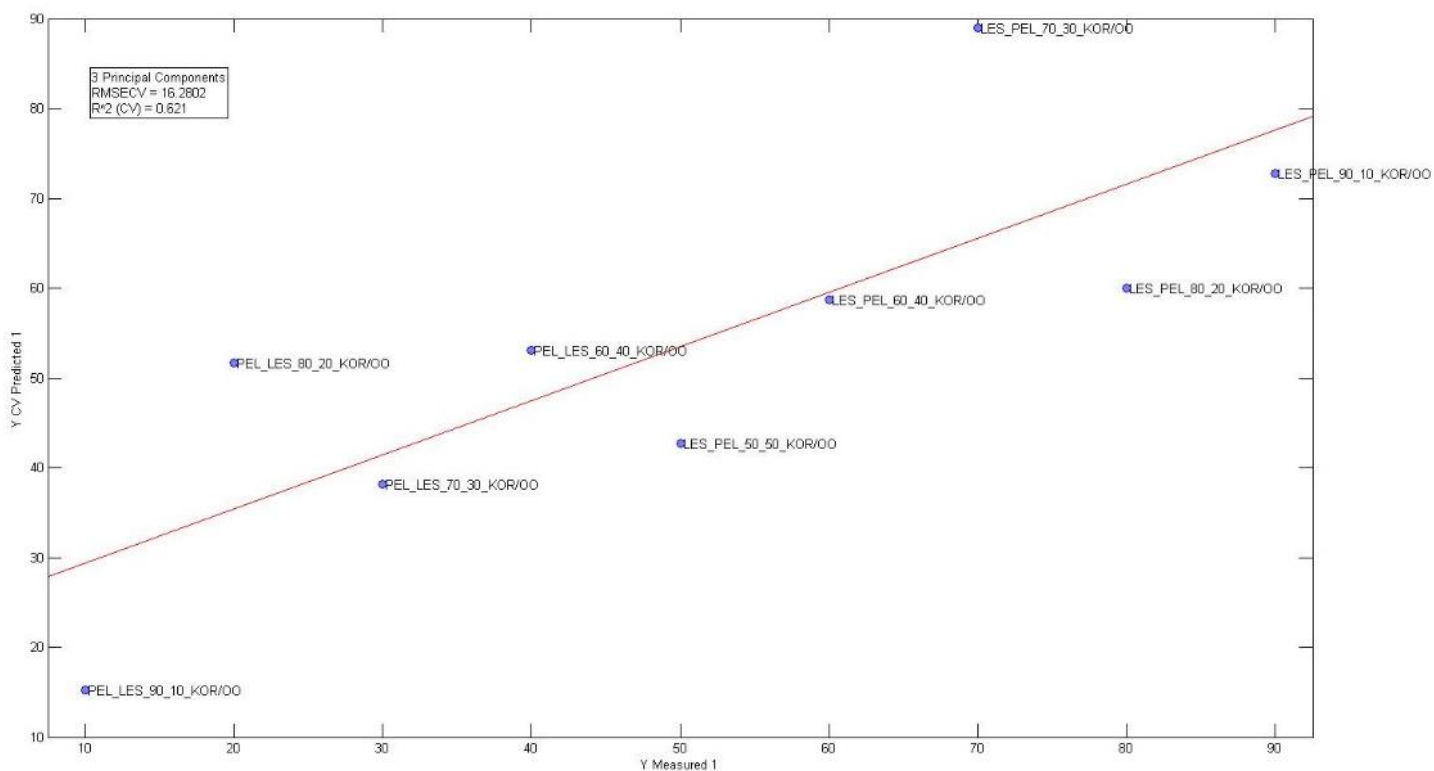
Προεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



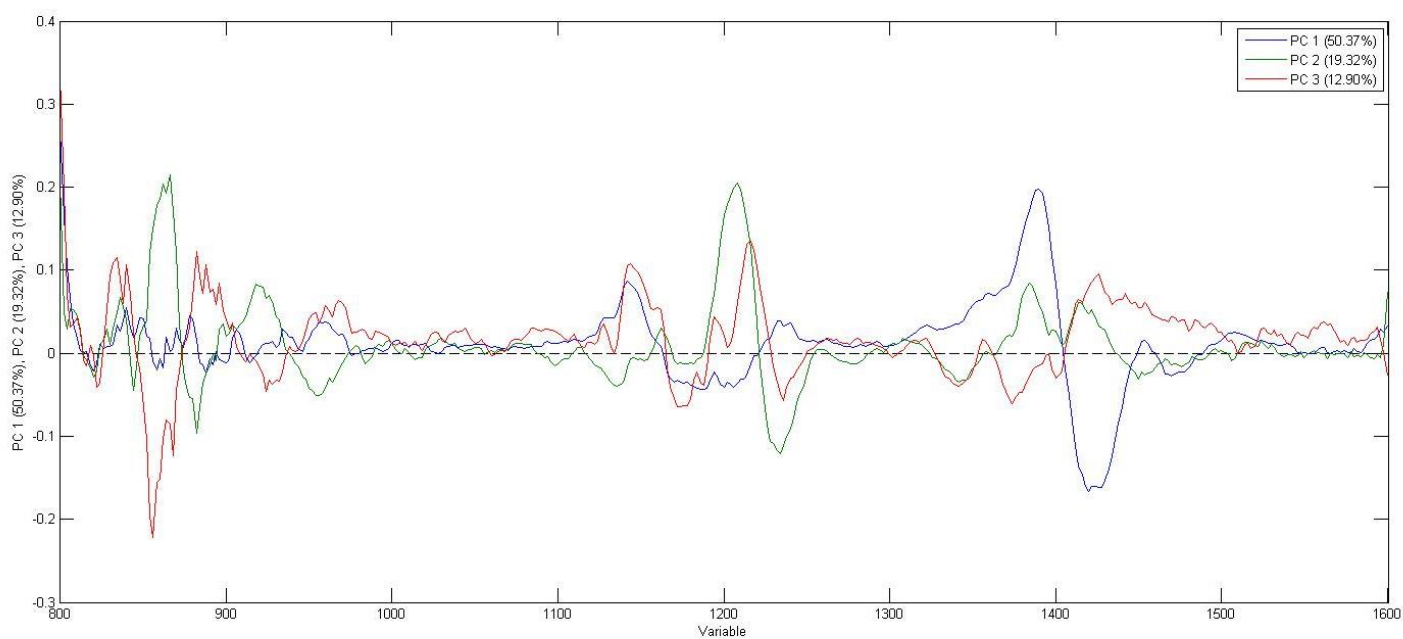
Εικόνα 5.3.53: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Κρήτη στα 800-1600 nm

## 800- 1600 nm

### Πελοπόννησος- Λέσβος



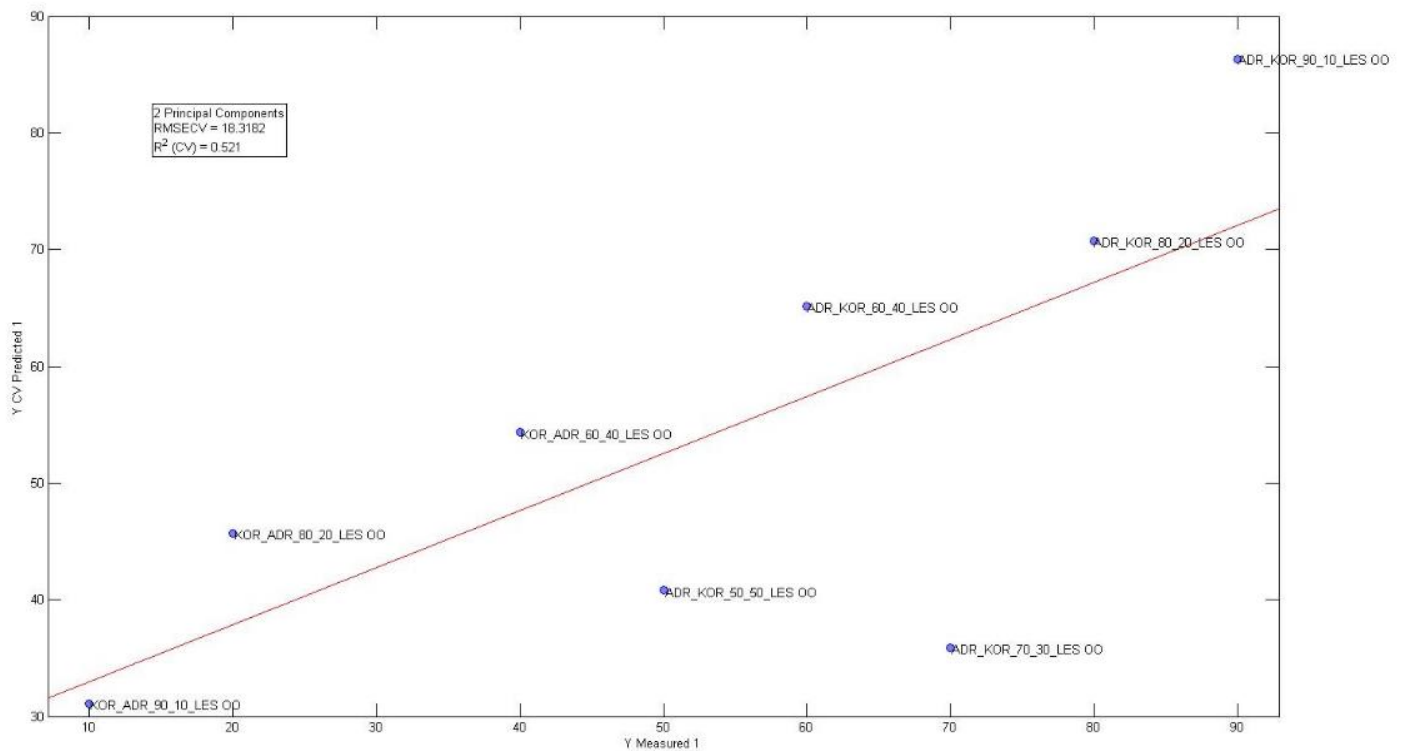
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



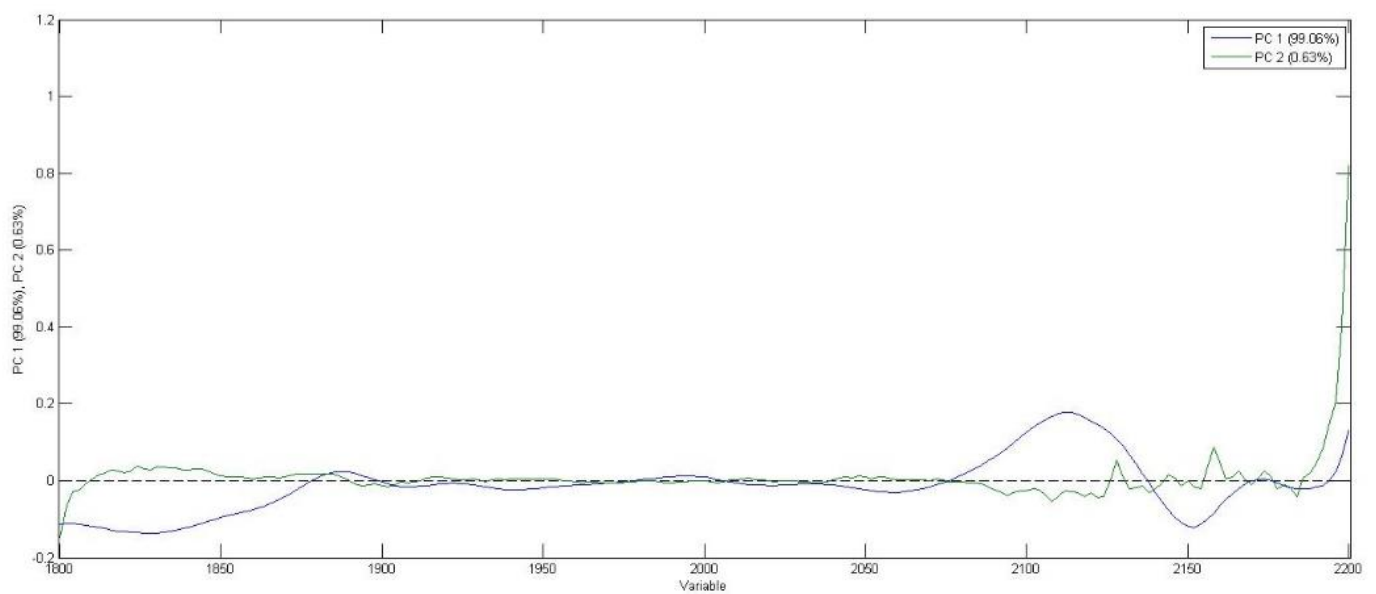
Εικόνα 5.3.54: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Λέσβος στα 800-1600 nm

**1800- 2200 nm**

**Κορωνέικη- Αδραμυτιανή**



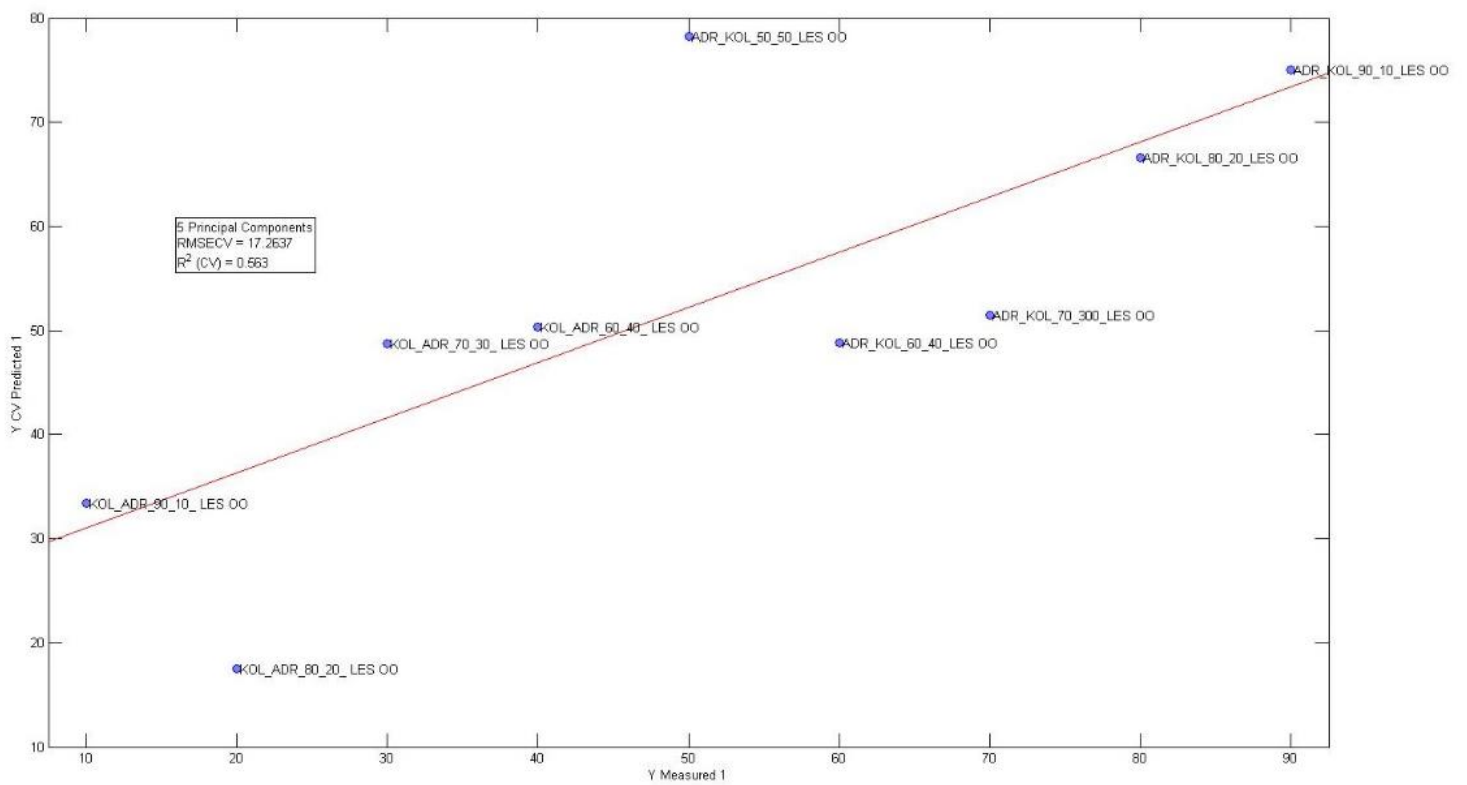
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, -3N



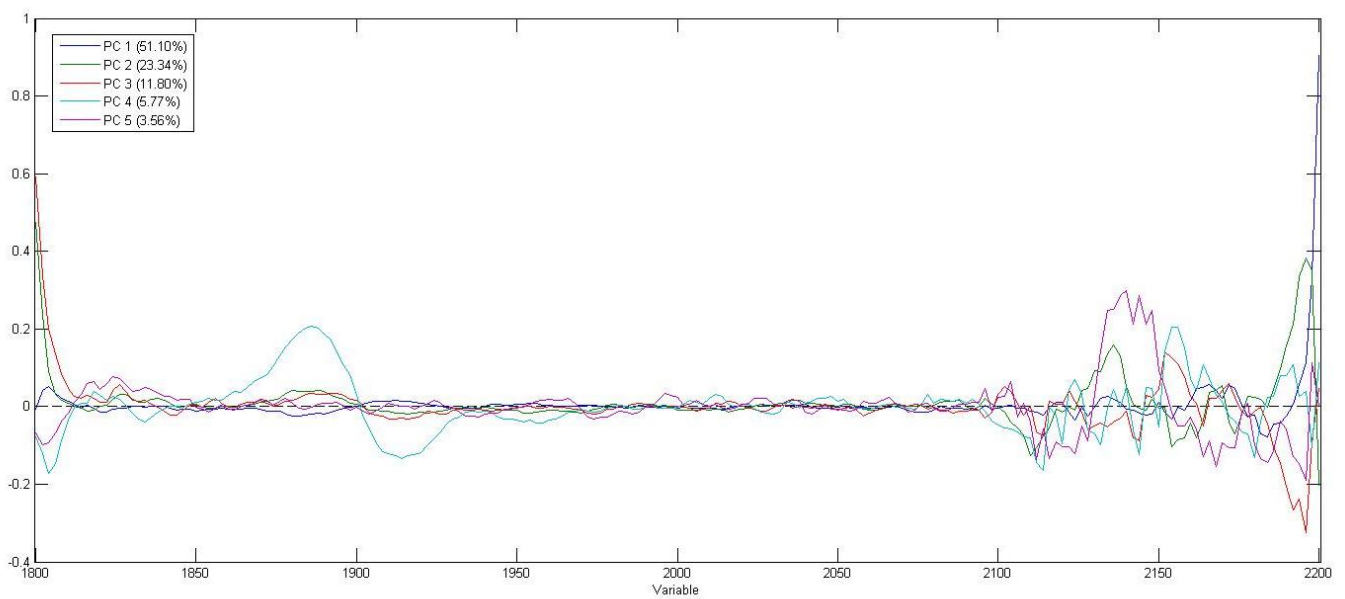
Εικόνα 5.3.55: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη-Αδραμυτιανή στα 1800-2200 nm

## 1800- 2200 nm

### Κολοβή- Αδραμυτιανή



Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center

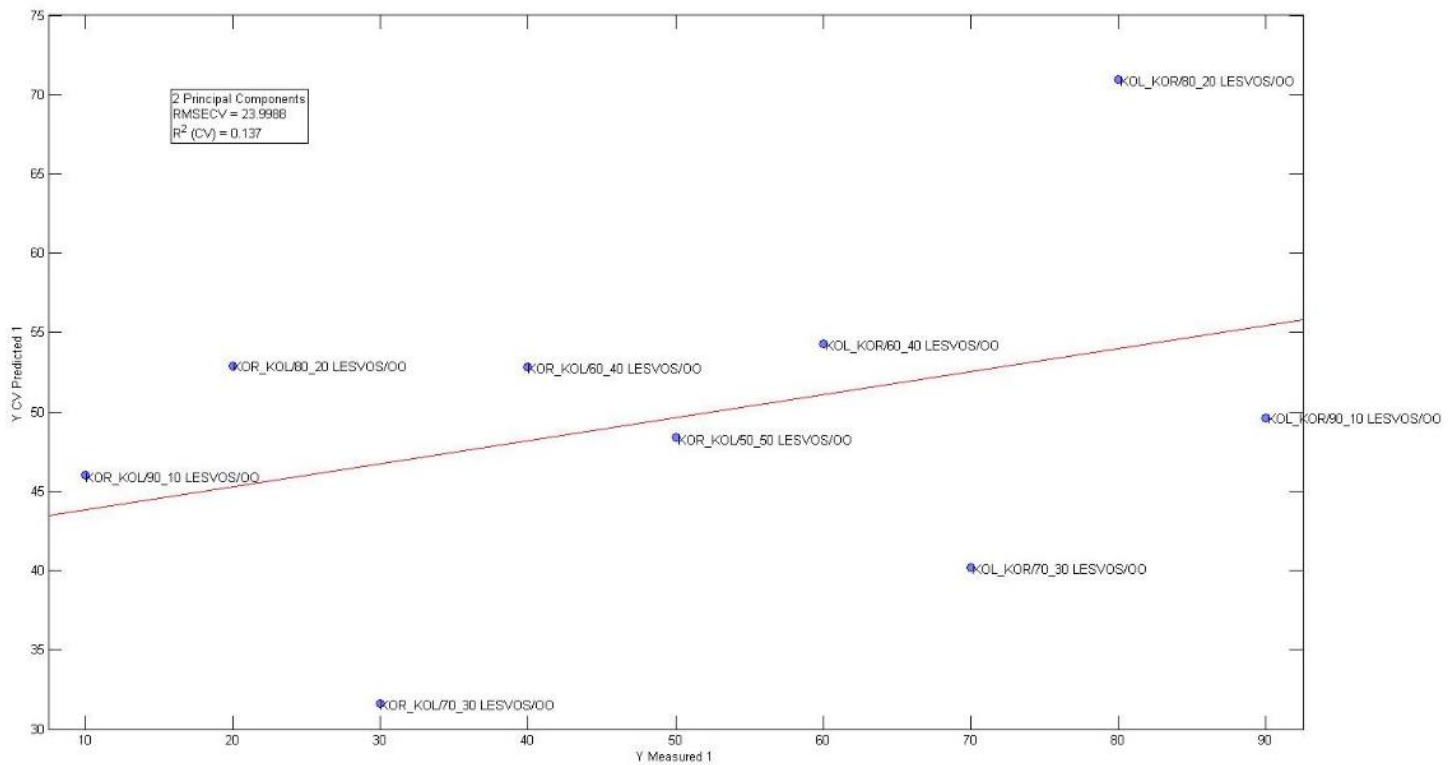


Εικόνα 5.3.56: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κολοβή-Αδραμυτιανή στα 1800-2200 nm

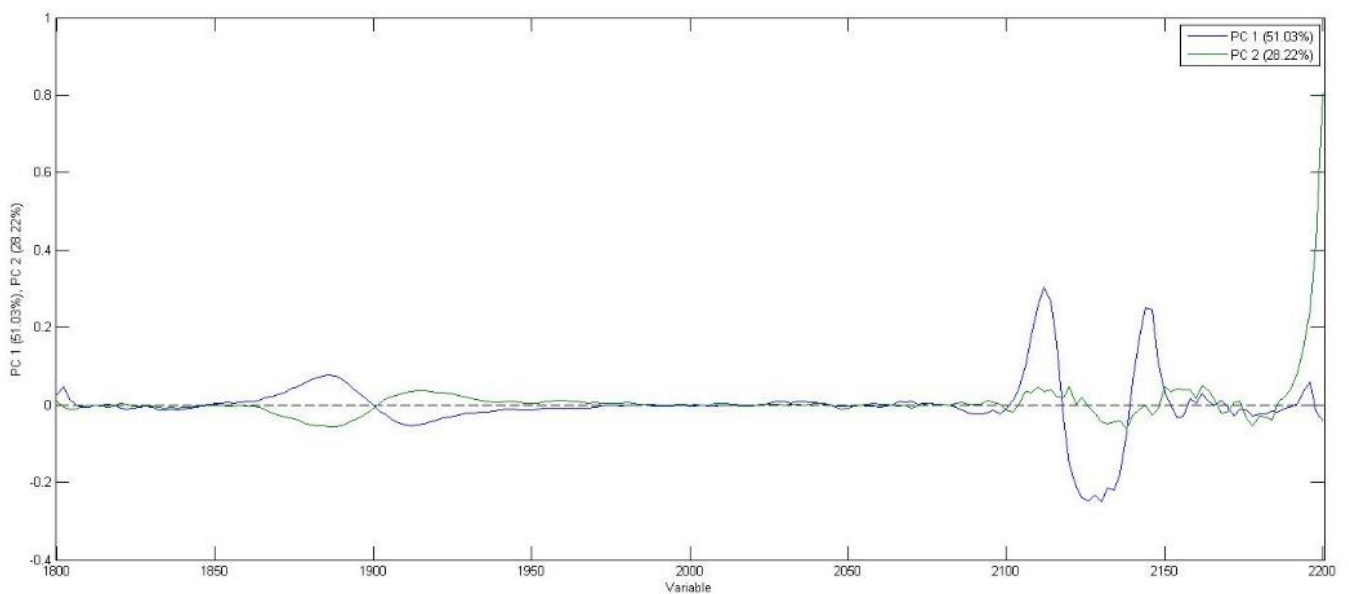


## 1800- 2200 nm

### Κορωνέικη- Κολοβή



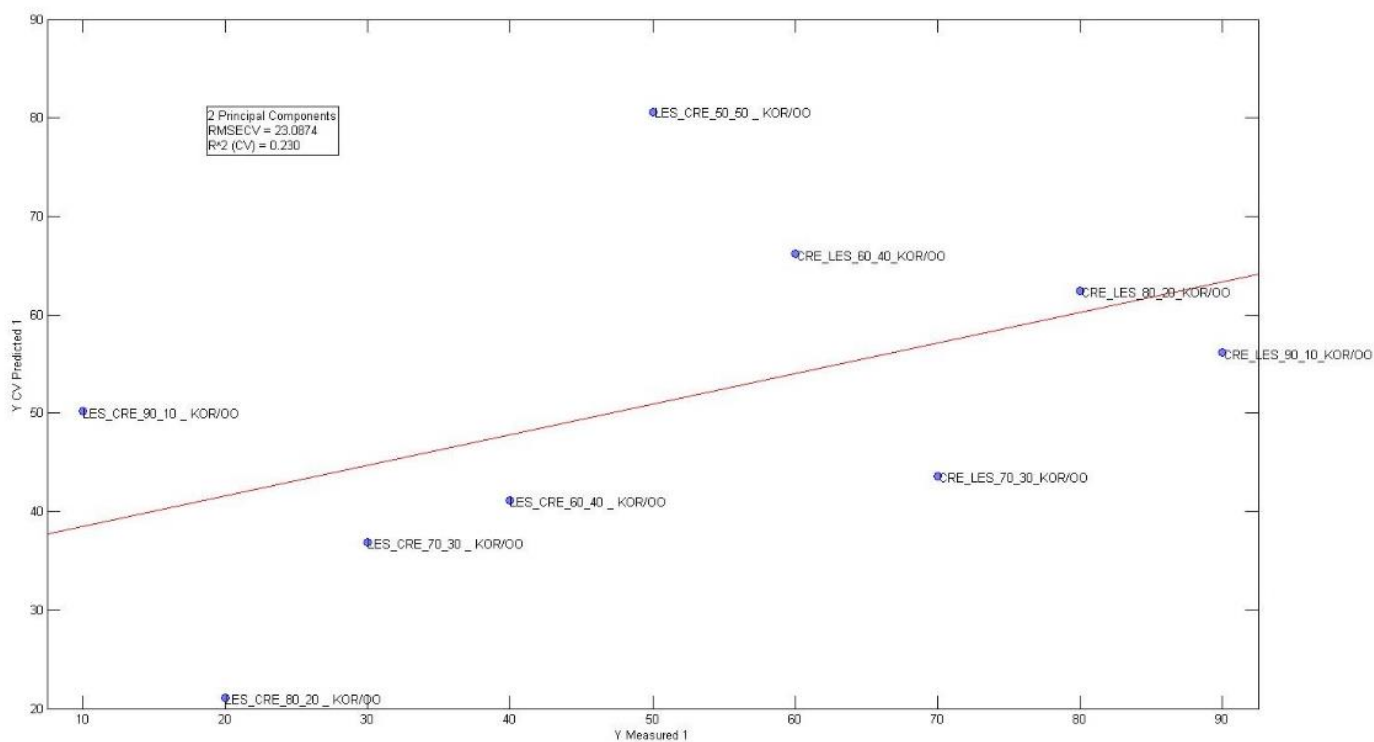
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



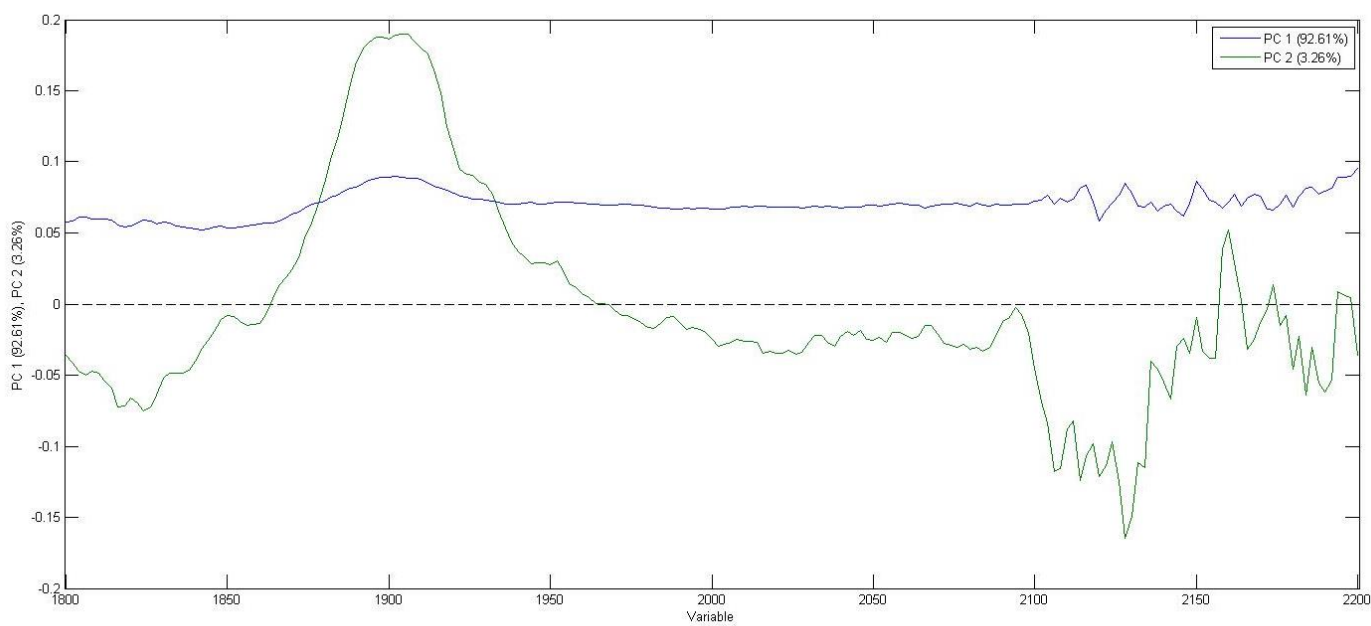
Εικόνα 5.3.57: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Κορωνέικη- Κολοβή στα 1800-2200 nm

## 1800- 2200 nm

### Λέσβος- Κρήτη



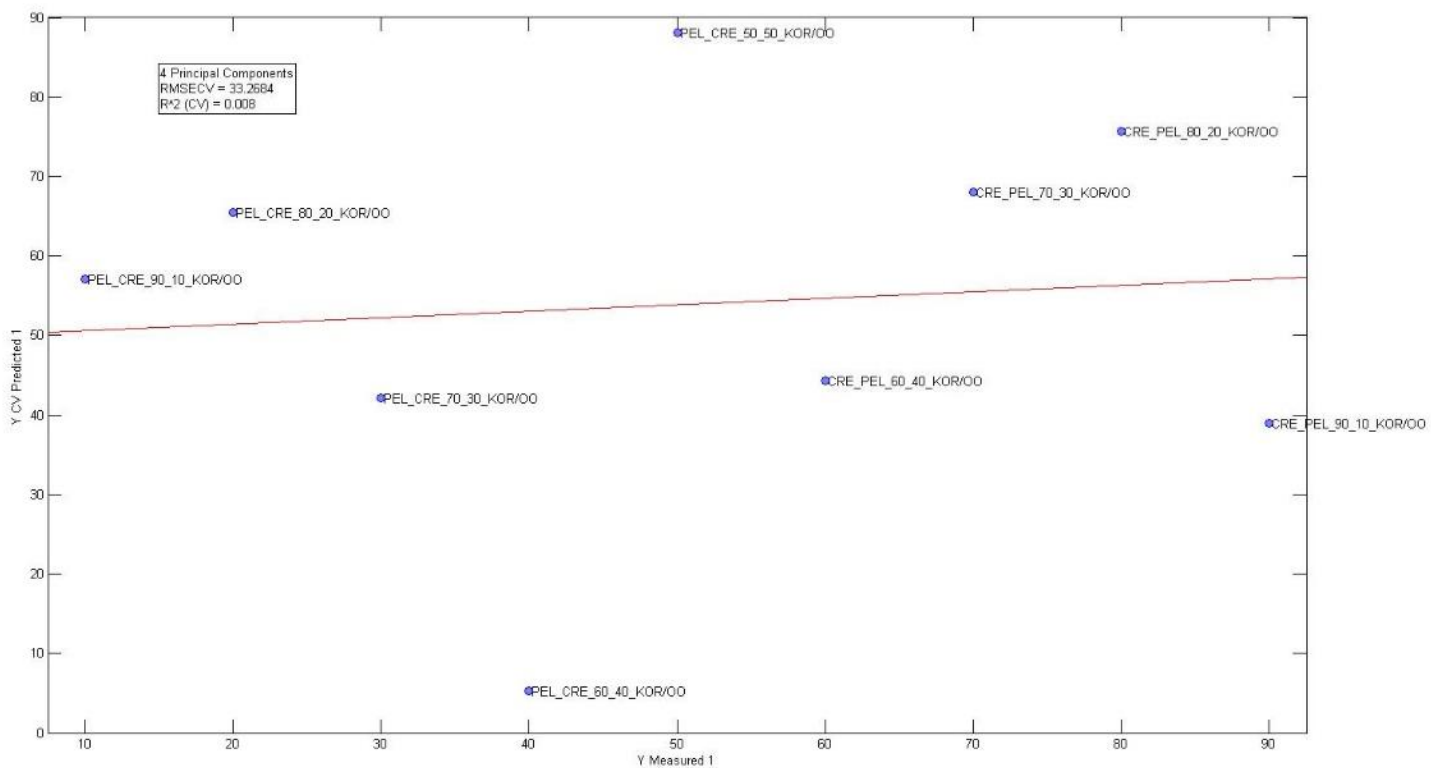
Προεξεργασία με Smoothing, Mean Center



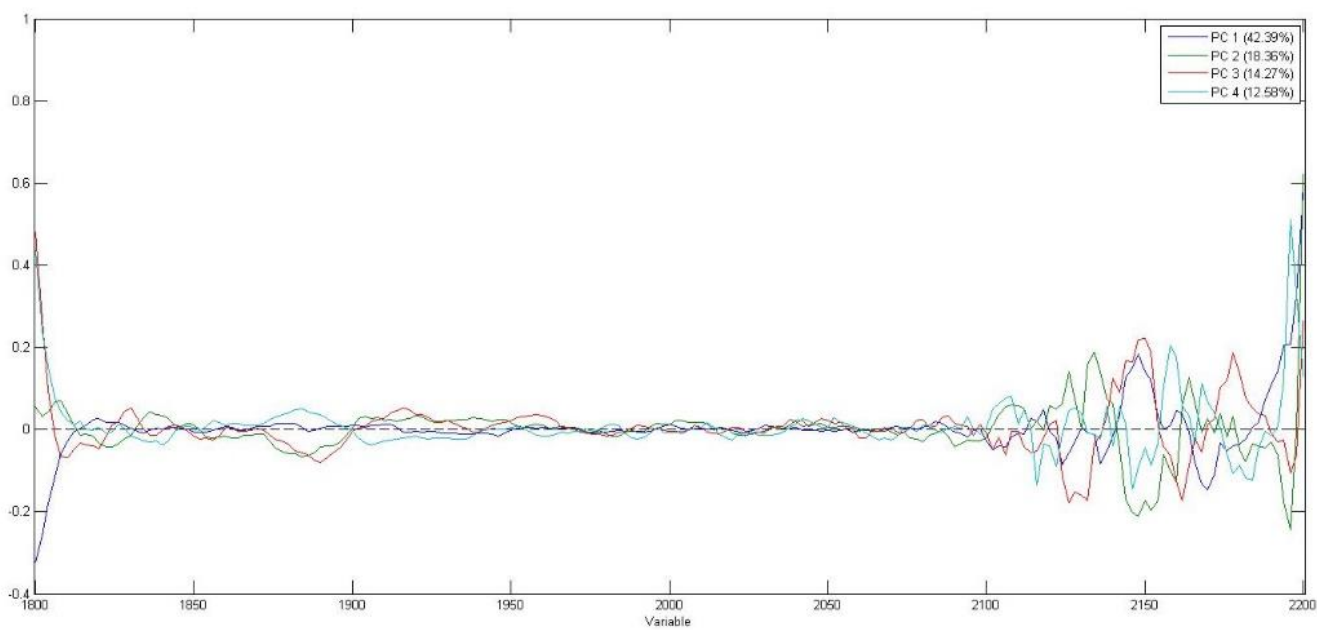
Εικόνα 5.358: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Λέσβος-Κρήτη στα 1800-2200 nm

## 1800- 2200 nm

### Πελοπόννησος- Κρήτη



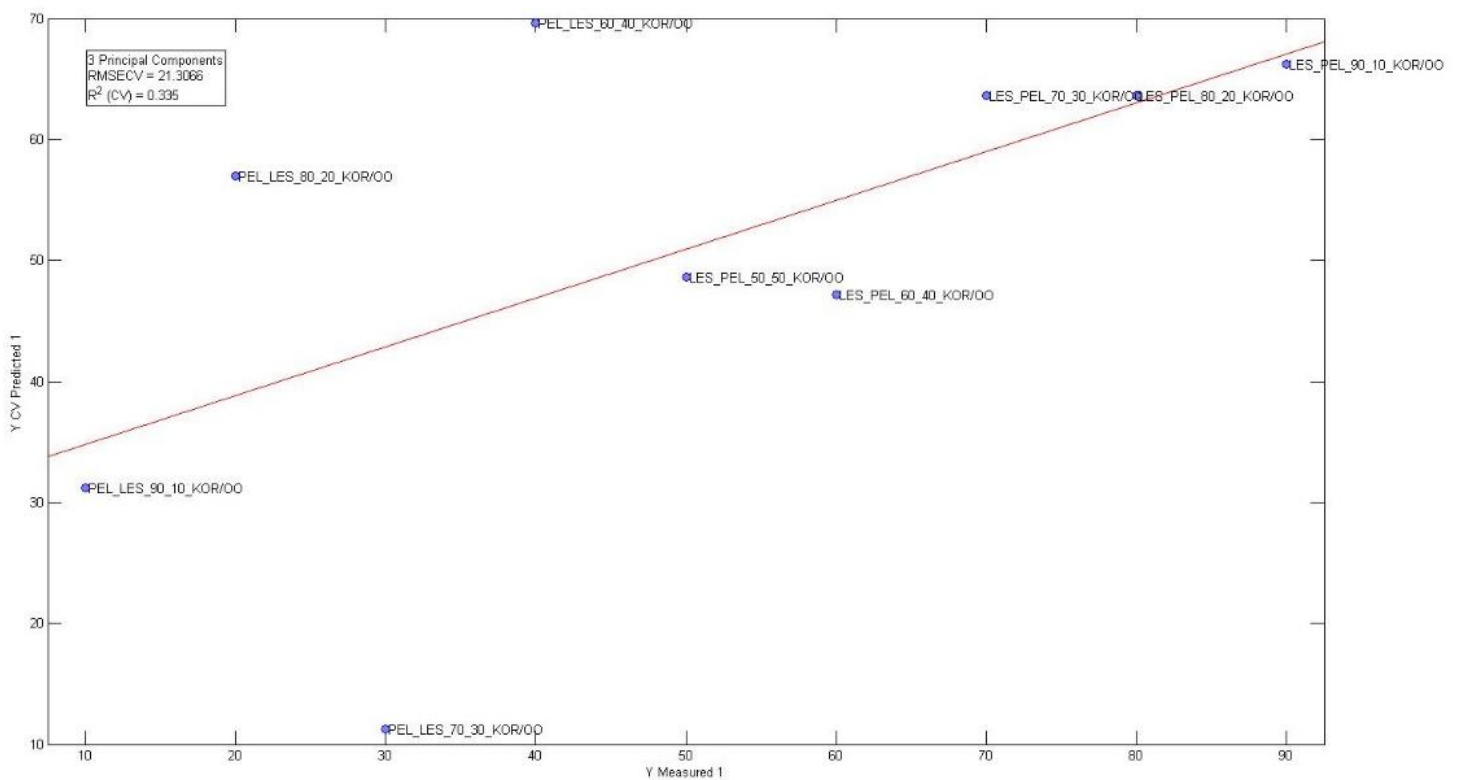
Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center



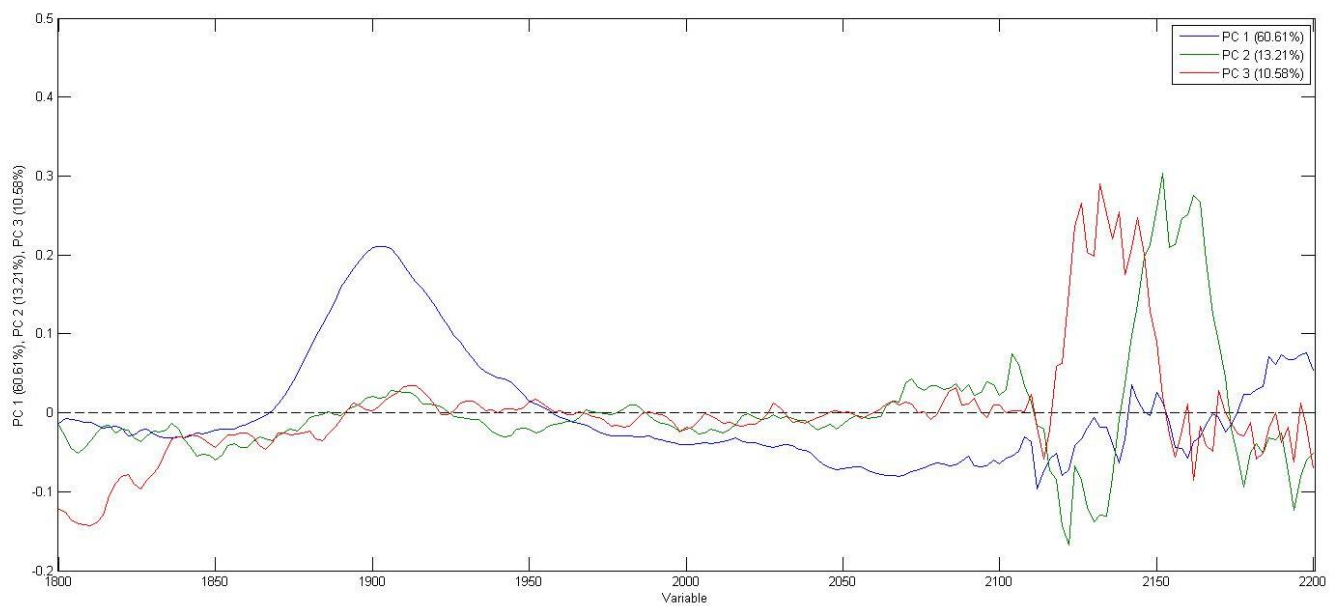
Εικόνα 5.3.59: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Κρήτη στα 1800-2200 nm

## 1800- 2200 nm

### Πελοπόννησος- Λέσβος



### Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



Εικόνα 5.3.60: Score Plot & Loading Plot Απορρόφησης μίξης Πελοπόννησος-Λέσβος στα 1800-2200 nm

**220-280 nm:** Στις ποικιλιακές μίξεις ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,785 και 0,929 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 9,000 και 12,615. Στις μίξεις περιοχών ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,887 και 0,961 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 5,525 και 8,961. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένη απορρόφηση από τα 230 nm και κάτω. Τα Loading Plots δείχνουν ότι η μπάντα απορρόφησης κοντά στα 230 nm είναι αυτή που συνεισφέρει περισσότερο στον διαχωρισμό των δειγμάτων. Είναι η κορυφή που αντιστοιχεί στα συζυγιακά διένια του ελαιολάδου.

**260-410 nm:** Στις ποικιλιακές μίξεις ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,813 και 0,921 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 7,275 και 17,889. Στις μίξεις περιοχών ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,893 και 0,983 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 3,400 και 8,652. Τα Loading Plots δείχνουν ότι η περιοχή στα 280 nm, που ανατίθεται στις φαινόλες, καθώς και η περιοχή κοντά στα 300 nm που ανατίθεται στα φλαβονοειδή συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό.

**400-800 nm:** Στις ποικιλιακές μίξεις ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,905 και 0,962 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 5,288 και 9,647. Στις μίξεις περιοχών ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,953 και 0,998 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 1,186 και 6,024. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές από 410-490nm και 665-675nm είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό. Είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στα καροτενοειδή του ελαιολάδου και η κορυφή της φαιοφυτίνης  $\alpha$ , αντίστοιχα. Στα εξαιρετικά παρθένα ελαιόλαδα είναι λογικό η διαφοροποίηση να βασίζεται στην παρουσία αυτών των ουσιών.

**800-1600nm:** Στις ποικιλιακές μίξεις ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,728 και 0,805 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 11,823 και 13,668. Στις μίξεις περιοχών ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,470 και 0,749 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 13,874 και 19,344. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές από 1100-1250 nm και 1350-1450 nm συνεισφέρουν περισσότερο στον διαχωρισμό. Σε μικρότερο βαθμό εμφανίζεται να συνεισφέρει η περιοχή κοντά στα 930 nm.

**1800-2200nm :** Στις ποικιλιακές μίξεις ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,137 και 0,563 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 17,264 και 23,999. Στις μίξεις περιοχών ο δείκτης  $R^2$  κυμαίνεται μεταξύ 0,008 και 0,395 και ο δείκτης RMSECV κυμαίνεται μεταξύ 21,307 και 33,268. Τα Loading Plots δείχνουν ότι οι περιοχές κοντά στα 1900 nm και 2100-2200 nm είναι υπεύθυνες για τον διαχωρισμό.

Τα καλύτερα αποτελέσματα βάσει των δεικτών  $R^2$  και RMSECV εμφανίζονται στην περιοχή του ορατού, με μεγάλη διαφορά, τόσο στις ποικιλιακές μίξεις, όσο και στις μίξεις περιοχών. Πολύ καλά αποτελέσματα έδειξαν και οι δυο περιοχές του υπεριώδους στην διάκριση ποικιλιών και περιοχών, με τα καλύτερα αποτελέσματα να εμφανίζονται στην διάκριση περιοχών. Οι διαφορές στις εδαφοκλιματικές συνθήκες αποτυπώνονται καλύτερα σε αυτές τις περιοχές.

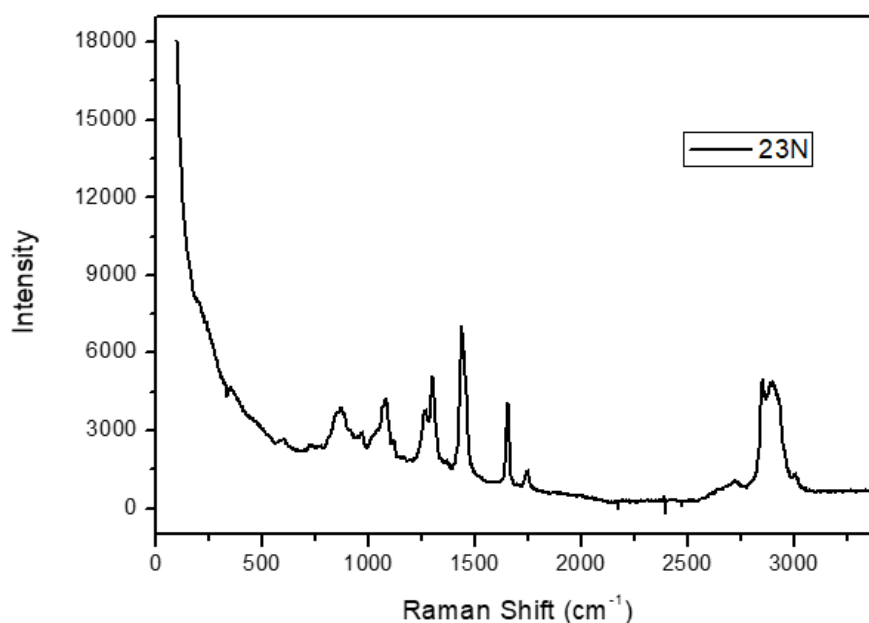
Τα αποτελέσματα στην περιοχή του υπέρυθρου ήταν μικτά. Στην περιοχή 800-1600 nm τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, παρά τις σχετικά υψηλές τιμές του δείκτη RMSECV για τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν. Στην περιοχή αυτή υπήρξε καλύτερη διάκριση των ποικιλιών έναντι των περιοχών. Η περιοχή 1800-2200 nm δεν έδωσε καθόλου ικανοποιητικά αποτελέσματα και για τον λόγο αυτό δεν πρόκειται να συμπεριληφθεί μελλοντικά στις μετρήσεις αυτού του τροφίμου.

## **5.4 Μελέτη ελαιολάδου με Φασματοσκοπία Raman**

Τα ίδια δείγματα μελετήθηκαν και με φασματοσκοπία Raman δεδομένου ότι η ανάλυση αυτή έχει δείξει ότι είναι μια πολύ καλή μέθοδος για την ανάλυση αυτού του τροφίμου [3].

Τα δείγματα μετρήθηκαν στο όργανο Horiba Jobin Yvon με laser 785 nm . Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο εύρος  $98,23 \text{ cm}^{-1}$  έως  $3362,01 \text{ cm}^{-1}$  (Raman shift). Το δείγμα τοποθετήθηκε σε μεταλλικό πλακίδιο με ειδική υποδοχή και μετρήθηκε άνευ επεξεργασίας. Λήφθηκαν 2 scans διάρκειας 60 δευτερολέπτων. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές για κάθε δείγμα προκειμένου να εξασφαλιστεί η μέγιστη επαναληψιμότητα. Από τις τρεις μετρήσεις λήφθηκε ο μέσος όρος ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στην περαιτέρω ανάλυση των δειγμάτων.

### **5.4.1 Αποτελέσματα**

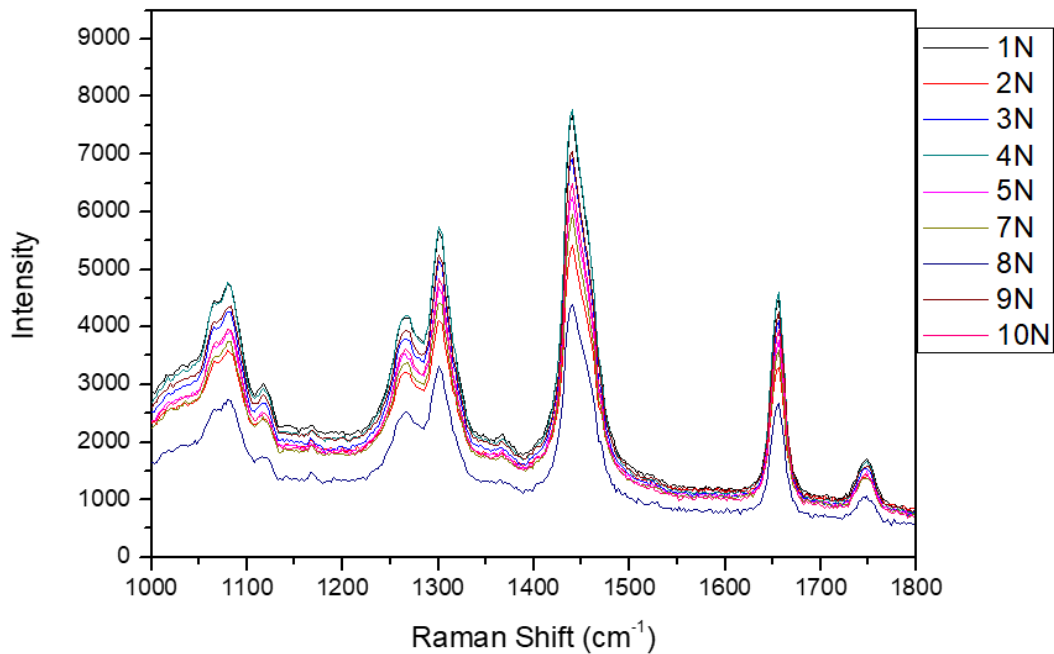


*Εικόνα 5.4.1: Ενδεικτικό φάσμα Raman ελαιολάδου*

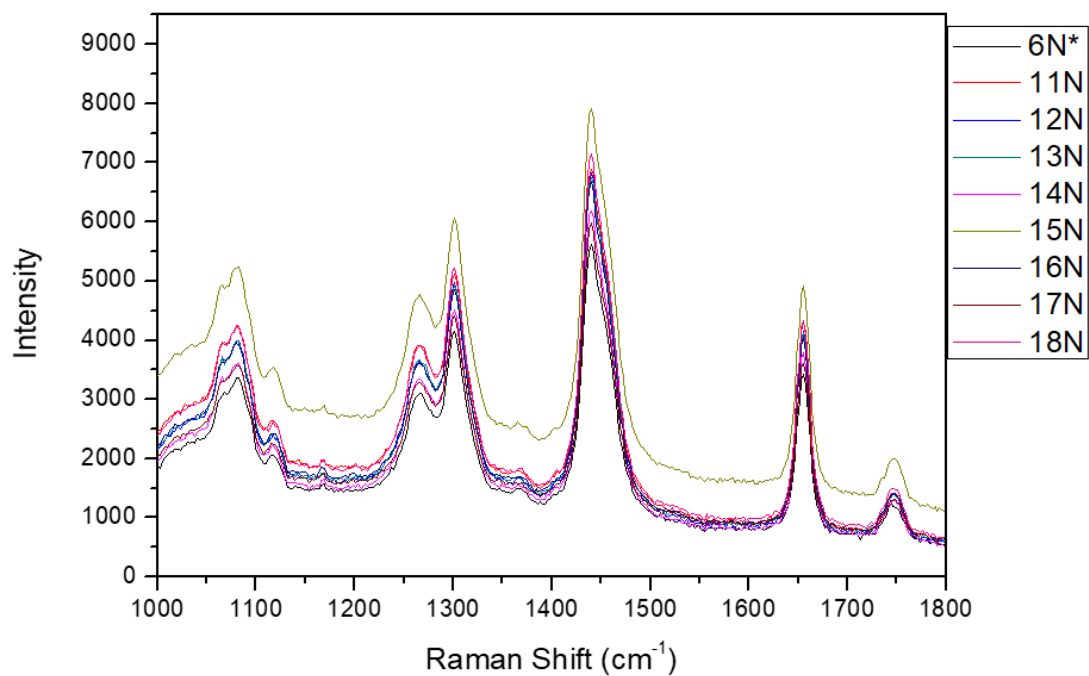
Η βιβλιογραφική διερεύνηση έδειξε ότι η περιοχή ενδιαφέροντος σε όλο το φάσμα Raman είναι η περιοχή  $1000-1800 \text{ cm}^{-1}$  όπου περιέχονται οι χαρακτηριστικές

κορυφές του ελαιολάδου<sup>[3], [7], [8]</sup>. Για τον λόγο αυτό θα παρουσιαστούν τα φάσματα για το σύνολο των δειγμάτων στην περιοχή αυτή.

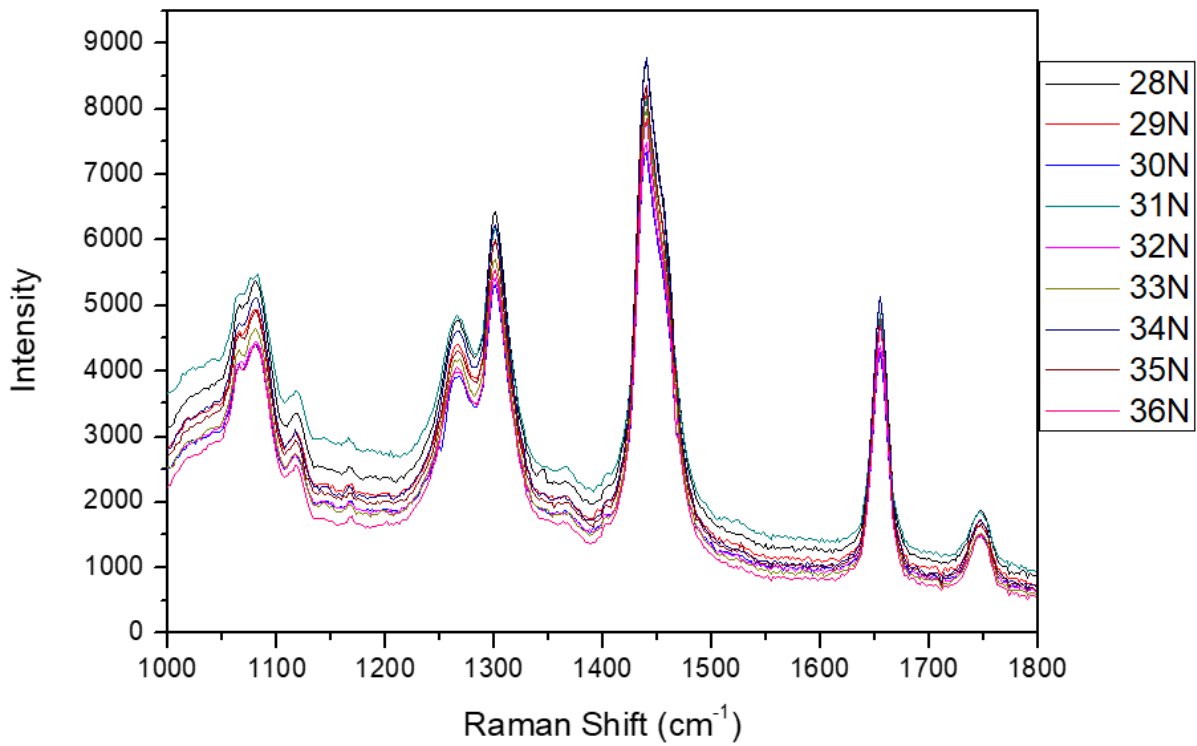
### Ποικιλιακές μίξεις



Εικόνα 5.4.2: Φάσματα Raman μίξεων Κορωνέικη- Αδραμυτιανή

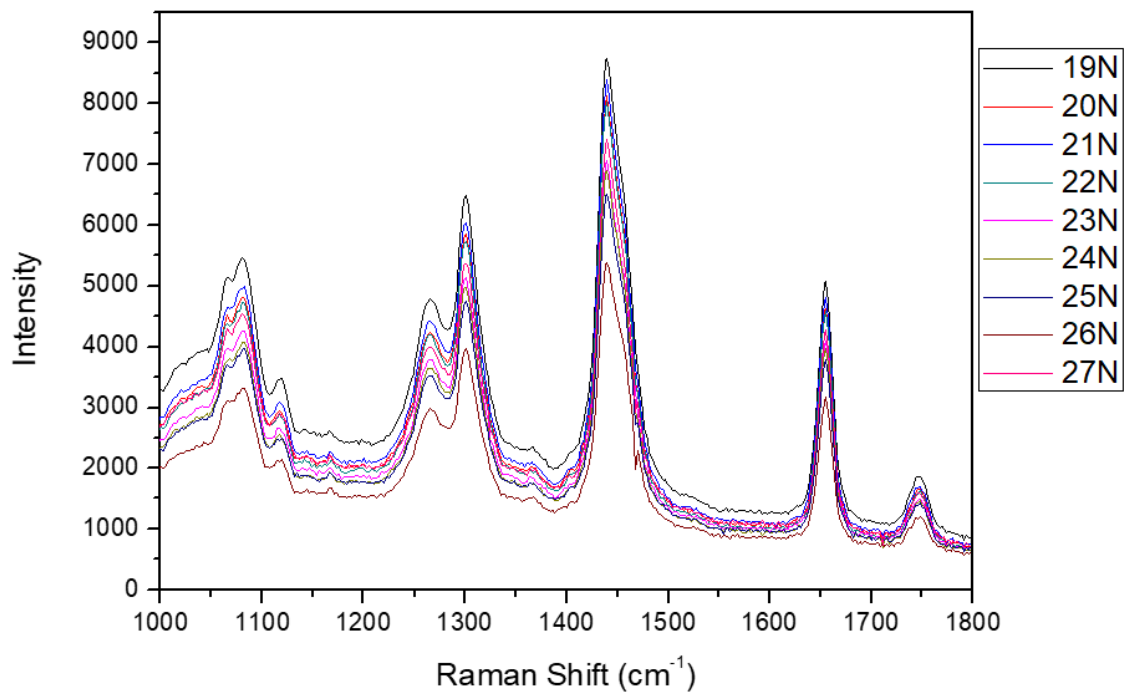


Εικόνα 5.4.3: Φάσματα Raman μίξεων Κολοθή- Αδραμυτιανή



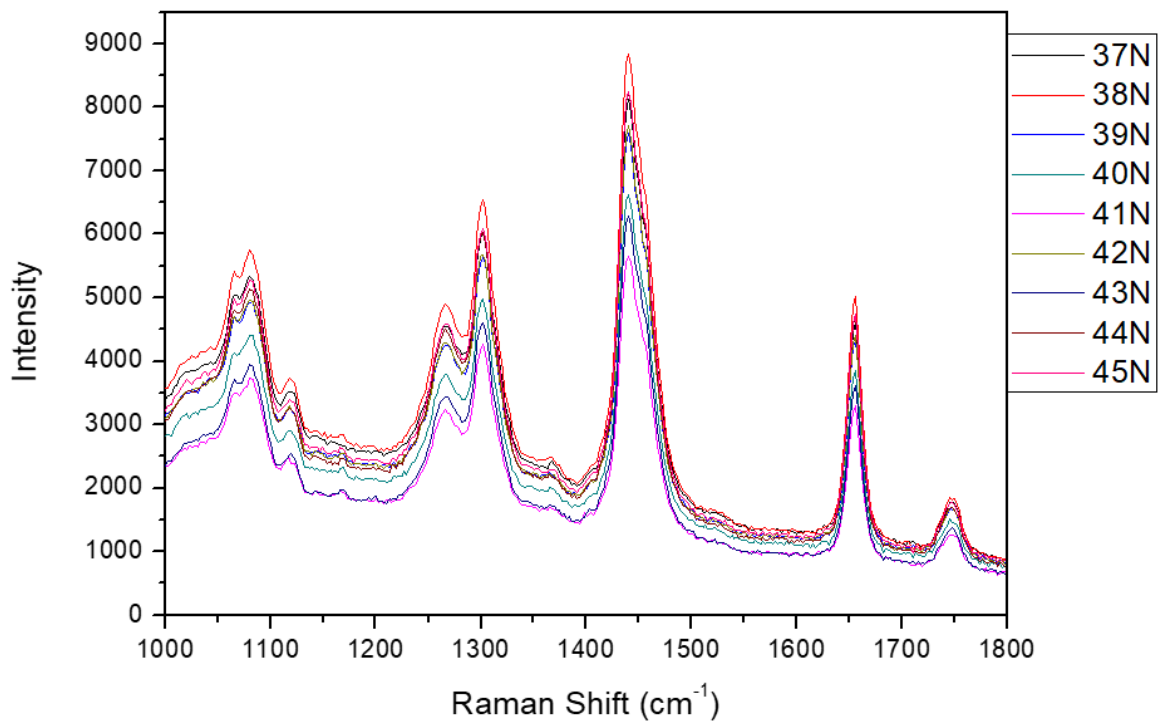
Εικόνα 5.4.4: Φάσματα Raman μίξεων Κορωνέικη-Κολοθή

### Μίξεις Περιχώων

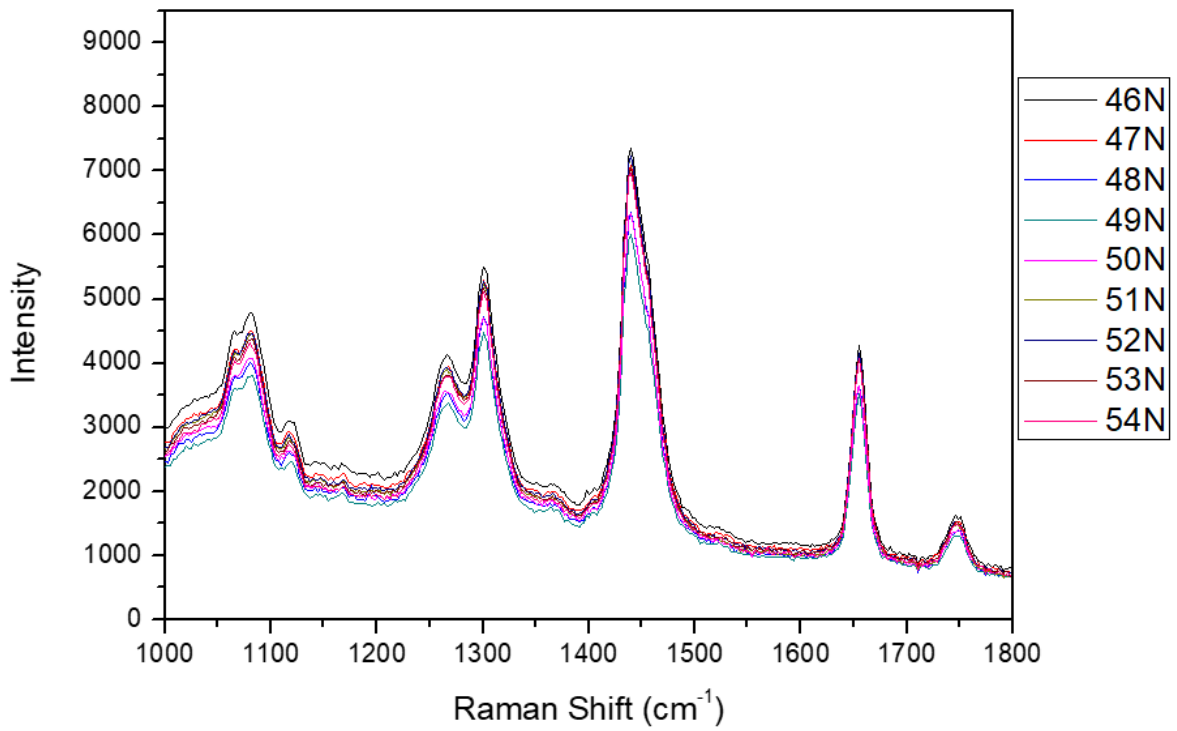


Εικόνα 5.4.5: Φάσματα Raman μίξεων Λέσβος- Κρήτη





Εικόνα 5.4.6: Φάσματα Raman μίξεων Πελοπόννησος- Κρήτη



Εικόνα 5.4.7: Φάσματα Raman μίξεων Πελοπόννησος- Λέσβος

Στα παραπάνω φάσματα βλέπουμε να εμφανίζονται οι ίδιες κορυφές σε όλα τα δείγματα. Η διαφοροποίηση που εντοπίζεται είναι στην ένταση της οπισθοσκέδασης. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή αυτή, έχουν ανατεθεί πλήρως <sup>[3], [7], [8]</sup>:

- Στους  $1080\text{ cm}^{-1}$  : Έκταση δεσμού C-C, του  $-(\text{CH}_2)-$
- Στους  $1265\text{ cm}^{-1}$  : Παραμόρφωση δεσμού( $=\text{C}-\text{H}$ ) του  $\text{cis}-(\text{R}-\text{HC}=\text{CH}-\text{R})$
- Στους  $1300\text{ cm}^{-1}$  : Συστρεφόμενη κάμψη δεσμού C-H, του  $-(\text{CH}_2)$
- Στους  $1440\text{ cm}^{-1}$  : Ψαλιδοειδής κάμψη δεσμού C=H, του  $-(\text{CH}_2)$
- Στους  $1655\text{ cm}^{-1}$  : Έκταση δεσμού C=C, του  $\text{cis}-(\text{R}-\text{HC}=\text{CH}-\text{R})$
- Στους  $1747\text{ cm}^{-1}$  : Έκταση δεσμού C=O, του  $\text{RC}=\text{OOR}$

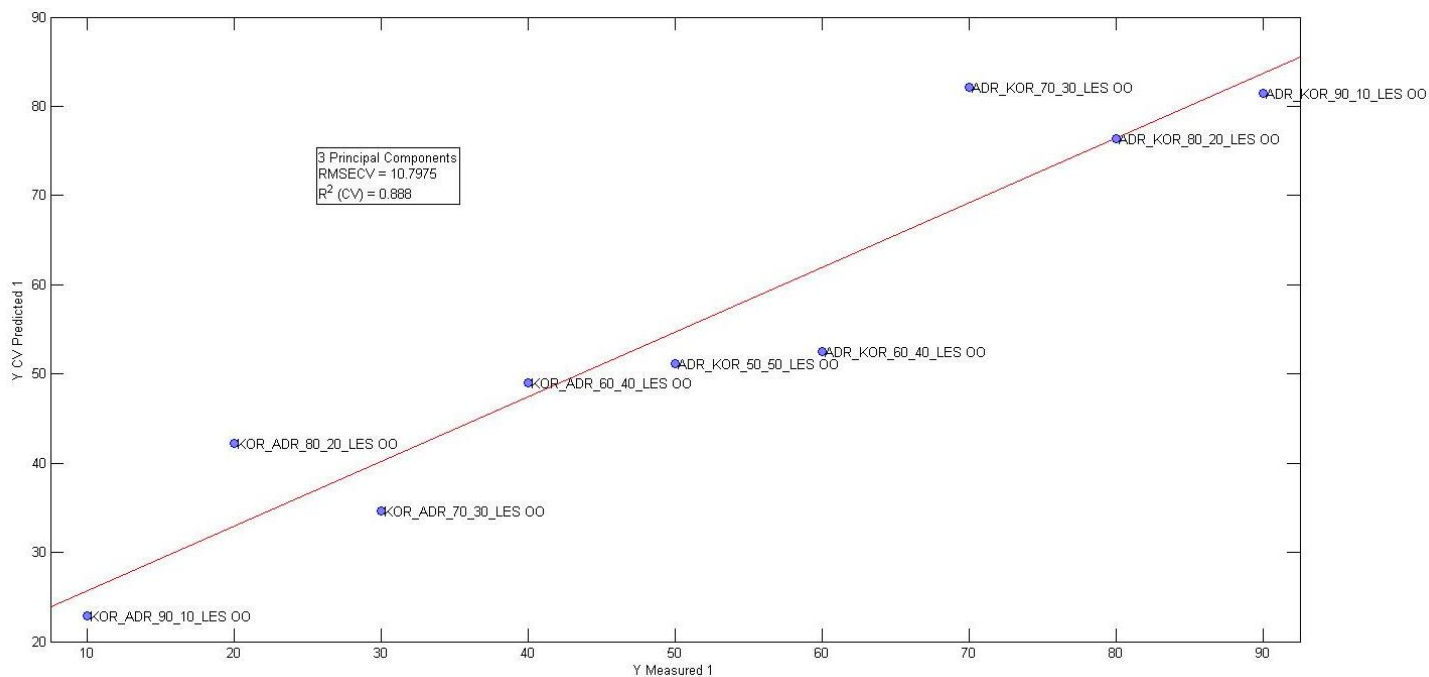
Επομένως οι κορυφές στους  $1265$  και στους  $1655\text{ cm}^{-1}$  ανατίθενται στα ακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο ελαιόλαδο. Η κορυφή στους  $1747\text{ cm}^{-1}$  ανατίθεται στους εστέρες των λιπαρών οξέων στο ελαιόλαδο ενώ η κορυφή στους  $1440\text{ cm}^{-1}$  ανατίθεται στα κορεσμένα λιπαρά οξέα.

## 5.4.2 Στατιστική Ανάλυση

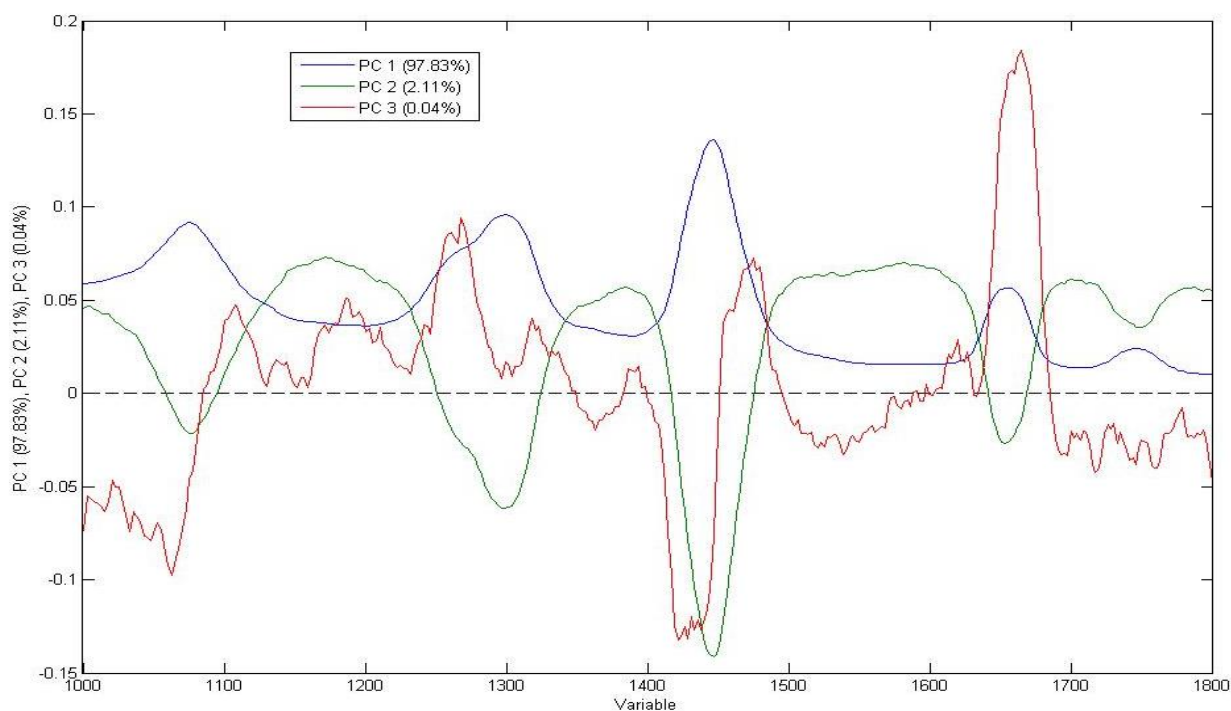
Τα δεδομένα της φασματοσκοπίας Raman μελετήθηκαν με την μέθοδο της PCR, και στο παρόν τμήμα θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματά της.

### Ποικιλιακές μίξεις

#### Κορωνέικη- Αδραμυτιανή

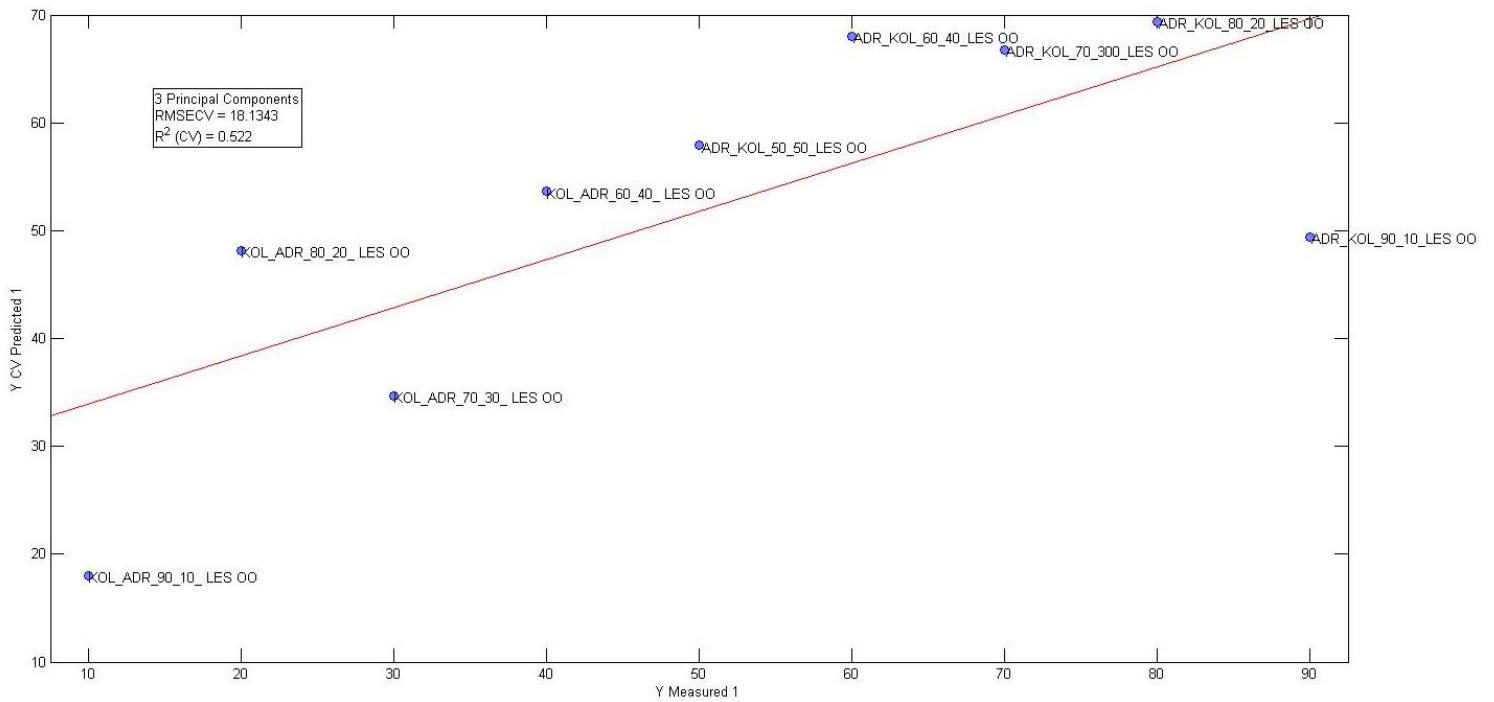


#### Προεξεργασία με Smoothing, Mean Center

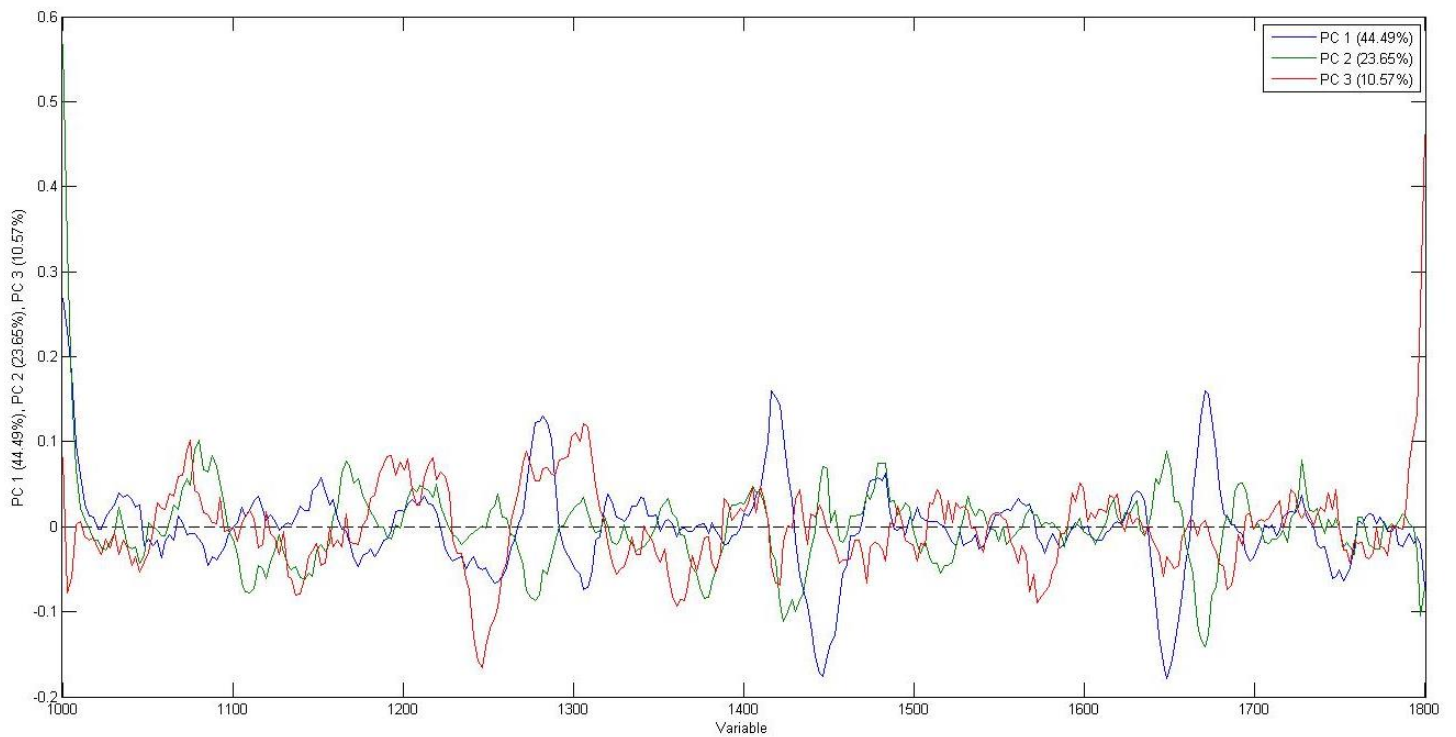


Εικόνα 5.4.8: Score Plot και Loading Plot μίξης Κορωνέικη-Αδραμυτιανή

## Κολοβή- Αδραμυτιανή

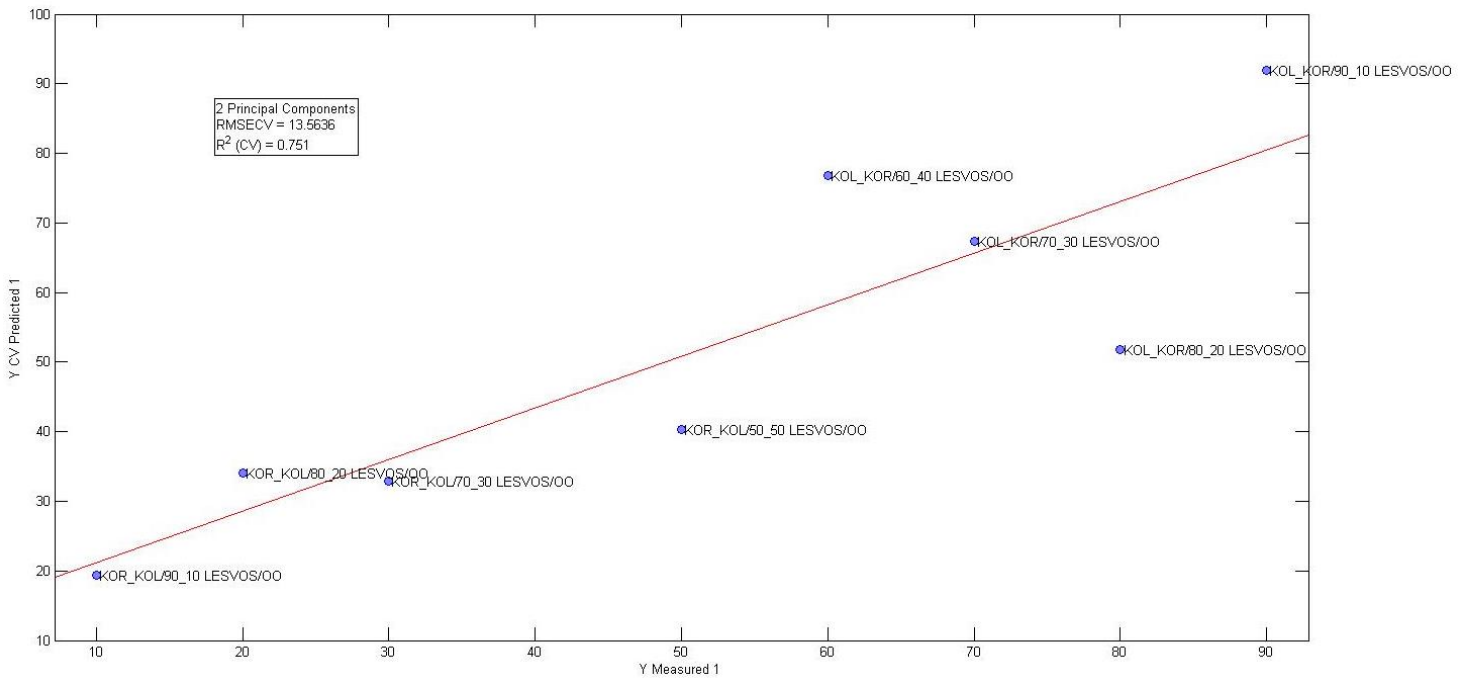


Προεπεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, SNV, Mean Center

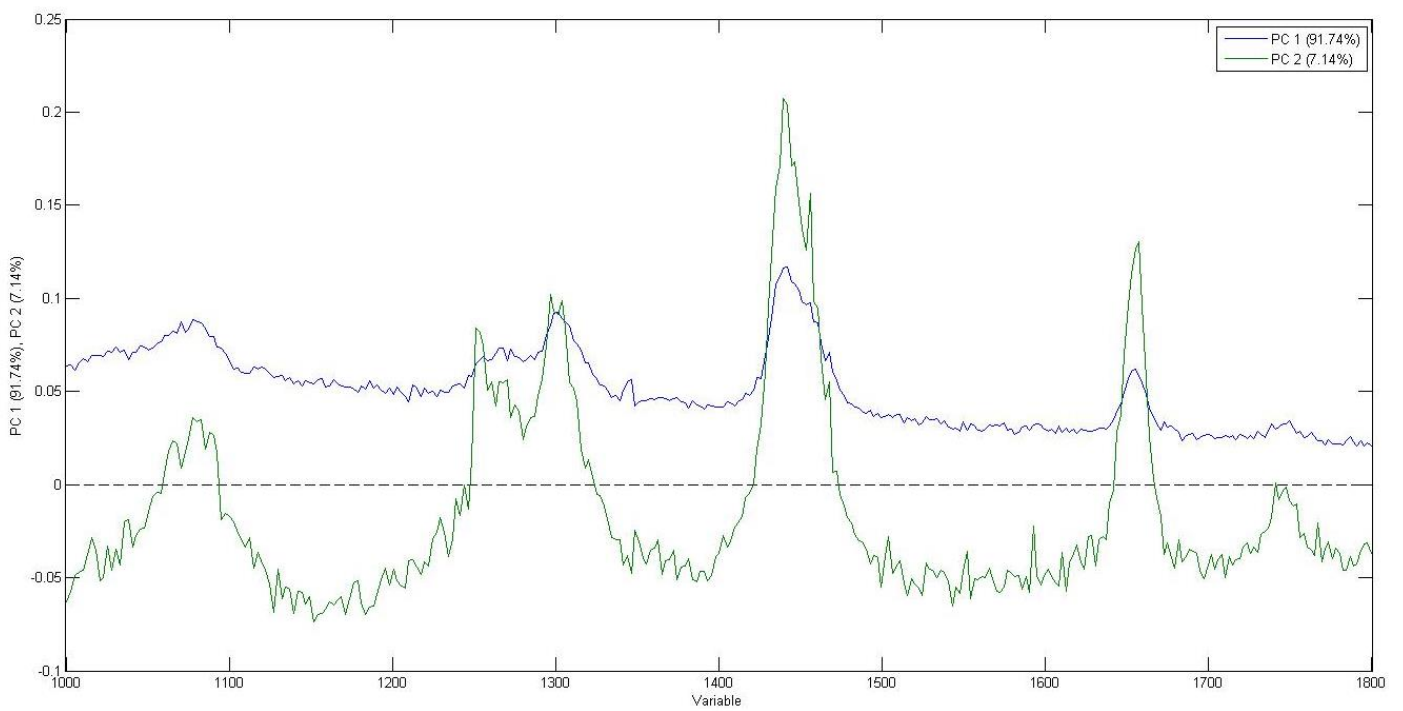


Εικόνα 5.4.9: Score Plot και Loading Plot μίξης Κολοβή-Αδραμυτιανή

## Κορωνέικη- Κολοβή



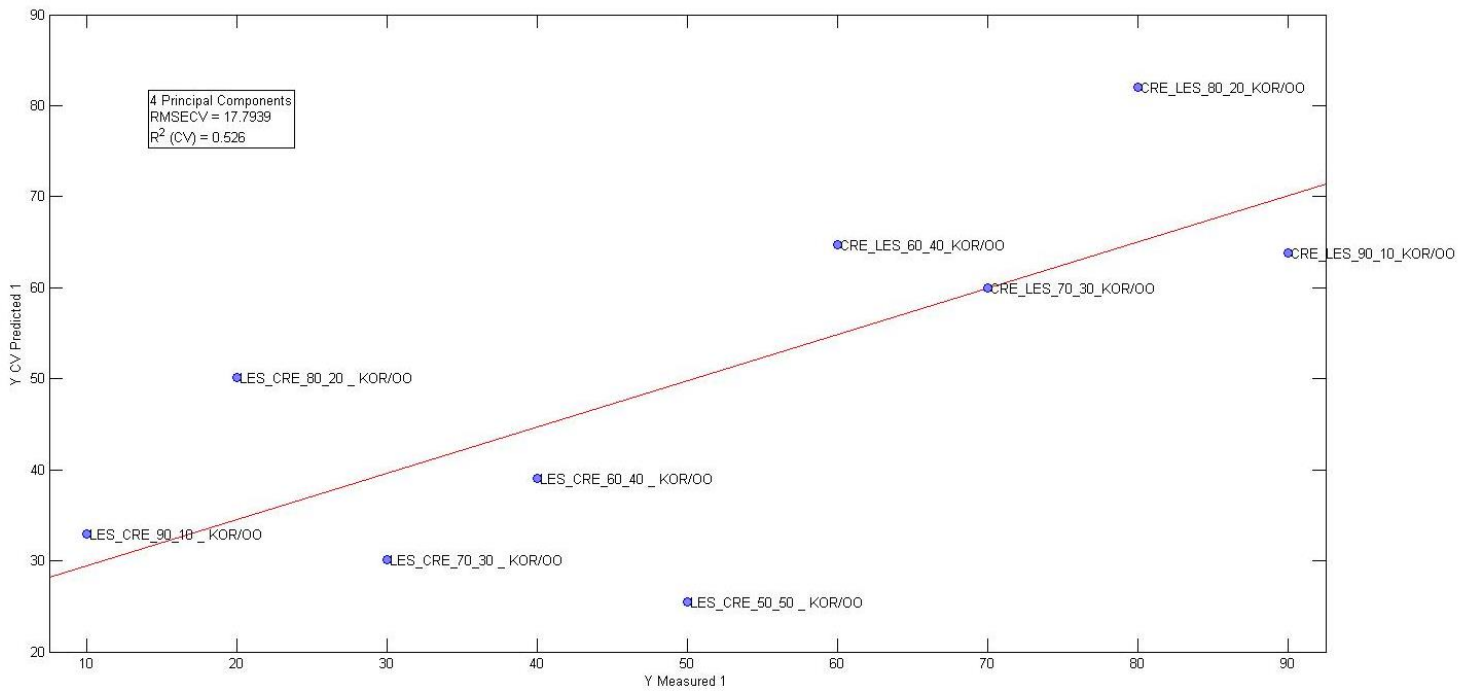
Προεπεξεργασία με Mean Center, -31N



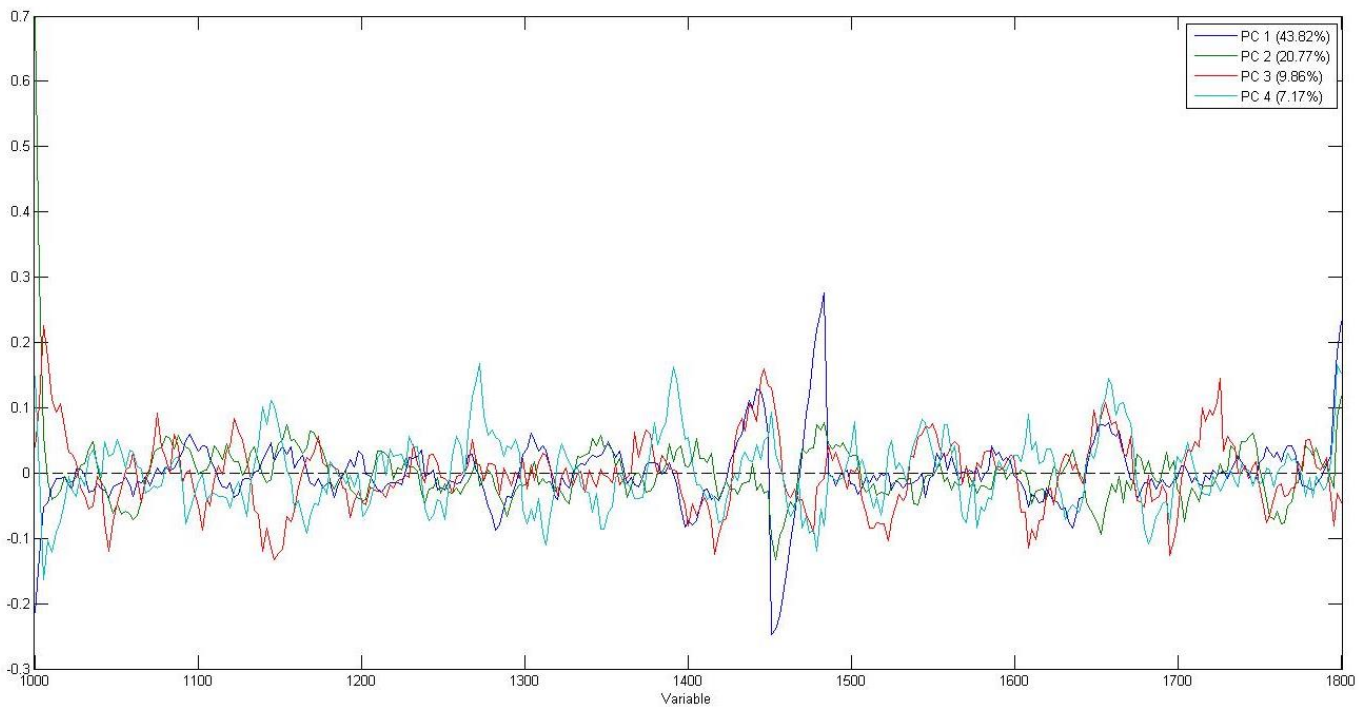
Εικόνα 5.4.10: Score Plot και Loading Plot μίξης Κορωνέικη -Κολοβή

## Μίξεις περιοχών

### Λέσβος-Κρήτη

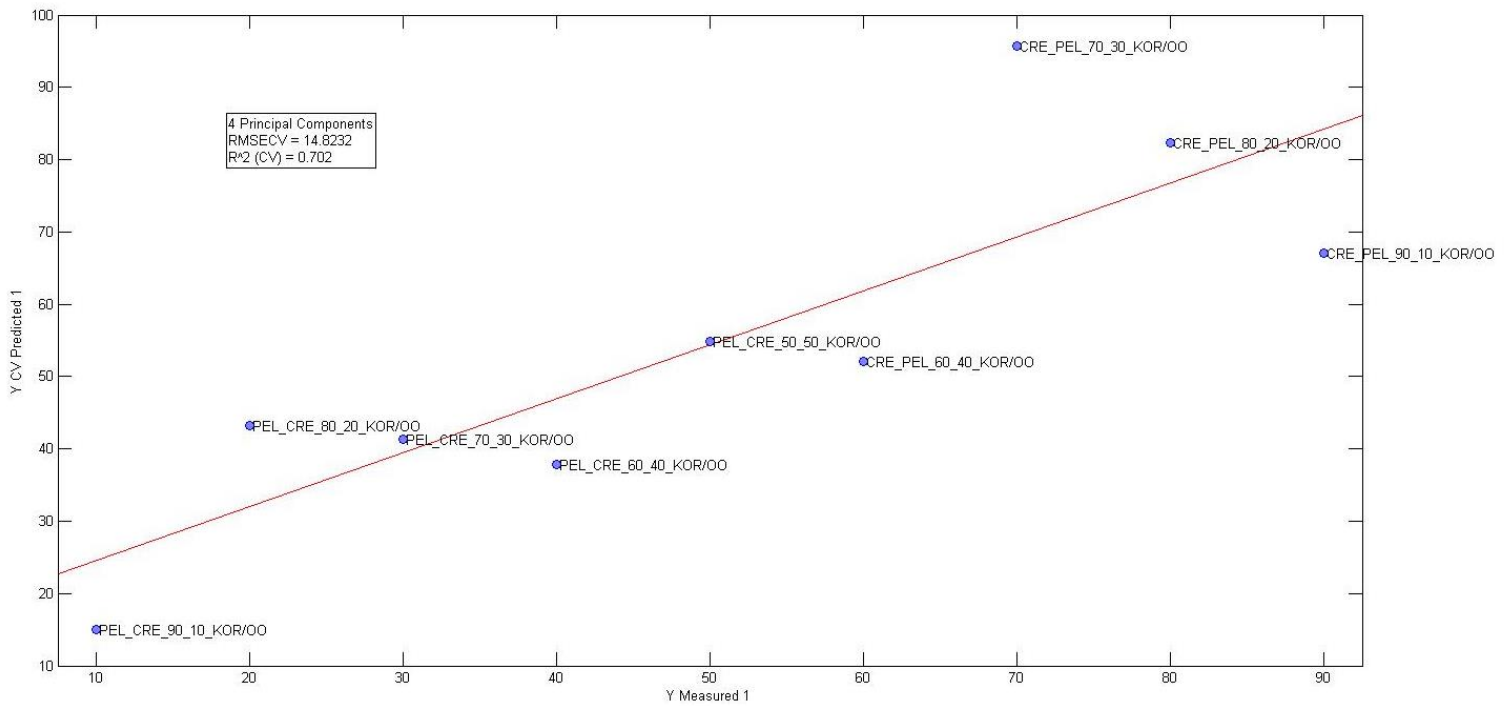


### Προεξεργασία με 1<sup>st</sup> derivative, Mean Center

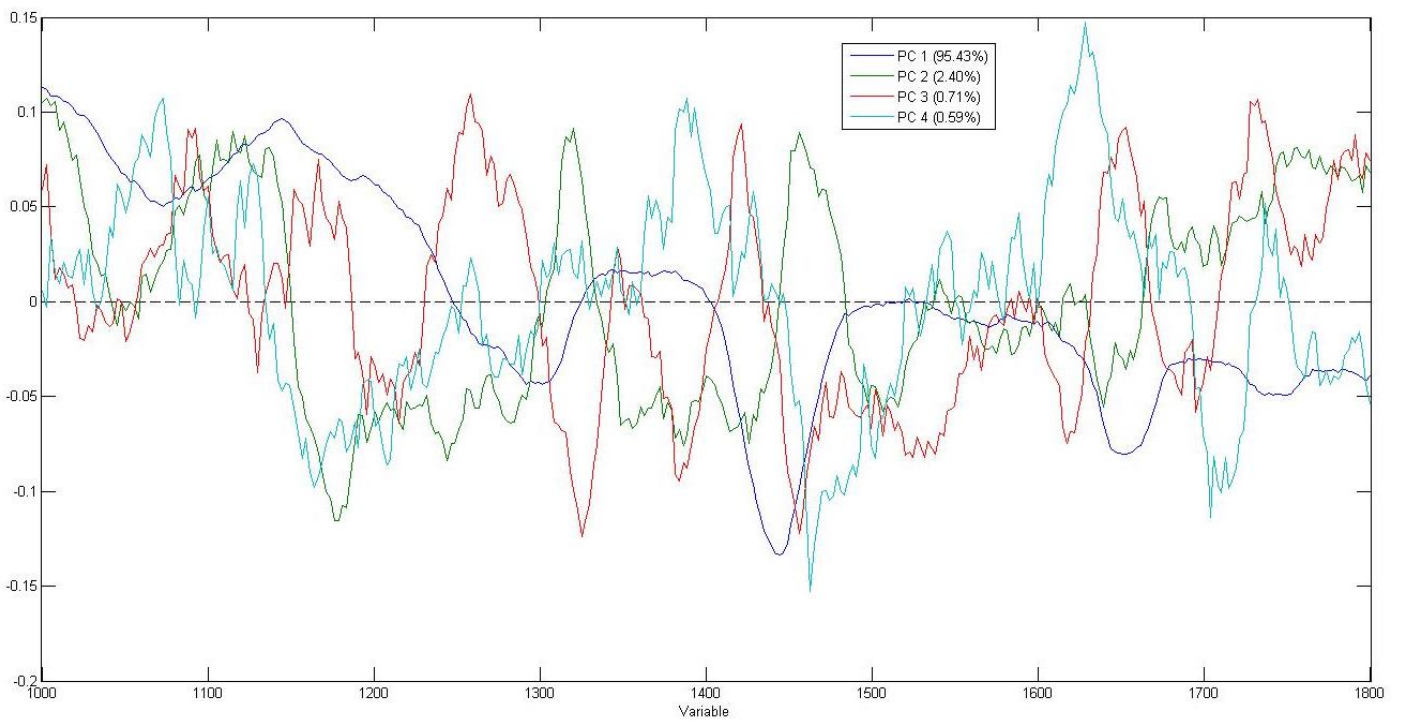


Εικόνα 5.4.11: Score Plot και Loading Plot μίξης Λέσβος-Κρήτη

## Πελοπόννησος-Κρήτη

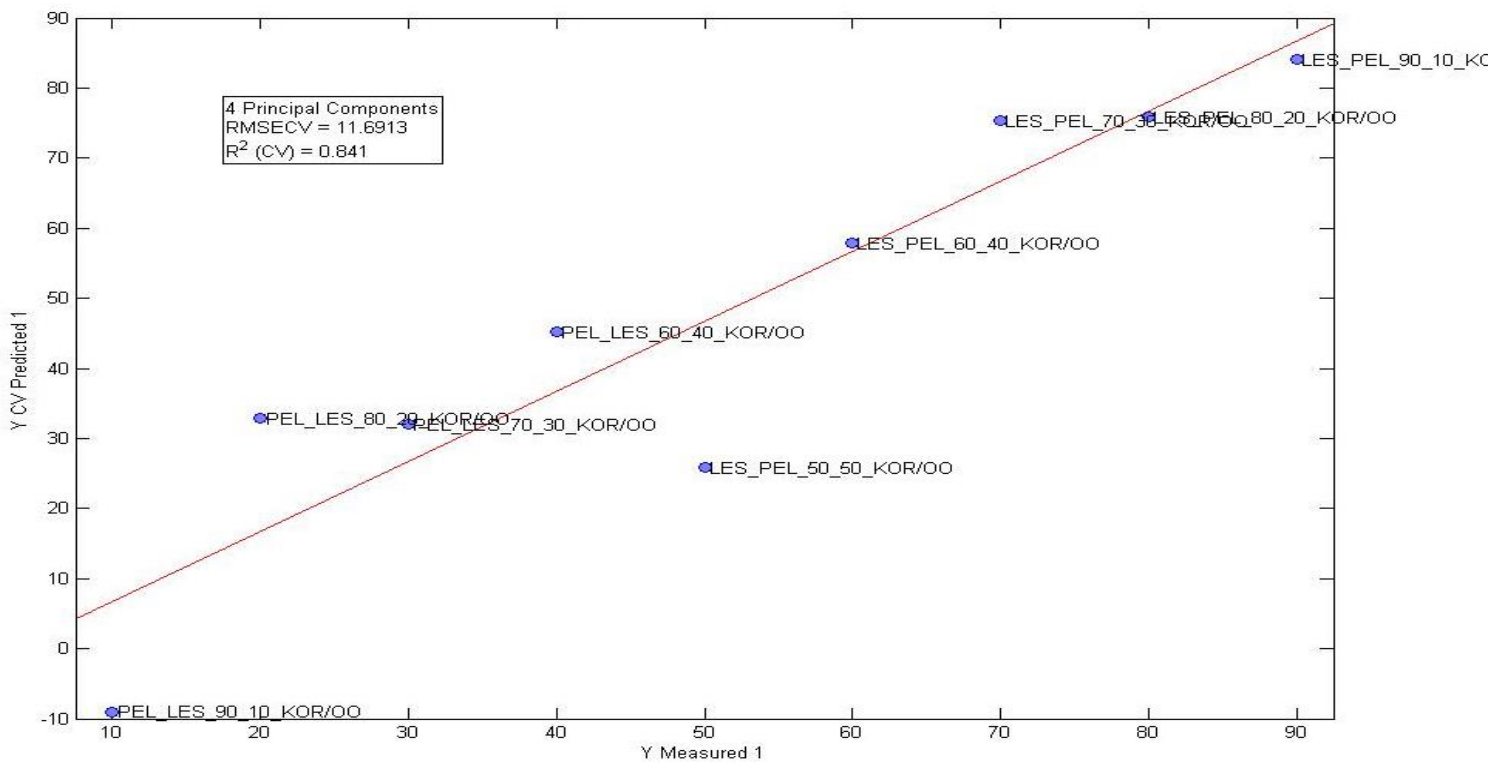


Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center

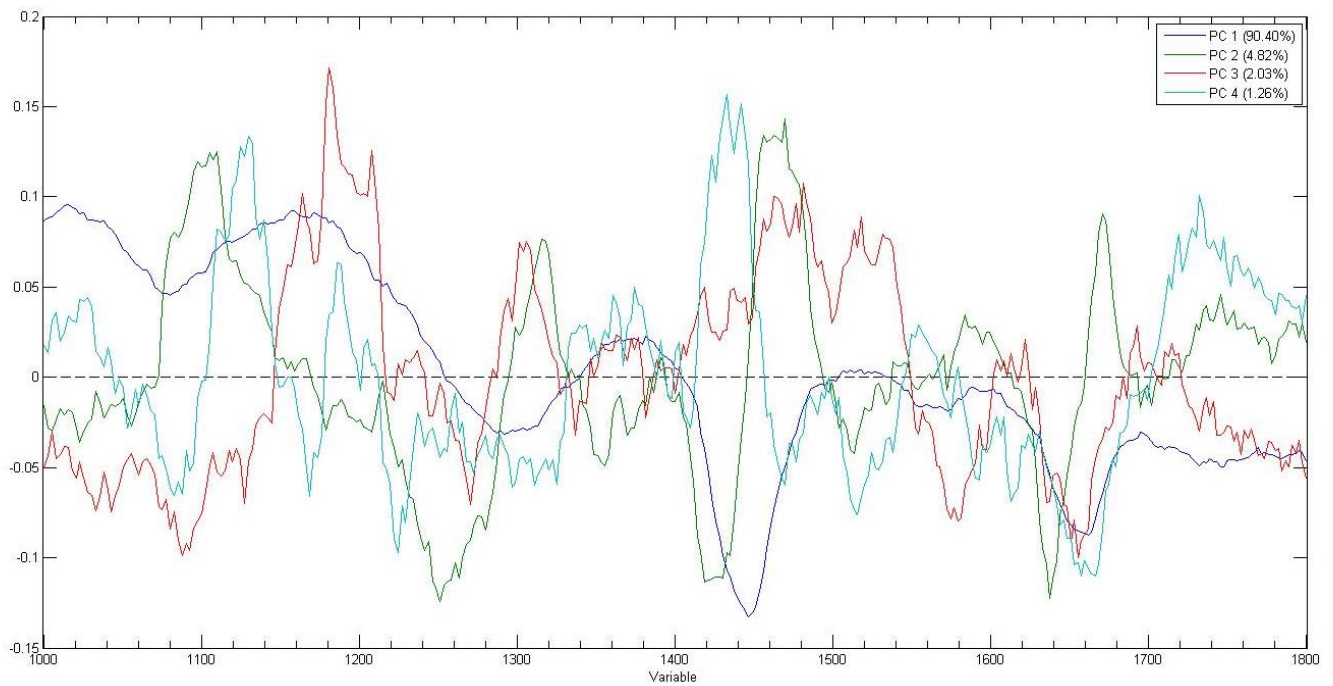


Εικόνα 5.4.12: Score Plot και Loading Plot μίξης Πελοπόννησος- Κρήτη

## Πελοπόννησος-Λέσβος



### Προεπεξεργασία με Smoothing, SNV, Mean Center



Εικόνα 5.4.13: Score Plot και Loading Plot μίξης Πελοπόννησος- Λέσβος



- Στην μίξη Κορωνέικης- Αδραμυτιανής ποικιλίας η PCR δημιούργησε πολύ ικανοποιητικό γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,888$  και  $RMSECV= 10,798$ . Το loading plot δείχνει μεγαλύτερη συνεισφορά στην ανάλυση από τις κορυφές στους 1440 και στους 1655  $cm^{-1}$  δηλαδή κορυφές που αντιστοιχούν τόσο στα κορεσμένα όσο και στα ακόρεστα λιπαρά οξέα.
- Στην μίξη Κολοβής- Αδραμυτιανής ποικιλίας η PCR δημιούργησε γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,522$  και  $RMSECV= 18,134$ . Το loading plot δείχνει κύρια συνεισφορά στην ανάλυση από τις κορυφές στους 1265, 1440 και 1655  $cm^{-1}$ . Ο δείκτης  $R^2$  έχει πολύ χαμηλή τιμή και το σφάλμα είναι αρκετά μεγάλο, επομένως το μοντέλο δεν είναι ικανοποιητικό.
- Στην μίξη Κορωνέικης- Κολοβής ποικιλίας η PCR δημιούργησε ένα ικανοποιητικό γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,751$  και  $RMSECV= 13,564$ . Το loading plot δείχνει αμοιβαία συνεισφορά στην ανάλυση από όλες τις κορυφές του φάσματος. Το δείγμα που δεν συμπεριλήφθηκε (31N) κρίθηκε ως μη αξιόπιστο.
- Στην μίξη Λέσβου- Κρήτης η PCR δημιούργησε γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,526$  και  $RMSECV= 17,794$ . Το loading plot δείχνει μεγαλύτερη συνεισφορά στην ανάλυση από την κορυφή στους 1440  $cm^{-1}$ . Το μοντέλο έχει πολύ χαμηλή τιμή  $R^2$  και δεν είναι ικανοποιητικό.
- Στην μίξη Πελοποννήσου- Κρήτης η PCR δημιούργησε ικανοποιητικό γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,702$  και  $RMSECV= 14,823$ . Το loading plot δείχνει μεγαλύτερη συνεισφορά στην ανάλυση από τις κορυφές στους 1440 και 1655  $cm^{-1}$  ενώ υπάρχει συνεισφορά από το σύνολο των κορυφών στις τέσσερις κύριες συνιστώσες.
- Στην μίξη Πελοποννήσου- Λέσβου η PCR δημιούργησε πολύ ικανοποιητικό γραμμικό μοντέλο με  $R^2= 0,841$  και  $RMSECV= 11,691$ . Το loading plot δείχνει κύρια συνεισφορά στην ανάλυση από τις κορυφές στους 1265 και 1440  $cm^{-1}$  ενώ και οι υπόλοιπες κορυφές του φάσματος συνεισφέρουν σημαντικά στις πρώτες τέσσερις κύριες συνιστώσες.

Συνολικά, τα βέλτιστα στατιστικά αποτελέσματα εμφανίστηκαν στην διάκριση της μίξης Κορωνέικης- Αδραμυτιανής (ποικιλιακές) και της μίξης Πελοποννήσου- Λέσβου (μίξεις περιοχών).

## Βιβλιογραφία

1. Σαριδάκης, Γιάννης., Χανιωτάκης, Νίκος. (2011). Αναλυτική Χημεία I & II, Ασκήσεις Εργαστηρίων. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2. Fuentes, E., Báez, M. E., Bravo, M., Cid, C., & Labra, F. (2012). Determination of Total Phenolic Content in Olive Oil Samples by UV–visible Spectrometry and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods*, 5(6), 1311–1319
3. Philippidis A., Poulakis E., Papadaki A., Velegrakis M., (2016) Comparative Study using Raman and Visible Spectroscopy of Cretan Extra Virgin Olive Oil Adulteration with Sunflower Oil. *Analytical Letters*, 1182-1195.
4. Aparicio, R., & Harwood, J. (2013). Handbook of olive oil: Analysis and properties (pp. 362-365)
5. Yang, H., & Irudayaraj, J. (2001). Comparison of Near-Infrared, Fourier Transform-Infrared, and Fourier Transform-Raman Methods for Determining Olive Pomace Oil Adulteration in Extra Virgin Olive Oil, 78(9), 889–895.
6. Bertran, E., Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., MasPOCH, S., & Montoliu, I. (2000). Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins, 52, 45–52.
7. Duraipandian, S., Petersen, J. C., & Lassen, M. (2019) Authenticity and Concentration Analysis of Extra Virgin Olive Oil Using Spontaneous Raman Spectroscopy and Multivariate Data Analysis, 1–11.
8. Qiu, J., Hou, H., Yang, I., & Chen, X. (2019). Raman Spectroscopy Analysis of Free Fatty Acid in Olive Oil.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΜΕΛΕΤΗ ΒΛΕΝΝΑΣ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ

### 6.1 Εισαγωγή

Η βλέννα από το σαλιγκάρι είναι μία ουσία που παράγεται φυσικά από το ίδιο το σαλιγκάρι. Πρόκειται για έναν γλοιώδη, ασημί χρώματος σχηματισμό, ο οποίος εκκρίνεται με μυϊκές συσπάσεις από αδένες στον μυώδη πόδα του σαλιγκαριού. Ο πόδας είναι ένας μυώδης σχηματισμός ο οποίος προέκυψε από τη διαφοροποίηση του κοιλιακού τμήματος του σώματος του ζώου. Παράγεται με σκοπό την διατήρηση της υγρασίας στο σώμα του σαλιγκαριού στα φυσιολογικά επίπεδα, την ομαλή κίνηση μέσα στο κέλυφος αλλά και την μετακίνηση του ζώου, καθώς και την ανάπλαση των πληγών του ζώου. <sup>[1]</sup> Το έκκριμα αυτό περιέχει γλυκολικό οξύ, ελαστίνη, κολλαγόνο, αλλαντοΐνη, βιταμίνη Α, βιταμίνη Ε και βιταμίνη D<sub>3</sub> (χοληκαλσιφερόλη) και κάποιες γλυκοπρωτεΐνες. <sup>[2], [3]</sup> Οφείλει την γλοιώδη υφή του στην έντονη παρουσία πολυμερών στην σύστασή του. Επίσης φέρει και διάφορα μέταλλα όπως είναι ο χαλκός, το μαγνήσιο και το ασβέστιο σε πολύ μικρή περιεκτικότητα. <sup>[3]</sup>

Στην Ελλάδα το κυρίαρχο είδος σαλιγκαριού που μπορεί να εντοπιστεί στην ύπαιθρο είναι το *Helix Aspersa*. Το κοινό όνομα του είδους στην Ελλάδα είναι Κρητικός κοχλίας. Το κέλυφος των ώριμων ατόμων μπορεί να φτάσει στα 25-35 mm ύψος και στα 25 - 40 mm διάμετρο <sup>[4]</sup>. Το είδος αυτό είναι ενδημικό στην περιοχή της Μεσογείου και της βορειοδυτικής Αφρικής.

Από την αρχαιότητα ακόμη, το έκκριμα του σαλιγκαριού χρησιμοποιείται για την επούλωση των πληγών και των εγκαυμάτων. Οι ιατροί της αρχαιότητας όπως ο Ιπποκράτης και ο Γαληνός συνήθιζαν να θεραπεύουν πλήθος παθήσεων με την χρήση της βλέννας του σαλιγκαριού. <sup>[5]</sup> Μέχρι τα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα αποτελούσε μια από τις μοναδικές θεραπείες για την φυματίωση.

Στις μέρες μας, η βλέννα του σαλιγκαριού βρίσκει εφαρμογές κατά κύριο λόγο ως βασικό συστατικό πολλών καλλυντικών. Η πρώτη φορά που καταγράφηκαν επίσημα τα οφέλη της βλέννας σαλιγκαριού στην δερματολογία ήταν στην δεκαετία του 1960 από τον Ισπανό ογκολόγο Rafael Abad Iglesias. Κατά την διάρκεια ακτινοθεραπείας με σκοπό την αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων στην επιφάνεια του ζώου, παρατήρησε ότι μετά την έκκριση βλέννας, οι πληγές στην επιφάνεια του ζώου επουλώθηκαν πολύ πιο γρήγορα από το φυσιολογικό. Συμπέρανε λοιπόν ότι μπορεί να βοηθήσει στην επιτάχυνση της αποκατάστασης της ανθρώπινης επιδερμίδας. <sup>[6]</sup> Πλέον πάρα πολλές εταιρίες στην Ελλάδα και στο εξωτερικό δραστηριοποιούνται στην δημιουργία καλλυντικώνσκευασμάτων όπως αντιρυτιδικές κρέμες, κρέμες ανάπλασης και κρέμες βαθιάς θρέψης.

Το προϊόν αυτό στο παρελθόν έχει μελετηθεί με διάφορες αναλυτικές τεχνικές όπως η GC-MS [3] αλλά και η HPLC [7],[8] ενώ η παρούσα μελέτη συνιστά την πρώτη ανάλυση του εκκρίματος αυτού με φασματοσκοπικές τεχνικές.

### **Δείγματα και Πειραματική Διαδικασία**

Η εταιρία escargot de Crete μας παρείχε δείγματα αποστειρωμένης βλέννας σαλιγκαριού καθώς και δείγματα βλέννας από σαλιγκάρια άνευ αποστείρωσης. Η φρέσκια βλέννα προήλθε από σαλιγκάρια νεαρά, ενήλικα και υπερήλικα. Τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν με την τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού.

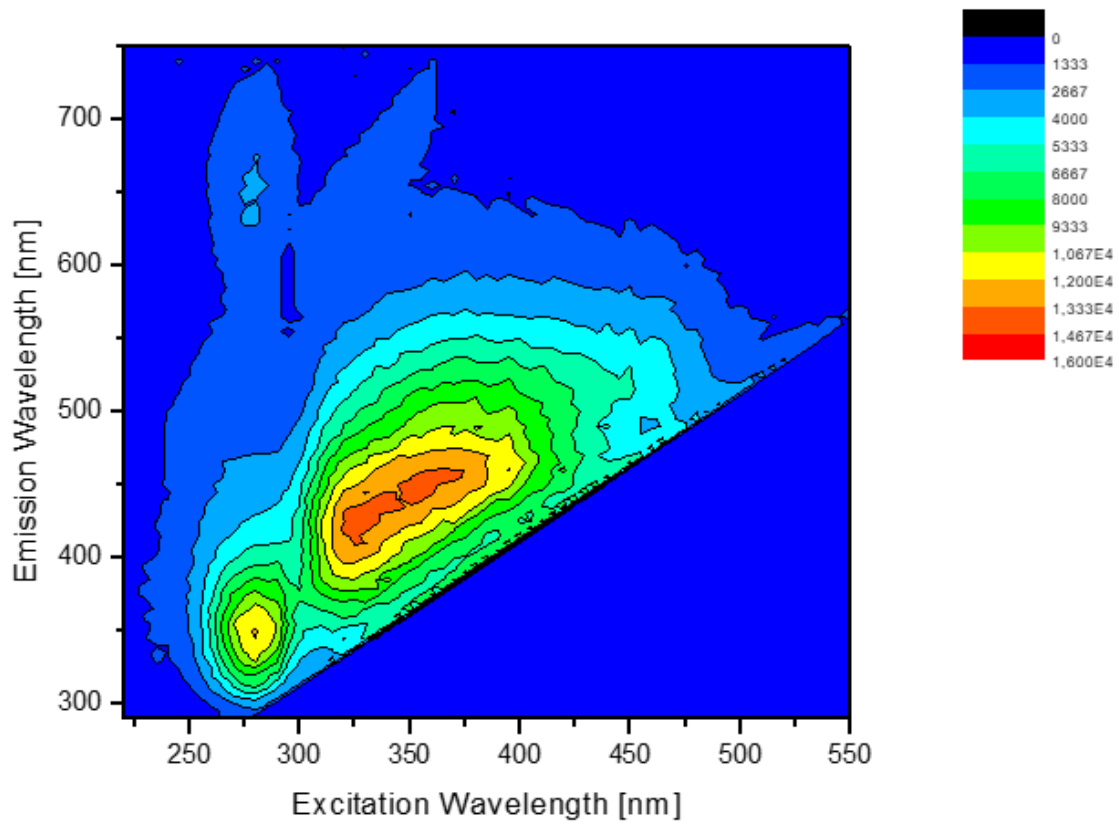
Φασματοσκοπία φθορισμού

<b>Όργανο</b>	Fluoromax P
<b>Κυψελίδα</b>	10mm από χαλαζία
<b>Διάταξη κυψελίδας</b>	35° Γεωμετρία Εμπρόσθιας Όψης (Front Face)
<b>Matrix Scan:</b>	
Μήκος Διέγερσης(Excitation Wavelength):	220-550 nm
Μήκος Εκπομπής(Emission Wavelength):	290-750 nm
Slits:	exc. 1nm/em. 2nm,
Integration time:	0,05 sec
Scans:	66 Scans

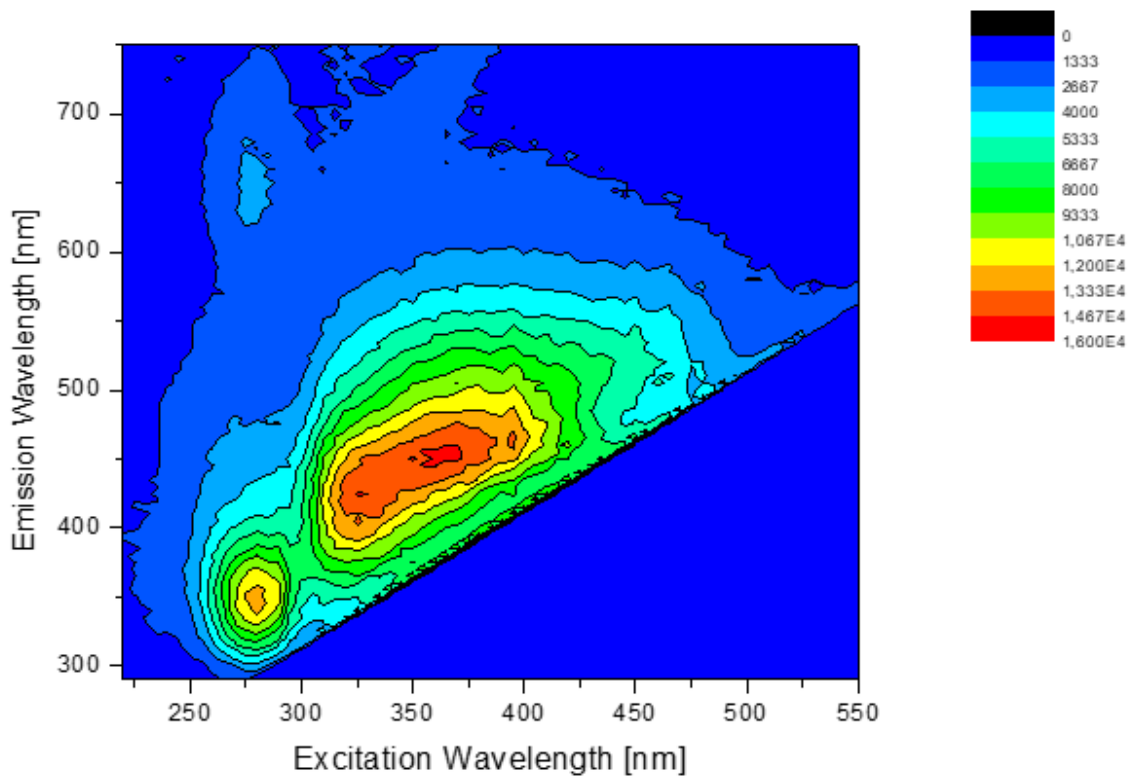
Τα δείγματα αποστειρωμένης βλέννας ήταν υπέρκορα ως προς την δραστική ουσία επομένως περιείχαν ποσότητα ιζήματος. Για την μελέτη του δείγματος στην πληρότητα του, μετρήθηκε ξεχωριστά το υπερκείμενο υγρό, το ίζημα αλλά και η μίξη που προέκυψε από την ανάδευση των δύο φάσεων. Κάθε φάση που απομονώθηκε υπέστη αραίωση προκειμένου να μειωθεί η ένταση του φθορισμού και να είναι συγκρίσιμη ανάμεσα στις τρεις φάσεις.

### **6.2 Αποτελέσματα**

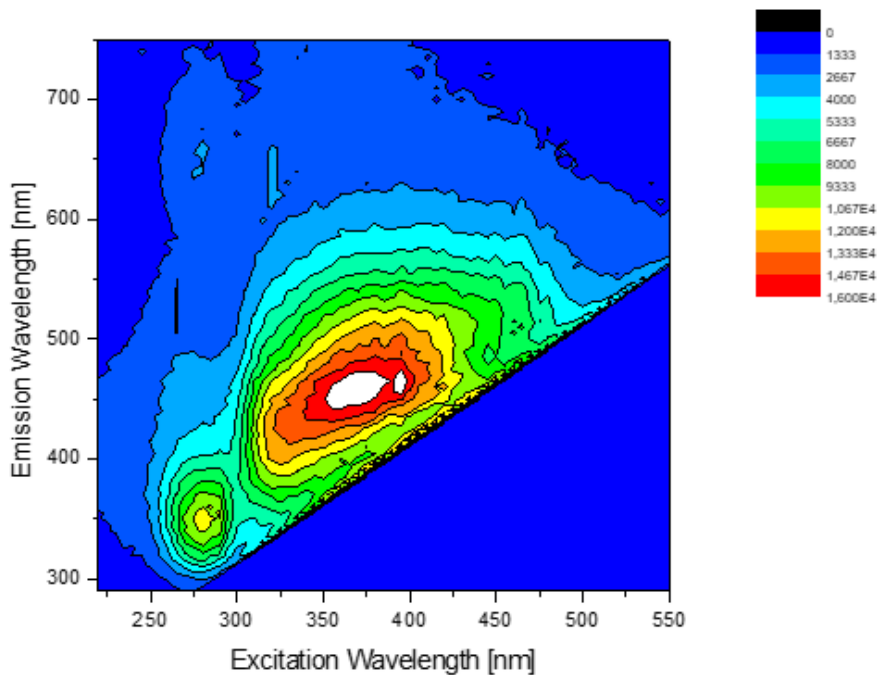
Όπως φαίνεται στους τρεις χάρτες φθορισμού που εμφανίζονται στις εικόνες 6.2.1 έως 6.2.3, και οι τρεις χάρτες εμφανίζουν τις ίδιες περιοχές φθορισμού, τις ίδιες κορυφές. Επομένως γίνεται αντιληπτό ότι το υπερκείμενο υγρό με το ίζημα που έχει καταβυθιστεί φέρει όντως τις ίδιες ουσίες, και ότι δεν έχει πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση εντός του διαλύματος. Η ένταση του φθορισμού είναι μέγιστη στην κάτω φάση, ελάχιστη στην πάνω φάση και ενδιάμεση στην μικτή φάση. Επομένως η δραστική ουσία στο ίζημα φθορίζει έντονα.



Εικόνα 6.2.1: Χάρτης φθορισμού πάνω φάσης

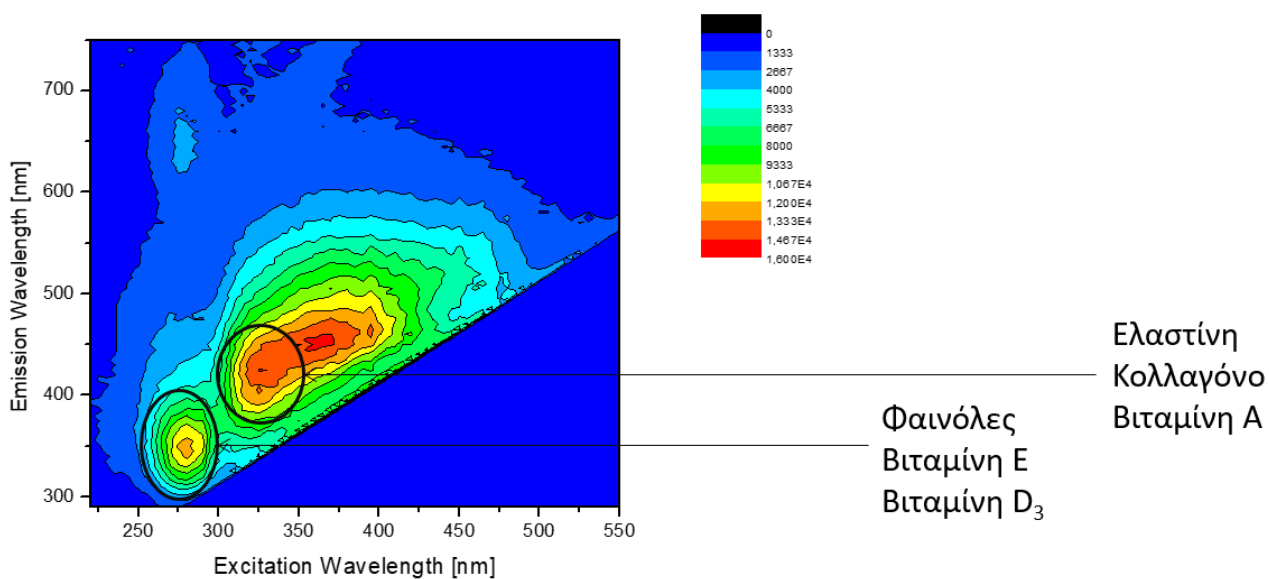


Εικόνα 6.2.2: Χάρτης φθορισμού μεσαίας φάσης (μίξη)



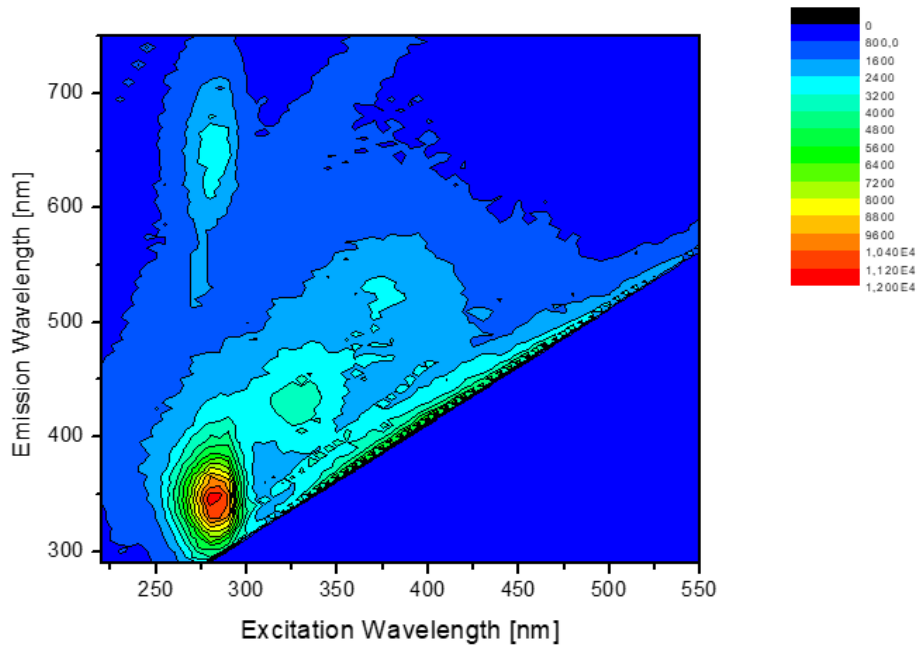
Εικόνα 6.2.3: Χάρτης φθορισμού κάτω φάσης (ίζημα)

Στην συνέχεια, οι ανεξάρτητες χημικές αναλύσεις που μας δόθηκαν από την εταιρία αντιστοιχίστηκαν με βιβλιογραφική έρευνα [9], [10] και έγινε ανάθεση των βασικών συστατικών της βλέννας με τις κορυφές του φθορισμού όπως φαίνεται στην εικόνα #.4. Στην περιοχή 275/350 nm (excitation/emission) ανατίθενται οι φαινόλες και οι βιταμίνες E και D<sub>3</sub> ενώ στην περιοχή 325/400 nm (excitation/emission) ανατίθεται ο φθορισμός της ελαστίνης, του κολλαγόνου και της βιταμίνης A.

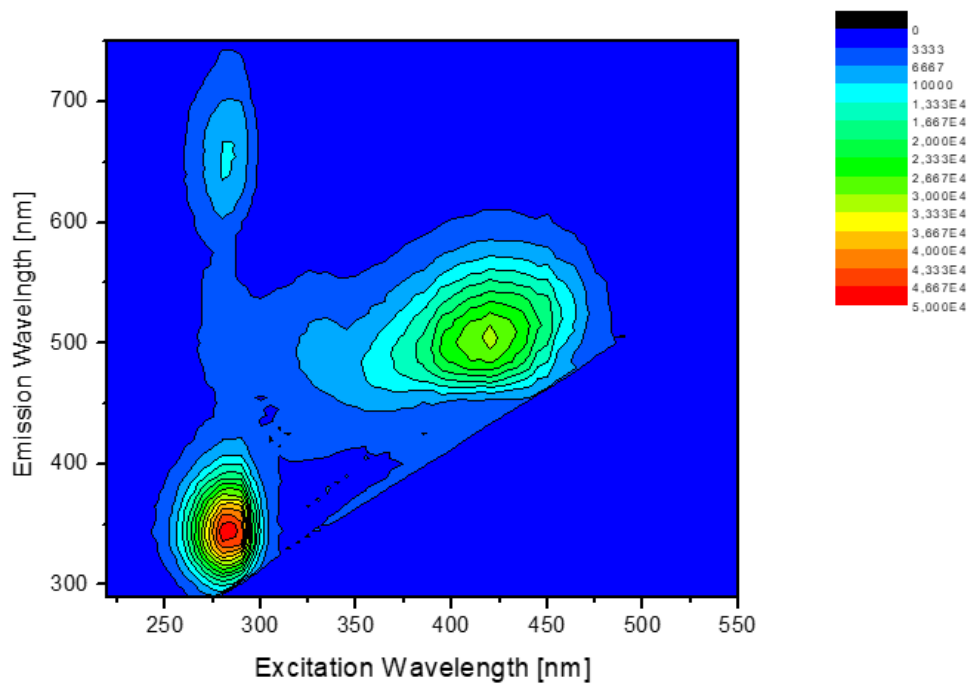


Εικόνα 6.2.4: Χάρτης φθορισμού με ανάθεση

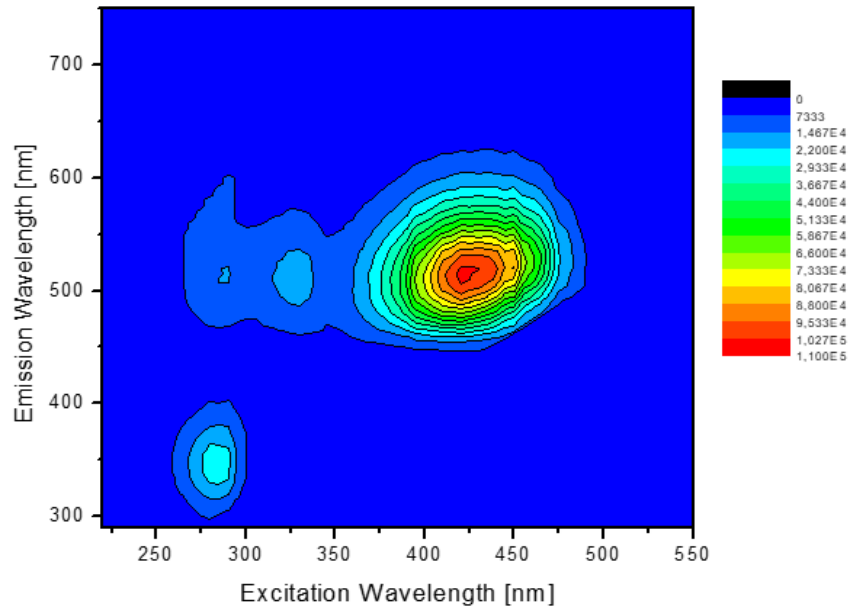
Στα δείγματα βλέννας άνευ αποστείρωσης δεν υπήρξε αραίωση. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις εικόνες 6.2.5 έως 6.2.7. Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί εύκολα είναι ότι η σύσταση της βλέννας αλλάζει όσο αυξάνεται η ηλικία του σαλιγκαριού. Το προφίλ των κορυφών στους χάρτες αλλάζει. Στα νεαρά, η μοναδική κορυφή που εμφανίζεται είναι στα 270/350 nm. Στα ενήλικα εμφανίζεται και μία δεύτερη κορυφή στα 425/500 nm με μικρή όμως ένταση φθορισμού σε σχέση με την άλλη κορυφή. Στα υπερήλικα η κορυφή στα 425/500 nm είναι η κυρίαρχη με πολύ μεγάλη ένταση φθορισμού ενώ η άλλη κορυφή, συγκριτικά, έχει πολύ μικρή ένταση φθορισμού.



Εικόνα 6.2.5: Χάρτης φθορισμού βλέννας νεαρών σαλιγκαριών

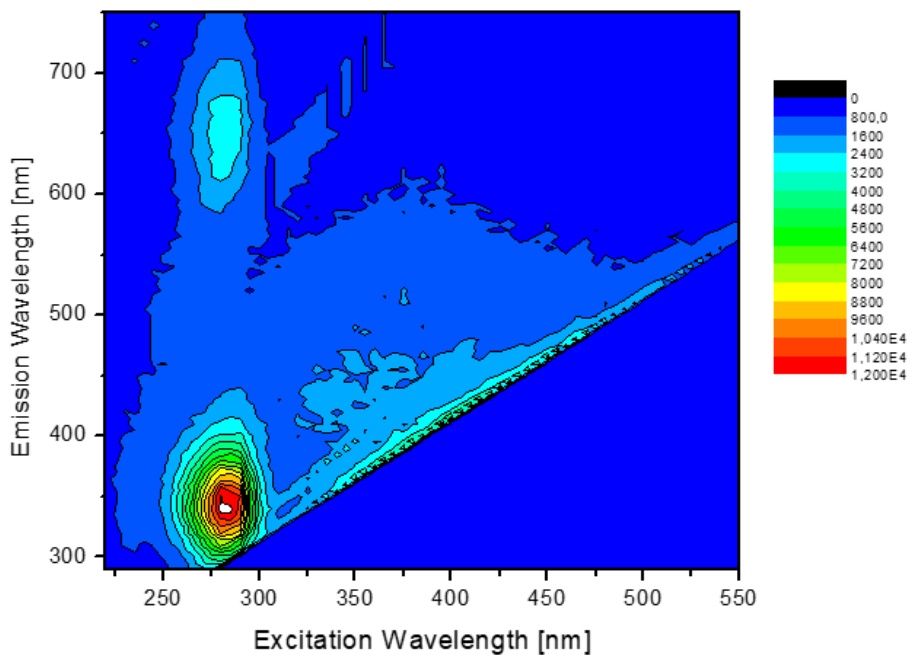


Εικόνα 6.2.6: Χάρτης φθορισμού ενήλικων σαλιγκαριών



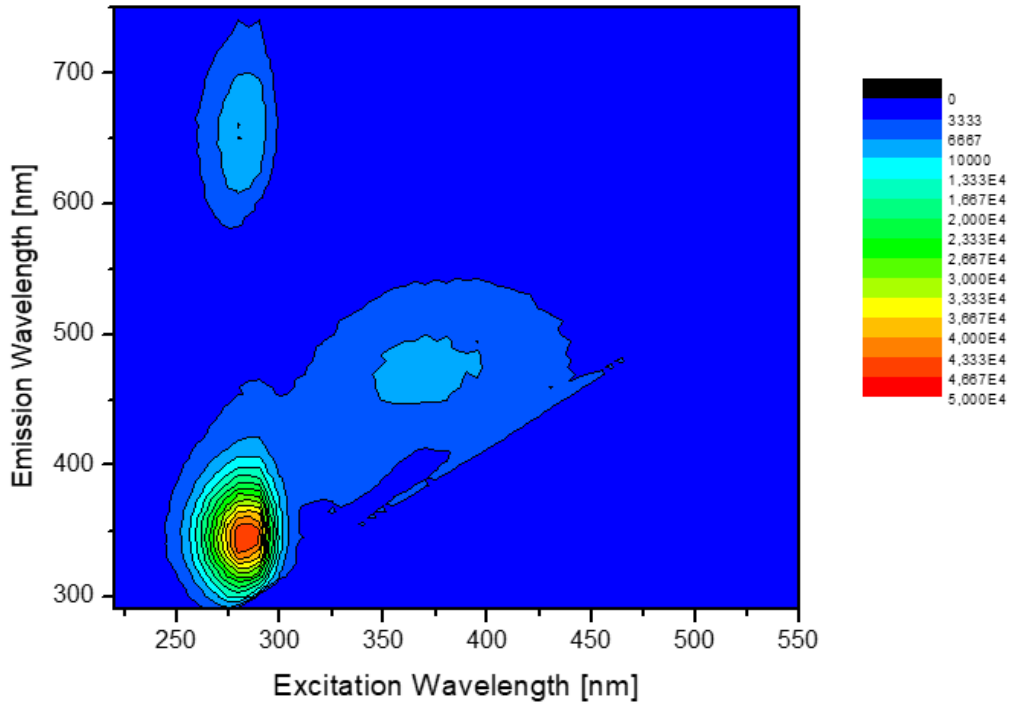
Εικόνα 6.2.7: Χάρτης φθορισμού υπερήλικων σαλιγκαριών

Τα ίδια δείγματα ξαναμετρήθηκαν και μετά από μία ημέρα προκειμένου να εξεταστεί και η χρονική επίδραση. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στις εικόνες 6.2.8 έως 6.2.10. Η εικόνα στα νεαρά σαλιγκάρια παρέμεινε η ίδια αλλά στα ενήλικα και υπερήλικα σαλιγκάρια παρατηρείται ότι η κορυφή στα 425/500 nm έχει εξασθενήσει σε μεγάλο βαθμό. Παρατηρείται επίσης ότι ένταση φθορισμού στην βλέννα από τα υπερήλικα σαλιγκάρια έχει πέσει αισθητά. Επομένως τα φθοροφόρα σε αυτό το δείγμα πιθανώς να οξειδώθηκαν κατά την επαφή τους με τον αέρα, δηλαδή η κορυφή στα 425/500 nm όπως καταγράφηκε νωρίτερα.

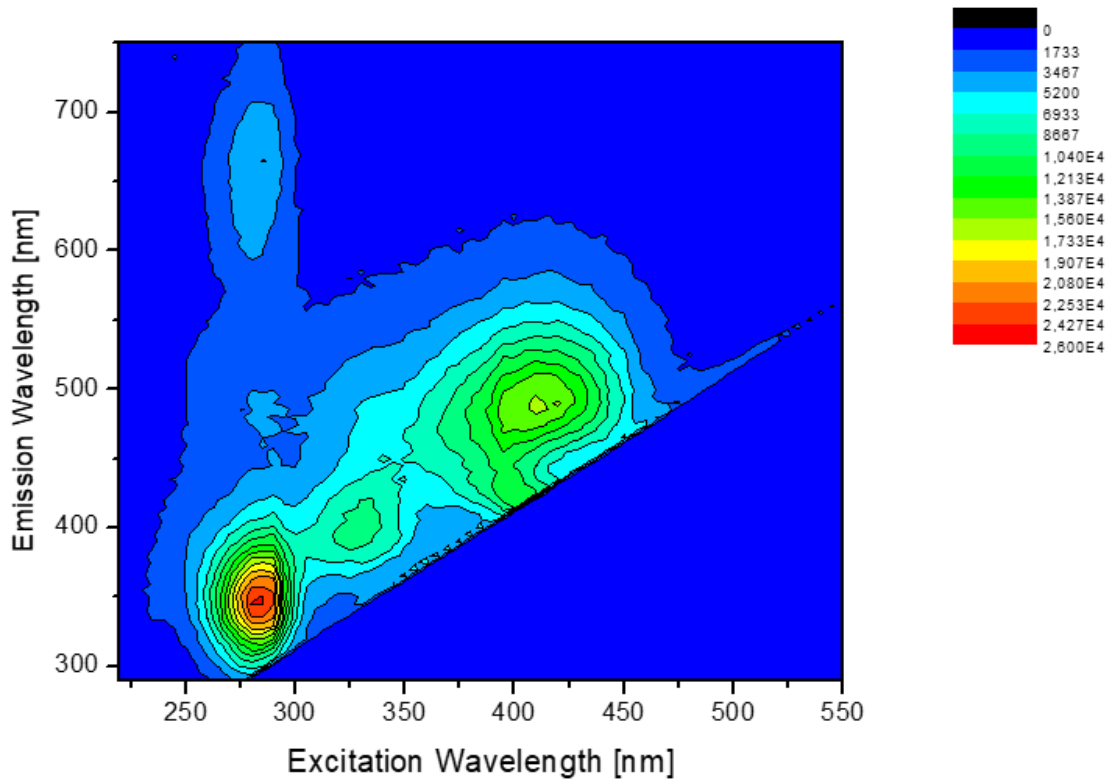


Εικόνα 6.2.8: Χάρτης φθορισμού νεαρών,  $t = 1 \text{ day}$





Εικόνα 6.2.9: Χάρτης φθορισμού ενήλικων,  $t=1 \text{ day}$



Εικόνα 6.2.10: Χάρτης φθορισμού υπεριώδικων,  $t=1 \text{ day}$

## Βιβλιογραφία

1. Gabriel, U. I., Mirela, S., & Ionel, J. (2011). Quantification of mucoproteins ( glycoproteins ) from snails mucus , *Helix aspersa* and *Helix Pomatia*, 17(4), 410–413.
2. El Mubarak Mohamed Ahmed «Ανάπτυξη Μεθοδολογίας για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αλλαντοΐνης και γλυκολικού οξέος φσε έκκριμμα σαλιγκαριού και καλλυντικές κρέμες», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 2012.
3. Young, E., & Godwin, J. (2019). Determination Of Nutrients / Organic Compounds In The Foot And Slime Of Land Snail ( *Achatina Achantina* ) *American Journal of Engineering Research ( AJER )*, (7), 27–31.
4. Gabriel, U. I., Mirela, S., & Ionel, J. (2011). Quantification of mucoproteins ( glycoproteins ) from snails mucus , *Helix aspersa* and *Helix Pomatia*, 17(4), 410–413.
5. Bonnemain, B. (2005). *Helix* and Drugs : Snails for Western Health Care From Application to CAM, 2(January), 25–28. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh057>
6. <https://patents.google.com/patent/US5538740A/en>
7. Sallam, A. A. A., & Nasr, I. N. (n.d.). Archives Of Phytopathology And Plant Protection Chemical analysis of mucus from certain land snails under Egyptian conditions, (January 2014), 37–41.
8. Ahmed, M., Mubarak, S. El, Lamari, F. N., & Kontoyannis, C. (2013). Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1322, 49–53.
9. Drezek, R., & Richards-kortum, R. (2001). Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra : Modeling , measurements , and implications, 6(4), 385–396.
10. Christensen J. et al. Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, *Chemical Reviews*, 2006,106

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη του γάλακτος, η φασματοσκοπία απορρόφησης έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την διάκριση των εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων βάσει λιποπεριεκτικότητας ενώ τα αποτελέσματα ήταν λιγότερο ικανοποιητικά για την διάκριση των δειγμάτων κατά την ζωική τους προέλευση. Επιπλέον, στην διάκριση των πρόβειων δειγμάτων κατά την γεωγραφική τους προέλευση έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στην διάκριση δειγμάτων από πεδινό και ορεινό κλίμα (Κεντρικό Ρέθυμνο και Λασιθί, αντίστοιχα). Η φασματοσκοπία ATR FT-IR έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την διάκριση των εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων κατά την λιποπεριεκτικότητά τους. Τα αποτελέσματα στην διάκριση κατά τη ζωική προέλευση ήταν ικανοποιητικά μόνο για τα πλήρη δείγματα. Η φασματοσκοπία φθορισμού έδειξε σχεδόν πλήρη διάκριση των εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων κατά την ζωική τους προέλευση ενώ και η σύνθετη διάκριση των δειγμάτων ως προς την λιποπεριεκτικότητα και την ζωική προέλευση έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα επίσης. Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας φθορισμού στα νωπά πρόβεια δείγματα έδειξε πολύ καλή διάκριση ανάμεσα στα δείγματα Λασιθίου και Κεντρικού Ρεθύμνου καθώς και μερική διάκριση των δειγμάτων από τα Αστερούσια. Τέλος η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης έδειξε πολύ ικανοποιητική πρόβλεψη για τις νοθείες του αγελαδινού γάλακτος με νερό, ενώ λιγότερο ικανοποιητική ήταν η πρόβλεψη για την νόθευση του αγελαδινού γάλακτος με κατσικίσιο γάλα. Συνολικά, οι τεχνικές αυτές σε συνδυασμό με την στατιστική, μπορούν να αποτελέσουν μια πολύ ικανή εναλλακτική των κλασικών αναλυτικών τεχνικών στην μελέτη του γάλακτος.

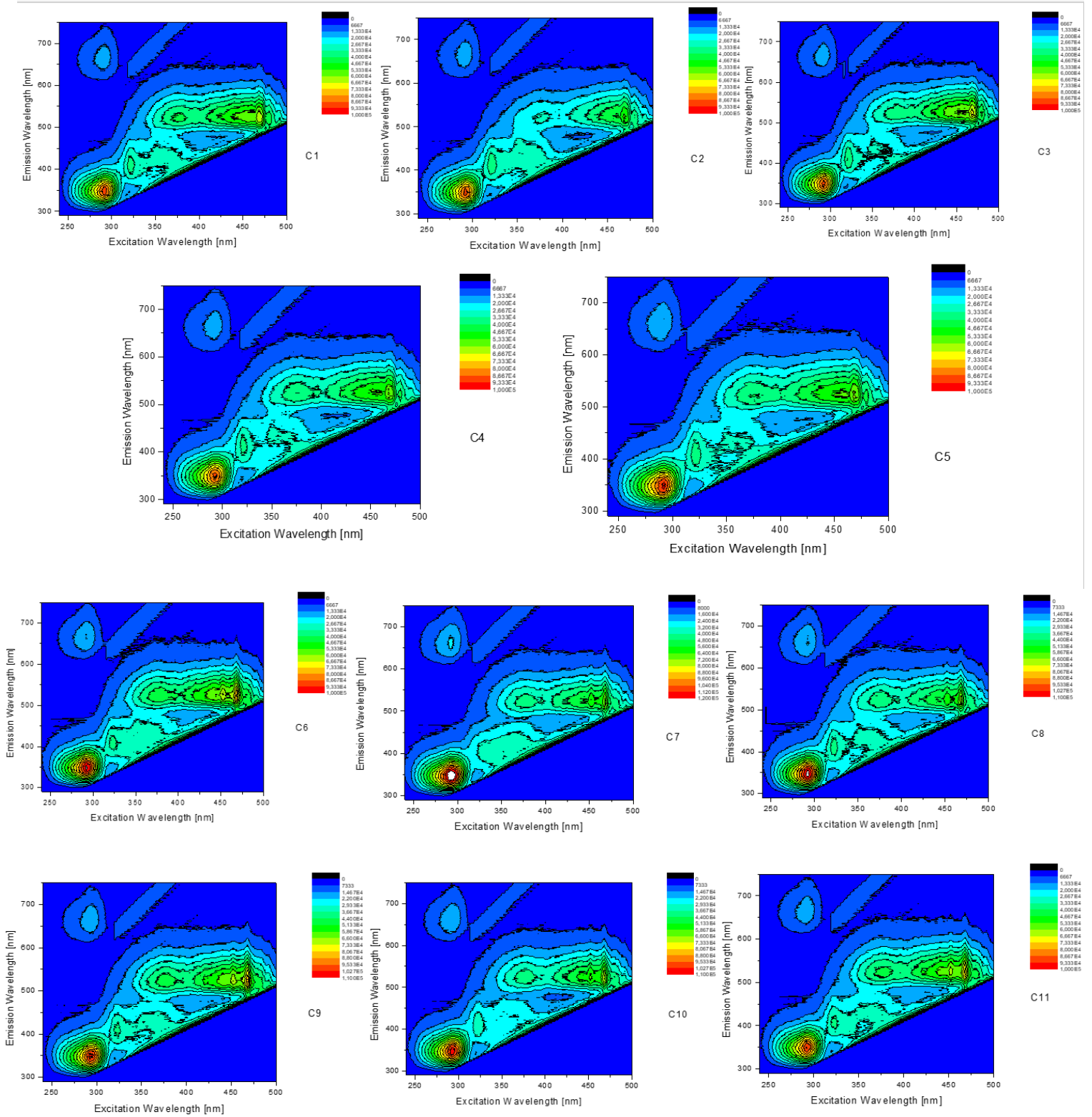
Στην μελέτη του εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου η φασματοσκοπία απορρόφησης έδειξε πάρα πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στα νοθευμένα με σπορέλαια δείγματα εξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου. Και στα 4 είδη σπορέλαιου (αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο, σογιέλαιο και πυρηνέλαιο) η καλύτερη φασματοσκοπική περιοχή υπήρξε η περιοχή στα 400-800 nm καθώς και στα 800-1600 nm όπου έδωσε την καλύτερη προβλεπτική ικανότητα ενώ τα λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε η περιοχή 1800-2200 nm. Στην μελέτη ποικιλιακών μίξεων και μίξεων ελαιολάδου ίδιας ποικιλίας και διαφορετικών περιοχών, η φασματοσκοπία απορρόφησης έδειξε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα για την περιοχή 400-800 nm. Επιπροσθέτως, στις ποικιλιακές μίξεις έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα και η μέτρηση στα 800-1600 nm ενώ στις μίξεις περιοχών ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα και η μέτρηση στα 260-410 nm. Η μέτρηση στα 1800-2200 nm δεν έδωσε καθόλου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η φασματοσκοπία σκέδασης Raman έδωσε μικτά αποτελέσματα. Από τις μίξεις περιοχών, τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξε η διάκριση Πελοποννήσου- Λέσβου ενώ από τις ποικιλιακές μίξεις τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξε η μίξη Κορωνέικης-Αδραμυτιανής ποικιλίας. Λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσαν επίσης οι μίξεις Πελοποννήσου-Κρήτης και Κορωνέικης-Κολοβής, μίξη περιοχών και ποικιλιών,

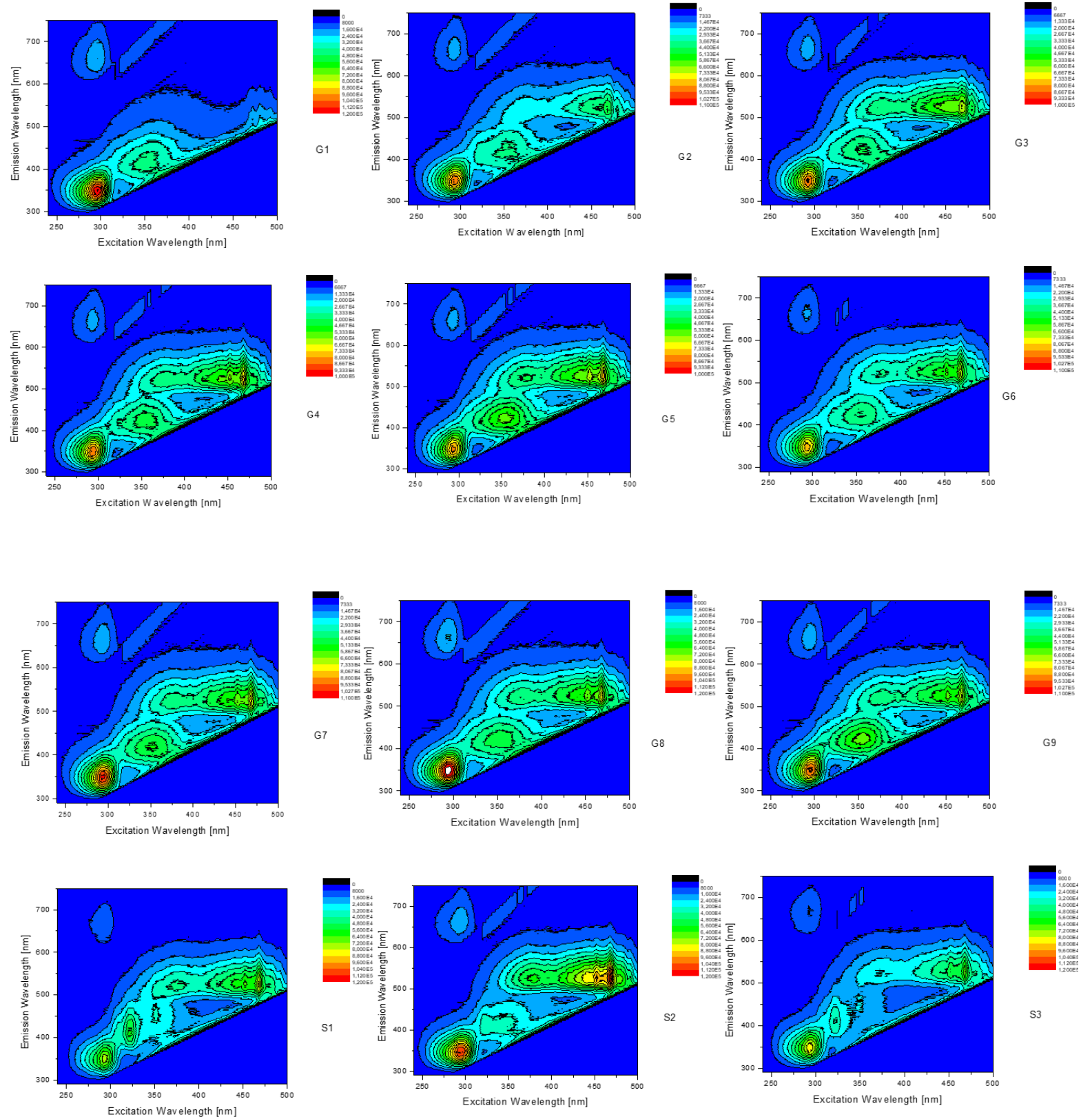
αντίστοιχα. Στο σύνολό τους, τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας απορρόφησης είναι συγκριτικά ανώτερα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας Raman για την ανάλυση αυτή. Οι ουσίες που φαίνονται να διαφοροποιούνται από την διαφορετική γεωγραφική και βοτανική προέλευση δεν εντοπίζονται με την φασματοσκοπία Raman ενώ εντοπίζονται με την φασματοσκοπία απορρόφησης. Η φασματοσκοπία απορρόφησης λοιπόν κρίνεται ως μια πολύ ικανή εναλλακτική των κλασικών αναλυτικών τεχνικών τόσο στην ανίχνευση νοθείας καθώς εμφανίζει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, όσο και στην μελέτη της βοτανικής αλλά και γεωγραφικής προέλευσης στο ελαιόλαδο. Σε ένα τρόφιμο που στην χώρα μας γνωρίζει τόσο σημαντική παραγωγή και εξαγωγή, οι παραπάνω εφαρμογές κρίνεται ως πολύ σημαντικές.

Στην μελέτη της βλέννας του σαλιγκαριού εξήχθησαν κάποια πολύ βασικά συμπεράσματα όσον αφορά την χημική σύσταση της βλέννας, την εξάρτηση της χημικής σύστασης από την ηλικία του σαλιγκαριού και την χρονική εξάρτηση αυτής, συμπεράσματα τα οποία δείχνουν την δυναμική της φασματοσκοπίας φθορισμού στην ανάλυση αυτού του προϊόντος βιολογικής προέλευσης. Δεδομένου του ενδιαφέροντος για καλλυντικά με βάση αυτό το υλικό, η φασματοσκοπία φθορισμού θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο παρέχοντας γρήγορα αποτελέσματα και κρατώντας το κόστος χαμηλό.

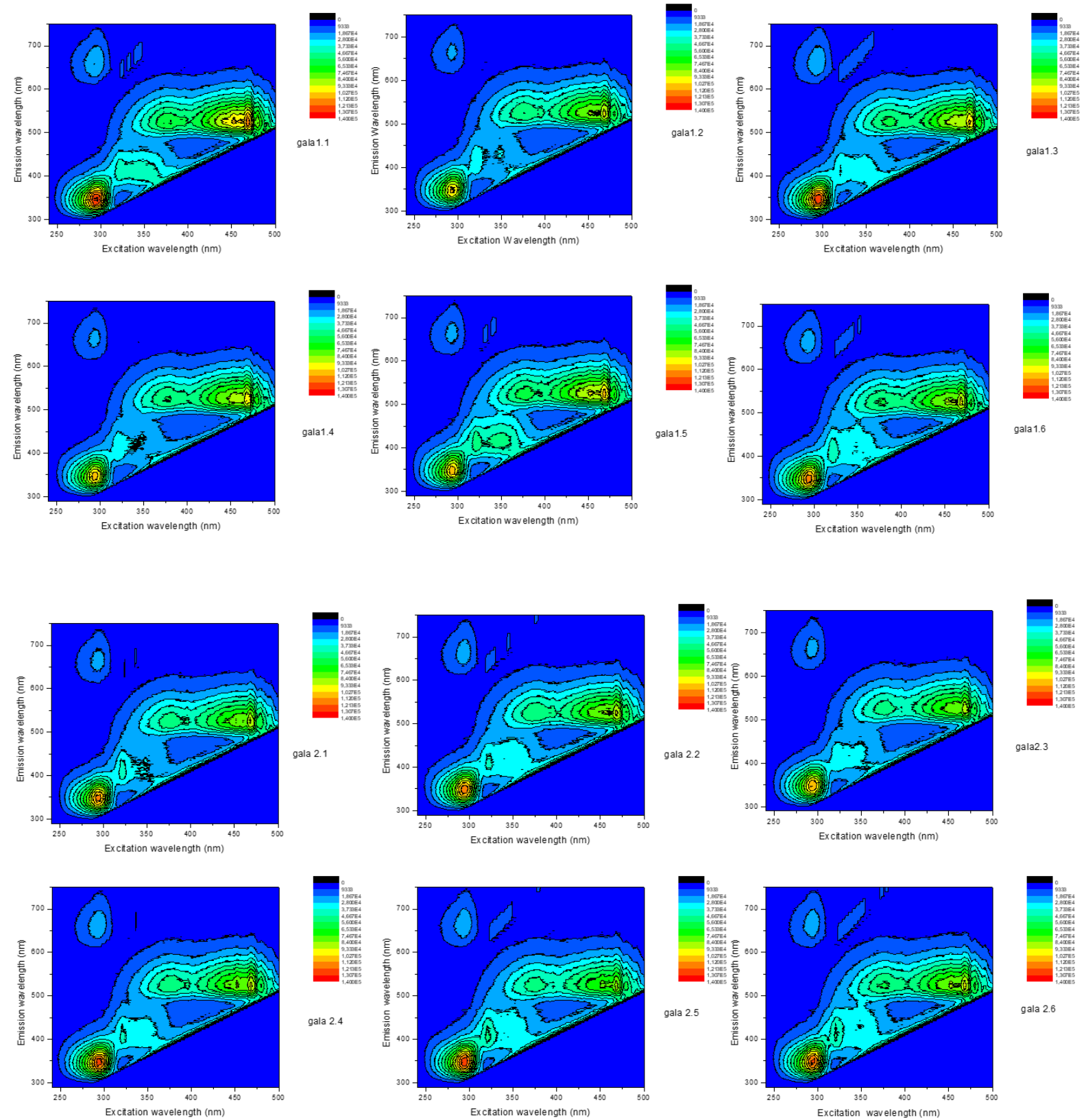
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

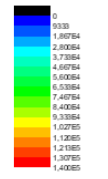
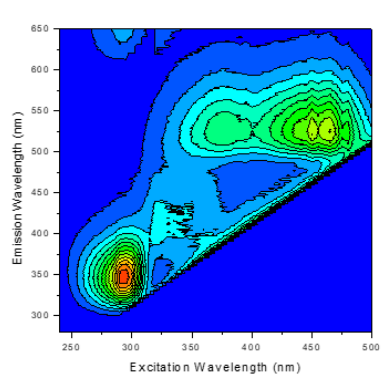
## Χάρτες φθορισμού εμπορικά διαθέσιμων δειγμάτων γάλακτος



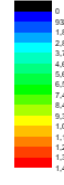
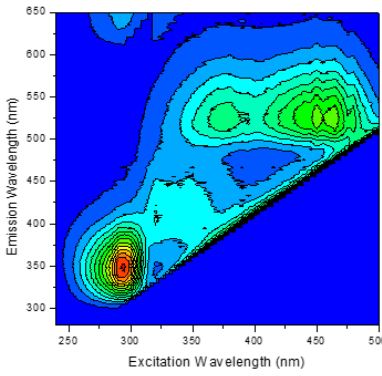


## Χάρτες φθορισμού δειγμάτων νωπού πρόβειου γάλακτος-1<sup>η</sup> σειρά

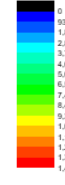
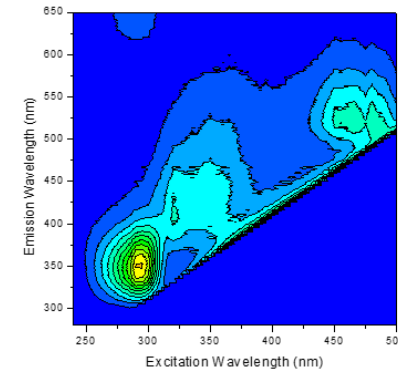




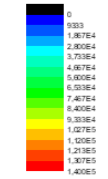
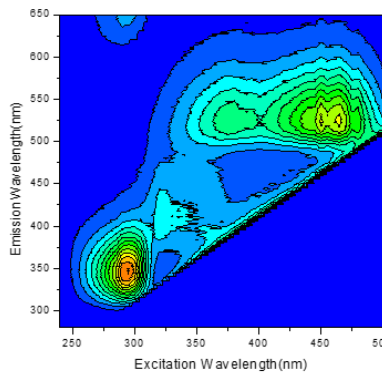
Milk 3.1  
Front Face 35°  
Slit Exc 1 nm  
Em 1 nm  
53 scans



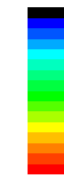
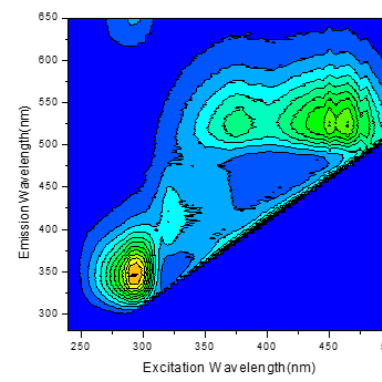
Milk 3.2  
Front Face 35°  
Slit Exc 1 nm  
Em 1 nm  
53 scans



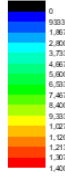
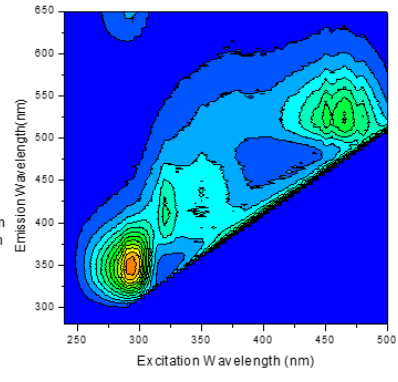
Milk 3.3  
F.F. 35°  
Slit Exc 1 nm  
Em 1 nm  
53 scans



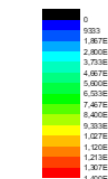
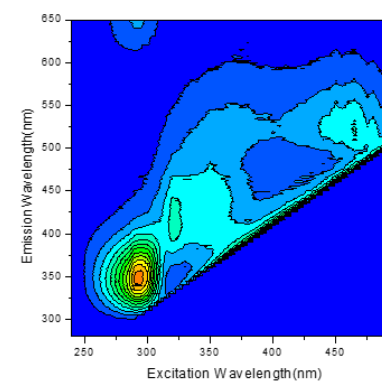
Milk 3.4  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



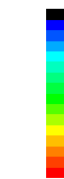
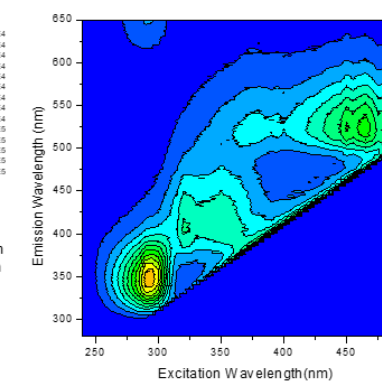
Milk 3.5  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



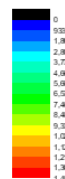
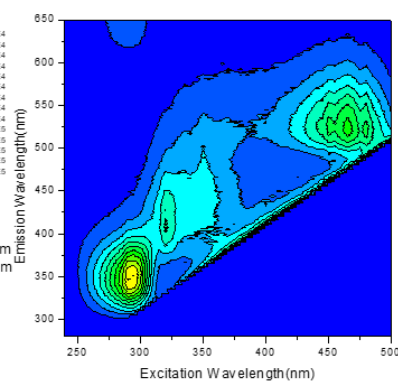
Milk 3.6  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



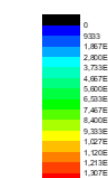
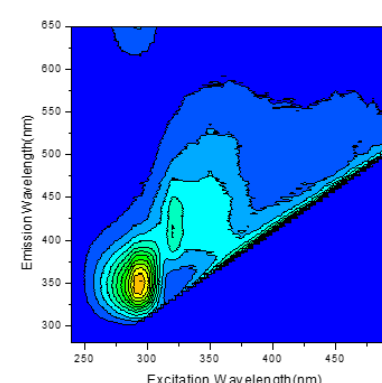
Milk 4.1  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



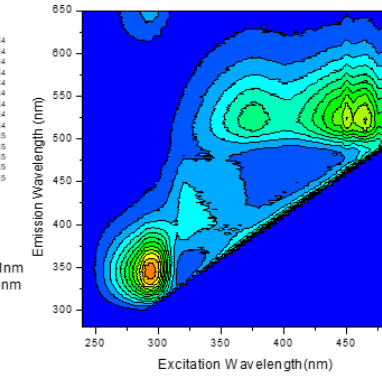
Milk 4.2  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



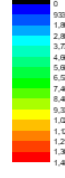
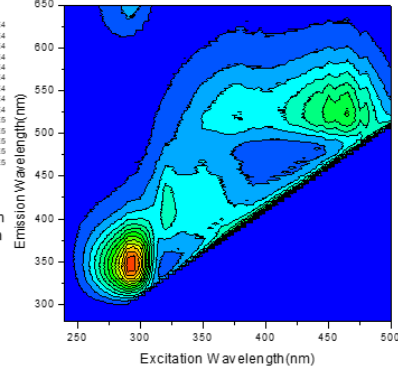
Milk 4.3  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



Milk 4.4  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



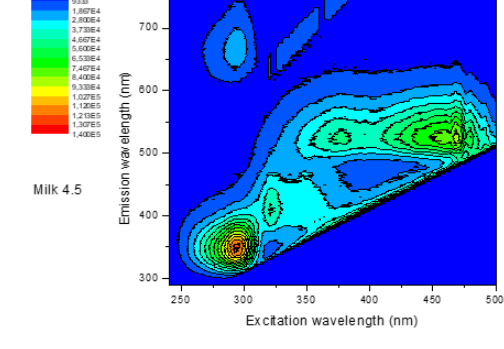
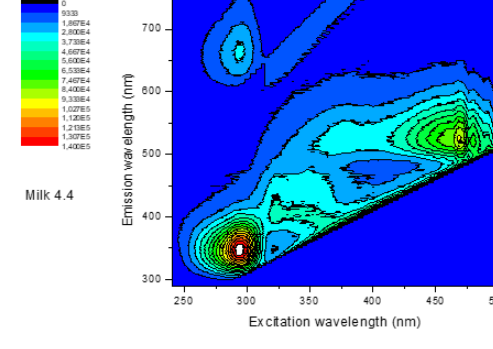
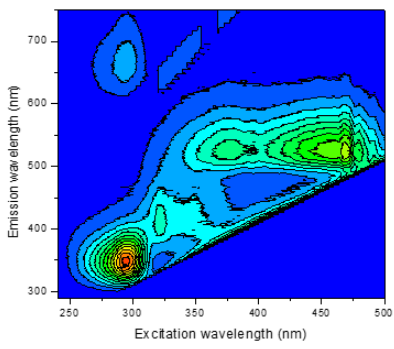
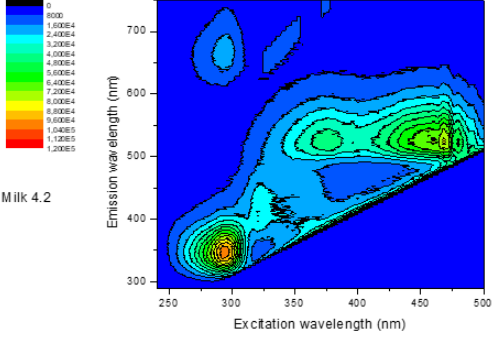
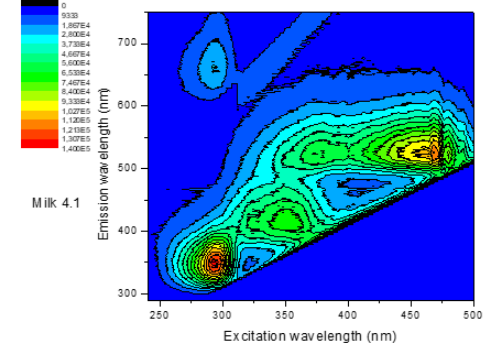
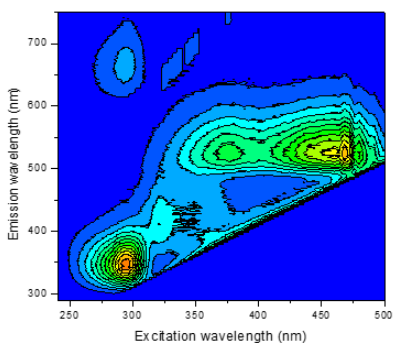
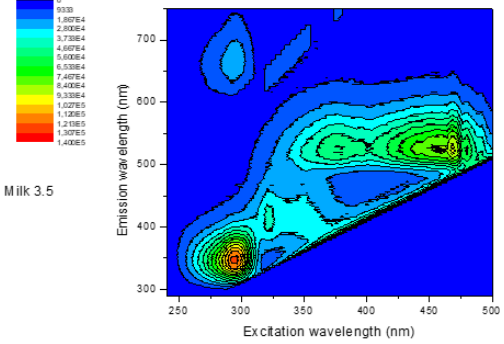
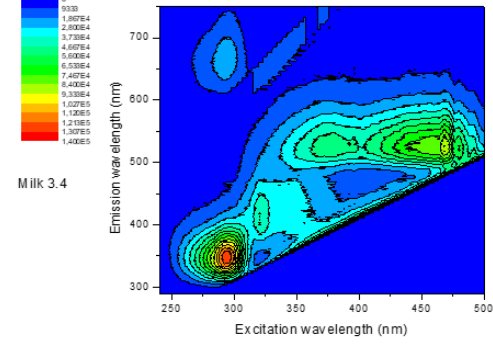
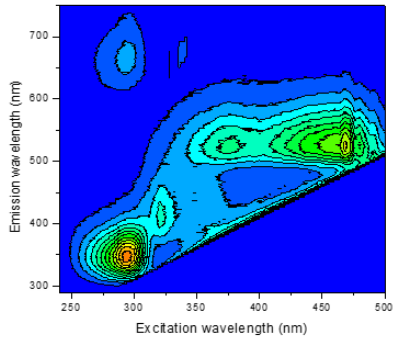
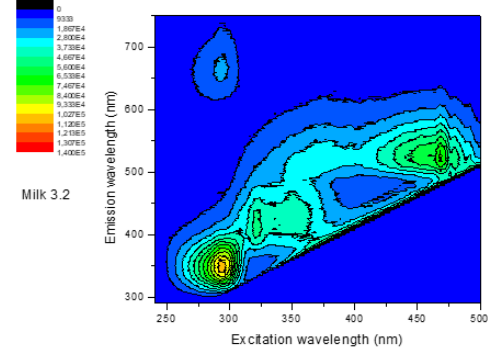
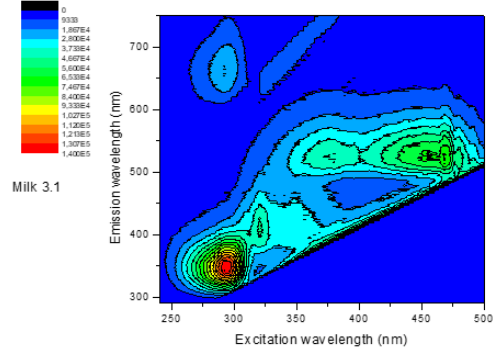
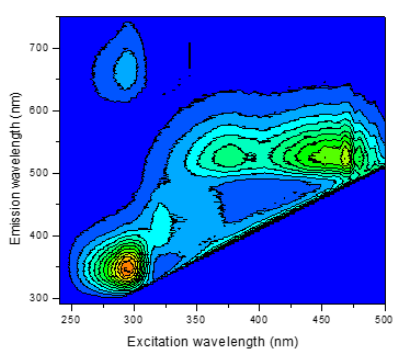
Milk 4.5  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm



Milk 4.6  
53 scans  
Slits Exc 1 nm  
Em 1 nm







## Χάρτες φθορισμού δειγμάτων νωπού πρόβειου γάλακτος-3<sup>η</sup> σειρά

